

THÈSE

UNIVERSITE DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR
École doctorale des sciences exactes et de leurs applications

Présentée et soutenue le 14 juin 2019

par **Mathieu Martinez**

pour obtenir le grade de docteur
de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour
Spécialité : Chimie Analytique et Environnement

SPÉCIATION ET ISOTOPIE DU SOUFRE INORGANIQUE EN MILIEU AQUEUX

CO-DIRECTRICES DE THÈSE

Isabelle Le Hécho, Maître de conférence / Université de Pau et des Pays de l'Adour

Corinne Parat, Ingénieur de recherche / Université de Pau et des Pays de l'Adour

RAPPORTEURS

Mathieu Sébilo, Maître de conférence / Sorbonne Université

Romain Millot, Directeur de recherche / BRGM

EXAMINATEURS

Olivier Donard, Directeur de recherche / CNRS, IPREM

Florence Pannier, Professeur / Université de Pau et des Pays de l'Adour

José Ignacio García Alonso, Professeur / Université d'Oviedo



Résumé

Le soufre existe dans l'hydrosphère dans des états d'oxydation allant des sulfates (+VI) aux sulfures (-II) et incluant de nombreuses espèces à des états d'oxydation intermédiaires, telles que le soufre élémentaire (0), les thiosulfates (-I, V) et les sulfites (IV). Ces espèces en particulier sont considérées comme des intermédiaires importants dans les réactions biologiques et abiotiques qui transforment (oxydent, réduisent ou dismutent) le soufre et sont fréquemment couplées aux cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote, de l'oxygène et du fer.

Les processus du cycle du soufre sont étudiés en mesurant les concentrations des différentes espèces contenant du soufre (analyse de spéciation) et en mesurant leur rapport isotopique respectif (analyse isotopique). Des difficultés analytiques sont fréquemment rencontrées, car les espèces soufrées, notamment celles de valence intermédiaire, sont présentes en faibles concentrations et sont difficiles à isoler. Ainsi, les rapports isotopiques des espèces de valence intermédiaire sont rarement déterminés. Les études des processus du cycle du soufre gagneraient grandement à l'amélioration des méthodes de mesure des rapports isotopiques des espèces de soufre inorganiques, en particulier des espèces intermédiaires les moins abondantes.

Dans ce contexte, ce travail de thèse s'est consacré à l'élaboration de stratégies analytiques combinant spéciation et isotopie du soufre, afin de réaliser la mesure des rapports isotopiques du soufre de plusieurs espèces inorganiques présentes simultanément dans des échantillons liquides. Une méthode de spéciation permettant de quantifier les sulfites, les sulfates et les thiosulfates par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse à plasma à couplage inductif haute résolution (LC-HR-ICP-MS) a tout d'abord été mise en place. Ensuite, une approche hors-ligne a été développée pour l'analyse isotopique des sulfures, des sulfates et des thiosulfates. Elle consiste en une préparation d'échantillon par précipitation séquentielle des espèces soufrées, suivie de leur analyse par analyseur élémentaire couplé à un spectromètre de masse à rapport isotopique (EA-IRMS). Cette méthode permet de déterminer les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfures, des sulfates et des thiosulfates avec des incertitudes de mesure inférieures à 0,5 ‰ pour des échantillons d'eau contenant au moins 27 μg de soufre. Cette méthode a été appliquée à l'étude d'eaux de source et d'eaux d'un aquifère profond et au suivi du fractionnement isotopique du soufre dans une culture de bactéries sulfato-réductrices.

Un couplage entre séparation anionique et détection par spectromètre de masse à plasma à couplage inductif multicollecteur (LC-MC-ICP-MS) a été mis au point pour la détermination en ligne des valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfites, des sulfates et des thiosulfates. Cette méthode nous a permis de déterminer $\delta^{34}\text{S}$ des sulfites, des sulfates et des thiosulfates pour des échantillons d'eau contenant 1 μg de soufre par espèce avec des incertitudes de mesure inférieures à 0,6 ‰.

Mots clés : Soufre, Spéciation, Isotopie, Eau, Cycle Biogéochimique, Bactéries Sulfato-réductrices.

Abstract

Sulfur is present in the hydrosphere at oxidation states ranging from sulfate (+VI) to sulfide (-II) and including many species at intermediate oxidation states, such as elemental sulfur (0), thiosulfate (-I, V) and sulfite (IV). These species in particular are considered as important intermediates in biological and abiotic reactions (oxidation, reduction or disproportionation) involving sulfur and are frequently coupled to the biogeochemical cycles of carbon, nitrogen, oxygen and iron.

Sulfur cycle processes are studied by measuring the concentrations of different species containing sulfur (speciation analysis) and by measuring their respective isotope ratios (isotopic analysis). Analytical difficulties are frequently encountered because sulfur species, especially intermediate valence species, are present in low concentrations and are difficult to isolate. Thus, the isotope ratios of intermediate valence compounds are rarely determined. Methods for measuring isotope ratios of inorganic sulfur species, particularly the least abundant intermediate species, would be a great assistance in deciphering sulfur cycle processes.

In this context, this thesis work was devoted to the development of analytical strategies combining speciation and isotopic analysis of sulfur, in order to measure sulfur isotope ratios of several inorganic species that can be simultaneously present in liquid samples. First, a speciation method for quantifying sulfite, sulfate and thiosulfate by liquid chromatography coupled to high resolution inductively coupled plasma mass spectrometer (LC-HR-ICP-MS) was set up. Then, an off-line approach was developed for the isotopic analysis of sulfide, sulfate and thiosulfate. It consisted of a sample preparation by sequential precipitation of the sulfur species, followed by elemental analyzer coupled to isotope ratio mass spectrometer (EA-IRMS) analysis. This method made it possible to determine the $\delta^{34}\text{S}$ values of sulfide, sulfate and thiosulfate with measurement uncertainties below 0.5 ‰ for water samples containing at least 27 μg of sulfur. This method has been applied to the study of spring waters and deep aquifer waters and the monitoring of isotopic fractionation of sulfur in a culture of sulfate-reducing bacteria.

Moreover, an on-line analytical method coupling anionic separation and detection by multicollector inductively coupled plasma mass spectrometer (LC-MC-ICP-MS) has been developed for the determination of $\delta^{34}\text{S}$ values of sulfite, sulfate and thiosulfate. This method allowed us to determine $\delta^{34}\text{S}$ of sulfite, sulfate and thiosulfate for water samples containing as little as 1 μg of sulfur per species with measurement uncertainties below 0.6 ‰.

Key words: Sulfur, Speciation, Isotope analysis, Water, Biogeochemical Cycle, Sulfate-reducing bacteria.

Remerciements

Ce manuscrit de thèse est le fruit d'une longue aventure au cours de laquelle de nombreuses personnes m'ont accompagné et m'ont permis d'avancer. Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé et soutenu.

Je voudrais tout d'abord remercier mes directrices de thèse Isabelle Le Hécho et Corinne Parat pour la confiance et la liberté que vous m'avez accordées. Isabelle je te remercie pour ton optimisme à toute épreuve, tous les conseils et remarques qui m'ont permis de surmonter les obstacles et la motivation que tu m'as insufflée tout au long de la thèse. Ta vision des choses et ton recul vis-à-vis du sujet m'ont toujours aidé à y voir clair et m'ont permis d'aller plus loin. Corinne je te remercie pour ta disponibilité, le temps passé avec moi au labo et tes conseils techniques. Je te remercie également pour tous nos échanges, ta rigueur et tes critiques qui ont permis l'aboutissement de ce travail. Enfin, je vous remercie pour tout le soutien que vous m'avez apporté et la patience dont vous avez su faire preuve, notamment pendant la période de rédaction.

Je remercie les rapporteurs de cette thèse, Romain Millot et Mathieu Sébilo pour le vif intérêt qu'ils ont porté à mon travail et le temps qu'ils ont consacré à l'évaluer et le commenter. J'associe à ces remerciements Florence Pannier, Olivier Donard et José Ignacio García Alonso pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je souhaite remercier toutes les personnes du laboratoire IPREM qui ont rendu ce travail possible. Merci Laura Alonso pour m'avoir initié aux analyses IRMS, pour le temps passé ensemble au labo et nos échanges en frangnol. Je remercie Carine Arnaudguilhem pour toute l'aide apportée avec l'ICP-HR-MS. Mes remerciements vont également à Anthony Ranchou-Peyruse et Marion Guignard qui m'ont ouvert les portes de leur laboratoire de microbiologie et ont réalisé les cultures de bactéries sulfato-réductrices. Un grand merci à Marie Larregieu pour tout le temps passé à précipiter et analyser des échantillons. J'ai eu la chance d'encadrer un étudiant de master avec qui j'ai beaucoup apprécié travailler, je remercie Carlos López pour le travail considérable qu'il a fourni. Je remercie également le personnel administratif Géraldine et Mickael sur qui j'ai toujours pu compter.

J'aimerais remercier mes collègues de l'IPREM qui m'ont permis de travailler dans une ambiance conviviale et avec qui j'ai partagé des bons moments au laboratoire et en dehors : Marine, Manue, Maxime, Dimitri, Bastien, Robin, Marina, Sara, Andy, Wahid, Izabela, Laurent, Gelito, Alexandr, Elias, Jordan...

Une partie de ce travail s'est déroulé à l'université d'Oviedo, je souhaite remercier toute les personnes qui m'ont accueilli et aidé durant mon séjour. Muchas gracias a Nacho García y Jorge Ruiz por acogerme con tanta alegría. Muchas gracias Nacho por introducirme al mundo del MC-ICP-MS y Jorge por ayudarme con la cromatografía (¡y por las cañas en Huelva!). También agradezco a Laura, Amanda y Bea por acogerme en su laboratorio, las comidas y las rizas compartidas. ¡No olvidáis de comer calabazas!

J'ai eu la chance d'avoir à mes côtés des personnes exceptionnelles qui m'ont permis de passer trois années géniales à Pau. Un grand merci à Marine, Manue et Maxime pour tous ces bons moments partagés, pour tous les repas, rires, randonnées, soirées ensemble et autres sorties. Je remercie également les deux joyeux lurons Bastien et Robin pour leur bonne humeur ! Nico et Tony je vous remercie pour toutes les sessions d'escalade et autres bons moments que nous avons partagés ! Je remercie également toute l'équipe des moniteurs de ski de l'université avec qui j'ai pris plaisir sur la neige et en dehors (on est pas tout seul !). Un merci particulier à Arnaud pour les sessions de ski, surf et wake ! Muchas gracias a los locos de Pau: Clément, Marina, Sara, Diego, Jesús, Iris, Izar, Aralar, Andy, Javi y Amaia, por los picnics en Beaumont o en la Gave, las cloxardres, los miércoles cinéfilos, los debates, las fiestas y por tanto cariño. Es increíble la energía de ese grupo y las muy buenas aventuras que hemos vivido.

Je remercie également tous mes amis de la côte Basque pour m'aider à déconnecter et pour tous ces fous rires. J'adresse tous mes remerciements à ma famille pour le soutien inconditionnel et leurs encouragements. Si j'en suis là c'est grâce à vous !

Enfin un immense merci à toi Manue, pour tes encouragements et tout ce que tu m'apportes au quotidien. Merci pour la patience dont tu as fait preuve face à mon irritabilité pendant les derniers mois, sans toi, je n'aurais pas eu l'endurance nécessaire pour terminer cette thèse.

Sommaire

| | |
|--|------------|
| Résumé | 3 |
| Abstract | 4 |
| Remerciements | 5 |
| Sommaire | 7 |
| Liste des figures | 9 |
| Liste des tableaux | 12 |
| Glossaire | 14 |
| INTRODUCTION GÉNÉRALE | 15 |
| CHAPITRE 1 – État de l’art | 18 |
| 1. Biogéochimie du soufre | 20 |
| 1.1. Généralités | 20 |
| 1.2. Le cycle du soufre dans l’hydrosphère | 23 |
| 2. Apport de l’isotopie pour la compréhension du cycle biogéochimique du soufre | 32 |
| 2.1. Isotopie du soufre : Généralités | 33 |
| 2.2. Détermination des sources de sulfates dans un réservoir | 37 |
| 2.3. Le fractionnement isotopique du soufre au cours des processus physico-chimiques et biologiques | 37 |
| 2.4. Le fractionnement isotopique et la spéciation : Outils d’identification des processus physico-chimiques et biologiques dans l’environnement | 49 |
| 3. Stratégies d’analyses isotopiques | 52 |
| 3.1. Analyse par spectromètre de masse à rapport isotopique (IRMS) | 54 |
| 3.2. Analyse par spectromètre de masse à plasma à couplage inductif multicollecteur (MC-ICP-MS) | 67 |
| 3.3. Autres techniques | 101 |
| 4. Objectifs et démarche de ce travail | 103 |

CHAPITRE 2 – Spéciation et analyses isotopiques du soufre : approche hors-ligne... 106

| | |
|---|------------|
| 1. Introduction | 108 |
| 2. Matériels et méthodes..... | 110 |
| 2.1. Réactifs | 110 |
| 2.2. Solutions étalons et matériaux de référence | 110 |
| 2.3. Préparation d'échantillon pour les analyses isotopiques | 112 |
| 2.4. Méthodes d'analyse | 114 |
| 2.5. Traitement des données | 117 |
| 2.6. Échantillons | 117 |
| 3. Résultats et discussion..... | 120 |
| 3.1. Analyses de spéciation par LC-HR-ICP-MS : Optimisation de la séparation..... | 120 |
| 3.2. Analyses isotopiques par EA-IRMS..... | 131 |
| 3.3. Analyses d'échantillons réels | 158 |
| 4. Conclusion du chapitre | 173 |

CHAPITRE 3 – Mesure de rapport isotopique du soufre par espèce :

Couplage chromatographie liquide - ICP-MS multicollecteur 176

| | |
|--|------------|
| 1. Introduction | 178 |
| 2. Analyse des sulfates et thiosulfates | 180 |
| 2.1. Matériels et méthodes..... | 180 |
| 2.2. Résultats et discussion..... | 188 |
| 2.3. Conclusion de la partie 1 | 200 |
| 3. Anion Specific Sulfur Isotope Analysis by Liquid Chromatography Coupled to Multicollector-ICPMS..... | 201 |
| Experimental section | 204 |
| Results and discussion..... | 205 |
| Conclusions | 210 |
| 4. Conclusion du chapitre | 217 |

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 219

Bibliographie..... 231

Annexes 249

Liste des figures

| | |
|--|-----|
| Figure 1-1 : Cycle du soufre simplifié dans les environnements aquatiques | 24 |
| Figure 1-2 : Mécanisme simplifié de la sulfato-réduction assimilatrice (SRA) | 25 |
| Figure 1-3 : La SRB selon le modèle de Rees (1973) | 27 |
| Figure 1-4 : La SRB selon la voie du trithionate (Brunner and Bernasconi, 2005; Kobayashi et al., 1969)..... | 28 |
| Figure 1-5 : Modèle révisé de la SRB selon Bradley et al. (2011)..... | 29 |
| Figure 1-6 : Modèle de distillation de Rayleigh pour la réduction des sulfates en sulfures dans un système fermé..... | 36 |
| Figure 1-7 : Fractionnement isotopique entre les sulfures et les sulfates obtenus pour des échantillons environnementaux et des cultures pures de 44 bactéries sulfato-réductrices | 39 |
| Figure 1-8 : Organigramme résumant les techniques d'analyse isotopique du soufre..... | 53 |
| Figure 1-9 : Schéma de l'IRMS. | 54 |
| Figure 1-10 : Organigramme résumant les procédures analytiques pour la précipitation sélective de diverses espèces inorganiques du soufre provenant d'échantillons d'eau pour une analyse isotopique ultérieure par IRMS. | 56 |
| Figure 1-11 : Schéma général du couplage EA-IRMS adapté de Thermo Scientific | 64 |
| Figure 1-12 : Analyse de 450 µg de BaSO ₄ par EA-IRMS | 65 |
| Figure 1-13 : Schéma général du MC-ICP-MS (exemple du Neptune Plus, Thermo Scientific)..... | 68 |
| Figure 1-14: Balayage en masse pour le MC-ICP-MS Neptune en mode moyenne résolution adapté de Clough et al. (2006)..... | 70 |
| Figure 2-1 : Analyse LC-HR-ICPMS avec une phase mobile d'EDTA à 2 mmol/L et pH = 9,9..... | 121 |
| Figure 2-2 : Analyse LC-HR-ICP-MS de 1 µg-S/g de sulfites, sulfates et thiosulfates. Elution isocratique avec 60 mmol/L de NH ₄ NO ₃ et 0,1 % de formaldéhyde à pH 7..... | 122 |
| Figure 2-3 : Analyse LC-HR-ICP-MS d'un blanc (phase mobile). Elution isocratique avec 60 mmol/L de NH ₄ NO ₃ et 0,1 % de formaldéhyde à pH 7. Présence d'une contamination en sulfates. | 123 |
| Figure 2-4 : Analyse LC-HR-ICP-MS de 50 ng-S/g de sulfures et 50 ng-S/g de sulfates. Éluion avec 60 mmol/L de NH ₄ NO ₃ et 0,1 % de formaldéhyde à pH 7..... | 124 |
| Figure 2-5 : Analyses LC-HR-ICP-MS de A) 25 ng-S/g de sulfures et 25 ng-S/g de sulfates. Éluion isocratique avec 60 mmol/L de NH ₄ NO ₃ et 0,1 % de formaldéhyde à pH 11. B) 100 ng-S/g de sulfites, sulfates et thiosulfates et 224 ng-S/g de sulfures. Éluion avec un gradient de 42 à 60 mmol/L de NH ₄ NO ₃ et 0,1 % de formaldéhyde à pH 11 (0-3 min : 42 à 60 mmol/L, 7-20 min : 60 mmol/L). C) 100 ng-S/g de sulfites, sulfates et thiosulfates et 224 ng-S/g de sulfures. Éluion avec un gradient de 42 à 60 mmol/L de NH ₄ NO ₃ et 0,1 % de formaldéhyde à pH 11 (0-3 min : 42 mmol/L, 3-7 min : 42→60 mmol/L, 7-20 min : 60 mmol/L)..... | 125 |
| Figure 2-6 : Analyses successives d'un étalon de sulfures à 200 ng-S/g..... | 127 |
| Figure 2-7 : Droites d'étalonnage LC-HR-ICP-MS réalisées avec des solutions étalons de sulfites, sulfates et thiosulfates entre 25 ng-S/g et 500 ng-S/g préparées dans la phase mobile à 60 mmol/L de NH ₄ NO ₃ et 0,1 % de formaldéhyde à pH 7. | 128 |

| | |
|--|-----|
| Figure 2-8 : Analyse LC-HR-ICP-MS de d'une solution étalon 1 µg-S/g de sulfites préparée dans la phase mobile, analysée immédiatement après sa préparation et 24 h après, présence d'un deuxième pic de HMS. | 129 |
| Figure 2-9 : Test de stabilité des sulfites dérivés en HMS à 1 µg-S/g dans 60 mmol/L NH ₄ NO ₃ et 0,1 % de formaldéhyde..... | 130 |
| Figure 2-10 : Variabilité du δ ³⁴ S des pulses de gaz de référence en fonction de leur intensité..... | 132 |
| Figure 2-11 : Droite d'étalonnage réalisée avec les matériaux de référence pour la normalisation du δ ³⁴ S sur l'échelle V-CDT | 133 |
| Figure 2-12 : Cartes de contrôle des matériaux de référence internes. a) HTS ; b) S-Julen ; c) H ₃ NO ₃ S | 135 |
| Figure 2-13 : Procédures comparées pour la précipitation des sulfures en solution.. | 137 |
| Figure 2-14 : Voltampérométrie cyclique d'une solution de 20 mmol-S/L de Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O dans un tampon acétate à 1 mol/L (pH 5) (sans agitation). | 142 |
| Figure 2-15 : Chronoampérométrie d'une solution de 20 mmol-S/L de Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O dans un tampon acétate à 1 mol/L (pH 5) (sous agitation) à 1,2 V pendant 12 h puis à 1,65 V pendant 12 h. | 143 |
| Figure 2-16 : Voltampérométrie cyclique d'une solution de 20 mmol-S/L de Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O dans un tampon acétate à 1 mol/L (pH 5) (sans agitation). A : Après 12h d'électrolyse à 1,2 V. B : Après 12h d'électrolyse à 1,2 V et 12h à 1,65 V. | 143 |
| Figure 2-17 : Analyse LC-HR-ICP-MS d'une solution de Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O à 20 mmol-S/L dans du tampon acétate 1 mol/L (diluée 50 fois dans la phase mobile), A : Avant électrolyse, B : Après 12h à 1,2 V, C : Après 12h à 1,2 V et 12h à 1,65 V. L'intensité est en échelle logarithmique... .. | 145 |
| Figure 2-18 : Suivi cinétique de la chronoampérométrie d'une solution de 20 mmol-S/L de (NH ₄) ₂ S ₂ O ₃ dans un tampon acétate à 1 mol/L (pH 5) (sous agitation magnétique) à 1,2 V..... | 147 |
| Figure 2-19 : Corrélation entre le courant mesuré au cours de l'électrolyse et la concentration en thiosulfates et sulfates. | 147 |
| Figure 2-20 : Analyse LC-HR-ICP-MS d'une solution (20 mL) de (NH ₄) ₂ S ₂ O ₃ à 20 mmol-S/L immédiatement après l'ajout de 10 mL de ClO ⁻ à 400 mmol/L à température ambiante et d'une solution étalons à 1 µg-S/g de sulfites, sulfates et thiosulfates. L'intensité est en échelle logarithmique..... | 151 |
| Figure 2-21 : Analyse LC-HR-ICP-MS d'une solution (20 mL) de (NH ₄) ₂ S ₂ O ₃ à 20 mmol-S/L oxydée par 10 mL de ClO ⁻ à 400 mmol/L à température ambiante après 1 h et 2 h de réaction et d'une solution étalons à 1 µg-S/g de sulfites, sulfates et thiosulfates. L'intensité est en échelle logarithmique..... | 152 |
| Figure 2-23: Voltampérométrie cyclique (sans agitation) d'une solution de 20 mmol-S/L de thiosulfates et 2,5 mmol/L de BaCl ₂ et d'une solution de 20 mmol-S/L de thiosulfates et 5 mmol/L de NaCl..... | 155 |
| Figure 2-24 : Schéma général de la précipitation séquentielle des sulfures, des sulfates et des thiosulfates pour leur analyse en EA-IRMS. | 156 |
| Figure 2-25 : Valeurs de δ ³⁴ S déterminées au laboratoire pour la série d'eaux naturelles en fonction des valeurs de δ ³⁴ S déterminées par un autre laboratoire (Pichat et al., 2018) | 159 |
| Figure 2-26 : Organigramme de la préparation des échantillons et des analyses chimiques pour le suivi de la spéciation et de l'isotopie du soufre dans une culture de bactéries sulfato-réductrices | 163 |
| Figure 2-27 : Courbe d'étalonnage du nombre de cellule en fonction de la densité optique (Do) à 580 nm..... | 164 |
| Figure 2-28 : Suivi de la croissance bactérienne moyenne. | 164 |

| | |
|--|-----|
| Figure 2-29 : Suivi de la concentration en pyruvate et en acétate et du nombre de cellules par mL au cours de la croissance des bactéries..... | 165 |
| Figure 2-30 : Concentrations mesurées en sulfates, thiosulfates et sulfures au cours de la croissance des bactéries | 166 |
| Figure 2-31: Corrélation entre la différence de concentration en soufre total à l'instant t et à t = 0 avec la concentration en sulfures. | 167 |
| Figure 2-32 : Suivi de la concentration en sulfates, thiosulfates et sulfures et du nombre de cellule par mL au cours de la croissance des bactéries | 169 |
| Figure 2-33 : Fractionnement isotopique global des sulfates ($^{34}\epsilon_{\text{SO}_4}$) et sulfures-sulfates ($^{34}\epsilon_{\text{HS-SO}_4}$) en fonction de la quantité de sulfates consommés par la sulfato-réduction ($1-f_{\text{SO}_4}$). | 172 |
| Figure 3-1 : Configuration des cages de Faradays pour la mesure simultanée des rapports $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ et $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ sur le MC-ICP-MS Neptune Plus. | 182 |
| Figure 3-2 : Balayage en masse d'une solution à 5 $\mu\text{g/g}$ de S et 5 $\mu\text{g/g}$ de Si analysée par MC-ICP-MS en auto-aspiration en mode moyenne résolution | 183 |
| Figure 3-3 : Illustration du calcul des rapports isotopiques du silicium et du soufre par LRS | 184 |
| Figure 3-4 : Analyse LC-MC-ICP-MS de 5 $\mu\text{g-S/g}$ d'acide sulfamique, 5 $\mu\text{g-S/g}$ de sulfates et 5 $\mu\text{g-S/g}$ de thiosulfates dans la phase mobile de NH_4NO_3 à 60 mmol/L et Si à 10 $\mu\text{g/g}$ | 188 |
| Figure 3-5 : Analyse LC-MC-ICPMS d'une solution de Si à 6 $\mu\text{g/g}$ avec une phase mobile de 60 mmol/L NH_4NO_3 à pH 7 sans Si. | 190 |
| Figure 3-6 : Variation de l'incertitude de mesure (u_a) des rapports isotopiques $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ et $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ déterminés par LC-MC-ICP-MS pour une solution à 5 $\mu\text{g-S/g}$ d'acide sulfamique, 5 $\mu\text{g-S/g}$ de sulfates et 5 $\mu\text{g-S/g}$ de thiosulfates en fonction du nombre de points des pics chromatographiques utilisés pour le calcul par LRS..... | 192 |
| Figure 3-7 : Analyses LC-MC-ICP-MS et EA-IRMS de solutions de Na_2SO_4 et $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ et d'un échantillon d'eau de source diluée 250 fois de façon à avoir une concentration finale de 5 $\mu\text{g-S/g}$ | 194 |
| Figure 3-8 : Dérive du rapport $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ pour les pics d'acide sulfamique(A), des sulfates (B) et des thiosulfates (C) obtenus en LC-MC-ICP-MS ($[\text{S}] = 5 \mu\text{g/g}$)..... | 196 |
| Figure 3-9 : Contribution en % des incertitudes de mesure des rapports isotopiques $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ et $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ de l'étalon interne ($\text{H}_3\text{NO}_3\text{S}$) et de l'analyte (sulfates ou thiosulfates) et de l'écart-type du $\delta^{34}\text{S}$ de l'étalon interne à l'incertitude composée u_c . A : Solution d'acide sulfamique, de sulfates et de thiosulfates à 5 $\mu\text{g-S/g}$; B : Solution d'acide sulfamique, de sulfates et de thiosulfates à 1 $\mu\text{g-S/g}$ | 198 |

Liste des tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 1-1 : Masse de soufre et espèces majeures dans les différents réservoirs (Schoonen, 2018) . . . 21 | 21 |
| Tableau 1-2 : Abondance et masse des isotopes stables du soufre (Coplen et al., 2002)..... 33 | 33 |
| Tableau 1-3 : Fractionnements isotopiques du soufre lors de l'oxydation des sulfures, des sulfites, des thiosulfates et du soufre élémentaire lors d'expériences en laboratoire 47 | 47 |
| Tableau 1-4 : Fractionnements isotopiques du soufre lors de la dismutation des sulfites, des thiosulfates et du soufre élémentaire lors d'expériences en laboratoire avec différentes souches pures ou cultures d'enrichissement d'eaux douces et marines 48 | 48 |
| Tableau 1-5 : Interférences des isotopes du soufre, adapté de Craddock et al. (2008)..... 70 | 70 |
| Tableau 1-6 : Études publiées à ce jour sur le développement analytique de la détermination des rapports isotopiques du soufre par MC-ICP-MS (sans couplage)..... 77 | 77 |
| Tableau 1-7 : Études publiées à ce jour sur les applications de la détermination des rapports isotopiques du soufre par MC-ICP-MS (sans couplage) 81 | 81 |
| Tableau 1-8 : Études publiées sur le développement analytique de la détermination des rapports isotopiques du soufre par GC-MC-ICP-MS 87 | 87 |
| Tableau 1-9 : Études publiées sur les applications de la détermination des rapports isotopiques du soufre par GC-MC-ICP-MS 89 | 89 |
| Tableau 1-10 : Études publiées à ce jour sur la détermination des rapports isotopiques du soufre par LC-MC-ICP-MS..... 93 | 93 |
| Tableau 1-11 : Études publiées à ce jour sur le développement analytique de la détermination des rapports isotopiques du soufre par LA-MC-ICP-MS 97 | 97 |
| Tableau 1-12 : Études publiées à ce jour sur les applications de la détermination des rapports isotopiques du soufre par LA-MC-ICP-MS 99 | 99 |
| Tableau 2-1 : Liste des matériaux de référence utilisés pour réaliser l'étalonnage ($\delta^{34}\text{S}$) de l'IRMS.. 111 | 111 |
| Tableau 2-2 : Paramètres de mesures et d'acquisition des analyses LC-HR-ICP-MS..... 115 | 115 |
| Tableau 2-3 : Programme EA-IRMS lors d'une analyse de $\delta^{34}\text{S}$ 116 | 116 |
| Tableau 2-4 : Mesures de répétabilité et de reproductibilité pour les matériaux de référence certifiés. 133 | 133 |
| Tableau 2-5 : Caractérisation par EA-IRMS des matériaux de référence internes..... 134 | 134 |
| Tableau 2-6 : Analyse EA-IRMS de sulfures selon différentes procédures de précipitation 138 | 138 |
| Tableau 2-7 : Analyse EA-IRMS de sulfures selon les procédures de précipitation 1, 3 et 4 (n = 9). 139 | 139 |
| Tableau 2-8 : Analyse EA-IRMS de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et des BaSO_4 précipités..... 140 | 140 |
| Tableau 2-9 : Oxydation des thiosulfates par du peroxyde d'hydrogène..... 149 | 149 |
| Tableau 2-10 : Analyses EA-IRMS des sulfures et des sulfates d'une solution contenant 50 mmol-S/L de Na_2S , 20 mmol-S/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et 20 mmol-S/L de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$ 154 | 154 |
| Tableau 2-11 : Analyse EA-IRMS d'une solution de milieu de culture bactérien dopée avec 20 mmol-S/L de Na_2S , 20 mmol-S/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et 20 mmol-S/L de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$ 157 | 157 |
| Tableau 2-12 : Concentrations en sulfates dissous des eaux souterraines..... 160 | 160 |
| Tableau 2-13 : Valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates et des sulfures des eaux souterraines. 161 | 161 |

| | |
|---|-----|
| Tableau 2-14 : Valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ déterminées pour les sulfates et les sulfures et valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfures calculées par bilan de masse à partir de la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates, dans l'hypothèse d'une absence de thiosulfates. | 168 |
| Tableau 2-15 : Données biologiques, chimiques et isotopiques de l'expérience de culture de bactéries sulfato-réductrices | 170 |
| Tableau 3-1 : Calcul d'une incertitude composée selon la méthode de Kragten (1994) pour $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates sans correction du biais de masse par le silicium | 187 |
| Tableau 3-2 : Analyses LC-MC-ICP-MS de solutions de Na_2SO_4 et $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ à 5 $\mu\text{g-S/g}$ et 1 $\mu\text{g-S/g}$ et d'un échantillon d'eau de source à 5 $\mu\text{g-S/g}$. Analyse EA-IRMS de Na_2SO_4 après précipitation sous forme BaSO_4 et de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ après oxydation et précipitation sous forme BaSO_4 | 195 |
| Tableau C-1 : Comparaison des approches EA-IRMS et LC-MC-ICP-MS pour l'analyse d'espèces inorganiques du soufre | 230 |

Glossaire

B

BTEX - Abbréviation des composés organiques volatils Benzène, Toluène, Ethylbenzène et Xylènes

C

CRM - Matériaux de référence certifiés
CSB - *Compound Specific Bracketing*
CUB - *Compound Unspecific Bracketing*

D

DMS - Diméthyle de sulfure
DMSO - Diméthylsulfoxyde
DMSP - Diméthylsulfoniopropionate
DO - Densité Optique

E

EA-IRMS - Analyseur élémentaire couplé à un Spectromètre de masse à rapport isotopique (*Elemental analyzer - isotope ratio mass spectrometer*)
EDTA - Éthylènediaminetétraacétique

H

HR - Haute Résolution
HR-ICP-MS - Spectromètre de masse à plasma à couplage inductif haute résolution

I

IAEA - Agence internationale de l'énergie atomique
ICP-MS - Spectromètre de masse à plasma à couplage inductif (*Inductively Coupled Plasma -Mass Spectrometer*)
IS - *Internal Standardization*
ISEC - *Internal Standardization combined to an External Calibration*

L

LC - Chromatographie Liquide
LR - Basse Résolution
LRS - Méthode de la régression linéaire (*linear regression slope*)

M

MC-ICP-MS - Spectromètre de masse à plasma à couplage inductif multicollecteur (*Multiple Collector – Inductively Coupled Plasma -Mass Spectrometer*)
MR - Moyenne Résolution

N

NIST - *National Institute of Standards and Technology*

P

PAI - Méthode par aire de pic
PBP - Méthode du point par point

R

RMSE - *Root-mean-square error*

S

SRA - Sulfato-réduction assimilatrice
SRB - Sulfato-réduction bactérienne
SSB - *Standard-Sample Bracketing*

T

TDC - Détecteur à Conductivité Thermique
TMSO - Triméthylsulfoxonium

V

VIM - Vocabulaire international de métrologie

D

$\Delta m/m$ - Résolution en masse (pour un spectromètre de masse)

δ

$\delta^{34}\text{S}$ - Notation de la valeur isotopique du soufre

ϵ

$\epsilon^{34}\text{S}$ - Fractionnement isotopique du soufre

Introduction générale

Le soufre, élément de symbole S, de la famille des chalcogènes est ubiquiste dans l'environnement, par conséquent c'est un élément clé du cycle biogéochimique global. Le soufre présente l'un des cycles biogéochimiques les plus complexes, car il existe dans de multiples états d'oxydation entre $-II$ (les sulfures) et $+VI$ (les sulfates) et forme une grande variété d'espèces organiques et inorganiques. Le cycle du soufre dans l'hydrosphère est mené par la combinaison de processus biologiques et abiotiques qui modifient sa spéciation (forme chimique). La sulfato-réduction bactérienne, un processus central du cycle du soufre, conduit à la réduction des sulfates en sulfures, tandis que l'oxydation biologique ou abiotique des sulfures entraîne la formation de composés de valence intermédiaire (SO_3^{2-} , $S_2O_3^{2-}$, $S_4O_6^{2-}$, $S^0 \dots$). Ainsi, les réactions d'oxydo-réduction biologiques et abiotiques du cycle du soufre conduisent à la formation de nombreuses espèces soufrées (Rickard, 2012). Il en résulte que les interactions du soufre dans l'environnement sont très complexes et diverses et ne sont pas toutes bien caractérisées (Fike et al., 2015). Afin d'obtenir une meilleure compréhension de la biogéochimie du soufre, il est nécessaire d'explorer les différentes réactions biologiques et abiotiques qui pilotent son cycle.

Les processus du cycle du soufre peuvent être suivis en mesurant les concentrations en différents composés contenant du soufre (analyse de spéciation) et en mesurant leur rapport isotopique respectif (analyse isotopique) (Kamyshny et al., 2011). Alors que de nombreuses études se sont focalisées sur l'analyse isotopique du soufre des sulfates et des sulfures ou du soufre total des échantillons, celles combinant spéciation et isotopie du soufre sont bien moins nombreuses. De plus, les rapports isotopiques des composés de valence intermédiaire sont rarement déterminés. Ceci résulte en partie de difficultés analytiques liées à la mesure des rapports isotopiques du soufre de plusieurs espèces coexistantes dans un échantillon.

Le plus souvent les mesures de rapports isotopiques du soufre sont réalisées avec un analyseur élémentaire couplé à un spectromètre de masse à rapport isotopique (EA-IRMS) (Grassineau et al., 2001). Cependant, l'analyse d'échantillon liquide n'est pas directement possible avec cette technique, car elle nécessite l'introduction d'un échantillon sous forme solide. Par conséquent, pour l'analyse de plusieurs espèces du soufre en solution un protocole de préparation d'échantillon adapté doit être mis en place.

Mais au cours des 15 dernières années, l'utilisation d'un spectromètre de masse à plasma couplage inductif multicollecteur (MC-ICP-MS) pour les études isotopiques du soufre a régulièrement augmenté (Hanousek et al., 2016a). En effet, cette technique représente une alternative avantageuse à l'IRMS car elle permet la mesure directe des rapports isotopiques du soufre en solution. C'est pourquoi

elle représente une méthode à fort potentiel pour les analyses isotopiques d'espèces inorganiques du soufre en solution.

L'objectif de ce travail consiste à mettre au point une stratégie analytique combinant spéciation et isotopie du soufre, afin de réaliser la mesure des rapports isotopiques du soufre de plusieurs espèces inorganiques présentes simultanément dans des échantillons liquides. Pour cela, deux approches seront développées. La première (méthode hors-ligne) consiste en une préparation d'échantillon par précipitation des différentes espèces à analyser suivi d'une mesure des rapports isotopiques par EA-IRMS. La seconde repose sur la mise au point d'un couplage entre chromatographie liquide et MC-ICP-MS.

Dans le **Chapitre 1**, une synthèse bibliographique expose les principales réactions physico-chimiques et biochimiques du cycle du soufre dans l'hydrosphère. Les effets sur l'isotopie du soufre des réactions de précipitation, d'oxydo-réduction biologiques ou abiotiques sont également relatés et deux exemples illustrent l'utilisation des isotopes du soufre pour la compréhension du cycle du soufre. Ensuite, les différentes techniques de mesure des rapports isotopiques du soufre sont présentées et discutées. À la fin de ce chapitre, les objectifs de la thèse et la démarche mise en œuvre sont présentés.

Le **Chapitre 2** présente les travaux relatifs à la mise au point d'une méthode de spéciation du soufre par couplage entre chromatographie liquide et ICP-MS, ainsi que le développement d'une approche hors-ligne pour la mesure des rapports isotopiques du soufre des sulfures, des sulfates et des thiosulfates présents en solution dans un échantillon. Cette approche consiste en une séparation par précipitation séquentielle des différents composés, suivie de leur analyse par EA-IRMS. Ensuite, la méthodologie développée est appliquée à l'analyse d'eaux souterraines et au suivi cinétique de la croissance de bactéries sulfato-réductrices.

Dans le **Chapitre 3**, le développement d'une méthode de mesure des rapports isotopiques du soufre par couplage d'une séparation par chromatographie liquide et d'une détection par MC-ICP-MS est présenté. Cette méthode se focalise sur l'analyse en ligne des sulfites, des sulfates et des thiosulfates. La validation de cette méthode se fait à travers l'analyse de solutions étalons et d'échantillons d'eaux naturelles préalablement caractérisés par EA-IRMS.

Enfin, une conclusion reprenant les principaux résultats obtenus au cours de ce travail de recherche est réalisée et des perspectives proposent d'approfondir certains points particuliers des développements analytiques réalisés.

Chapitre 1 – État de l’art

1. Biogéochimie du soufre

1.1. Généralités

Le soufre (S) est l'élément numéro 16 du tableau périodique des éléments, il a pour masse molaire $32,065 \pm 0,005$ g/mol (David R. Lide, 2007). Dans la nature, il se trouve en phases gazeuse, liquide ou solide et dans des états d'oxydation entre $-II$ (H_2S) et $+VI$ (SO_4^{2-}). De ce fait sa spéciation (distribution de l'élément parmi des espèces chimiques) est importante et on le retrouve dans de nombreuses espèces inorganiques (SO_2 , SO_3^{2-} , $S_2O_3^{2-}$, $S_4O_6^{2-}$...) et organiques (cystéine, méthionine, APS, DMS, DMSO, CH_3SH) (Zehnder and Zinder, 1980). Dans sa forme élémentaire (S^0) le soufre est un solide cristallin jaune. C'est un élément essentiel à la vie, il joue un rôle important dans la structure des protéines en tant que composant clé des acides aminés méthionine et cystéine (Alexander, 1974). Il est également présent dans la kératine, un composé présent dans les ongles des doigts et les cheveux. Alors que l'élément soufre est le quatorzième élément le plus abondant sur Terre, les sulfates sont les deuxièmes anions les plus abondants après les chlorures dans l'eau de mer et les hydrogénocarbonates dans l'eau douce (Loka Bharathi, 2008). Le soufre est présent dans la plupart des environnements naturels, c'est un constituant majeur de la lithosphère, de l'hydrosphère, de la biosphère et de l'atmosphère de la Terre (Friend, 1973). Il est réparti dans trois réservoirs majeurs : sous forme de sulfates dissous dans les océans, dans la lithosphère essentiellement sous forme d'évaporites (gypse et anhydrite) et dans les sédiments (pyrite : FeS_2 principalement). Les océans contiennent la plus grande partie du soufre résidant dans l'hydrosphère, la concentration moyenne mondiale en sulfates dans les rivières est de $11,2$ $\mu g/g$ (Livingstone, 1963) alors qu'elle est de 2717 $\mu g/g$ dans les océans (Riley and Chester, 1971), soit plus de 240 fois plus importante. La quantité de soufre contenu dans les sols et la biomasse est environ quatre ordres de grandeur inférieure à la quantité de soufre présente dans les océans, tandis que l'atmosphère représente le plus petit réservoir de soufre sur Terre (Tableau 1-1).

Tableau 1-1 : Masse de soufre et espèces majeures dans les différents réservoirs (Schoonen, 2018).

| Réservoir | Espèces majeures | Masse de soufre (g) |
|-------------------------|---|----------------------|
| Lithosphère | Gypse, anhydrite, sulfures métalliques, S ⁰ | 2×10^{22} |
| Océans | SO ₄ ²⁻ | $1,3 \times 10^{21}$ |
| Sédiments marins | Pyrite, gypse, anhydrite | 3×10^{20} |
| Pédosphère et biosphère | Sulfates, S organique, pyrite | 3×10^{17} |
| Rivières et lacs | SO ₄ ²⁻ | 3×10^{14} |
| Atmosphère | Gaz : H ₂ S, SO ₂ , DMS, OCS Aérosols : H ₂ SO ₄ , (NH ₄) ₂ SO ₄ | $4,8 \times 10^{12}$ |

Les réservoirs de soufre sont alimentés par les émissions volcaniques qui libèrent des gaz soufrés, principalement le dioxyde de soufre (SO₂) et le sulfure d'hydrogène (H₂S) (Kellogg et al., 1972). De tels composés sont également émis par les activités anthropiques. Actuellement, entre un tiers et la moitié des émissions de SO₂ proviennent des émissions industrielles et automobiles du fait de la combustion de combustibles fossiles (Maier, 2015). Du soufre est également émis dans l'atmosphère à partir des océans, sous forme de sulfates ou de soufre biogénique. Dans l'atmosphère, SO₂ et H₂S sont oxydés sous forme de sulfates solubles dans l'eau, qui sont déposés dans l'océan ou au sol par la pluie.

Le soufre dans les sols est présent sous des formes inorganiques et organiques et provient essentiellement des dépôts atmosphériques secs (particules, poussières) et humides (pluie, neige, embruns). Quand les résidus des plantes, des animaux ou des microorganismes morts retournent au sol et sont dégradés par les microorganismes, une partie seulement du soufre organique de ces résidus est minéralisée jusqu'au stade de sulfures ou de sulfates, la plus grande partie restant sous forme organique, soit en tant que fraction libre soit combinée à l'humus. Dans les sols calcaires, environ 90 % du soufre sont sous forme organique. Les arylsulfates, les sulfates phénoliques, les polysaccharides et les lipides sulfatés représentent environ la moitié du soufre organique, 10 à 20 % du soufre organique se trouve sous la forme d'acides aminés (méthionine et cystine). Les sulfates (soufre inorganique) sont présents en solution et sous formes insolubles (CaSO₄, BaSO₄...). Les sulfates en solution sont incorporés par les plantes. Des engrais soufrés (CaSO₄, (NH₄)₂SO₄, (NH₄)₂S₂O₃) sont de plus en plus utilisés et constituent une source de soufre supplémentaire dans les sols (Havlin et al., 1999), qui par lessivage est transporté (principalement sous forme de sulfates) vers les cours d'eau. L'érosion et l'altération des sédiments ou des roches, contenant principalement du gypse et de la pyrite, mobilisent des quantités importantes de soufre. Le gypse pénètre dans les cours d'eau par simple dissolution sous forme d'ions Ca²⁺ et SO₄²⁻. La pyrite, en revanche, consomme de l'oxygène pour s'oxyder en Fe₂O₃ et H₂SO₄. Il est considéré que la totalité du soufre libéré par l'altération des roches et des sédiments pénètre dans les rivières sous forme de sulfates (Zehnder and Zinder, 1980). Les sulfates issus de l'altération et des dépôts atmosphériques sont transportés par les rivières jusqu'à l'océan. Les apports de soufre dans les réservoirs

aquatiques sont principalement dus à l'altération des dépôts évaporitiques contenant des sulfates et à l'altération des sédiments contenant de la pyrite.

La majeure partie du soufre dans les lacs est sous forme de sulfates et provient de l'altération des roches contenant du soufre dans le bassin versant et de l'oxydation du soufre organique provenant de sources terrestres. Une partie du soufre provient des dépôts issus de la combustion de combustibles fossiles et du rejet d'eaux usées contenant des sulfates (Holmer and Storkholm, 2001). La concentration en sulfates dans les lacs varie entre 1 et plus de 50 $\mu\text{g/g}$, ce qui est bien inférieure à la concentration dans l'océan (2717 $\mu\text{g/g}$). Elle est généralement inférieure à 10 $\mu\text{g/g}$ dans les lacs acides et à 30 $\mu\text{g/g}$ dans les lacs oligotrophes alors qu'elle peut atteindre 70 $\mu\text{g/g}$ dans les lacs mésotrophes et eutrophes. Certains lacs enrichis en sulfates à cause de drainages miniers, d'évacuation d'eaux usées ou d'une intrusion d'eau salée ont des concentrations supérieures à 100 $\mu\text{g/g}$ et jusqu'à 200 $\mu\text{g/g}$ (Holmer and Storkholm, 2001).

Dans les eaux souterraines, le soufre est également principalement présent sous forme de sulfates. Celui-ci peut provenir de différentes sources qui comprennent la dissolution de minéraux de sulfates évaporitiques, tels que le gypse et l'anhydrite, l'oxydation de minéraux sulfurés (FeS_2 , MnS , PbS , ZnS ...), les dépôts atmosphériques, la minéralisation de matières organiques ou encore l'infiltration de sources anthropiques, telles que des eaux usées ou des effluents agricoles (Krouse and Mayer, 2000). La concentration dans les eaux souterraines est très variable, et dépend généralement du type de roches qui constitue le réservoir. Elle varie entre 0 et 468 $\mu\text{g/g}$ pour des roches ignées, entre 0 et 132 $\mu\text{g/g}$ pour des roches métamorphiques et entre 0,2 et 2420 $\mu\text{g/g}$ pour des roches sédimentaires (Zehnder and Zinder, 1980).

Nous nous intéresserons ici, uniquement aux processus (physico-chimiques et biologiques) du cycle du soufre dans l'hydrosphère et aux interfaces avec les sédiments et l'atmosphère.

1.2. Le cycle du soufre dans l'hydrosphère

Bien que les sulfates soient la forme principale de soufre dans les eaux, une chimie complexe menée par les activités biologiques conduit à une large spéciation du soufre (H_2S , SO_3^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, S^0 , DMSP, DMS, DMSO, CH_3SH ...) dans les compartiments aquatiques. Les processus physico-chimiques et biologiques principaux sont représentés sur la Figure 1-1. Il existe deux mécanismes principaux de réduction biologique des sulfates, la sulfato-réduction assimilatrice (SRA) et la sulfato-réduction dissimilatrice, aussi appelée sulfato-réduction bactérienne (SRB). La SRA correspond à la biosynthèse de composés organosoufrés tels que les acides aminés. La SRB a lieu exclusivement en milieu anoxique et consiste à utiliser les sulfates comme accepteur d'électrons et les réduire en sulfures pour soutenir le métabolisme respiratoire en absence d'oxygène (Harrison and Thode, 1958). Au sein des eaux interstitielles des sédiments, en milieu anoxique, la concentration en sulfates diminue avec la profondeur alors que la concentration en sulfures augmente pouvant atteindre 20 mmol/L, ce qui en fait la forme inorganique la plus abondante après les sulfates (Brüchert et al., 2009).

Les produits formés par ces deux mécanismes pourront ensuite subir des réactions d'oxydation biotiques ou abiotiques (Figure 1-1). Les espèces inorganiques de valence intermédiaire (SO_3^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, S^0) peuvent subir une dismutation par des bactéries qui les utilisent à la fois en tant qu'oxydant et réducteur (Canfield and Thamdrup, 1994; Cypionka et al., 1998). Les sulfates peuvent être précipités sous forme de gypse ou de baryte (Figure 1-1). Les sulfures sont principalement précipités sous forme de pyrite, mais peuvent précipiter avec d'autres cations métalliques (ex : MnS , ZnS , CuS , CdS , PbS , seul MnS est représenté sur la Figure 1-1).

La SRA et la SRB sont particulièrement importantes dans les océans où les sulfates sont abondants. L'activité bactérienne dans les lacs est de nature similaire à celle rencontrée en milieu océanique (SRA et SRB) mais généralement de moindre importance car elle dépend essentiellement de la disponibilité en sulfates et en matière organique qui sont moins abondants qu'en milieu océanique. La réduction des sulfates est généralement faible dans les lacs acides ($\text{pH} < 6$) en raison de la faible disponibilité en sulfates. Elle est moins importante en conditions oligotrophes qu'en conditions eutrophes où elle peut jouer un rôle significatif dans les transferts de soufre vers les sédiments, car la disponibilité de la matière organique et la concentration en sulfates sont souvent plus élevées dans les lacs eutrophes (Holmer and Storkholm, 2001). Dans les eaux souterraines, le mécanisme bactérien principal est la SRB dont l'occurrence dépend principalement de la concentration en sulfates et en matière organique.

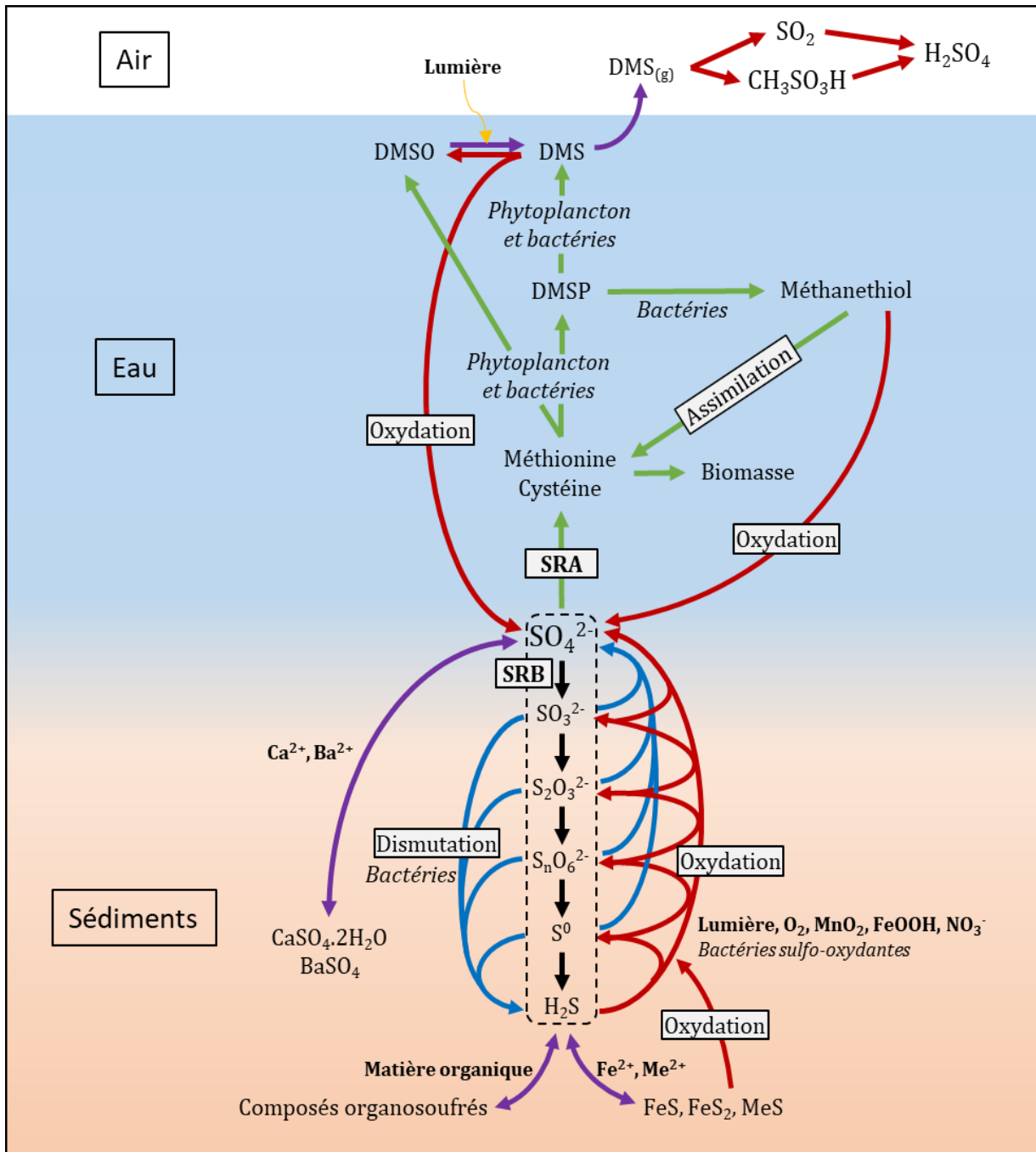


Figure 1-1 : Cycle du soufre simplifié dans les environnements aquatiques. SRA : Sulfato-réduction assimilatrice. Me^{2+} : Cation métallique (Ex : Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+}) → Sulfato-réduction bactérienne (SRB), → Oxydation biotique ou abiotique, → Dismutation bactérienne, → Autres réactions biologiques, → Autres réactions abiotiques. Les sulfates, espèces centrales de ce système, peuvent être réduits et incorporés à des composés organiques par SRA ou bien en sulfures par SRB. Cette dernière réaction biologique a lieu uniquement en milieu anoxique. Les composés organiques formés par SRA peuvent à leur tour subir des transformations biologiques ou abiotiques. La majorité des sulfures produits par SRB sont ré-oxydés par des réactions biologiques ou inorganiques. De nombreuses espèces intermédiaires soufrées peuvent être formées et consécutivement oxydées, réduites ou dismutées en sulfures et sulfates.

1.2.1. Sulfato-réduction assimilatrice

La SRA est réalisée par les plantes, les algues et les bactéries pour l'incorporation du soufre dans des biomolécules faisant partie de la biomasse cellulaire. Le mécanisme de la SRA est illustré Figure 1-2. Une fois que les sulfates sont transportés à l'intérieur de la cellule, l'adénosine triphosphate (ATP) est utilisée pour convertir les sulfates en adénosine-5-phosphosulfate (APS). Une partie des sulfates est incorporée, sous formes oxydées *via* l'APS, à des polysaccharides sulfatés (par exemple du mucus), mais la majeure partie est réduite en sulfites (SO_3^{2-}) puis en sulfures (HS^-). Selon les organismes, l'APS subit une réduction directe ou une phosphorylation en 3-phosphoadénosine-5-phosphosulfate (PAPS) avant réduction (Canfield, 2001). Les sulfures sont combinés à la sérine pour former la cystéine, qui peut à son tour être transformée en méthionine. Les acides aminés, cystéine et méthionine, sont les constituants majeurs des molécules soufrées et notamment des protéines dans les cellules.

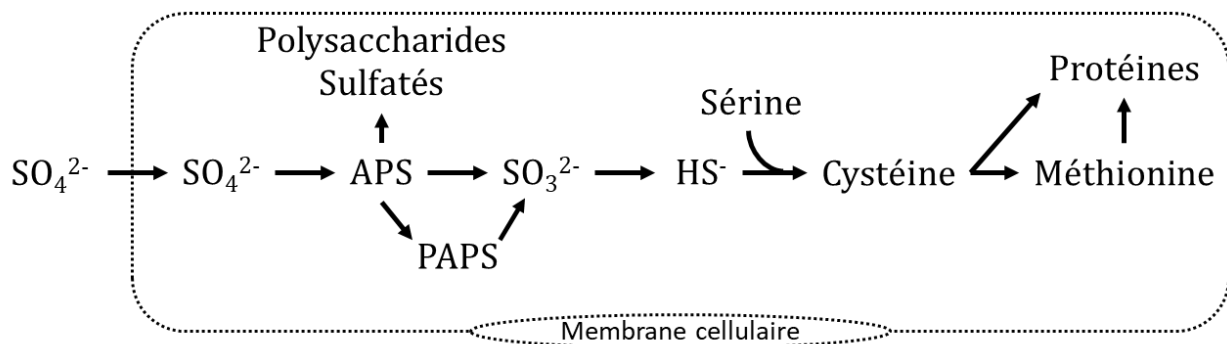


Figure 1-2 : Mécanisme simplifié de la sulfato-réduction assimilatrice (SRA). APS : adénosine-5-phosphosulfate, PAPS : 3-phosphoadénosine-5-phosphosulfate.

Dans la zone photique (zone où la lumière pénètre dans l'eau) des eaux de surface océaniques et continentales, les sulfates sont réduits par SRA par des organismes tels que le phytoplancton qui transforme la méthionine en diméthylsulfoniopropionate (DMSP : $(\text{CH}_3)_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{COO}$) (Gage et al., 1997) (Figure 1-1). L'importance du DMSP dans le cycle biogéochimique est amplifiée par son rôle de précurseur principal du diméthyle de sulfure (DMS : $(\text{CH}_3)_2\text{S}$) volatil. Le phytoplancton qui produit du DMSP, le convertit en DMS et en acide acrylique par réaction enzymatique (Andreae, 1990). Certaines bactéries peuvent également convertir le DMSP en DMS (Yoch, 2002), mais la quantité de DMS produit par les bactéries est limitée par le fait qu'elles métabolisent la majeure partie (80 à 90%) du DMSP par déméthylation ne produisant pas de DMS mais du méthanethiol (CH_3SH). Ce composé étant très réactif, il est rapidement oxydé et ne transite que très faiblement vers l'atmosphère, il peut également être assimilé pour former de la méthionine ou de la cystéine (Kiene et al., 2000). De plus, les bactéries consomment une grande partie du DMS produit et le convertissent en deux produits non volatils, le diméthylsulfoxyde (DMSO : $(\text{CH}_3)_2\text{OS}$) et le sulfate (del Valle et al., 2007). Le DMSO peut également être synthétisé par le phytoplancton (Bouillon et al., 2002). Toutefois, le DMS émis via la SRA représente le flux principal de soufre biogénique des eaux de surfaces vers l'atmosphère (Figure 1-1),

où il est oxydé en acide méthanesulfonique ($\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$) et SO_2 qui est lui-même oxydé en acide sulfurique (H_2SO_4). Le DMS est l'organosoufré majoritairement présent dans les lacs, sa concentration varie selon les saisons et peut parfois se situer dans la même plage que celle rencontrée dans l'eau de mer, c'est-à-dire quelques nmol/L (Richards et al., 1994).

Selon Charlson *et al.* (1987), la production de DMS jouerait également un rôle dans la régulation du climat (réduction de la quantité de radiations solaires qui atteignent la surface de la Terre) en tant que noyaux de condensation des nuages. Mais cette hypothèse demeure controversée car la contribution relative des produits d'oxydation du DMS, du sel (sulfates) de mer et des sources anthropiques au nombre de noyaux de condensation dans les nuages doivent encore être résolus (Quinn and Bates, 2011; Lana et al., 2012).

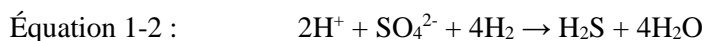
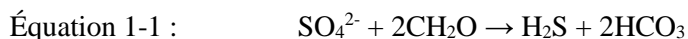
1.2.2. Sulfato-réduction bactérienne

Dans les environnements anoxiques au sein des sédiments (eaux interstitielles), les sulfates sont utilisés comme accepteurs d'électrons pour la respiration des bactéries sulfato-réductrices qui oxydent la matière organique qui joue le rôle de donneur d'électrons. Au cours de cette réaction les sulfates sont réduits en sulfures (Figure 1-1). La sulfato-réduction bactérienne (SRB) se produit pratiquement dans tous les habitats anoxiques contenant de la matière organique et des sulfates. Elle se produit dans les sédiments d'eau salée et d'eau douce, les eaux souterraines, les sols inondés, les boues de station d'épuration, le système digestif des ruminants (Gilhooly III et al., 2016; Howard and Hungate, 1976; Knöller et al., 2008). La SRB peut avoir lieu entre $-1,5^\circ\text{C}$ et 100°C , à des pH compris entre 5 et 9. Elle est réalisée par de nombreux microorganismes, plus de 100 espèces sont recensées (Canfield, 2001). En plus de la réduction des sulfates, de nombreuses bactéries sont capables de réduire d'autres espèces de soufre telles que les sulfites, les thiosulfates et le soufre élémentaire (Kemp and Thode, 1968; Fitz and Cypionka, 1990; Surkov et al., 2012). Les bactéries sulfato-réductrices sont capable d'utiliser plus de 100 composés organiques comme source de carbone et donneur d'électrons, tel que le lactate, le pyruvate, le fumarate, le malate, l'éthanol, les acides mono- et di- carboxyliques, les sucres, les alcools, les cétones, les acides aminés, les composés aromatiques (BTEX, HAP...) ou encore les hydrocarbures (Barton and Fauque, 2009; Fike et al., 2015).

La SRB est d'une grande importance géologique dans les sédiments marins en raison des vastes zones et de la forte concentration en sulfates impliquées. C'est le processus principal conduisant à un flux sortant du soufre des océans et affectant le rapport sulfates/sulfures global de la Terre. De plus, ce mécanisme couple le cycle du soufre avec ceux du carbone et du fer (voir paragraphe 1.2.3). C'est la voie la plus importante (50%) de minéralisation de la matière organique dans les sédiments marins (Froelich et al., 1979; Jørgensen, 1982). Dans les eaux douces, les sulfates (en concentration plus faible) sont rapidement épuisés avec la profondeur des sédiments, et la sulfato-réduction bactérienne représente une part moins importante dans la minéralisation globale de la matière organique, les processus de dégradation oxygène, de dénitrification, de réduction du fer ou de méthanogénèse étant majoritaires

(Canavan et al., 2006; Jørgensen and Kasten, 2006; Thomsen et al., 2004), c'est la différence majeure avec l'océan.

La croissance des bactéries repose sur la catalyse de la réaction chimique dans laquelle des sulfates sont réduits et du carbone organique (Équation 1-1) ou H₂ gazeux (Équation 1-2) est oxydé (Chambers and Trudinger, 1979). Lors de la réduction des sulfates par SRB dans la cellule, la matière organique (ou H₂) fournit les 8 électrons nécessaires au passage de l'état d'oxydation +VI à -II du soufre.



Les équations 1 et 2 représentent la réaction globale généralisée de la SRB. Selon les espèces, la SRB peut conduire à une oxydation complète ou incomplète des composés organiques. Dans le premier cas le produit sera du dioxyde de carbone, dans le second de l'acétate (Schauder et al., 1986; Spormann and Widdel, 2000). De plus, la SRB possède un mécanisme de réaction en plusieurs étapes (Figure 1-3, Figure 1-4 et Figure 1-5) (Bradley et al., 2011; Brunner and Bernasconi, 2005; D. E. Canfield, 2001). Différents mécanismes réactionnels ont été proposés, desquels deux modèles ont émergé. Le premier, nommé « modèle de Rees », consiste en une séquence linéaire de quatre réactions (Figure 1-3) (Rees, 1973). Dans ce modèle, la réduction des sulfates commence par son transport à travers la membrane de la cellule et dans le cytoplasme de la cellule. Les sulfates étant une espèce anionique, leur transport dans la cellule s'accompagne de celui d'un cation afin d'équilibrer les charges, habituellement H⁺ pour les eaux douces et Na⁺ pour les eaux salées (Cypionka, 1995). Ensuite, les sulfates réagissent avec l'adénosine triphosphate (ATP) pour former l'adénosine phosphosulfate (APS), qui est directement réduite en sulfites. Ces trois premières réactions sont considérées réversibles au contraire de la réaction terminale de réduction des sulfites en sulfures. Le modèle de Rees suggère que cette dernière réaction est une réduction directe des sulfites en sulfures, dans laquelle six électrons sont échangés.

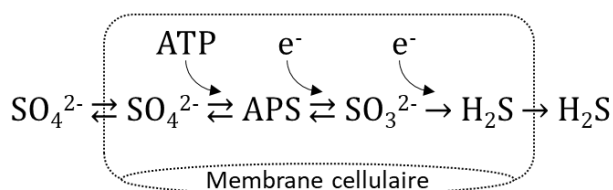


Figure 1-3 : La SRB selon le modèle de Rees (1973). Les pointillés représentent la membrane de la cellule. ATP : Adénosine triphosphate, APS : Adénosine phosphosulfate.

Dans le deuxième modèle appelé « Voie du trithionate », les premières étapes sont les mêmes que pour le modèle de Rees, à savoir le transport des sulfates dans la cellule, la formation de l'APS puis la réduction en sulfites. Ce modèle se différencie au niveau de la dernière étape avec une réduction des sulfites en sulfures *via* deux intermédiaires, les trithionates ($S_3O_6^{2-}$) et les thiosulfates ($S_2O_3^{2-}$) (Figure 1-4), d'où son nom (Brunner and Bernasconi, 2005; Kobayashi et al., 1969). Ce modèle fait suite à l'observation de la production de thiosulfates et de trithionates lors d'expériences de culture bactérienne (Findley and Akagi, 1969; Fitz and Cypionka, 1990; Kobayashi et al., 1972, 1969).

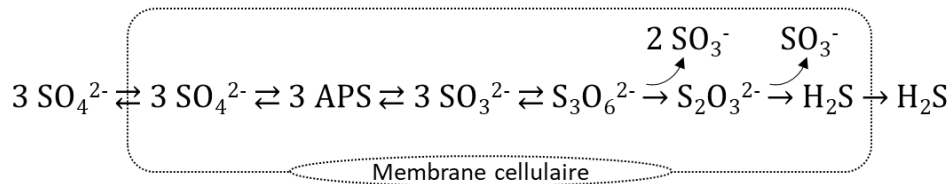


Figure 1-4 : La SRB selon la voie du trithionate (Brunner and Bernasconi, 2005; Kobayashi et al., 1969). Les pointillés représentent les limites de la cellule. APS : Adénosine phosphosulfate.

Ces deux modèles ont longtemps été opposés, mais plus récemment, des études menées sur la structure cristalline du complexe enzymatique responsable de la réduction des sulfites en sulfures (Dsr : *Dissimilatory sulfite reductase*) ont permis de mettre en évidence qu'aucun des deux modèles précédents n'était totalement juste (Oliveira et al., 2008; Parey et al., 2010). Bradley *et al.* (2011) ont proposé un modèle révisé qui concilie les deux modèles précédents dans lequel de multiples réactions intracellulaires sont possibles (Figure 1-5). Dans ce modèle, il est suggéré que, dans la plupart des cas, la SRB suit un mécanisme réactionnel similaire au modèle de Rees (flèches noires Figure 1-5), mais dans lequel les sulfites sont réduits en soufre à l'état d'oxydation zéro (S^0) par une série de deux réactions, chacune impliquant un transfert de deux électrons, avant d'être finalement réduit en sulfures. A ce mécanisme principal s'ajoute un second réseau de réactions (flèches de couleurs Figure 1-5) correspondant à la formation et à la réduction des espèces intermédiaires, trithionates et thiosulfates, qui peuvent avoir lieu en présence de certaines souches bactériennes. La réduction des espèces intermédiaires s'accompagne d'une régénération de sulfites. De plus, il est considéré que des réactions d'échange des espèces intermédiaires (sulfites, trithionates et thiosulfates), avec le milieu environnant les bactéries, sont possibles.

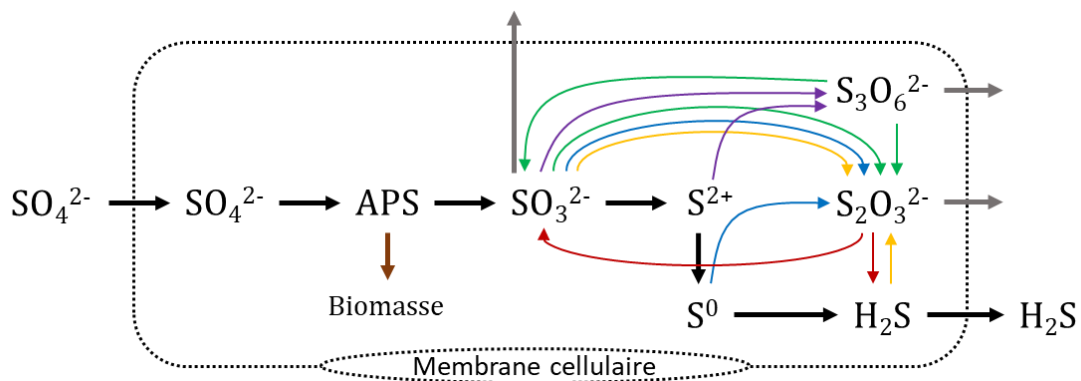


Figure 1-5 : Modèle révisé de la SRB selon Bradley et al. (2011). Pour simplifier le schéma, les réactions réversibles ne sont pas incluses. Les pointillés représentent la membrane de la cellule. APS : Adénosine phosphosulfate. Les flèches noires indiquent le mécanisme réactionnel principal similaire au modèle de Rees. Les flèches de couleurs indiquent des réactions spécifiques impliquant les trithionates et/ou les thiosulfates. Violet : Formation du trithionate, bleu : formation de thiosulfates, vert : réduction des trithionates, rouge : réduction des thiosulfates, jaune : réaction non-enzymatique, marron : assimilation du soufre par la biomasse. La réduction des trithionates ou des thiosulfates régénère des sulfites.

1.2.3. Oxydation et dismutation

Environ 75% à 90 % des sulfures produits par SRB sont ré-oxydés par différentes réactions et les espèces de valence intermédiaire formées par oxydation des sulfures ou par SRB ne sont généralement présentes qu'en faibles concentrations, de l'ordre de quelques $\mu\text{mol/L}$ et ne s'accumulent pas car elles réagissent rapidement après leur formation (Figure 1-1) (Zopfi et al., 2004).

En conditions oxygènes, les sulfures sont rapidement oxydés en sulfates par des réactions abiotiques avec l'oxygène dissous (dans la couche supérieure des eaux interstitielles à l'interface sédiments-eau) (Zhang and Millero, 1993). La demi-vie des sulfures dans des eaux (sans bactérie) en contact avec l'oxygène de l'atmosphère varie entre 16 h à pH 10 et 240 h à pH 4 et la vitesse d'oxydation augmente d'environ un facteur 7 quand la salinité augmente de 0 à 35 % selon l'étude de Zhang et Millero (1993). Les principaux produits de l'oxydation par l'oxygène dissous sont les sulfates, les thiosulfates et les sulfites, ces-derniers étant rapidement oxydés en sulfates. Par ailleurs, l'oxydation des sulfures fait intervenir des intermédiaires de réaction tels que du soufre élémentaire et des polysulfures (S_x^{2-} , $x = 2-5$) (Chen and Morris, 1972; Zhang and Millero, 1993).

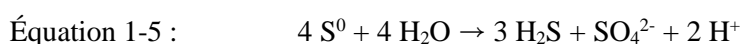
Certains types de bactéries utilisent les sulfures comme donneurs d'électrons et l'oxygène dissous comme accepteur d'électrons (Jørgensen, 1982). La plupart des bactéries (chimiotrophes) oxydant les sulfures en présence d'oxygène produisent des sulfates, mais du soufre élémentaire, des thiosulfates ou des tétrathionates ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$) peuvent être produits par certaines bactéries en conditions d'oxygène limité (Fike et al., 2015). L'oxydation bactérienne du soufre élémentaire (en présence ou en absence d'oxygène) conduit majoritairement à la formation de sulfates (Fike et al., 2015).

Les sulfures ne sont pas transformés directement en sulfates dans des environnements limités en oxygène, mais forment différents intermédiaires de soufre tels que les sulfites et les thiosulfates (Jørgensen and Nelson, 2004). Dans des conditions strictement anoxiques, les sulfures sont oxydés en soufre élémentaire par des oxyhydroxydes de fer (FeOOH) et des oxydes de manganèse (MnO₂) et, dans une moindre mesure, en thiosulfates et sulfates (Yao and Millero, 1996, 1993). L'oxydation bactérienne des sulfures en conditions anoxiques conduit à la formation de thiosulfates, de soufre élémentaire et de sulfates (Fike et al., 2015; Jørgensen, 1990a). La plupart des bactéries oxydant les sulfures en anoxie sont photosynthétiques et assimilent du CO₂. D'autres bactéries, de type chimio-litho-autotrophes, utilisent les nitrates en tant qu'accepteurs d'électrons pour oxyder les sulfures (Figure 1-1).

D'après Luther *et al.* (2011), les taux d'oxydation biotiques des sulfures en présence ou en absence d'oxygène sont supérieurs d'au moins trois ordres de grandeur aux taux d'oxydation abiotiques, ce qui suggère que, dans la plupart des environnements, l'oxydation des sulfures est principalement biotique.

En milieu anoxique, les bactéries sulfo-oxydantes transforment les sulfites en sulfates alors que l'oxydation des thiosulfates peut conduire à la formation de sulfates ou de soufre élémentaire lorsque la concentration en thiosulfates est élevée (Fike et al., 2015; Fry et al., 1985). L'oxydation des thiosulfates par des bactéries peut également conduire à la formation de tétrathionates en tant qu'intermédiaires de réaction (Alam et al., 2013). Des tétrathionates sont également formés lors de l'oxydation abiotique des thiosulfates par FeOOH ou MnO₂ (Schippers and Jørgensen, 2001). Les tétrathionates formés peuvent alors être oxydés en sulfates par des bactéries (Alam et al., 2013; Roy and Trudinger, 1970).

Les espèces de valence intermédiaire (sulfites, thiosulfates et soufre élémentaire) peuvent également subir une dismutation en milieu anoxique par des bactéries (Figure 1-1). C'est-à-dire que les bactéries les utilisent à la fois comme donneur et accepteur d'électrons, ce qui conduit à la formation de sulfates et de sulfures (Jørgensen, 1990b; Canfield and Thamdrup, 1994). Les équations 3, 4 et 5 illustrent les réactions globales de la dismutation des sulfites, des thiosulfates ou le soufre élémentaire. Lors de la dismutation des thiosulfates (S-SO₃⁻), le soufre (interne) lié aux atomes d'oxygène (-SO₃⁻) à l'état d'oxydation +V est oxydé en sulfates tandis que le soufre en position externe (S-) à l'état d'oxydation -I est réduit en sulfures (Canfield, 2001).



1.2.4. Précipitation des sulfures

Les sulfures n'ayant pas été ré-oxydés réagissent avec les ions Fe (II) pour former FeS et finalement de la pyrite (FeS_2), qui précipite dans les sédiments (Figure 1-1). Les sulfures peuvent également précipiter avec divers cations métalliques. La pyrite peut être ré-oxydée en présence d'oxygène dissous ou de MnO_2 (Moses and Herman, 1991; Schippers and Jorgensen, 2001). Les produits d'oxydation de la pyrite par MnO_2 sont des thiosulfates et des polythionates ($\text{S}_n\text{O}_6^{2-}$, $n = 3-6$). Les sulfures formés par SRB peuvent également réagir avec la matière organique sédimentaire (sulfuration) pour former des composés organosoufrés (Fry et al., 1986; Werne et al., 2004), qui représentent la seconde réserve de soufre réduit dans les sédiments marins après la pyrite (Werne et al., 2008).

2. Apport de l'isotopie pour la compréhension du cycle biogéochimique du soufre

Le cycle biogéochimique du soufre se caractérise par le grand nombre d'espèces chimiques qu'il fait intervenir au cours de différentes réactions d'oxydo-réduction, biotiques ou abiotiques, de précipitation ou encore de sulfuration. Ainsi dans les eaux de surface, le phytoplancton et certaines bactéries peuvent synthétiser du diméthylsulfoniopropionate (DMSP) et du diméthyle de sulfure (DMS) à partir des sulfates *via* la SRA. Le DMS peut alors être émis vers l'atmosphère ou être utilisés par d'autres bactéries qui le transforment en diméthylsulfoxyde (DMSO), méthanethiol ou sulfates. En milieu anoxique, les sulfates sont réduits par SRB produisant essentiellement des sulfures mais également des sulfites, des thiosulfates et du soufre élémentaire. Les sulfures peuvent alors être précipités par différents cations métalliques, principalement par du fer sous forme de pyrite. Mais la majorité des sulfures (75-90%) sont oxydés par différentes réactions biotiques ou abiotiques qui conduisent à la formation de soufre élémentaire, de thiosulfates, de sulfates, de sulfites et de polythionates. Toutes ces espèces de valence intermédiaire peuvent alors être à nouveau réduites par SRB, oxydées en sulfates ou subir une dismutation en sulfates et sulfures.

Le nombre de réactions qui peuvent se produire rend l'interprétation du cycle du soufre très complexe. L'analyse de spéciation et la quantification du soufre sont rarement suffisantes pour caractériser un phénomène dans son intégralité et mettre en évidence les processus qui ont lieu dans un écosystème. Par exemple, elles ne permettent pas de déterminer les différentes origines du soufre dans un compartiment tel que les eaux souterraines ou d'identifier quelles sont les réactions qui s'y produisent.

La connaissance des rapports isotopiques du soufre, en complément des informations quantitatives et de la spéciation, peut être utilisée comme indicateurs pour la compréhension du cycle du soufre. En effet, chaque réaction chimique, physique ou biologique, peut entraîner une variation des rapports isotopiques qui dépend du mécanisme mis en jeu. Par exemple, différentes sources de soufre sont susceptibles d'avoir des rapports isotopiques différents. Ainsi, plusieurs auteurs ont montré que les origines du soufre dans les eaux souterraines peuvent être déterminées grâce à la mesure des rapports isotopiques du soufre (André et al., 2005; Moncaster et al., 2000; Tostevin et al., 2016). Récemment, il a été montré que les rapports isotopiques du soufre permettaient de distinguer le soufre atmosphérique issu de la volatilisation du DMS de l'hydrosphère et le soufre issu des sources anthropiques et ainsi d'estimer la contribution du DMS de l'hydrosphère aux aérosols atmosphériques (Amrani et al., 2013). Il a également été montré que les rapports isotopiques du soufre étaient un outil précieux pour la compréhension des mécanismes biologiques tel que la SRB (Harrison and Thode, 1958; Rees, 1973; Brunner and Bernasconi, 2005; Bradley et al., 2011) et la mise en évidence de leur occurrence dans l'environnement (Rye et al., 1981; André et al., 2005). De plus, les rapports isotopiques du soufre ont

permis dans certains cas de tracer les processus de biodégradation de contaminants organiques dans l'environnement car certaines bactéries sulfato-réductrices utilisent des contaminants organiques (BTEX, HAP...) comme source de carbone, (Knöller et al., 2008; Feisthauer et al., 2012; Einsiedl et al., 2015).

Avant de discuter plus en détails des apports des analyses isotopiques du soufre pour la compréhension des processus intervenant dans le cycle biogéochimique du soufre en milieu aquatique, il est nécessaire de définir quelques termes.

2.1. Isotopie du soufre : Généralités

Le soufre possède quatre isotopes stables : ^{32}S , ^{33}S , ^{34}S et ^{36}S dont les abondances relatives moyennes et les masses exactes sont présentées dans le Tableau 1-2. Deux molécules dont la composition diffère d'un isotope sont appelées isotopologues (ex : $^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2$ et $^{34}\text{S}^{16}\text{O}_2$).

Les rapports isotopiques représentent le rapport du nombre d'atomes d'un isotope sur le nombre d'atomes de l'isotope le plus abondant (aussi le plus léger dans le cas du soufre) du même élément chimique ($^{33}\text{S}/^{32}\text{S}$, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ et $^{36}\text{S}/^{32}\text{S}$).

Tableau 1-2 : Abondance et masse des isotopes stables du soufre (Coplen et al., 2002). Les nombres entre parenthèses représentent l'incertitude sur les deux dernières décimales.

| Isotope | Abondance relative (%) | Masse (amu) |
|-----------------|------------------------|-------------|
| ^{32}S | 95.03957 (90) | 31.97207 |
| ^{33}S | 0.74865 (12) | 32.97146 |
| ^{34}S | 4.19719 (87) | 33.96786 |
| ^{36}S | 0.01459 (21) | 35.96708 |

Les mesures des rapports isotopiques d'un échantillon sont généralement rapportées à celles d'un échantillon de référence international. La valeur isotopique, notée δ , correspond à l'écart relatif entre le rapport de deux isotopes dans un échantillon et le rapport isotopique de ces mêmes isotopes dans un matériau de référence (Équation 1-6).

$$\text{Équation 1-6 : } \delta^{34}\text{S} = \left(\frac{{}^{34}\text{S}/{}^{32}\text{S}_{\text{Échantillon}}}{{}^{34}\text{S}/{}^{32}\text{S}_{\text{Référence}}} - 1 \right)$$

Les variations des rapports isotopiques du soufre étant très faibles, leurs valeurs sont difficiles à comparer. Pour faciliter les comparaisons entre différents échantillons, la valeur isotopique obtenue (δ), sans dimension, est généralement exprimée en ‰.

Pour le soufre, la référence internationale a longtemps été la Cañon Diablo Troilite (CDT), un sulfure de fer provenant d'une météorite (Macnamara and Thode, 1950). Des études ont ensuite mis en évidence que la CDT n'était pas suffisamment homogène ($\pm 0,4$ ‰) pour servir de référence

internationale (Beaudoin et al., 1994). Elle a alors été remplacée par l'échelle Vienna-Cañon Diablo Troilite (V-CDT) qui fixe la valeur du matériau de référence IAEA-S-1 (Ag_2S) à -0,3 ‰ (Gonfiantini et al., 1993; Coplen and Krouse, 1998).

La variation de masse atomique entre deux isotopes engendre des différences entre leurs propriétés physico-chimiques : volume molaire, température de fusion, viscosité, vitesse de réaction, constante d'équilibre, etc. Ces différences de propriétés sont à l'origine des différences de comportement et de répartition des isotopes au cours des processus physico-chimiques ou biologiques qui peuvent ainsi conduire à une modification de leur rapport isotopique. Ce phénomène est appelé fractionnement isotopique dépendant de la masse (FDM) (Hoefs, 2015). Par exemple, lors de la réduction des sulfates en sulfures, les liaisons $^{32}\text{S-O}$ sont rompues plus facilement que les liaisons $^{34}\text{S-O}$ car cela nécessite moins d'énergie. Il en résulte que les sulfures produits ont un $\delta^{34}\text{S}$ plus faible (Harrison and Thode, 1958; Kendall et al., 2014). Ce type de fractionnement isotopique est dit cinétique, son ampleur dépend du mécanisme de réaction, du taux d'avancement de la réaction et des énergies des liaisons coupées ou formées au cours de la réaction (Kendall et al., 2014). Toutes les réactions d'oxydo-réduction (biotique ou abiotique), ou de précipitation induisent potentiellement un fractionnement isotopique. Dans le cas du FDM, on considère que la distribution isotopique est strictement gouvernée par les différences relatives de masse entre les isotopes du soufre. Il est donc attendu que les δ soient proportionnels selon : $\delta^{33}\text{S} = 0,515 \times \delta^{34}\text{S}$ et $\delta^{36}\text{S} = 1,89 \times \delta^{34}\text{S}$ (Bigeleisen and Mayer, 1947; Young et al., 2002).

Le FDM entre deux réservoirs de soufre ou entre un réactif (A) et un produit (B) est communément exprimé en ‰ par $^{34}\epsilon_{B-A}$:

$$\text{Équation 1-7 : } \quad ^{34}\epsilon_{B-A} = (^{34}\alpha_{B-A} - 1)$$

Avec $^{34}\alpha_{B-A}$, le facteur de fractionnement (Équation 1-8):

$$\text{Équation 1-8 : } \quad ^{34}\alpha_{B-A} = (\delta^{34}S_B + 1)/(\delta^{34}S_A + 1)$$

Le fractionnement isotopique est parfois exprimé (en ‰) plus simplement selon l'Équation 1-9 :

$$\text{Équation 1-9 : } \quad \Delta^{34}S_{B-A} = \delta^{34}S_B - \delta^{34}S_A$$

Ce qui est approximativement équivalent ($\Delta^{34}S_{B-A} \approx ^{34}\epsilon_{B-A}$) (Canfield, 2001; Mariotti et al., 1981). Les termes $^{34}\alpha$ et $^{34}\epsilon$ sont définis de telle sorte qu'un appauvrissement en ^{34}S se traduira par un $^{34}\alpha < 1$ et un $^{34}\epsilon$ négatif alors qu'un enrichissement en ^{34}S se traduira par un $^{34}\alpha > 1$ et un $^{34}\epsilon$ positif.

On distingue le FDM du fractionnement indépendant de la masse (FIM), aussi appelé anomalie isotopique. Le FIM est décrit par la déviation des lois communément acceptées de fractionnement dépendant de la masse. Le terme de Δ est employé pour quantifier le FIM :

$\Delta^{33}\text{S} = \delta^{33}\text{S} - ^{33}\lambda \times \delta^{34}\text{S}$ et $\Delta^{36}\text{S} = \delta^{36}\text{S} - ^{36}\lambda \times \delta^{34}\text{S}$ où λ est le coefficient qui caractérise le FDM. $^{33}\lambda$ est généralement fixé à 0,515 et $^{36}\lambda$ à 1,89 mais il peut être recalculé pour tenir compte de la masse moléculaire de l'espèce étudiée (Assonov and Brenninkmeijer, 2005; Farquhar and Wing, 2003). L'utilité de la mesure du FIM a été démontrée lorsque Farquhar *et al.* (2000) ont constaté des anomalies

isotopiques dans certains minéraux de sulfures et de sulfates dans des roches sédimentaires archéennes de plus de 2,0 Ga, alors que ces anomalies n'étaient pas présentes dans des roches plus récentes. Farquhar *et al.* (2001) ont souligné que la photolyse du SO₂ générant du S⁰ et du SO₄²⁻ avec un FIM important et ont suggéré que la présence ou l'absence de FIM dans les roches sédimentaires était étroitement liée à l'évolution de l'oxygène atmosphérique. L'augmentation des concentrations en oxygène dans l'atmosphère et la formation de la couche d'ozone bloquant les rayonnements UV et par conséquent les réactions photochimiques sur les molécules soufrées sont les hypothèses proposées pour expliquer le changement brutal du cycle du soufre dans l'archéen (Farquhar *et al.*, 2000; Farquhar and Wing, 2003). Malgré l'intérêt considérable de ces découvertes, nous ne nous intéresserons pas aux valeurs de δ³³S et δ³⁶S dans la discussion suivante, puisque le fractionnement isotopique du soufre provoqué par des réactions d'oxydo-réduction est dépendant de la masse.

Le modèle de distillation de Rayleigh

L'évolution des rapports isotopiques d'espèces soufrées dans un système fermé, dont la consommation ou la production est associée à un fractionnement isotopique peut être exprimée selon le modèle de distillation de Rayleigh. Ce modèle permet de prédire l'évolution des rapports isotopiques d'un réactif et d'un produit au cours d'une réaction avec un coefficient de fractionnement constant dans un système fermé. Dans ce modèle, le rapport isotopique du réactif (R) est lié à son rapport isotopique initial (R₀), au facteur de fractionnement associé à la transformation (³⁴α_{B-A}) et à la fraction molaire (f) (Canfield, 2001; Mariotti *et al.*, 1981) :

$$\text{Équation 1-10 : } R/R_0 = f^{(34\alpha_{B-A}-1)}$$

En reprenant l'

Équation 1-10 avec la notation δ on obtient :

$$\text{Équation 1-11 : } \delta^{34}S_A = f_A^{(34\alpha_{B-A}-1)} \times (\delta^{34}S_A^{t_0} + 1) - 1$$

Et d'autre part, ce modèle se base sur le principe de conservation des masses (quantité totale de ³²S et ³⁴S constante dans le système fermé), c'est-à-dire que si le produit est appauvri en ³⁴S alors le réactif est proportionnellement enrichi en ³⁴S selon les équations suivantes :

$$\text{Équation 1-12 : } f_A + f_B = 1$$

$$\text{Équation 1-13 : } \delta^{34}S_A \times f_A + \delta^{34}S_B \times f_B = \delta^{34}S_A^{t_0}$$

Par exemple, au cours de la réduction progressive des sulfates dans un réacteur fermé, la valeur de δ³⁴S des sulfates va évoluer conformément au modèle de Rayleigh. Au cours de la réaction, la quantité de sulfates va diminuer et les sulfures vont quantitativement s'accumuler. Sur la Figure 1-6, δ³⁴S_{SO₄²⁻ représente la valeur de δ³⁴S des sulfates en fonction de f_{SO₄²⁻}, son calcul dérive de l'Équation 1-11 ; δ³⁴S_{H₂S}(i) représente la valeur de δ³⁴S des sulfures formés à chaque instant, son calcul dérive de l'Équation 1-13, δ³⁴S_B représentent la valeur de δ³⁴S des sulfures totaux en fonction de f_{SO₄²⁻}. Dans ce système, la production de sulfures entraîne donc un enrichissement en ³⁴S des sulfates au cours de la}

réaction, alors que les sulfures sont appauvris en début de réaction mais tendent progressivement vers la valeur isotopique initiale des sulfates ($\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4^{2-}}^{t_0} = 20,3 \text{ ‰}$ dans cet exemple) lorsque que le rendement de réaction approche les 100% ($f_{\text{SO}_4^{2-}} = 0$ et $f_{\text{H}_2\text{S}} = 1$).

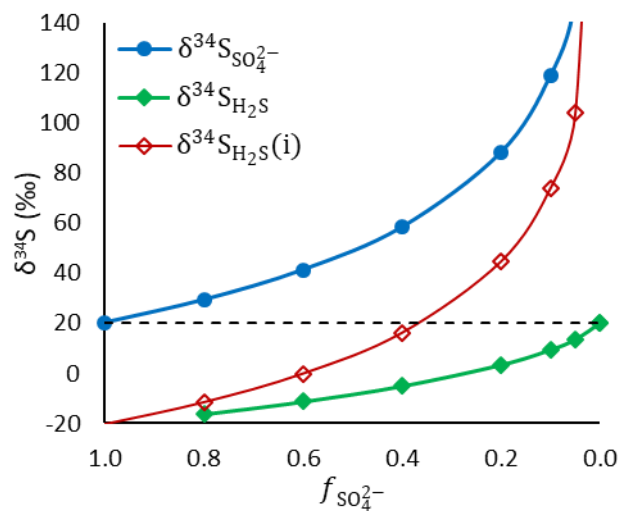


Figure 1-6 : Modèle de distillation de Rayleigh pour la réduction des sulfates en sulfures dans un système fermé, avec $^{34}\alpha_{\text{H}_2\text{S}-\text{SO}_4^{2-}} = 0,96$ et $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4^{2-}}^{t_0} = 20,3 \text{ ‰}$. $f_{\text{SO}_4^{2-}}$ la fraction molaire des sulfates, $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4^{2-}}$ la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates, $\delta^{34}\text{S}_{\text{H}_2\text{S}}$ la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfures accumulés, $\delta^{34}\text{S}_{\text{H}_2\text{S}}(i)$ la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfures formés à chaque instant (Canfield, 2001).

2.2. Détermination des sources de sulfates dans un réservoir

De nombreux auteurs ont montré que les analyses quantitatives couplées à l'isotopie du soufre permettaient d'identifier les sources du soufre et de calculer la contribution de chaque source dans un réservoir tel qu'un aquifère, un lac ou encore une rivière (Moncaster et al., 2000; André et al., 2005; Stam et al., 2010; Killingsworth and Bao, 2015; Brenot et al., 2015; Valiente et al., 2017; Burke et al., 2018).

Dans un système simple, où les sulfates proviennent de deux sources, la contribution de chaque source peut être calculée en résolvant l'équation de mélange :

$$\text{Équation 1-14 : } \delta^{34}\text{S}_{\text{Réservoir}} = n \cdot \delta^{34}\text{S}_{\text{Source 1}} + (1-n) \cdot \delta^{34}\text{S}_{\text{Source 2}}$$

avec n la proportion de sulfates provenant de la source 1.

Cependant, lorsque des réactions abiotiques ou biotiques ont lieu dans le réservoir, il est nécessaire de prendre en considération leur influence sur les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$. Par conséquent, il est nécessaire de connaître le fractionnement isotopique associé à ces réactions.

2.3. Le fractionnement isotopique du soufre au cours des processus physico-chimiques et biologiques

2.3.1. La précipitation et la dissolution

La cristallisation de minéraux de sulfates favorise la précipitation des isotopes lourds. Le fractionnement isotopique entre les sulfates dissous et le gypse ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) est de $1,1 \pm 0,9$ ‰ selon les expériences de Holser et Kaplan (1966). Selon les expériences de Raab et Spiro (Raab and Spiro, 1991), le fractionnement isotopique entre les sulfates dissous et les évaporites (gypse, anhydrite, MgSO_4 , KSO_4) varient entre 0 et +4 ‰. De même, le fractionnement isotopique du soufre entre les sulfates et la baryte est inférieur à 0,4 ‰ (Paytan et al., 1998). A l'inverse, le fractionnement isotopique est négligeable durant la dissolution. Il a également été montré que l'adsorption et la désorption des sulfates conduisaient à un fractionnement isotopique négligeable (Mayer et al., 1995; Van Stempvoort et al., 1990).

Aucun fractionnement isotopique significatif des sulfures n'est supposé avoir lieu au cours de la formation de pyrite (Wilkin and Barnes, 1996), il a été montré expérimentalement que la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ de la pyrite correspond à celle des sulfures en solution (Butler et al., 2004).

Les facteurs de fractionnement étant relativement faibles entre les espèces dissoutes et les précipités formés, la pyrite, le gypse et la baryte servent généralement à estimer la valeur $\delta^{34}\text{S}$ des sulfures et des sulfates, respectivement, lorsque ceux-ci ne peuvent pas être déterminés directement (Bottrell and Newton, 2006; Jørgensen et al., 2004; Seal, 2006).

2.3.2. La sulfato-réduction bactérienne

Comme décrit précédemment, la SRB est le mécanisme principal de réduction des sulfates en sulfures dans les océans, mais aussi dans tous les écosystèmes aquatiques terrestres (lacs, rivières, estuaires, eaux souterraines...). De ce fait, le mécanisme de la SRB a fait l'objet de nombreuses études visant à déterminer son mécanisme réactionnel et l'ampleur du fractionnement isotopique qu'il génère.

La sulfato-réduction bactérienne conduit à un appauvrissement en ^{34}S dans les sulfures produits. Comme illustré Figure 1-7 le fractionnement isotopique entre les sulfures et les sulfates dans les eaux environnementales varie entre 0 et -75 ‰ (Rye et al., 1981; Habicht and Canfield, 1997; Aharon and Fu, 2000; Dogramaci et al., 2001; Einsiedl et al., 2015). Dans des cultures pures il varie entre +3 et -66 ‰ (Harrison and Thode, 1958; Kaplan and Rittenberg, 1964; Detmers et al., 2001; Davidson et al., 2009; M.S. Sim et al., 2011). Les fortes variations observées s'expliquent par le fait que le fractionnement isotopique est très sensible à plusieurs paramètres. Les principaux facteurs (cinétique, génétique, nature et concentration du donneur d'électrons, concentration en sulfates) impactant le fractionnement isotopique sont évoqués dans cette partie et les différents modèles proposés pour prédire le fractionnement isotopique sont présentés.

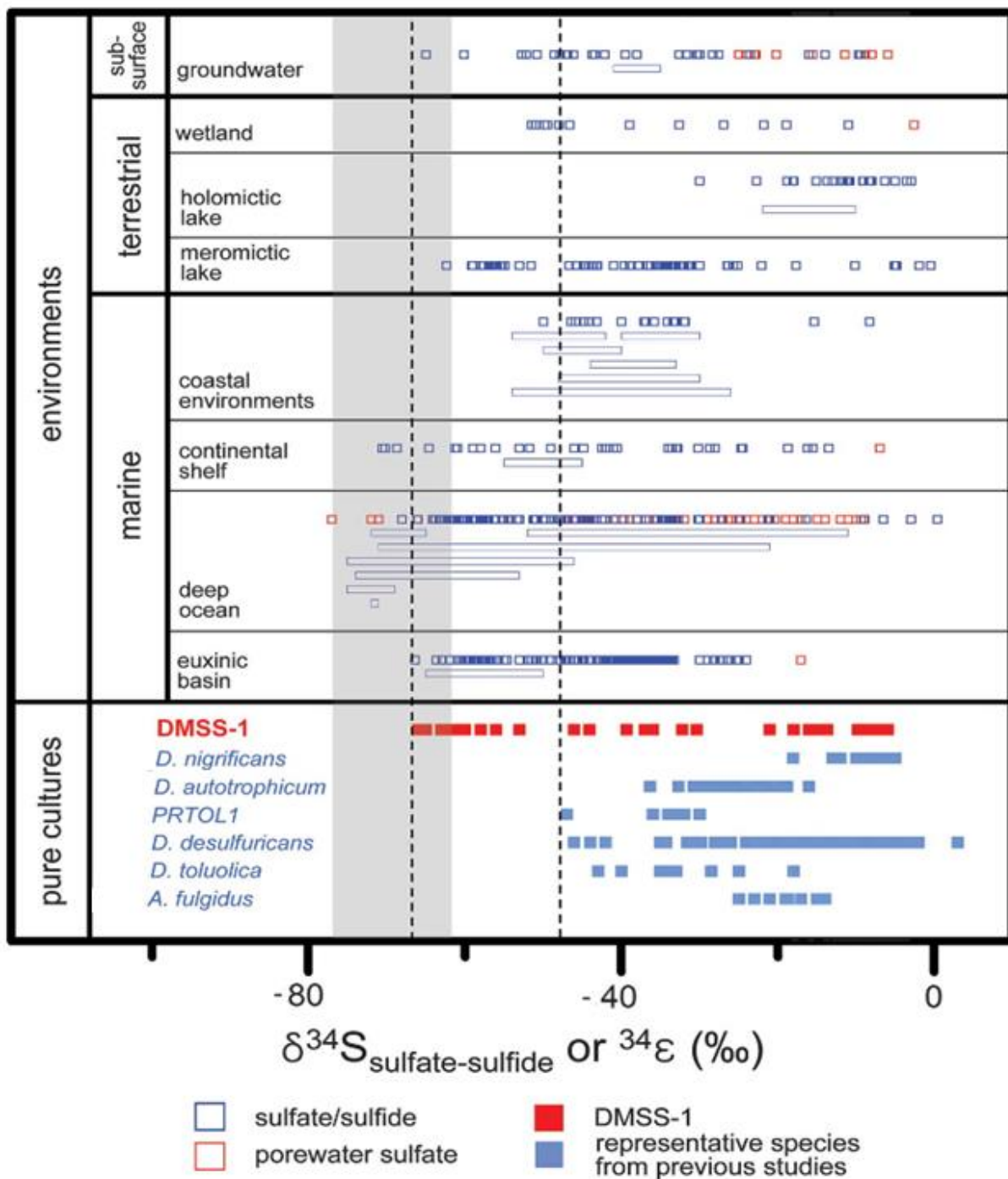


Figure 1-7 : Fractionnement isotopique entre les sulfures et les sulfates obtenus pour des échantillons environnementaux et des cultures pures de 44 bactéries sulfato-réductrices. Les fractionnements isotopiques des échantillons environnementaux ont été estimés à partir des sulfates dissous et des sulfures dissous ou sédimentaires, ou encore des concentrations et de la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates des eaux interstitielles. Dans le cas des cultures pures, chaque point correspond à des conditions de culture différentes. Les lignes en pointillés noirs indiquent la gamme de fractionnement supplémentaire obtenue dans l'étude de Sim et al. (2011) avec la souche DMSS-1 par rapport aux études réalisées précédemment sur des cultures pures de bactéries. La zone grise correspond à la variation du fractionnement isotopique en fonction de la température. Figure adaptée de l'étude réalisée par Sim et al. (2011).

Vitesse de réduction des sulfates

Plusieurs auteurs ont rapporté que le fractionnement isotopique sulfates-sulfures était proportionnel au taux spécifique de réduction cellulaire des sulfates (mol/cellule/jour, csSRR : *cell specific sulfate reduction rate*) qui exprime la vitesse de réduction des sulfates (Kaplan and Rittenberg, 1964; Canfield, 2001; Leavitt et al., 2013; Min Sub Sim et al., 2011). D'après ces études, la SRB se traduit par un appauvrissement plus important lorsque que les taux de réduction des sulfates sont plus faibles. Le fractionnement isotopique du soufre pourrait alors servir d'indicateur de la vitesse de réduction des sulfates dans l'environnement.

Mais, d'autres auteurs n'ont pas observé de corrélation entre les csSRR et le fractionnement isotopique du soufre (Detmers et al., 2001; Davidson et al., 2009).

D'autre part, Sim *et al.* (2011) ont montré que chaque espèce de bactéries sulfato-réductrices présentait des corrélations entre le fractionnement isotopique du soufre et le csSSR, mais que cette corrélation variait entre les espèces.

Les résultats des différentes études sont contradictoires, par conséquent l'effet des csSSR sur le fractionnement isotopique n'est pas évident.

Génétique

Detmers *et al.* (2001) ont observé pour 32 souches différentes de bactéries sulfato-réductrices que celles oxydant complètement le donneur d'électrons (production de CO₂) génèrent un fractionnement isotopique entre sulfures et sulfates entre -42 et -15 ‰ alors que celles oxydant incomplètement le carbone (production d'acétate) présentent un fractionnement entre -18,7 et -2 ‰. D'après Detmers *et al.* (2001), la capacité d'oxyder complètement ou non le donneur d'électrons est un paramètre clé qui influence fortement la valeur du fractionnement isotopique du soufre.

Pour différentes souches bactériennes oxydant complètement le benzoate, des fractionnements isotopiques de -42 à -15 ‰ ont été obtenus et pour différentes souches bactériennes oxydant complètement le butyrate des fractionnements isotopiques de -32,7 à -23,1 ‰ ont été obtenus (Detmers et al., 2001). Ainsi, il semble que des organismes génétiquement différents conduisent à des fractionnements isotopiques différents.

Nature du donneur d'électrons

Plusieurs études montrent que la nature du donneur d'électrons influence le fractionnement isotopique du soufre, quelle que soit la souche cultivée (Detmers et al., 2001; Kleikemper et al., 2004; Leavitt et al., 2014). Par exemple, Detmers *et al.* (2001) ont observé une variation de fractionnement isotopique de -14,0 à -37,2 ‰ pour la souche *Desulfobacterium autotrophicum* cultivée respectivement avec de l'hydrogène et du butyrate. Cependant, l'effet de la nature du donneur d'électron ne peut pas être généralisé car il dépend de la nature de la souche (voir paragraphe précédent).

Concentration en donneur d'électrons et phase de croissance

La croissance des bactéries sulfato-réductrices est caractérisée par une phase exponentielle (augmentation exponentielle du nombre de cellules) suivi d'une phase stationnaire durant laquelle la croissance et la mort des cellules se compensent (stabilisation du nombre de cellules). Matsu'ura *et al.* (2016) ont montré que le changement de phase de croissance est concomitant à la diminution de la concentration en donneur d'électrons et que lors de la phase stationnaire les fractionnements isotopiques entre les sulfates et les sulfures sont plus négatifs que lors de la phase exponentielle. D'autre part, Matsu'ura *et al.* supposent que la présence d'intermédiaires de réaction pourrait expliquer la variation du fractionnement lors de la phase stationnaire. Davidson *et al.* (2009) ont également observé une variation du fractionnement isotopique entre sulfures et sulfates de +5 à -21 ‰ entre la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance, parallèlement à une diminution de la concentration en donneur d'électrons (lactate) de 4 mmol/L à moins de 77 µmol/L. De plus, des thiosulfates ont été détectés dans cette étude et leur concentration a augmenté pendant la phase exponentielle. Ceci suggère que les faibles concentrations en donneur d'électrons, favorise également la formation d'intermédiaires de réaction.

Les différentes études s'accordent sur le fait que la diminution de la concentration en donneur d'électrons conduit à des fractionnement isotopiques entre sulfures et sulfates plus négatifs (Davidson *et al.*, 2009; Min Sub Sim *et al.*, 2011; Leavitt *et al.*, 2013; Matsu'ura *et al.*, 2016).

Concentration en sulfates

La concentration en sulfates est un autre paramètre qui influence la valeur du fractionnement isotopique entre sulfures et sulfates. Des appauvrissements en ³⁴S plus importants ont été observés lorsque la concentration en sulfates a été augmentée (Harrison and Thode, 1958; Canfield, 2001; Habicht, 2002; Bradley *et al.*, 2016). Mais cette relation dépend de la nature de la souche étudiée. En effet, Bradley *et al.* (2016) ont montré que pour certaine souche le fractionnement était indépendant de la concentration en sulfates. Ainsi, le fractionnement isotopique est plus négatif lorsque la concentration en sulfates augmente, mais cet effet est plus ou moins marqué voire absent selon la souche bactérienne impliquée.

Température

Certaines études ont montré que les fractionnements isotopiques étaient plus importants aux températures basses et hautes qu'aux températures intermédiaires (Canfield *et al.*, 2006; Hoek *et al.*, 2006) alors que l'effet inverse a été observé dans une autre étude (Mitchell *et al.*, 2009). Dans une autre étude, aucune corrélation entre température et fractionnement isotopique n'a pu être mise en évidence (Canfield *et al.*, 2000). L'effet de la température demeure donc incertain.

En conclusion, il semble que la nature de la souche soit le paramètre qui influence le plus le fractionnement isotopique au cours de la sulfato-réduction bactérienne. En outre, les effets des autres paramètres dépendent de la nature de la souche. La concentration en donneur d'électrons apparaît comme un paramètre important et sa diminution entraîne un fractionnement isotopique plus négatif. L'augmentation de la concentration en sulfates entraîne également un fractionnement isotopique plus négatif, mais cet effet ne semble pas systématique. La nature du donneur d'électrons influence le fractionnement mais son effet dépend de la souche bactérienne et ne peut pas être généralisé. La vitesse de réduction des sulfates et la température sont deux paramètres dont l'influence sur le fractionnement est controversée.

Modèles prédictifs

Il a été suggéré par plusieurs auteurs que le fractionnement mesuré entre les sulfates et les sulfures correspondait à la somme des fractionnements isotopiques de chaque étape du mécanisme réactionnel (Rees, 1973; Canfield, 2001; Brunner and Bernasconi, 2005; Bradley et al., 2011). Aussi, plusieurs modèles prédictifs ont été proposés.

Rees *et al.* (1973) ont suggéré dans leur modèle (Figure 1-3) que le transport des sulfates à l'intérieur de la cellule ne produit pas de fractionnement isotopique ou très faiblement ($\Delta^{34}\text{S}$ de 0 à +3 ‰). Dans ce modèle, il est considéré que la formation de l'APS n'engendre pas de fractionnement (Kemp and Thode, 1968). En revanche, ce modèle prévoit un fractionnement isotopique de -25 ‰ pour la réduction de l'APS en sulfites. Le modèle de Rees prévoit un fractionnement isotopique entre sulfures et sulfates maximum de -47 ‰ (équivalent à la somme des fractionnements mesurés dans des cultures pour chaque étape). Le problème avec ce modèle est que les fractionnements isotopiques observés dans les sédiments naturels dépassent le fractionnement théorique de -47 ‰. Le fractionnement isotopique produit par des bactéries sulfato-réductrices dans l'environnement atteint -75 ‰ (Jørgensen, 1979; Wortmann et al., 2001; Canfield et al., 2010; Goldhaber and Kaplan, 1980). Différents travaux avancent l'hypothèse que les sulfures extrêmement appauvris en ^{34}S dans les sédiments naturels résultent des taux de réduction des sulfates considérablement plus lents dans les environnements naturels par rapport à ceux dans des conditions de laboratoire (Chambers and Trudinger, 1979; Goldhaber and Kaplan, 1980; Rees, 1973). Une autre hypothèse est que les fractionnements plus importants observés dans l'environnement sont le résultat des réactions successives de réduction des sulfates, oxydation des sulfures et oxydation et dismutation des intermédiaires (voir paragraphes 2.3.3 et 2.3.4) (Canfield and Thamdrup, 1994; Jørgensen, 1990b; Jørgensen and Nelson, 2004; Poser et al., 2014). Cependant, Sim *et al.* (2011) ont mesuré un fractionnement à -66 ‰ dans une culture pure en laboratoire de bactéries

sulfato-réductrices, ce qui suggère que la limite de -47 ‰ pour des cultures pures ne tient pas, mais cette étude est la seule à ce jour, à rapporter des valeurs comprises entre -47 à -66 ‰ pour des cultures pures.

Un second modèle, celui de la « Voie du trithionate », se différencie au niveau de la dernière étape avec une réduction des sulfites en sulfures *via* deux intermédiaires, les trithionates et les thiosulfates (Figure 1-4), à laquelle il assigne un fractionnement isotopique maximum de -53 ‰, atteignant un fractionnement isotopique entre sulfures et sulfates maximum de -70 ‰, ce qui est plus en adéquation avec les mesures réalisées dans l'environnement (Brunner and Bernasconi, 2005).

Bradley *et al.* (2011) ont supposé, dans leur modèle (Figure 1-5) qui concilie les deux précédents, que chaque étape du mécanisme de réduction des sulfites en sulfures peut potentiellement conduire à un fractionnement isotopique et que chaque étape peut être réversible. Ils ont ensuite réalisé des expériences de réduction *in vitro* des sulfites par l'enzyme « sulfite reductase dissimilatrice » qui leur ont permis de calculer un fractionnement isotopique entre sulfites et sulfures de -15,3 ‰ (Leavitt *et al.*, 2015). Cette valeur est bien inférieure aux estimations précédentes de -25 et -53 ‰, mais les auteurs avancent qu'elle est très proche de la médiane des valeurs publiées (-16,1 ‰, n = 648) pour le fractionnement isotopique entre les sulfures et les sulfates/sulfites pour des expériences de cultures en laboratoire. Leavitt *et al.* (2015) suggèrent donc un rôle fondamental de cette enzyme dans la détermination du fractionnement isotopique du soufre.

Ainsi le nombre d'étapes constituant le mécanisme réactionnel de réduction des sulfates par les bactéries influence également la valeur du fractionnement isotopique, puisque chaque étape peut elle-même conduire à un fractionnement isotopique.

Bien que quelques études se soient intéressées à la mesure du fractionnement isotopique entre intermédiaires de réactions et sulfures, dans la plupart des cas, seul le fractionnement entre les sulfates et les sulfures a été mesuré (Leavitt *et al.*, 2015, 2014; Smock *et al.*, 1998).

De nombreuses recherches ont été menées sur le mécanisme réactionnel et le fractionnement isotopique du soufre de la SRB et les résultats ne sont pas toujours concordants. Ceci reflète la complexité du processus et la diversité des facteurs susceptibles d'influencer le fractionnement isotopique produits par la SRB. La compréhension de la SRB nécessite une étude systématique des facteurs influençant le fractionnement isotopique avec plusieurs espèces de bactéries sulfato-réductrices génétiquement diverses.

2.3.3. L'oxydation des espèces soufrées

Le nombre d'études du fractionnement isotopique du soufre lors des réactions d'oxydation biotiques ou abiotiques est relativement faible par rapport aux études concernant les bactéries sulfato-réductrices, probablement à cause de la complexité des différents processus de réaction et de la réactivité

élevée des produits de valence intermédiaire (Zerkle et al., 2016). Une autre raison est que, généralement, le fractionnement isotopique est faible (Tableau 1-3) et a parfois été considéré comme négligeable par rapport à celui de la SRB. Par exemple, l'oxydation par les bactéries photosynthétiques ou chimiotrophiques des sulfures en soufre élémentaire et de ce dernier en sulfates conduisent à un fractionnement isotopique négligeable.

Dans l'étude de Kaplan et Rittenberg (1964), l'oxydation des sulfures par des bactéries chimiotrophes a produit des sulfates appauvris en ^{34}S , jusqu'à -18 ‰ et des polythionates enrichis en ^{34}S , jusqu'à +19 ‰ (Tableau 1-3), mais ceux-ci constituaient des produits mineurs comparés au soufre élémentaire produit au cours de la même réaction avec un fractionnement entre -2,5 et +1,2 ‰. Le principal problème du fractionnement isotopique du soufre par les bactéries sulfo-oxydantes est qu'il ne semble pas systématique. En effet, selon les différentes études, une même réaction peut conduire à un enrichissement ou à un appauvrissement en ^{34}S , ou encore ne pas générer de fractionnement isotopique (Tableau 1-3). Par exemple, pour l'oxydation du soufre élémentaire en aérobie par la bactérie chimiotrophe *Thiobacillus thiooxidans*, certains auteurs ont observé un enrichissement en ^{34}S des sulfates (jusqu'à +1,4 ‰) (Kaplan and Rafter, 1958; Kaplan and Rittenberg, 1962), alors que d'autres auteurs ont observé un appauvrissement en ^{34}S des sulfates (jusqu'à -1,7 ‰) (Jones and Starkey, 1957; McCready and Krouse, 1982). Pour l'oxydation abiotique des sulfures par l'oxygène, un appauvrissement en ^{34}S a été observé, mais là encore les études sont peu nombreuses (Tableau 1-3).

Contrairement à la SRB les mécanismes réactionnels et les voies métaboliques d'oxydation sont peu caractérisés, en outre, l'influence des paramètres environnementaux sur le fractionnement isotopique n'est pas quantifiée, des études supplémentaires s'avèrent donc nécessaires.

2.3.4. La dismutation bactérienne des espèces sulfurées de valence intermédiaire

Le fractionnement isotopique associé à la dismutation du soufre élémentaire a été étudié pour diverses cultures pures et cultures d'enrichissement à partir d'échantillons de sédiments marins et d'eaux douces (Canfield et al., 1998; Habicht et al., 1998; Böttcher and Thamdrup, 2001; Böttcher et al., 2005). Néanmoins, là encore les études sont beaucoup moins nombreuses que pour la SRB. La dismutation bactérienne du soufre élémentaire, des thiosulfates ou des sulfites donne lieu à la production de sulfates et de sulfures. Contrairement aux réactions d'oxydation, la dismutation du soufre, quelle que soit l'espèce, induit un fractionnement isotopique du soufre significatif et systématique (Tableau 1-4). La dismutation produit des sulfates enrichis en ^{34}S et des sulfures appauvris en ^{34}S . C'est pourquoi les fractionnements isotopiques de -47 à -75 ‰ observés dans l'environnement (Figure 1-7) ne pouvant être expliqués seulement par la sulfato-réduction bactérienne ont été attribués à une combinaison de cette dernière à des réactions de dismutation (Jørgensen, 1990b; Canfield and Thamdrup, 1994; Johnston et al., 2005; Finster, 2008).

Soufre élémentaire

D'après Thamdrup *et al.* (1993), la dismutation du soufre élémentaire nécessite un apport d'énergie pour se réaliser sauf si la concentration en sulfures dans le milieu est maintenue faible (<1 mmol/L), la réaction peut alors générer une énergie suffisante pour soutenir la croissance des bactéries. En conséquence, les cultures sont généralement enrichies en oxyhydroxydes de fer (III) (FeOOH) qui maintiennent la concentration de sulfures à de faibles niveaux par précipitation. Le problème est que les oxydes de fer peuvent également oxyder les sulfures formés lors de la dismutation et former du soufre élémentaire supplémentaire (Canfield *et al.*, 1998). Le fractionnement isotopique observé ne représente donc pas nécessairement le fractionnement spécifique de la dismutation. La valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates et des sulfures dépend alors de la quantité de S^0 qui est à nouveau dismutée.

Dans les différentes études menées, la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ du soufre élémentaire n'a pas varié significativement, par conséquent il n'y a pas d'utilisation préférentielle de $^{34}\text{S}^0$ ou $^{32}\text{S}^0$ (Tableau 1-4). Le fractionnement isotopique pour 2 souches pures et 8 cultures d'enrichissement en présence de fer était compris dans une gamme de +16,4 à +20,6 ‰ pour les sulfates et de -6,9 à -5,5 ‰ pour les sulfures (Canfield *et al.*, 1998; Böttcher and Thamdrup, 2001). Il semble donc qu'il n'y ait pas de différence significative entre espèces comme pour la SRB. Seule la souche *Desulfobulbus propionicus* produit un fractionnement isotopique significativement différent, équivalent à deux fois ceux des autres cultures (Tableau 1-4). Canfield *et al.* (1998) supposent que cette souche utilise un mécanisme de dismutation différent des autres souches. Les fractionnements isotopiques des sulfates sont 3 fois plus grands (en valeur absolue) que ceux des sulfures, ce qui reflète la stœchiométrie de la réaction (Équation 1-5). Le fractionnement mesuré par Böttcher *et al.* (2001) en présence de MnO_2 est bien plus faible (Tableau 1-4). Böttcher et Thamdrup (2001) attribuent cette différence à une ré-oxydation des sulfures en sulfates par MnO_2 . Ceci peut avoir des implications pour les environnements à fortes concentrations de manganèse.

Thiosulfates

La dismutation des thiosulfates par des bactéries cultivées en laboratoire a conduit à la formation de sulfures appauvris en ^{34}S par rapport au soufre externe des thiosulfates (celui n'étant pas lié aux atomes d'oxygène, S-SO_3^-) (Tableau 1-4). L'ampleur de cet appauvrissement a cependant varié considérablement entre les études de Habicht *et al.* (1998) et de Cypionka *et al.* (1998). Cette variation reflète des conditions expérimentales différentes, en effet dans la première étude, les sulfures s'accumulaient dans le milieu de culture, tandis que dans la seconde, les sulfures étaient purgés activement du milieu de culture. De même, les sulfates produits ont été enrichis en ^{34}S par rapport au soufre interne des thiosulfates (S-SO_3^-) initiaux, dans la première étude, alors qu'ils ont été appauvris en ^{34}S dans la seconde étude. Il semble donc que les paramètres environnementaux puissent conditionner l'expression du fractionnement isotopique du soufre lors de la dismutation bactérienne des thiosulfates.

Mais, à ce jour, les facteurs environnementaux pouvant influencer le fractionnement isotopique lors de cette réaction n'ont pas été étudiés.

Sulfites

La dismutation des sulfites, pour 2 souches pures, génère un fractionnement isotopique élevé, particulièrement pour les sulfures ainsi formés qui sont appauvris en ^{34}S jusqu'à -45 ‰ alors que les sulfates sont enrichis jusqu'à +12 ‰ (Tableau 1-4). Le rapport de 3 entre le fractionnement des sulfates et celui des sulfures est cohérent avec la stœchiométrie de la réaction (Équation 1-3). Habicht *et al.* (1998) et Johnston *et al.* (2005) ont étudiés les deux mêmes souches et ils ont obtenu des résultats du même ordre de grandeur, avec une différence de 11-23 ‰ pour le fractionnement isotopique entre les sulfites et les sulfures et de 0,4-4 ‰ pour le fractionnement isotopique entre les sulfites et les sulfates entre les deux souches. Contrairement à la dismutation du soufre élémentaire, il semble donc que la nature de la souche influence le fractionnement isotopique. Habicht *et al.* (1998) suggèrent que les fractionnements augmentent avec la diminution des taux (vitesse) de dismutation des sulfites. Toutefois, le nombre de données étant très faible, cette hypothèse nécessite d'autres expériences pour être confirmée. Une tendance similaire a été observée pendant la réduction bactérienne des sulfates mais n'a pas été systématique. Par ailleurs, lors de la dismutation élémentaire du soufre, aucune relation entre le fractionnement et le taux de dismutation n'a été trouvée.

Tableau 1-3 : Fractionnements isotopiques du soufre lors de l'oxydation des sulfures, des sulfites, des thiosulfates et du soufre élémentaire lors d'expériences en laboratoire. Modifié à partir de (Canfield, 2001), (Rickard, 2012) et (Zerkle et al., 2016). $^{34}\epsilon_{P-R}$ représente le fractionnement isotopique du soufre entre le réactif et le ou les produits.

| Processus | Réactions | $^{34}\epsilon_{P-R}$ (‰) | Références |
|---|---|---|--|
| Photosynthétique anaérobie | $H_2S \rightarrow S^0$ | 0 à +3 | (Chambers and Trudinger, 1979; Fry et al., 1984, 1988a) |
| | $S^0 \rightarrow SO_4^{2-}$ | -3,3 à +0,4 | (Kaplan and Rittenberg, 1964; Fry et al., 1984, 1988a; Zerkle et al., 2009) |
| | $H_2S \rightarrow S^0 + SO_4^{2-} + S_nO_6^{2-}$ | S^0 : -10 à -3,6 SO_4^{2-} : -2,9 à +0,9 | (Kaplan and Rittenberg, 1964) |
| | $S_2O_3^{2-} \rightarrow S^0 + SO_4^{2-}$ | 0 | (Fry et al., 1985) |
| | $SO_3^{2-} \rightarrow SO_4^{2-}$ | -5,5 à +5 (fin - début de réaction) | (Fry et al., 1985) |
| Chimiotrophique avec O_2 | $H_2S \rightarrow S^0$ | -2,5 à +1,2 | (Kaplan and Rittenberg, 1964) |
| | $H_2S \rightarrow S_nO_6^{2-}$ | +0,6 à +19 | (Kaplan and Rittenberg, 1964) |
| | $H_2S \rightarrow SO_4^{2-}$ | -18 à -10,5 | (Kaplan and Rittenberg, 1964) |
| | $S^0 \rightarrow SO_4^{2-}$ | -2,2 à +1,4 | (Jones and Starkey, 1957; Kaplan and Rafter, 1958; Kaplan and Rittenberg, 1962; McCready and Krouse, 1982; Fry et al., 1986; Balci et al., 2012) |
| | $S_2O_3^{2-} \rightarrow SO_4^{2-}$ | -5,8 à +4,6 | (Fry et al., 1985, 1986; Kelly, 2008; Alam et al., 2013) |
| | $SO_3^{2-} \rightarrow SO_4^{2-}$ | 0 | (Fry et al., 1986) |
| Chimiotrophique anaérobie avec NO_3^- | $H_2S \rightarrow S^0$ | 0 | (Hubert et al., 2009) |
| | $H_2S \rightarrow SO_4^{2-}$ | -4,3 à -1,3 | (Poser et al., 2014) |
| | $S^0 \rightarrow SO_4^{2-}$ | -2 | (Hubert et al., 2009) |
| Abiotique avec O_2 | $H_2S \rightarrow SO_4^{2-} + SO_3^{2-} + S_2O_3^{2-}$ (pH 9,8 – 11) (SO_4^{2-} produit principal) | -6,3 à -4 | (Fry et al., 1988b; Eldridge and Farquhar, 2018) |
| | $H_2S \rightarrow S^0$ (pH 8,2) | -7,5 à -4 | (Fry et al., 1988b) |
| | $SO_3^{2-} \rightarrow SO_4^{2-}$ | -0,6 à -0,3 | (Fry et al., 1985) |

Tableau 1-4 : Fractionnements isotopiques du soufre lors de la dismutation des sulfites, des thiosulfates et du soufre élémentaire lors d'expériences en laboratoire avec différentes souches pures ou cultures d'enrichissement d'eaux douces et marines. $^{34}\epsilon_{R-SO_4^{2-}}$ et $^{34}\epsilon_{R-H_2S}$ représentent respectivement le fractionnement isotopique du soufre entre le réactif et les sulfates et entre le réactif et les sulfures. Pour les thiosulfates, pour $^{34}\epsilon_{R-SO_4^{2-}}$ R représente le soufre interne de la molécule ($-SO_3^-$) et pour $^{34}\epsilon_{R-H_2S}$ R représente le soufre externe ($-S-$). A : Souche pure, B : Culture d'enrichissement, C : Souche *Desulfobulbus propionicus*. n.d. : non disponible.

| Espèce dismutée | Culture | Oxydant | $^{34}\epsilon_{R-SO_4^{2-}}$ (‰) | $^{34}\epsilon_{R-H_2S}$ (‰) | Références |
|---|---------|-----------------------|--------------------------------------|---------------------------------|---|
| S ⁰ | A, B | Fe(III)OOH | +16,4 à +20,6 | -6,9 à -5,5 | (Canfield et al., 1998) |
| S ⁰ | A, B | Fe(III)OOH | +16,8 | -4,1 | (Böttcher and Thamdrup, 2001) |
| S ⁰ | A, B | Fe(II)CO ₃ | +18,4 | -3,7 | (Böttcher and Thamdrup, 2001) |
| S ⁰ | A, B | Mn(IV)O ₂ | -0,6 à +2,0 | n.d. | (Böttcher et al., 2001) |
| S ⁰ | C | Fe(III)OOH | +33,9 | -11,3 | (Canfield et al., 1998) |
| S ⁰ | C | Fe(III)OOH | +16,0 à +28,4 | n.d. | (Böttcher et al., 2005) |
| S ⁰ | C | Fe(II)CO ₃ | +34,4 à +35,5 | n.d. | (Böttcher et al., 2005) |
| S ₂ O ₃ ²⁻ | A | - | +0,6 à +2,5 | -3,2 à -0,7 | (Habicht et al., 1998) |
| S ₂ O ₃ ²⁻ | B | - | +5,0 à +12,7 | -11,8 à -4,7 | (Habicht et al., 1998) |
| S ₂ O ₃ ²⁻ | A | - | -4 | -20 | (Cypionka et al., 1998) |
| SO ₃ ²⁻ | A | - | +6,9 à +12,0 | -45,2 à -20,5 | (Habicht et al., 1998; Johnston et al., 2005) |

Les fractionnements isotopiques déterminés pour les processus physico-chimiques et biologiques lors d'expérience de laboratoire servent de base de données pour identifier les dits processus dans l'environnement. La sulfato-réduction bactérienne est le processus principal conduisant à un fractionnement isotopique entre les sulfures et les sulfates. Les mesures de rapports isotopiques du soufre peuvent donc être utilisées pour déceler l'occurrence de la SRB dans l'environnement. Cependant, d'autres processus tels que l'oxydation et la dismutation bactérienne sont susceptibles de modifier les valeurs de $\delta^{34}S$ des espèces du soufre. De ce fait l'isotopie, ne permet pas toujours à elle seule d'identifier et de quantifier les processus mis en jeu. La spéciation est un outil qui peut être utilisé en complément ou en combinaison de l'isotopie (analyses isotopiques par composés spécifiques) et permet une meilleure compréhension des processus se produisant dans l'environnement.

2.4. Le fractionnement isotopique et la spéciation : Outils d'identification des processus physico-chimiques et biologiques dans l'environnement

Plusieurs auteurs ont mis en évidence que les processus du cycle du soufre peuvent être identifiés à l'aide de la détermination des valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ et d'analyse de spéciation, pour des écosystèmes particuliers (Kamyshny et al., 2011; Szykiewicz et al., 2012; Einsiedl et al., 2015; Stefánsson et al., 2015; Gilhooly III et al., 2016). Par exemple, Einsiedl *et al.* (2015) ont utilisé des mesures de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates, des sulfures et du soufre élémentaire en combinaison à des analyses de spéciation des espèces du soufre de valence intermédiaire et en particulier les sulfites, les thiosulfates et le soufre élémentaire pour comprendre le lien entre le cycle du soufre (SRB et ré-oxydation) et la biodégradation des composés aromatiques dans un aquifère poreux. Les auteurs ont montré que les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates diminuaient parallèlement à l'augmentation de la concentration en sulfates et à la diminution de la concentration en contaminants (BTEX) sur un profil de profondeur. Sur la base des fractionnements isotopiques entre sulfures et sulfates de -29 ‰ dans la partie supérieure et de -40 ‰ dans la partie inférieure du panache les auteurs ont suggéré l'occurrence de phénomènes distincts dans ces deux zones. Les auteurs ont remarqué que cette dernière valeur correspond à celle mesurée dans une culture de bactéries sulfato-réductrices avec du toluène comme donneur d'électrons. Les auteurs ont suggéré que les valeurs élevées de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates et les concentrations observées d'intermédiaires très réactifs tels que les sulfites, ainsi que la présence de bactéries sulfato-réductrices fournissent des preuves solides de la coexistence de SRB et de processus de ré-oxydation abiotiques du soufre dans le profil de profondeur, en particulier dans la partie inférieure du panache. Cette partie de l'aquifère étant exempte d'oxygène dissous, les auteurs suggèrent que des intermédiaires de soufre se forment lors de la ré-oxydation des sulfures avec des oxydes de fer. Cette hypothèse est renforcée par le fait que des valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ similaires pour le soufre élémentaire et les sulfures ont été mesurées dans cette zone, ce qui est représentatif d'une oxydation abiotique des sulfures par des oxydes de fer. Les mesures de spéciation couplées aux données isotopiques ont donc permis à Einsiedl *et al.* (2015) d'obtenir des informations clés sur les processus mis en jeu dans cet aquifère contaminé. Cette étude rend compte de la complexité de l'interprétation des mesures de $\delta^{34}\text{S}$ réalisées sur des échantillons réels et de la difficulté d'identifier les processus (SRB, ré-oxydation biotique ou abiotique, dismutation, précipitation), qui caractérisent un écosystème.

Pour interpréter avec fiabilité les mesures de rapports isotopiques, il apparaît nécessaire de connaître les mécanismes réactionnels responsables du fractionnement isotopique et l'influence des paramètres biologiques et environnementaux sur ces mécanismes et par extension sur le fractionnement isotopique. Ainsi le fractionnement isotopique du soufre dans l'environnement soulève un certain nombre de questions auxquelles il faut répondre pour interpréter correctement les données de rapports isotopiques. Le système est-il fermé ou soumis à des flux entrants ou sortants ? Quels sont les mécanismes générant le fractionnement mis en jeu ? Quelle est la cinétique de la réaction ? Aussi lors

de transformations chimiques ou biologiques, il apparaît déterminant de prendre en compte la spéciation du soufre et de déterminer la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des différentes espèces pour comprendre le processus mis en jeu. En effet, il a été mis en évidence par différentes études que les espèces de valence intermédiaire peuvent jouer un rôle prépondérant dans le cycle du soufre (Jørgensen, 1990a; Thamdrup et al., 1994; Zopfi et al., 2004; Kamyshny et al., 2011, 2014; Balci et al., 2017), mais leur concentration peut être de l'ordre de quelques $\mu\text{mol/L}$ (Kamyshny et al., 2011, 2014; Einsiedl et al., 2015). La difficulté réside dans la capacité à mesurer avec précision les rapports isotopiques des différentes espèces soufrées présentes dans un échantillon.

Synthèse de l'étude de l'isotopie du soufre dans l'hydrosphère

Le cycle du soufre dans l'hydrosphère implique de nombreuses réactions de réduction, oxydation et dismutation qui sont majoritairement le fruit de l'activité bactérienne et conduisent à un fractionnement isotopique du soufre.

La réduction des sulfates conduit à un appauvrissement en ^{34}S des sulfures et un enrichissement en ^{34}S des sulfates. Un grand nombre de paramètres biologiques et environnementaux influence le fractionnement isotopique induit par la SRB qui varie par conséquent entre 0 et -75 ‰. La relation entre le fractionnement isotopique et les facteurs biologiques (génétique) et environnementaux (concentration et nature du donneur d'électrons, concentration en sulfates, température) nécessite d'être étudiée en détails pour pouvoir interpréter les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ mesurées dans l'environnement.

Les sulfures produits par SRB sont en grande partie ré-oxydés par des réactions biologiques et dans une moindre mesure par des réactions abiotiques. Ces réactions conduisent à la formation d'espèces intermédiaires tels que les sulfites, les thiosulfates et le soufre élémentaire qui peuvent à leur tour être oxydées. Les oxydations peuvent conduire à un enrichissement ou à un appauvrissement en ^{34}S des produits. Le fractionnement isotopique associé aux oxydations est beaucoup plus faible que celui de la SRB et ne semble pas systématique. Les espèces intermédiaires peuvent également être dismutées en sulfates et sulfures. Ceci conduit généralement à un enrichissement en ^{34}S des sulfates et un appauvrissement en ^{34}S des sulfures ; contrairement aux oxydations les fractionnements isotopiques sont systématiques et varient peu. Les réactions d'oxydation et de dismutation n'ont été que peu étudiées et nécessitent de plus amples recherches afin de caractériser le fractionnement isotopique qu'elles génèrent.

Les mesures de $\delta^{34}\text{S}$ dans les compartiments aquatiques permettent de déterminer et de quantifier les sources de soufre dans les systèmes où le cycle du soufre demeure relativement simple. Dans les systèmes plus complexes où les réactions biochimiques sont plus nombreuses, les mesures de $\delta^{34}\text{S}$ et de spéciation permettent d'identifier quels sont les processus qui ont lieu.

La détermination des valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des espèces de valence intermédiaire permet une meilleure compréhension du réseau de réactions se déroulant dans un écosystème aquatique. Cependant, ces analyses ne sont pas systématiques et constituent un manque d'information pour l'interprétation des processus du cycle du soufre dans l'hydrosphère.

3. Stratégies d'analyses isotopiques

Connaître le fractionnement isotopique du soufre en fonction de sa spéciation est important pour comprendre les processus mis en jeu dans le cycle du soufre comme montré précédemment (paragraphe 2). Pour cela des méthodes permettant d'obtenir à la fois des informations sur la spéciation du soufre et sur l'isotopie sont nécessaires. Lorsqu'une ou plusieurs molécules cibles présentes dans un échantillon sont isolées et analysées, on parle d'analyse isotopique par composé spécifique (CSIA : *Compound Specific Isotope Analysis*). Il existe différentes stratégies analytiques (préparation d'échantillon et analyse) pour la mesure de rapport isotopique du soufre qui sont choisies essentiellement selon la nature de l'échantillon (solide, liquide ou gazeux) et les informations désirées ($\delta^{34}\text{S}$ et/ou $\Delta^{33}\text{S}$ et/ou $\Delta^{36}\text{S}$, spéciation, résolution spatiale, ...). La Figure 1-8 présente les différents outils analytiques permettant des mesures de rapports isotopiques du soufre. Les méthodologies sont présentées (de haut en bas) selon la nature de l'échantillon, les informations requises en supplément des valeurs de $\delta^{34}\text{S}$, les procédures d'extraction, puis les préparations d'échantillon ou les méthodes séparatives, le gaz analysé lorsque cela s'applique et enfin la détection. Dans la partie gauche, sont présentées les méthodes pour lesquelles un spectromètre de masse à rapports isotopiques (IRMS) est utilisé. L'IRMS est un spectromètre à source gazeuse, c'est-à-dire que l'échantillon doit être introduit sous forme gazeuse (SO_2 ou SF_6). La conversion de l'échantillon en gaz peut se faire hors ligne, dans ce cas un système de valves appelé *Dual-Inlet* est utilisé pour l'introduction du gaz dans l'IRMS (DI-IRMS). Les techniques où la conversion de l'échantillon en gaz est réalisée en ligne sont dites à flux continu (CF-IRMS). Bien que des couplages entre la chromatographie liquide (LC) ou gazeuse (GC) et l'IRMS existent pour C, N, O, H, ce type de couplage n'est à ce jour pas possible pour le soufre, la difficulté réside dans la mise en place d'une interface permettant la conversion en continu des analytes en gaz. L'IRMS ne permet donc pas de faire des analyses CSIA en ligne pour le soufre, mais une extraction séquentielle permet des analyses CSIA hors-ligne. Le couplage entre ablation laser et l'IRMS, *via* une interface permettant la conversion de l'analyte en SF_6 , permet d'obtenir des informations de résolution spatiale. Ce même type d'informations peut être obtenu par un couplage entre une ablation laser et un spectromètre de masse à plasma à couplage inductif multicollecteur (MC-ICP-MS) ou par spectromètre de masse d'ionisation secondaire (SIMS). Le MC-ICP-MS permet l'analyse directe d'échantillons liquides et le couplage avec la chromatographie gazeuse ou la chromatographie liquide et il est donc adapté pour des analyses CSIA en ligne. Dans cette partie, les différentes stratégies d'analyse pour les mesures de rapports isotopiques du soufre sont discutées et plus particulièrement les méthodes permettant l'analyse isotopique de composés spécifiques en phase aqueuse.

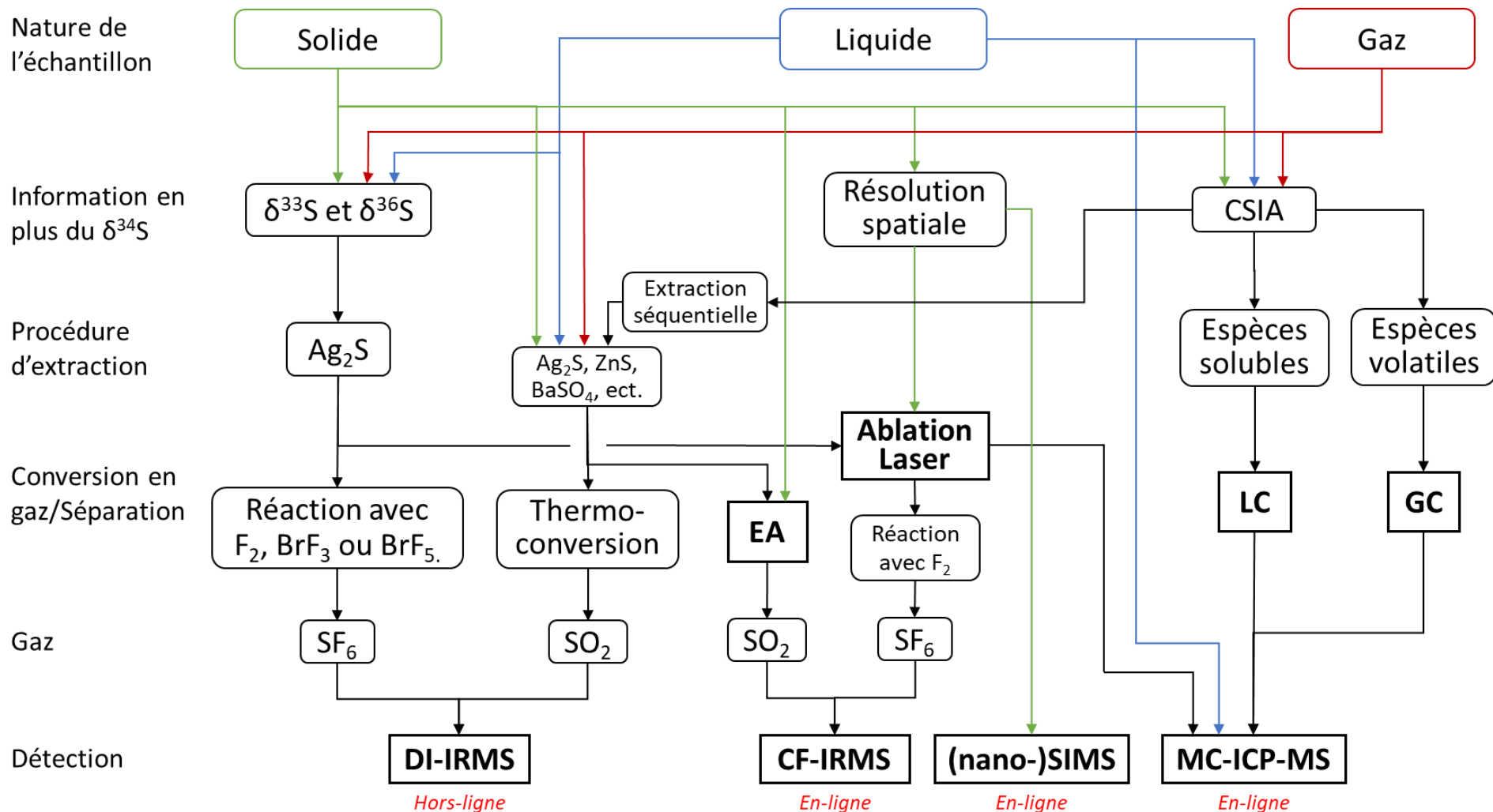


Figure 1-8 : Organigramme résumant les techniques d'analyse isotopique du soufre. Les flèches vertes s'appliquent aux échantillons solides, les bleues aux liquides, les rouges aux gaz et les noires à tout type d'échantillons. Les instruments d'analyse sont en gras. Les techniques de préparation et d'analyse sont décrites plus en détail dans le texte. IRMS : Spectromètre de masse à rapport isotopique, EA : Analyseur Élémentaire, DI : Dual-Inlet, CF : Flux continu, SIMS : Spectromètre de masse à ionisation secondaire, MC-ICP-MS : Spectromètre de masse à plasma à couplage inductif multicollecteur, CSIA : Analyse isotopique par composé spécifique, LC : Chromatographie liquide, GC : Chromatographie gazeuse.

3.1. Analyse par spectromètre de masse à rapport isotopique (IRMS)

Le spectromètre de masse à rapport isotopique (IRMS) permet de mesurer des rapports isotopiques dans un échantillon gazeux (Figure 1-9). Il est constitué d'une source d'ionisation, d'un secteur magnétique et d'un collecteur multiple (cages de Faradays). Les molécules de gaz sont introduites dans la source d'ionisation où elles sont ionisées par impact électronique grâce aux électrons émis par un filament chauffé électriquement (1,5 mA). Le faisceau ionique est focalisé par une série de lentilles et accéléré à haut voltage (3 kV), puis les ions sont séparés par le secteur magnétique selon leur rapport masse/charge (m/z). Les différents isotopologues sont détectés simultanément par les cages de Faraday, où les intensités des faisceaux d'ions sont mesurées (Révész et al., 2012). C'est l'instrument conventionnellement utilisé pour la mesure de rapports isotopiques des éléments légers et stables (C, N, S, O, H). Pour la mesure des rapports isotopiques du soufre en IRMS, la conversion de l'échantillon en gaz se fait sous la forme SO_2 ou SF_6 . Cette conversion peut être réalisée hors ligne ou en ligne selon l'appareillage utilisé et la nature de l'échantillon, ce qui peut impliquer des étapes de préparation d'échantillons plus ou moins complexes.

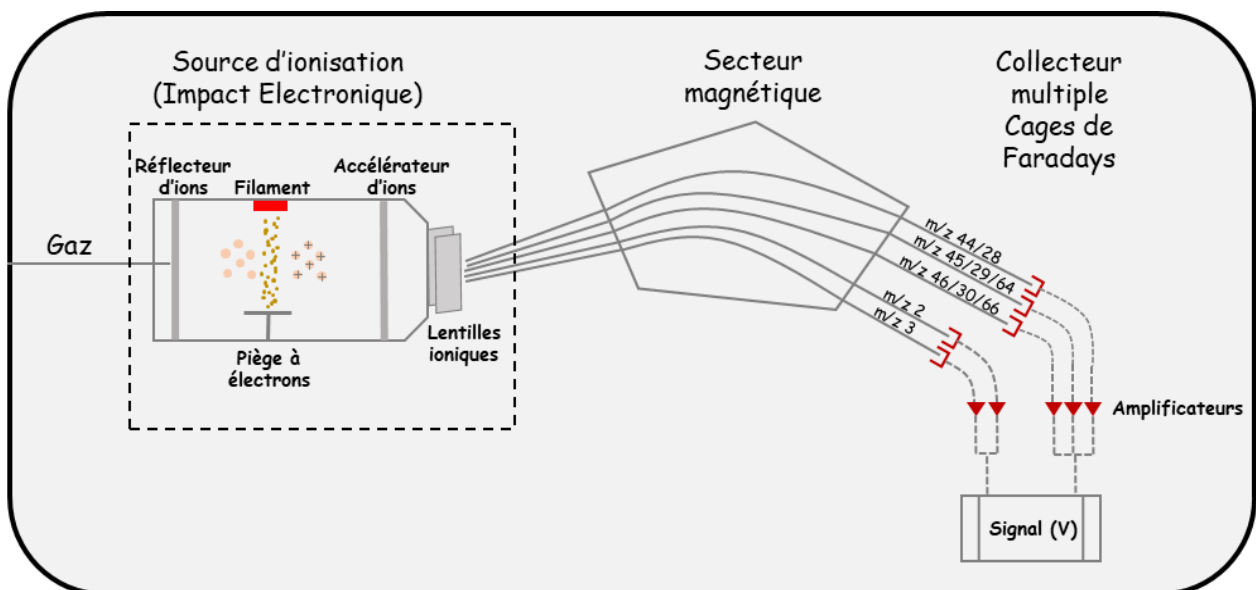


Figure 1-9 : Schéma de l'IRMS.

3.1.1. Préparation d'échantillon : Précipitation sélective d'espèces soufrées dans des échantillons liquides

Les analyses de $\delta^{34}\text{S}$ du soufre par IRMS nécessitent généralement la conversion du soufre des échantillons en un solide pur (Ag_2S ou BaSO_4 le plus souvent). Il existe différentes procédures qui dépendent de la nature de l'échantillon et vise à convertir le soufre total d'un échantillon ou à convertir sélectivement certaines espèces. Seules les techniques de préparation sélective pour les espèces dissoutes seront discutées. Les processus (précipitation, évaporation, oxydation...) mis en jeu lors de la préparation d'échantillon peuvent conduire à un fractionnement isotopique. Lors de la précipitation des sulfates, la précipitation des isotopes lourds est favorisée, un fractionnement isotopique ($< 2 \text{ ‰}$) entre les sulfates dissous dans la solution initiale et le précipité formé peut avoir lieu lorsque la réaction n'est pas totale (Holser and Kaplan, 1966; Raab and Spiro, 1991). De même, lors de l'évaporation de H_2S les isotopes légers s'évaporent préférentiellement et un fractionnement isotopique jusqu'à $2,2 \text{ ‰}$ peut avoir lieu entre H_2S dissous et gazeux (Szaran, 1996). Dans un échantillon, quelle que soit l'espèce qui est précipitée, un rendement de 100 % garantit l'absence de fractionnement isotopique entre l'analyte originellement présent dans l'échantillon et le précipité formé.

Le soufre dans les environnements aquatiques est principalement présent sous forme de sulfates et/ou de sulfures (voir paragraphe 1.2). Dans la plupart des études publiées, seules ces deux espèces (ou une des deux) sont récupérées sous forme d'un précipité avant analyse. Le soufre élémentaire est sans doute l'espèce de valence intermédiaire pour laquelle on trouve le plus de méthode d'extraction dans la littérature. Les publications décrivant des procédures de précipitation des sulfites et des thiosulfates sont bien moins nombreuses. La Figure 1-10 résume les procédures pour la précipitation sélective de ces espèces à partir d'un échantillon d'eau. Les sulfures, les sulfates et les sulfites peuvent être précipités directement (en Ag_2S , BaSO_4 et BaSO_3 respectivement) alors que les thiosulfates et le soufre élémentaire doivent subir une oxydation et une réduction, respectivement, avant d'être précipités.

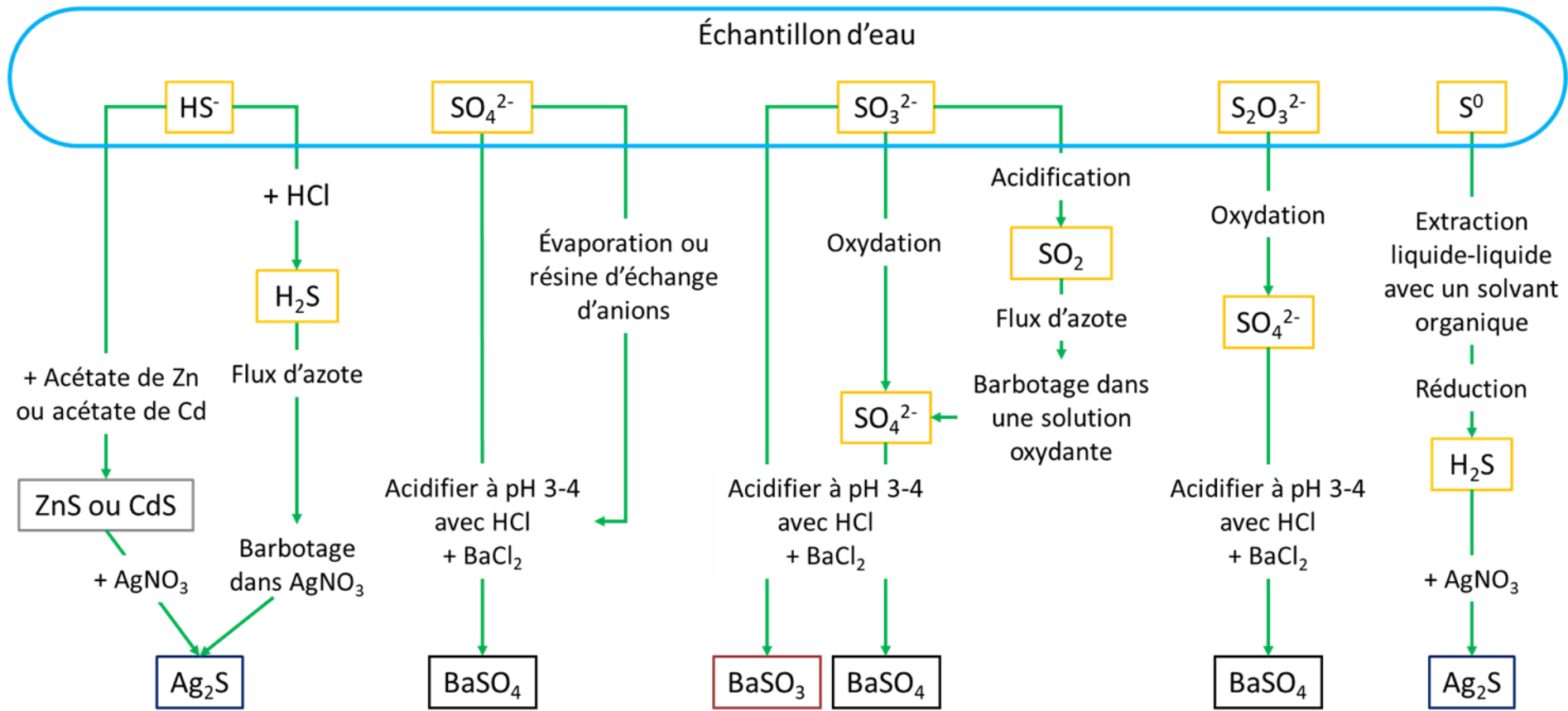


Figure 1-10 : Organigramme résumant les procédures analytiques pour la précipitation sélective de diverses espèces inorganiques du soufre provenant d'échantillons d'eau pour une analyse isotopique ultérieure par IRMS.

Les sulfates :

La précipitation des sulfates est réalisée par ajout d'une solution de BaCl_2 afin de former du BaSO_4 , insoluble dans l'eau ($K_S = 1,08 \cdot 10^{-10}$) (David R. Lide, 2007). Cependant, le baryum forme aussi un sel insoluble avec les ions carbonates ($K_S = 2,58 \cdot 10^{-9}$). Il est donc nécessaire d'ajuster le pH de l'échantillon entre 3 et 4 avec HCl puis de le porter à ébullition, de sorte que les ions carbonates soient sous la forme H_2CO_3 ($\text{pKa}(\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-) = 6,35$) pour que la réaction de dissociation $\text{H}_2\text{CO}_{3(\text{aq})} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}_{(\text{l})} + \text{CO}_{2(\text{aq})}$ se produise et que le CO_2 soit dégazé. L'acidification à un pH inférieur à 2 doit être évitée car HSO_4^- sera alors la forme dominante ($\text{pKa}(\text{HSO}_4^-/\text{SO}_4^{2-}) = 1,99$) et la précipitation de BaSO_4 sera lente. Une fois les carbonates éliminés, une solution de BaCl_2 peut être ajoutée à l'échantillon pour précipiter les sulfates. Le BaSO_4 est ensuite filtré et rincé avec de l'eau distillée chaude (afin d'enlever l'excédent de BaCl_2) puis séché dans un four à 70°C pendant une nuit. Lorsque les concentrations en sulfates sont faibles, il est nécessaire de prélever des quantités d'échantillon plus importantes afin de récupérer une quantité suffisante de BaSO_4 (au moins 20 mg d'après Carmody *et al.* (1998)). Certains auteurs ont précipité directement les sulfates à partir de grands volumes (jusqu'à 20 L) (Michalik and Migaszewski, 2012; Ishida et al., 2015). L'inconvénient est que la filtration de tels volumes est très longue. Carmody *et al.* (1998) conseillent de pré-concentrer les échantillons en utilisant une résine échangeuse d'anions lorsque la concentration en sulfates est inférieure à 20 mg/L, afin d'éviter la filtration de volumes de plus de 2 L. Carmody *et al.* (1998) ont obtenu avec une pré-concentration sur résine échangeuse d'anions et des rendements entre 81 et 98 %, des valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ non significativement différentes par rapport à une précipitation directe. L'inconvénient de cette méthode est que la récupération des sulfates n'est pas toujours totale. D'autres auteurs ont préféré pré-concentrer des échantillons de plusieurs litres d'eau par évaporation avant de précipiter les sulfates avec une solution de BaCl_2 (Brenot et al., 2007; Jenkins and Bao, 2006). Brenot *et al.* (2007) n'ont pas observé de fractionnement isotopique significatif avec cette méthode. Il semble que la méthode de pré-concentration des sulfates par évaporation soit plus avantageuse puisqu'elle n'induit pas de perte de sulfates comparée à la pré-concentration sur résine anionique.

Les sulfures :

Les sulfures subissent rapidement une oxydation s'ils sont exposés à l'oxygène de l'air (voir paragraphe 1.2.3), le challenge est donc de prévenir leur oxydation pendant le prélèvement. Deux types de procédures sont généralement employés pour collecter les sulfures, une précipitation directe ou une acidification pour que les sulfures soient sous forme de H_2S suivie d'un dégazage sous flux d'azote et d'un piégeage par barbotage (Figure 1-10). La précipitation directe peut être réalisée par ajout d'une solution d'acétate de Cd pour former CdS (Van Everdingen et al., 1982), d'acétate de Zn pour former ZnS (Rye et al., 1981) ou AgNO_3 pour former Ag_2S . Cependant, une précipitation directe des sulfures par des ions Ag^+ doit être évitée en présence d'ions halogénures (Cl^- , Br^- , I^-), ces derniers formant également un produit insoluble avec Ag. Or, cette situation représente la majorité des cas car Cl^- est

invariablement présent dans les eaux naturelles. Les précipitations avec Cd ou Zn sont donc préférées. Bolliger *et al.* (2001) ont précipité les sulfures produits lors de culture de bactéries sulfato-réductrices avec de l'acétate de Zn à 1 mol/L et ont analysé ZnS formé directement par EA-IRMS. Mais généralement, une conversion en Ag₂S est réalisée après filtration du précipité par ajout d'une solution de AgNO₃ car Ag₂S a plusieurs avantages. Il est beaucoup moins soluble que ZnS et CdS ($K_S(\text{Ag}_2\text{S}) = 8.10^{-51}$, $K_S(\text{ZnS}) = 2.10^{-25}$, $K_S(\text{CdS}) = 1.10^{-27}$) et il est plus stable, il ne s'oxyde pas en présence d'air (David R. Lide, 2007). Le zinc est généralement préféré au cadmium car il est moins toxique. Pour la conversion de ZnS à Ag₂S, Leavitt (2014) a laissé l'échantillon dans à l'obscurité pendant 1 nuit afin que la réaction soit complète. Leavitt recommande ensuite de rincer le précipité de Ag₂S obtenu avec de l'acide acétique 1 mol/L, puis de l'eau, puis NH₄OH 1 mol/L et à nouveau avec de l'eau afin de le purifier. Pour un échantillonnage rapide des sulfures dissous, Mayer et Krouse (2004) recommandent d'utiliser une précipitation directe en utilisant des récipients pré-remplis avec la solution de précipitation. Moncaster et Botrell (1991) ont décrit une méthode pour collecter les sulfures dans des échantillons de grands volumes (> 20 L) avec des concentrations faibles (< 1 mg/L). La technique implique le transfert de l'échantillon d'eau dans un grand contenant hermétique et une acidification avec HCl concentré (1 mL/L) afin que les sulfures dissous soient sous forme de H₂S. Le transfert doit être le plus rapide possible afin de minimiser l'exposition de l'échantillon d'eau à l'oxygène atmosphérique. Les sulfures sont ensuite purgés avec un flux de N₂ et entraîné dans un piège contenant une solution de AgNO₃. Pour maximiser la récupération de H₂S, la procédure de dégazage doit durer plusieurs heures, 3 h selon Carmody *et al.* (1998). Le précipité de Ag₂S est ensuite filtré et séché. Cette procédure étant très longue, Ag₂S formé n'est pas isotopiquement homogène, en effet, Ag₂S formé en début d'extraction est enrichi en ³²S par rapport à Ag₂S formé en fin d'extraction car H₂³²S est plus rapidement dégazé que H₂³⁴S (Carmody *et al.*, 1998). Par ailleurs, Carmody *et al.* (1998) rapportent que Ag₂S extrait par cette méthode conduit à des δ³⁴S inférieurs de 0,2 à 0,5 ‰ à ceux obtenus par précipitation directe, qui pourraient être imputés à une extraction incomplète. Une autre limitation de cette méthode est qu'elle implique, lors d'un échantillonnage sur site, le transport de matériel conséquent (bouteille de N₂...). La méthode de précipitation directe est donc plus facile et rapide à réaliser, cependant, la solubilité de ZnS et CdS empêche le traitement d'échantillons faiblement concentrés en sulfures et dans ce cas l'extraction par purge à l'azote est préférée.

Les sulfites :

Différentes procédures ont été développées pour la précipitation des sulfites (Figure 1-10). La plus simple repose sur l'ajout de BaCl₂ après acidification pour former BaSO₃ (Leavitt, 2014). Cette procédure est identique à celle des sulfates, de ce fait, elle n'est pas applicable en présence de sulfates car elle conduirait à leur co-précipitation. Une autre méthode consiste à oxyder les sulfites en sulfates avant leur précipitation en BaSO₄ (Harrison and Thode, 1958). Cette méthode ne semble pas avantageuse par rapport à la première puisqu'elle ajoute une étape. D'autres auteurs ont procédé à l'ajout d'acide

concentré (H_3PO_4 ou HCl) dans l'échantillon, afin de convertir les sulfites en SO_2 . Celui-ci a été bullé grâce à un flux d'azote dans une solution oxydante (H_2O_2 ou Na_2O_2) afin de former des sulfates qui sont ensuite précipités par ajout de BaCl_2 (Kemp and Thode, 1968; Fry et al., 1985). L'avantage de cette méthode c'est qu'elle permet de séparer les sulfites des sulfates comme l'on montré Fry *et al.* (1985). Cependant, ces derniers ont observé que cette méthode d'extraction des sulfites résultait en un rendement de 95% et en un appauvrissement du $\delta^{34}\text{S}$ de 0,7 ‰.

Les thiosulfates :

Pour les thiosulfates, la procédure consiste en une oxydation en sulfates, suivi de la procédure de précipitation des sulfates (Figure 1-10). Smock *et al.* (1998) ont oxydé les thiosulfates avec H_2O_2 et CuCl_2 en milieu basique (NaOH) alors que Fry *et al.* (1985) ont utilisé Na_2O_2 . Ces auteurs ne concluent pas quant à l'effet de ces procédures sur la valeur de $\delta^{34}\text{S}$.

D'autres protocoles pour oxyder les thiosulfates en sulfates existent, tels que l'ajout d'ions hypochlorites (Yokosuka et al., 1975) ou une électrolyse dans un tampon acétate (Feng et al., 1995). Mais ces protocoles n'ont pas été appliqués pour des analyses isotopiques.

Le soufre élémentaire :

Un certain nombre de méthodes a été utilisée pour extraire le soufre élémentaire d'échantillons environnementaux. Les procédures globales nécessitent un solvant organique pour extraire le soufre élémentaire de l'échantillon, puis une procédure de réduction pour convertir le soufre élémentaire extrait en sulfures. Ces derniers sont finalement précipités par ajout de AgNO_3 (Figure 1-10). Pour l'extraction liquide-liquide du soufre élémentaire, différents solvant ont été utilisés tels que le dichlorométhane, du tétrachlorométhane, de l'hexane ou encore du méthanol (Zerkle et al., 2009; Einsiedl et al., 2015; Gilhooly III et al., 2016; Kurek et al., 2018). L'utilisation de chrome (III) pour réduire le soufre élémentaire est une méthode largement adoptée (Canfield et al., 1986).

Récemment, un protocole utilisant des réactifs moins toxiques a été proposé, il repose sur l'utilisation du dithiothréitol comme agent réducteur (Kurek et al., 2018). Après extraction au méthanol, la procédure permet de réduire (rendement supérieur à 93%) le soufre élémentaire dissous sans fractionnement isotopique du soufre. Des expériences contrôles démontrent également que le dithiothréitol ne réagit pas avec les sulfates, les sulfites, la pyrite ou le soufre organique. Ce protocole semble donc prometteur.

Précipitation séquentielle :

Lorsque plusieurs espèces sont présentes dans un même échantillon, l'ordre de précipitation est d'une importance capitale, afin d'éviter des réactions parasites ou une co-précipitation de différentes espèces. Lorsque des sulfures et des sulfates sont présents simultanément, que ce soit dans des cultures de bactéries (Harrison and Thode, 1957; Kaplan and Rittenberg, 1964; Bolliger et al., 2001) ou des eaux

naturelles (Schroth et al., 2001; André et al., 2002), les sulfures étant très réactifs, ils sont précipités en premier par une des méthodes décrites précédemment et les sulfates sont ensuite précipités par ajout de BaCl_2 . Dans les différentes études, les sulfures, du fait de leur réactivité, sont toujours précipités lors de l'échantillonnage. Si seuls les sulfates sont ciblés, les sulfures doivent tout de même être éliminés pour éviter leur oxydation en sulfates. Ceci peut être réalisé par précipitation ou par acidification avec HCl et dégazage de H_2S (Fontes et al., 1989; Dogramaci et al., 2001). Le soufre élémentaire en solution aqueuse étant sous forme colloïdale, il peut co-précipiter avec les sulfures. En présence de soufre élémentaire, il est donc préférable d'extraire les sulfures par la méthode de purge à l'azote (Zerkle et al., 2009). Le soufre élémentaire peut ensuite être extrait, puis réduit et précipité en Ag_2S . Lorsque des sulfites sont présents, en absence de sulfates ils peuvent être précipités en BaSO_4 après oxydation en sulfates ou directement sous forme de BaSO_3 . Mais pour séparer les sulfites des sulfates, il est d'abord nécessaire de dégazer les sulfites sous forme de SO_2 dans une solution oxydante et où ils seront récupérés sous forme de BaSO_4 avant de précipiter les sulfates de l'échantillon. Les thiosulfates doivent être oxydés après précipitation des sulfures, des sulfates et éventuellement des sulfites (Fry et al., 1985; Smock et al., 1998).

La préparation d'échantillons liquide pour les analyses isotopiques du soufre par IRMS comporte plus ou moins d'étapes selon le nombre d'espèces soufrées à extraire. Il apparaît que l'ordre de précipitation le plus judicieux est le suivant : sulfures-soufre élémentaire-sulfites-sulfates-thiosulfates. Il sera nécessaire lors de la mise en place de tels protocoles de vérifier qu'ils ne conduisent pas un fractionnement isotopique des analytes. L'extraction de plusieurs espèces au sein d'un même échantillon représente donc une préparation d'échantillon complexe et laborieuse.

3.1.2. Détection

Après avoir été précipitées selon l'un des méthodes décrites précédemment, les rapports isotopiques des espèces soufrées peuvent être mesurés selon différentes méthodes. Elles se différencient principalement par la forme sous laquelle le soufre est analysé (SO_2 ou SF_6) et par le mode de conversion de l'échantillon sous forme de gaz qui peut être hors ligne (DI-IRMS) ou en ligne (CF-IRMS).

3.1.3. Analyse par DI-IRMS

Le dual-inlet (DI) est un système d'introduction de gaz pour l'IRMS qui permet, grâce à un assemblage de valves, de mesurer à pression constante et à courant constant, alternativement un gaz de référence et le gaz produit à partir d'un échantillon. Le gaz à analyser est introduit directement dans la source d'ionisation de l'IRMS. Avec ce système les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ sont généralement calculées par *Sample-Standard-Bracketing*, c'est-à-dire que le gaz de référence est analysé avant et après l'échantillon et la moyenne des rapports isotopiques mesurés pour le gaz de référence est utilisée pour calculer $\delta^{34}\text{S}$ de l'échantillon (Mayer and Krouse, 2004). La mesure de l'intensité pour chaque isotope est ici statique (par opposition à un signal transitoire, voir EA-IRMS paragraphe 3.1.4), ceci permet d'obtenir plusieurs

valeurs pour un même échantillon. Dans cette méthode, l'échantillon à analyser doit être transformé en gaz avant analyse, soit en SO₂ soit en SF₆, ce qui représente une étape de préparation d'échantillon supplémentaire.

Conversion et analyse de l'échantillon sous forme de SO₂

La pratique la plus commune pour déterminer la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ d'un échantillon consiste à le convertir en SO₂ et à mesurer le rapport isotopique 66/64 sur l'ion SO₂⁺ dans un IRMS. Comme vu précédemment le soufre des échantillons est le plus généralement précipité sous forme de Ag₂S ou BaSO₄. Il existe différentes méthodes (Mayer and Krouse, 2004) pour convertir (hors-ligne) Ag₂S ou BaSO₄ en SO₂ afin de réaliser des analyses par DI-IRMS. Ces méthodes consistent généralement en une combustion à haute température (> 800 °C) en présence d'oxygène ou d'un composé donneur d'oxygène. En voici deux exemples : la combustion de Ag₂S peut être réalisée en le mélangeant à du pentoxyde de vanadium (4,25/10) dans un vial en quartz sous-vide et en chauffant celui-ci à 1000 °C pendant 90 secondes afin de produire le SO₂ (Giesemann et al., 1994). La méthode de Yanagisawa et Sakai (1983) permet de décomposer le BaSO₄ en SO₂, en le mélangeant à du V₂O₅-SiO₂ (1/10/10) et en chauffant à 900-950 °C. Le dioxyde de soufre (SO₂) produit est ensuite introduit dans le spectromètre de masse de rapports isotopiques grâce au système dual-inlet, puis ionisé en SO₂⁺, ³²S¹⁶O₂ et ³⁴S¹⁶O₂ sont séparés par le champ magnétique et collectés par les cages de Faradays.

L'inconvénient majeur de cette méthode est qu'elle comporte de nombreuses étapes de préparation qui requièrent une quantité importante d'échantillon (3-7 mg de soufre), prennent beaucoup de temps (4h30 selon le protocole suivi par Giesemann *et al.* (1994)) et peuvent conduire à un fractionnement isotopique en cas de réaction incomplète. De plus, SO₂ est un gaz visqueux, il s'adsorbe facilement sur les surfaces et particulièrement lorsque qu'il y a des traces d'eau, ce qui le rend difficile à évacuer de la ligne d'entrée du spectromètre de masse et peut conduire à des effets mémoires (Rees, 1978). D'autre part, des interférences sont causées par les isotopes 17 et 18 de l'oxygène (³²S¹⁶O¹⁸O interfère avec ³⁴S¹⁶O₂), ce qui empêchent notamment de mesurer les abondances isotopiques de ³³S et ³⁶S (³²S¹⁶O¹⁷O interfère avec ³³S¹⁶O₂ ; ³⁴S¹⁶O¹⁸O avec ³⁶S¹⁶O₂) (Rees, 1978). De plus, pour calculer $\delta^{34}\text{S}$ à partir du rapport 66/64 mesuré dans l'IRMS, l'interférence de ³²S¹⁶O¹⁸O sur ³⁴S¹⁶O₂ à m/z = 66 doit être corrigée (Dunn and Carter, 2018). L'approche la plus courante consiste à éviter cette correction, en veillant à ce que les rapports isotopiques de l'oxygène du SO₂ des matériaux de référence et des échantillons d'une même séquence d'analyses soient identiques. Ceci implique des conditions de conversion constante (Fritz et al., 1974; Robinson and Kusakabe, 1975), c'est pourquoi il est souvent préféré de convertir les échantillons en Ag₂S avant de produire SO₂ par oxydation. Les incertitudes de cette méthode sont généralement de 0,1-0,2 ‰ (Fritz et al., 1974; Robinson and Kusakabe, 1975; Thode et al., 1961). Cette méthode est de moins en moins utilisée et remplacée par l'EA-IRMS (paragraphe 3.1.4).

Conversion et analyse de l'échantillon sous forme de SF₆

Une autre technique consiste à convertir le soufre de l'échantillon en SF₆, il existe différents protocoles permettant de réaliser cette synthèse, qui se différencient principalement au niveau de la source de fluor utilisée (F₂, BrF₃ ou BrF₅). Les différentes techniques consistent à faire réagir un échantillon de soufre sous forme de sulfures (généralement Ag₂S) avec du F₂, du BrF₃ ou du BrF₅ en excès, puis à chauffer à 200 °C pendant 3 h (Johnston et al., 2005), 200 °C pendant 12 h (Puchelt et al., 1971) et à 300 °C pendant 16 h (Thode and Rees, 1971) respectivement. Le gaz SF₆ est ensuite séparé du réactif en excès et d'autres impuretés par une série de distillations à partir de pièges cryogéniques puis par chromatographie gazeuse ; enfin SF₆ est collecté dans un piège refroidi à l'azote liquide et transféré dans un tube. La méthode utilisant F₂ est la plus simple à mettre en œuvre puisque la température et le temps de réaction sont inférieurs aux autres méthodes, cependant BrF₃ est un composé moins dangereux. Ces méthodes permettent l'analyse d'échantillons à partir de 0,4 mg de soufre.

Récemment, un protocole de fluoration flash dans un pyrolyseur à Point de Curie a été mis au point par Ueno *et al.* (2015). L'échantillon sous forme de Ag₂S réagit avec du CoF₃ à 590 °C pendant 5 s. Le gaz SF₆ produit est purifié comme dans les méthodes précédentes. Avec cette procédure les analyses sont possibles à partir de 50 µg de Ag₂S soit 6,5 µg de soufre. Cette méthode est très rapide par rapport aux méthodes précédentes et permet l'analyse de quantités de soufre bien plus faibles.

Pour l'analyse isotopique, SF₆ est introduit dans l'IRMS *via* le système dual-inlet. Ce sont les ions SF₅⁺ qui sont détectés, aux masses 127, 128, 129 et 131, ce qui nécessite un IRMS avec une plus grande résolution que pour la mesure des masses 64 et 66 lorsque l'analyse est réalisée sur SO₂ (Mayer and Krouse, 2004). En revanche, le fluor possédant un seul isotope, il n'y a pas d'interférence isobarique, ce qui permet une détermination précise de δ³³S, δ³⁴S et δ³⁶S. De plus, SF₆ est un gaz inerte qui ne s'adsorbe pas comme SO₂, il n'y a donc pas d'effet mémoire. Lors de l'ionisation de SF₆ dans l'IRMS, SF₅⁺ représente 90% des ions formés, alors que l'ionisation de SO₂ conduit à 50% de SO₂⁺, ceci représente un gain en sensibilité par rapport à la méthode SO₂ (Mayer and Krouse, 2004). C'est pourquoi la quantité de soufre nécessaire est plus faible pour SF₆ (0,4 mg) que pour SO₂ (3 mg). Cependant, cette méthode requiert de longues (excepté avec la méthode Ueno *et al.* (2015)) et délicates étapes de préparation et la manipulation de composés fluorés extrêmement toxiques et très réactifs. Cette réactivité rend difficile la préparation du SF₆ pur en toute sécurité. Malgré sa dangerosité, cette technique est largement utilisée puisqu'elle permet de déterminer simultanément δ³³S (et Δ³³S), δ³⁴S et δ³⁶S (et Δ³³S) avec des incertitudes de 0,03-0,2 ‰ (0,008 ‰), 0,1-0,4 ‰ et 0,2-0,5 ‰ (0,2 ‰) respectivement (Johnston et al., 2005; Puchelt et al., 1971). Mais lorsque seul δ³⁴S est recherché les méthodes d'analyses sur SO₂ sont préférées.

3.1.4. Analyse par CF-IRMS

Dans les méthodes à flux continu (CF-IRMS), la conversion de l'échantillon en gaz et sa détection sont réalisées en ligne et le gaz formé est introduit dans l'IRMS dans un flux d'hélium.

Analyse par EA-IRMS

Le couplage d'un analyseur élémentaire (EA) à l'IRMS permet de réaliser en ligne et de façon automatisée la conversion d'un échantillon (généralement un solide réduit en poudre) en SO_2 pour la mesure des rapports isotopiques. Cette méthode permet de convertir directement en SO_2 un grand nombre de composés (Ag_2S , CdS , ZnS , BaSO_4 , BaSO_3 , S élémentaire, soufre organique, *etc.*). Le schéma général du couplage EA-IRMS est présenté Figure 1-11, cette technique est également appelée spectrométrie de masse à rapport isotopique en flux continu (CF-IRMS), l'analyse se faisant sous un flux constant d'hélium (80-100 mL/min) (Grassineau et al., 2001; Kaufman et al., 2007; Révész et al., 2012). Les échantillons sont placés dans des capsules en étain qui sont scellées puis déposées dans le passeur d'échantillons de l'EA. Ils sont ensuite introduits dans un réacteur chauffé à 1020-1100 °C, qui combine à la fois des réactions d'oxydation et de réduction (Giesemann et al., 1994; Yun et al., 2005). Le réacteur consiste généralement en un tube de quartz rempli de granules d'oxydes de tungstène et de fibres ou copeaux de cuivre, mais il existe aussi des systèmes où l'oxydation et la réduction ont lieu dans deux réacteurs distincts. Dans ce cas le réacteur de réduction est chauffé à des températures voisines de 850 °C alors que celui d'oxydation peut être porté à une température de 1150 °C (Fourel et al., 2015; Sieper et al., 2006). Simultanément à l'échantillon, de l'oxygène est introduit en tête de réacteur, ce qui, combiné à l'oxydation rapide et exothermique de l'étain, favorise une combustion dites *flash* permettant d'atteindre des températures de l'ordre de 1800 °C (Grassineau, 2006). Le soufre présent dans l'échantillon est alors quantitativement converti en SO_2 et SO_3 , d'autres gaz (H_2O , CO_2 et N_xO_x) peuvent être produits selon la nature de l'échantillon. Le cuivre métallique contenu dans le réacteur absorbe le surplus d'oxygène et réduit les traces de SO_3 en SO_2 . La vapeur d'eau est éliminée par un piège à eau contenant du perchlorate de magnésium situé en sortie du réacteur. Les différents gaz sont ensuite entraînés vers une colonne chromatographique (0,8-2 m, Porapak 50-80 mesh) maintenue entre 75 et 115 °C qui permet leur séparation (Cui et al., 2015; Kaufman et al., 2007). La séparation peut aussi se faire grâce à une série de pièges spécifiques (Fourel et al., 2015; Sieper et al., 2006). Un détecteur à conductivité thermique (TCD) permet une analyse quantitative du carbone, de l'azote et du soufre. Le flux est ensuite introduit dans l'IRMS *via* un diluteur (*open split*), avec une éventuelle dilution. Le dioxyde de soufre est ionisé dans la source du spectromètre par impact électronique, puis les ions SO_2^+ formés sont séparés par un champ magnétique et collectés par des cages de Faraday. Le gaz de référence est introduit sous forme de pulses qui précèdent ou suivent le pic de l'échantillon *via* le diluteur (Figure 1-12).

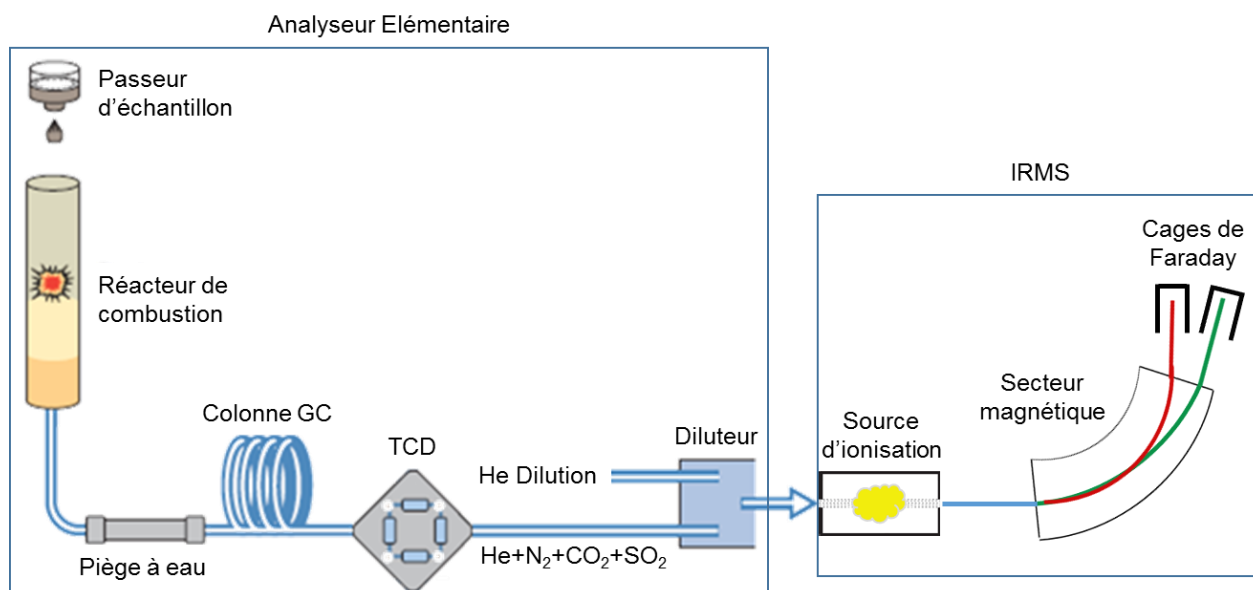


Figure 1-11 : Schéma général du couplage EA-IRMS adapté de Thermo Scientific (*"Analyseur élémentaire Flash 2000 HTTM,"* 2018).

À la différence des méthodes hors-ligne, SO_2 est ici détecté comme un pic chromatographique (Figure 1-12). Les rapports isotopiques ne sont pas calculés comme un rapport d'intensités comme en DI-IRMS mais comme un rapport des aires de pics obtenues pour chaque isotope. Une légère séparation des isotopes peut être observée, en effet, le début du pic de SO_2 est enrichi en ^{34}S alors que la fin du pic est appauvrie (Giesemann et al., 1994). Cette méthode est sujette aux interférences isobariques inhérentes au SO_2 comme dans la méthode hors-ligne ($^{32}\text{S}^{17}\text{O}_2$ et $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ interfèrent avec $^{34}\text{S}^{16}\text{O}_2$, $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$ interfère avec $^{33}\text{S}^{16}\text{O}_2$ et $^{34}\text{S}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ avec $^{36}\text{S}^{16}\text{O}_2$). Par conséquent, cette technique ne permet pas de déterminer $\delta^{33}\text{S}$ et $\delta^{36}\text{S}$. En revanche l'introduction de SO_2 dans un flux d'hélium diminue les effets mémoires. Comparée à la méthode hors-ligne, l'analyse est bien plus rapide, moins d'une heure d'après Giesemann *et al.* (1994), en incluant la préparation d'échantillon (précipitation des sulfates). Un cycle d'analyse dure 10-15 minutes (Giesemann et al., 1994; Grassineau et al., 2001; Yun et al., 2005) et peut être réduit à moins de 4 minutes selon la colonne utilisée et la température du four GC (Cui et al., 2015; Fry et al., 2002). Typiquement les incertitudes de cette technique pour la mesure de $\delta^{34}\text{S}$ sont de 0,1-0,5 ‰ pour des quantités supérieures à environ 33 μg de soufre (Grassineau, 2006; Mann et al., 2009; Thomas et al., 2011).

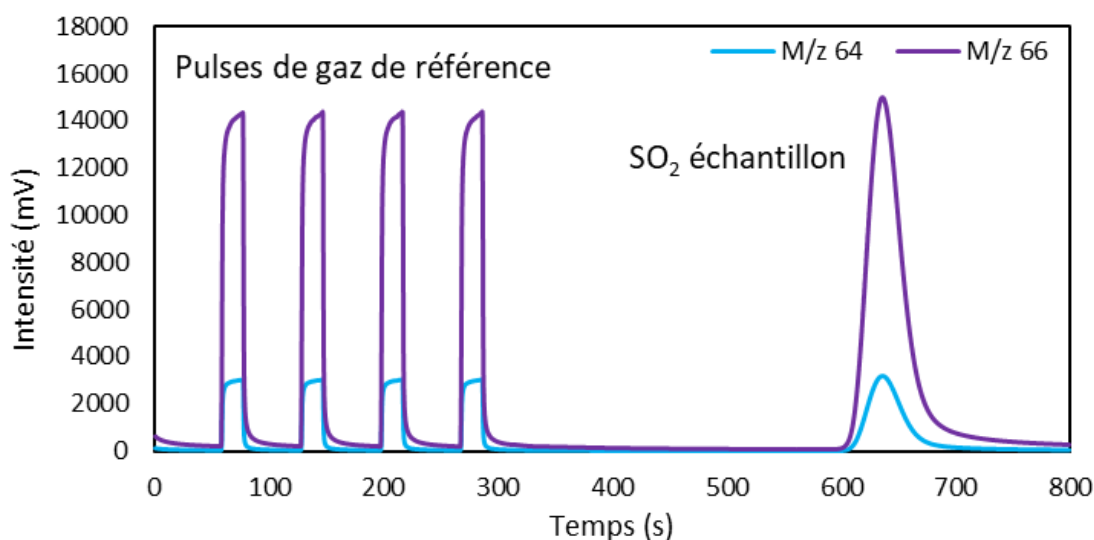


Figure 1-12 : Analyse de 450 μg de BaSO_4 par EA-IRMS. Au début du chromatogramme, 4 pulses du gaz SO_2 de référence sont introduits, leur rapport 66/64 sont mesurés ainsi que celui de l'échantillon et permettent de calculer $\delta^{34}\text{S}$.

Certains auteurs ont réalisé la mesure du rapport $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ sur les fragments SO^+ (correspondant aux masses 48, 49 et 50) formés par ionisation du SO_2 . Ceci présente l'avantage de nécessiter une résolution en masse ($m/\Delta m$) inférieure par rapport à la détection des ions SO_2^+ . La méthode est la même que précédemment, seules les masses mesurées changent. D'après Fry et al. (2002), dans la source d'ionisation de l'IRMS, un tiers du SO_2 est ionisé en SO^+ . Cette technique présente les mêmes avantages et inconvénients que l'analyse de SO_2 par EA-IRMS, mais présente moins d'interférences liées aux isotopes de l'oxygène ce qui permet la mesure de $\delta^{33}\text{S}$. La mesure des masses 48, 49 et 50 permet de calculer $\delta^{34}\text{S}$ ainsi que $\delta^{33}\text{S}$ avec des incertitudes respectives de 0,1-0,3 ‰ et 0,2-0,3 ‰ (Baublys et al., 2004; Fry et al., 2002; Kaufman et al., 2007).

Analyse sous forme de SF_6 assistée par laser

Hu et al. (2003) ont mis au point un laser infrarouge CO_2 et un laser ultraviolet KrF permettant l'analyse des quatre isotopes du soufre, sur des poudres pour le premier et sur des solides (analyse de surface) pour le deuxième. Le rayonnement du laser infrarouge sert à chauffer et à vaporiser l'échantillon dans la chambre de réaction qui contient l'agent de fluoration (F_2), alors que le laser ultraviolet ablate efficacement la surface de l'échantillon, un aérosol chaud contenant des ions, des atomes, des molécules et des particules micrométriques est produit et réagit avec F_2 . La taille des cratères du laser ultraviolet est limitée par la quantité de SF_6 requise ($\geq 1 \mu\text{mol}$), typiquement de $600 \times 800 \mu\text{m}$ avec une profondeur de $600 \mu\text{m}$. Le SF_6 est ensuite purifié par piégeage cryogénique et chromatographie gazeuse, puis injecté dans l'IRMS. Contrairement à la méthode classique d'analyse sur SF_6 , la conversion de l'échantillon en SF_6 et l'analyse se font en ligne. Des incertitudes de 0,2 ‰ et 0,1 ‰ respectivement pour $\delta^{34}\text{S}$ et $\delta^{33}\text{S}$ ont été obtenues avec le laser infrarouge et 0,2 ‰ pour $\delta^{34}\text{S}$ et $\delta^{33}\text{S}$ avec le laser ultraviolet, pour des

échantillons de sphalérite, pyrite, galène, et chalcopryrite. Une analyse dure 45 min. Ono et *al.* (2006) ont étendu l'analyse au ^{36}S en améliorant la purification de SF_6 (piège d'éthanol/azote liquide à $-110\text{ }^\circ\text{C}$ après la GC). La limite de détection a été diminuée (100 nmol soit $3,2\text{ }\mu\text{g}$ de soufre) en injectant SF_6 dans un flux d'hélium, ce qui a également pour effet d'améliorer la résolution spatiale (cratères de $150\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre et $150\text{ }\mu\text{m}$ de profondeur) et le temps d'analyse (20 min). Cette méthode simplifie grandement les analyses par rapport aux analyses SF_6 hors ligne et réduit le temps d'analyse. Cependant elle nécessite un appareillage complexe qui n'est pas commercialement disponible.

Récapitulatifs des méthodes d'analyse avec une détection par IRMS

Les différentes méthodes d'analyse isotopiques du soufre par IRMS requièrent la conversion du soufre des échantillons liquides sous forme d'un solide pur, généralement Ag_2S ou BaSO_4 . Le soufre doit ensuite être converti en gaz SO_2 ou SF_6 . La mesure des rapports isotopiques sur SF_6 permet de déterminer $\delta^{33}\text{S}$ et $\delta^{36}\text{S}$ contrairement au SO_2 . Mais cela nécessite des instruments capables de réaliser des mesures pour des masses jusqu'à $m/z = 131$, ce qui n'est pas le cas de tous les instruments. Par ailleurs, les différentes méthodes de préparation de SF_6 ne permettent pas la conversion directe de BaSO_4 en SF_6 , il doit d'abord être converti en Ag_2S , alors que pour SO_2 la conversion (hors-ligne) est possible à partir de Ag_2S ou BaSO_4 . L'EA-IRMS permet de convertir directement en SO_2 un grand nombre de composés. Les méthodes de conversion hors-lignes (DI-IRMS) nécessitent des quantités plus élevées de soufre, 3 mg pour SO_2 et $0,4\text{ mg}$ pour SF_6 ($6,5\text{ }\mu\text{g}$ selon la méthode de Ueno et al. (2015)), que les méthodes en ligne, $33\text{ }\mu\text{g}$ pour l'EA-IRMS (SO_2) et $3,2\text{ }\mu\text{g}$ pour la génération de SF_6 assistée par laser. Cette dernière méthode offre en plus des informations de résolution spatiale pour les échantillons solides. L'EA-IRMS est la méthode la plus simple à mettre en œuvre, car elle demande le moins de préparation d'échantillon et permet l'analyse de soufre sous différentes formes (Ag_2S , BaSO_4 , ZnS , CdS , $\text{S}\dots$). Les incertitudes de ces méthodes sont de $0,1\text{-}0,5\text{ ‰}$ pour $\delta^{34}\text{S}$.

3.2. Analyse par spectromètre de masse à plasma à couplage inductif multicollecteur (MC-ICP-MS)

3.2.1. Principe général

Le MC-ICP-MS combine une source d'ionisation à plasma, un analyseur de masse double secteur (secteur électrostatique et secteur magnétique) et des collecteurs multiples (cages de Faradays et/ou compteurs d'ions) pour la mesure des rapports masse sur charge (m/z) (Halliday et al., 1995). Le schéma du MC-ICP-MS est présenté Figure 1-13. L'échantillon est généralement introduit sous forme liquide grâce à un nébuliseur et une chambre de nébulisation, qui produit un aérosol formé à partir de l'échantillon et d'un gaz vecteur, généralement de l'Argon. Il peut également être introduit sous forme de gaz (couplage avec la chromatographie gazeuse) ou d'un aérosol (couplage avec l'ablation laser). Des ions positifs sont produits dans un plasma d'Argon, ce qui permet en théorie d'ioniser tous les éléments dont le potentiel d'ionisation est inférieur à celui de l'Argon (15,8 eV), soit la plupart des éléments du tableau périodique. La source d'ionisation est à pression atmosphérique alors que le reste du système est sous vide. Une interface composée de deux cônes percés, l'échantillonneur et l'écrêteur, permet le passage de la pression atmosphérique au vide exercé dans le spectromètre. Les ions sont ensuite accélérés à haut voltage (jusqu'à 10 kV) et focalisés en un faisceau *via* un système de lentilles ioniques. Ce faisceau d'ions traverse alors le secteur électrostatique, c'est un filtre d'énergie cinétique qui limite la dispersion énergétique des ions due au plasma. Le secteur magnétique permet de séparer les ions sur la base de leur rapport m/z . À la sortie du secteur magnétique, il y a autant de faisceaux d'ions qu'il y a d'isotopes, chacun se déplaçant selon une trajectoire propre. Les faisceaux d'ions sont ensuite détectés par le multicollecteur constitué de cages de Faradays. Il y a entre 9 et 16 cages de Faradays selon les appareils, ce qui permet une détection simultanée des isotopes contrairement aux autres ICP-MS plus couramment utilisés où leur détection est séquentielle. La détection simultanée des isotopes permet de s'affranchir des instabilités dues à l'atomisation et l'ionisation dans le plasma et au transport des ions dans le spectromètre et par conséquent, d'améliorer la précision des rapports isotopiques mesurés. La cage de Faradays centrale est fixe et le rapport m/z qui y est mesuré dépend du champ magnétique appliqué par le secteur magnétique, les cages latérales sont mobiles afin d'ajuster le rapport m/z mesuré sur chaque détecteur. Certains MC-ICP-MS sont également équipés de compteurs d'ions, ce type de détecteur est bien plus sensible que les cages de Faradays, mais les mesures isotopiques sont moins précises car le signal produit est bien plus bruité. Comme les autres technologies ICP-MS, le MC-ICP-MS est sujet à différentes interférences spectrales (isobariques, poly-atomiques, doublement chargés). Pour les résoudre, l'appareil est équipé d'un jeu de fentes qui permet de réduire la largeur du faisceau ionique et ainsi d'améliorer le pouvoir de résolution en masse ($\Delta m/m$) (Weyer and Schwieters, 2003). Le pouvoir de résolution en masse est la capacité à distinguer deux ions dont les rapports m/z sont proches ; plus les rapports m/z sont proches et plus un grand pouvoir de résolution est nécessaire pour les distinguer. Certain modèle de MC-ICP-MS possède plusieurs modes de résolution

(basse : LR, moyenne : MR et haute : HR) correspondants à différentes largeurs de fente d'entrée, qui permettent d'ajuster la résolution de l'appareil en fonction des interférences à résoudre. L'augmentation de la résolution obtenue en réduisant la largeur de fente entraîne une perte de sensibilité car le nombre d'ions atteignant le secteur électrostatique est diminué.

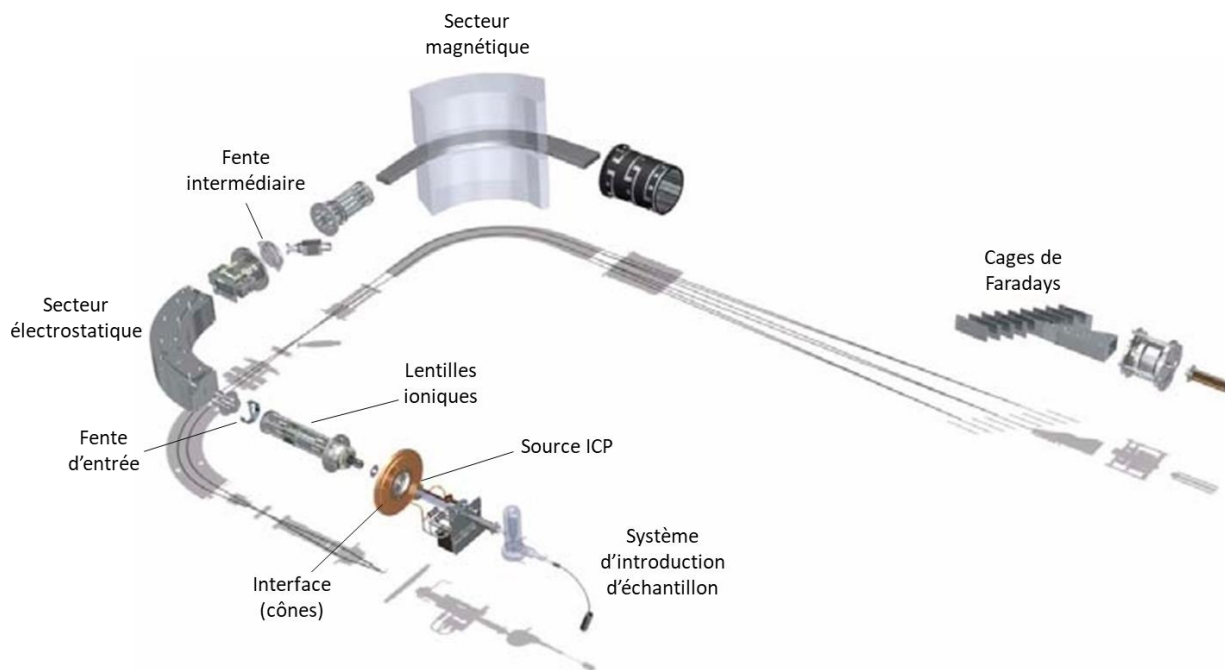


Figure 1-13 : Schéma général du MC-ICP-MS (exemple du Neptune Plus, Thermo Scientific).

Le MC-ICP-MS est une technique émergente pour la détermination de rapports isotopiques du soufre dont l'utilisation est grandissante. À ce jour, il y a à notre connaissance environ 84 études dans lesquelles le MC-ICP-MS a été utilisé pour la détermination des rapports isotopiques du soufre. Ces études sont présentées dans les Tableaux 1-6 à 1-12. Les paramètres clés des méthodes utilisées tels que la préparation des échantillons, le mode d'introduction de l'échantillon, le mode de résolution et les corrections du biais de masse sont répertoriés dans ces tableaux. La nature des échantillons analysés, les performances (incertitudes de mesure et masse minimale de soufre) et les résultats notables (en lien avec l'isotopie du soufre) sont également présentés. Les publications axées sur le développement analytique sont différenciées de celle concernant une application, ces dernières n'étant pas détaillées. Chaque tableau correspond à un type de couplage (ablation laser, chromatographie gazeuse et liquide) ou à l'absence de couplage dans le cas des analyses directes par MC-ICP-MS. Le couplage avec des techniques de séparation permet ainsi la détermination de rapports isotopiques en tenant compte de la spéciation du soufre dans l'échantillon (CSIA). D'autres avantages sont la réduction de la quantité d'échantillon requis (<15 µg-S, Tableaux 1-6 à 1-12) et la réduction des étapes de préparation pour un échantillon liquide, ce qui diminue le risque de contamination et le temps nécessaire au traitement d'un échantillon.

3.2.2. Résolution des interférences

En MC-ICP-MS, les rapports isotopiques du soufre sont déterminés sur l'ion S^+ qui est affecté par plusieurs interférences (Tableau 1-5). Différentes stratégies ont été mises en place afin de résoudre ces interférences. La plus répandue consiste à travailler dans un mode de moyenne ou haute résolution (MR ou HR, $\Delta m/m > 2500$) ; sur les 84 études seules 4 études ont réalisé des mesures en basse résolution (Tableaux 1-6 à 1-12). Un mode MR ou HR permet d'obtenir lors d'un balayage en masse un plateau libre d'interférence où le soufre peut être mesuré (Figure 1-14), les espèces interférentes apparaissent alors comme des marches discrètes avec des sections à sommet plat (Clough et al., 2006; Craddock et al., 2008; Giner Martínez-Sierra et al., 2010). Les signaux ne sont pas parfaitement séparés dans le spectre de masse, mais la stabilité de l'aimant permet de sélectionner une zone où l'analyte peut être mesuré sans interférence. Le mode moyenne résolution des appareils actuels permet généralement de résoudre les interférences majeures dues à l'oxygène (Bendall et al., 2006; Santamaria-Fernandez et al., 2008). D'après Craddock *et al.* (2008), pour des mesures sur un Neptune Plus en mode haute résolution, la contribution de $^{33}S^1H^+$ sur le signal mesuré à $m/z = 34$ représente moins de 0,02 %, ce qui est négligeable et n'affecte pas la mesure du rapport $^{34}S/^{32}S$. L'utilisation du mode HR permet une meilleure résolution des interférences mais diminue l'intensité du signal mesuré. Selon Pribil *et al.* (2015) l'intensité mesurée est 2,5 fois plus grande en moyenne résolution qu'en haute résolution. En considérant l'ensemble des études réalisées, il ne semble pas y avoir de différence significative en terme d'incertitude entre un mode MR et un mode HR (Tableaux 1-6 à 1-12).

Différents auteurs ont montré que des conditions de « plasma sec » (utilisation d'une membrane de désolvatation, couplage GC ou ablation laser) permettaient également de réduire les interférences (Amrani et al., 2009; Bendall et al., 2006; Han et al., 2013). Ainsi, Han *et al.* (2013) ont pu déterminer les valeurs de $\delta^{34}S$ des sulfates contenus dans des lixivats de minerai d'uranium en conditions de plasma sec en basse résolution avec des incertitudes de 0,45-1,9 ‰. Dans les autres études en basse résolution les incertitudes sur $\delta^{34}S$ sont de 1 ‰ (Tableaux 1-6 à 1-12). Lorsque des conditions de plasma sec ont été combinées à un mode MR ou HR, les incertitudes sont inférieures à 0,5 ‰ excepté pour quelques études par GC-MC-ICP-MS sur des échantillons dont la matrice est particulièrement complexe (pétroles, sédiments). Les conditions de plasma sec permettent également d'obtenir un gain en sensibilité. En effet, Yu *et al.* (2017) et Paris *et al.* (2013) ont pu analyser des échantillons contenant seulement 100-160 ng de soufre en solution alors qu'en conditions de plasma humide les quantités de soufre en solution nécessaires sont supérieures à 2 μg (Tableaux 1-6 à 1-12).

Mason *et al.* (2006) ont utilisé un MC-ICP-MS en mode basse résolution muni d'une cellule de collision employant un mélange de He et Xe pour diminuer la quantité d'ions O_2^+ , mais cela a également conduit à une diminution de 50% du signal de soufre. À cause de cet inconvénient majeur, cette dernière méthode de réduction des interférences n'a pas été utilisée dans les autres travaux (Tableaux 1-6 à 1-12).

Tableau 1-5 : Interférences des isotopes du soufre, adapté de Craddock et al. (2008).

| Isotope | Abondance (%) | Interférence | Abondance (%) | m/Δm |
|-----------------|---------------|---|---------------|-------|
| ³² S | 94,93 | ¹⁶ O- ¹⁶ O ⁺ | 99,52 | 1801 |
| | | ⁶⁴ Zn ²⁺ | 48,89 | -4562 |
| | | ¹⁵ N- ¹⁶ O- ¹ H ⁺ | 0,37 | 1040 |
| ³³ S | 0,76 | ¹⁷ O- ¹⁶ O ⁺ | 0,08 | 1461 |
| | | ¹⁶ O- ¹⁶ O- ¹ H ⁺ | 99,51 | 1260 |
| | | ³² S- ¹ H ⁺ | 95,01 | 3907 |
| | | ⁶⁶ Zn ²⁺ | 27,81 | -3905 |
| ³⁴ S | 4,29 | ¹⁸ O- ¹⁶ O ⁺ | 0,4 | 1297 |
| | | ¹⁷ O- ¹⁶ O- ¹ H ⁺ | 0,76 | 1000 |
| | | ³³ S- ¹ H ⁺ | 0,75 | 2977 |
| | | ⁶⁸ Zn ²⁺ | 18,56 | -6238 |
| ³⁶ S | 0,02 | ³⁶ Ar ⁺ | 0,34 | 77083 |
| | | ³⁵ Cl- ¹ H ⁺ | 75,76 | 3747 |

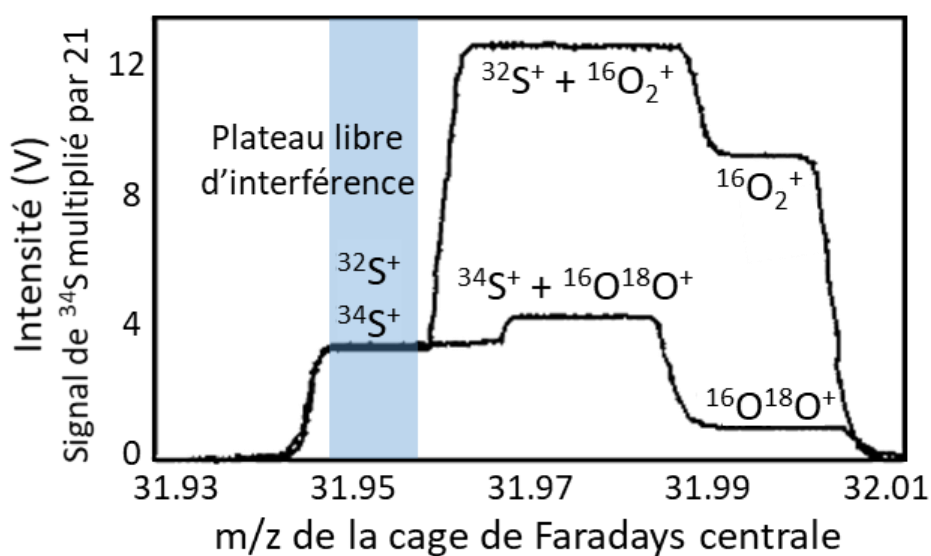


Figure 1-14: Balayage en masse pour le MC-ICP-MS Neptune en mode moyenne résolution adapté de Clough et al. (2006).

3.2.3. Correction du biais de masse

Un autre inconvénient de cette technique est le biais de masse (Albarède et al., 2015). C'est un effet bien connu en ICP-MS qui correspond à une meilleure transmission des isotopes lourds, essentiellement due à un effet de charge d'espace dans la région des lentilles du spectromètre. L'effet de charge d'espace consiste en la répulsion mutuelle des ions positifs, qui tendent à s'écarter de l'axe du faisceau ionique. L'effet est plus marqué pour les ions légers (de moindre énergie cinétique) que pour les ions lourds. Le biais de masse conduit généralement à une surestimation des rapports isotopiques. D'autre part, la matrice de l'échantillon peut avoir un effet notable sur le biais de masse. En effet, les éléments de la matrice introduits simultanément au soufre dans le plasma peuvent conduire à une modification du biais de masse (Hanousek et al., 2016a; Liu et al., 2016). Le biais de masse peut donc être instrumental et/ou induit par effet de matrice. Quelle que soit sa nature, il est nécessaire de corriger les signaux du biais de masse pour obtenir des rapports isotopiques exacts. Le calcul de $\delta^{34}\text{S}$ (Équation 1-6) implique une correction du biais de masse dans le cas où il est le même pour l'échantillon et l'étalon (biais de masse instrumental stable dans le temps, absence d'effet de matrice), ce qui est rarement le cas. En effet, au cours d'une session analytique, le biais de masse instrumental a tendance à varier de façon plus ou moins rapides.

La correction du biais de masse peut se faire par comparaison avec des étalons analysés dans les mêmes conditions avant et après l'échantillon, cette méthode est appelée **Sample-Standard-Bracketing (SSB)**. Le biais de masse de l'échantillon est calculé par interpolation linéaire des biais de masse calculés pour l'étalon analysé avant et après l'échantillon, puis le rapport isotopique de l'échantillon est corrigé de ce biais de masse (Albarède et al., 2004). Une autre façon d'appliquer la méthode SSB est d'utiliser la moyenne des rapports isotopiques mesurés pour l'étalon avant et après l'échantillon pour calculer $\delta^{34}\text{S}$ de l'échantillon. C'est la méthode qui est majoritairement choisie lors des études de détermination de $\delta^{34}\text{S}$ par MC-ICP-MS ; 73 études sur 84 ont utilisé le SSB pour corriger le biais de masse (Tableaux 1-6 à 1-12). Cette approche présente toutefois une limite dès lors que le biais de masse varie rapidement. D'autre part, pour appliquer la méthode SSB, il est nécessaire que la matrice de l'échantillon et de l'étalon soient identiques puisque la matrice peut affecter le biais de masse (Albarède et al., 2015).

Une méthode combinant SSB et un étalonnage externe avec des matériaux de référence de $\delta^{34}\text{S}$ entre 0 et 20 ‰ a été mise au point par Pribil *et al.* (2015). Cette méthode est analogue à l'étalonnage réalisé en EA-IRMS. Les auteurs rapportent pour les sulfates (analysés par MC-ICP-MS et LA-MC-ICP-MS) des différences entre les valeurs mesurées et les valeurs reportées dans la littérature jusqu'à 1,6 ‰ avec une correction par SSB. En revanche, pour les sulfures (analysés par LA-MC-ICP-MS), les résultats par SSB étaient en accord avec les valeurs reportées dans la littérature. Les auteurs suggèrent qu'il existe un biais de masse spécifique aux sulfates dû à un effet de vaporisation dans le plasma lié à l'état de valence. L'étalonnage externe a permis de corriger les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates. Pribil *et al.* (2015) suggèrent que le SSB corrige le biais de masse instrumental au cours de l'analyse, tandis que la courbe d'étalonnage corrige les autres biais de masse résultant d'effets de matrice ou spécifiques aux

sulfates. Cette étude a mis en évidence que le biais de masse peut être différent en fonction de la spéciation du soufre. En outre, la méthode de l'étalonnage externe semble être une approche adéquate pour corriger le biais de masse pour une large gamme de valeurs isotopiques.

Une autre méthode pour corriger le biais de masse est la **normalisation interne**. Cette méthode a été utilisée dans seulement 7 études (Tableaux 1-6 à 1-12). Elle consiste à mesurer le rapport isotopique d'un autre élément ayant une masse proche de l'élément analysé, simultanément à celui-ci permettant ainsi de corriger les variations rapides du biais de masse. Une correction mathématique est ensuite appliquée pour corriger le biais de masse, pour les mesures de rapport isotopique du soufre. L'équation de Russel (Équation 1-15) est généralement utilisée pour la correction par normalisation interne (Giner Martínez-Sierra et al., 2010; Hanousek et al., 2016b; Santamaria-Fernandez and Hearn, 2008). Des étalons dont la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ est connue doivent tout de même être analysés pour calculer $\delta^{34}\text{S}$ des échantillons.

Équation 1-15 : Équation de Russel, correction du biais de masse du soufre par le rapport $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$.

$$\left(\frac{^{34}\text{S}}{^{32}\text{S}}\right)^{\text{Corrigé}} = \left(\left(\frac{^{34}\text{S}}{^{32}\text{S}}\right)^{\text{Mesuré}} \left/ \left(\frac{\left(\frac{^{30}\text{Si}}{^{29}\text{Si}}\right)^{\text{Mesuré}}}{\left(\frac{^{30}\text{Si}}{^{29}\text{Si}}\right)^{\text{Référence}}} \right)^{\left(\frac{\ln\left(\frac{\text{Masse}^{34}\text{S}}{\text{Masse}^{32}\text{S}}\right)}{\ln\left(\frac{\text{Masse}^{30}\text{Si}}{\text{Masse}^{29}\text{Si}}\right)} \right)} \right)$$

Mason *et al.* (2006) ont montré que **Si** et **Cl** pouvaient être utilisés pour corriger le biais de masse du soufre lors d'analyse de sulfures par LA-MC-ICP-MS, les isotopes ^{29}Si et ^{30}Si ou ^{35}Cl et ^{37}Cl ont été mesurés simultanément aux isotopes ^{32}S , ^{33}S et ^{34}S . Dans un cas une solution à 20% de HCl a été nébulisée et mélangée à l'aérosol issu du laser, dans l'autre un système de désolvation a été utilisé pour introduire une solution de Si à 2% de HNO_3 dans le plasma. Des résultats similaires pour la correction au Cl et celle au Si ont été obtenus. Cependant, il a été observé que la correction avec Cl ne pouvait être utilisée en combinaison avec un système de désolvation car il en résultait une instabilité du signal de Cl. Lors d'une correction par normalisation interne, l'hypothèse émise est que les variations du biais de masse affectent de manière identique les rapports isotopiques de S et Si ou Cl. Mason *et al.* suggèrent que les efficacités d'ionisation et les propriétés chimiques contrastées de S, Cl et Si sont susceptibles de limiter la précision de ce type de correction. Ils recommandent donc d'appliquer une seconde correction par SSB. Cette correction combinée présente un avantage par rapport au simple SSB, car la dérive à court terme du biais de masse n'est pas prise en compte par SSB, alors qu'elle est corrigée en permanence par normalisation au Cl ou Si.

Aucune autre étude ne rapporte la correction du biais de masse par normalisation au Cl. En revanche, la correction du biais de masse par mesure de Si a été employée dans diverses applications telles que la détermination des $\delta^{34}\text{S}$ d'eaux minérales et de bières par MC-ICP-MS (Clough et al., 2006;

Giner Martínez-Sierra et al., 2010), ou l'authentification de produits pharmaceutiques par MC-ICP-MS, LA-MC-ICP-MS ou HPLC-MC-ICP-MS (Clough et al., 2006; Santamaria-Fernandez et al., 2008, 2009b). Dans les études de Clough *et al.* (2006) et de Santamaria-Fernandez *et al.* (2009b), le biais de masse a été corrigé par mesure des isotopes ^{28}Si et ^{30}Si . La géométrie de l'instrument utilisé (Thermo Scientific Neptune) ne permettant pas la mesure simultanée des masses 28 et 34, la mesure des isotopes du silicium et du soufre a donc été réalisée séquentiellement, 25 cycles de 8 s de mesure des masses 32, 34, 3 s de stabilisation, 4 s de mesure des masses 28, 30, 3 s de stabilisation dans l'étude de Clough *et al.* (2006). Dans ce cas, les variations du biais de masse sur des temps inférieurs à la durée d'un cycle de mesure ne sont pas prises en compte.

Santamaria-Fernandez *et al.* (2008) et Hanousek *et al.* (2016b) ont comparé les approches par SSB et normalisation au Si (mesure séquentielle de Si et S). Les premiers rapportent que les rapports $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ pour deux matériaux de référence certifiés différaient de ceux rapportés précédemment de 0,1 à 0,5 % pour la correction par SSB et de 0,06 à 0,15 % avec la normalisation interne au Si. Lors de la détermination de $\delta^{34}\text{S}$ pour deux matériaux de référence certifiés les valeurs obtenues avec la normalisation interne par du Si pour IAEA-S4 ($16,9 \pm 1,4$ ‰) et NBS123 ($17,6 \pm 1,4$ ‰) et celles obtenues par SSB (respectivement $17,4 \pm 0,9$ ‰ et $18,5 \pm 1,0$ ‰) n'étaient pas significativement différentes des valeurs certifiées (respectivement $16,86 \pm 0,03$ ‰ et $17,44 \pm 0,10$ ‰). Les auteurs concluent que la normalisation par du Si est une option plus appropriée pour la détermination de rapport isotopique avec le MC-ICP-MS Neptune. Hanousek *et al.* (2016b) ont obtenu des résultats en accord avec la valeur certifiée pour la détermination du rapport $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ de IAEA-S1 avec une correction par SSB ou normalisation avec $^{30}\text{Si}/^{28}\text{Si}$, $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ ou $^{29}\text{Si}/^{28}\text{Si}$ (Si et S mesurés séquentiellement). Toutefois, la méthode SSB fournit le plus petit écart à la valeur certifiée ($<0,002$ % par SSB, 0,002-0,02 par normalisation avec $^{30}\text{Si}/^{28}\text{Si}$, $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ ou $^{29}\text{Si}/^{28}\text{Si}$). Contrairement à Santamaria-Fernandez *et al.* (2008), Hanousek *et al.* (2016b) concluent que la méthode SSB fournit les meilleures performances (plus petites incertitudes et plus petit écart à la valeur certifiée). Les résultats contradictoires de ces deux études ne permettent pas de conclure quant à l'efficacité d'une méthode par rapport à l'autre. En revanche, plusieurs auteurs (Clough et al., 2006; Giner Martínez-Sierra et al., 2010) s'accordent sur le fait que la normalisation interne au Si permet de corriger les effets de matrice alors que la méthode SSB ne le permet pas. Les effets de matrice et les corrections qui y sont liées sont discutés plus en détails dans les paragraphes suivant dédiés aux différents modes d'introduction d'échantillon.

3.2.4. MC-ICP-MS

Le MC-ICP-MS permet l'analyse directe d'échantillons liquides qui sont introduits par aspiration des solutions. Cela permet la détermination du $\delta^{34}\text{S}$ du soufre total en solution ou d'analytes préalablement isolés (Tableau 1-6 et Tableau 1-7).

La majorité des auteurs ont utilisé une correction du biais de masse par SSB (Tableau 1-6). Cette méthode requière une matrice identique entre l'échantillon et l'étalon utilisé. En effet, il a été rapporté que la matrice et notamment les cations (Ca, K, Li, Na...) peuvent avoir un effet sur le biais de masse du soufre et donc sur la justesse des mesures (Hanousek et al., 2016a). Afin de s'affranchir des effets de matrice, plusieurs auteurs ont eu recours à l'addition d'un cation aux échantillons et/ou à l'étalon de bracketing afin d'avoir une correspondance de matrice entre échantillons et étalons, Na^+ a le plus souvent été utilisé (Tableau 1-6 et Tableau 1-7). Han *et al.* (2013) ont choisi d'ajouter Ag^+ à leurs échantillons pour une correspondance avec la matrice de IAEA-S1 minéralisé ($\text{Ag}^+ + \text{SO}_4^{2-}$). Il est à noter que ce choix ne serait pas judicieux dans le cas d'analyse d'eaux naturelles ou tout autre solution contenant des ions Cl^- car cela conduirait à la formation du produit AgCl qui est insoluble ($K_s = 1,77 \cdot 10^{-10}$) (David R. Lide, 2007).

Dans la majorité des études, les échantillons ont été purifiés par des techniques de séparation ionique préalablement à leur analyse et le soufre a été détecté sous forme de sulfates (Tableau 1-6 et Tableau 1-7). Certains auteurs ont utilisé la chromatographie d'échange de cations alors que d'autres ont utilisé une résine d'échange d'anions. Das *et al.* (2012b) précisent que l'échange d'anions réduit la quantité de réactifs utilisée, le temps de traitement des échantillons et la quantité de soufre dans les blancs par rapport à l'échange de cations (car la résine d'échange d'anions ne contient pas de groupements sulfoniques contrairement à la résine cationique). L'utilisation d'une résine anionique a donc permis à ces auteurs de diminuer la quantité de soufre requise par rapport aux études précédentes utilisant une résine cationique.

Par ailleurs, il a été montré que l'utilisation d'une membrane de désolvatation afin de travailler en conditions de plasma sec permettait de diminuer considérablement les quantités de soufre nécessaires (Paris et al., 2013; Present et al., 2015; Albalat et al., 2016). Ceci combiné à une purification sur résine échangeuse d'anions ou de cations et à l'ajout d'un cation dans l'échantillon à la même concentration que dans l'étalon de bracketing a permis de réaliser des analyses de $\delta^{34}\text{S}$ et $\delta^{33}\text{S}$ pour de faibles quantités de sulfates dissous (160 à 320 ng de S), avec justesse et des incertitudes respectives de 0,1-0,35 ‰ et 0,1-0,3 ‰. Classiquement, une étape de purification par échange d'ions (cations ou anions) est combinée à un ajout de cations pour une correspondance de matrice entre étalons et échantillons et un système de désolvatation sont très souvent utilisés (20 sur 35 études, Tableau 1-6 et Tableau 1-7). Cette combinaison permet d'obtenir des résultats justes avec des incertitudes de 0,1-0,5 ‰. Cependant, l'utilisation d'un système de désolvatation peut conduire à des pertes de soufre, jusqu'à 99 % sans ajout de cation (Yu et al., 2017). Plusieurs auteurs ont montré que l'ajout d'un cation à l'échantillon, lorsqu'un système de désolvatation est utilisé, favorise la transmission de SO_4^{2-} à travers le processus de désolvatation et

permet donc d'augmenter l'intensité du signal mesuré. Cela permet ainsi de résoudre le problème de perte de SO_4^{2-} lors de la désolvation (Han et al., 2013; Paris et al., 2013). Albalat *et al.* (2016) ont comparé l'effet de l'ajout de Na^+ , Ag^+ ou NH_4^+ sur la sensibilité du signal de ^{32}S . Pour Na^+ et Ag^+ , la sensibilité maximale (en V/ppm) est atteinte à partir d'un rapport molaire $\text{Na}^+/\text{SO}_4^{2-}$ ou $\text{Ag}^+/\text{SO}_4^{2-}$ égal à 2, alors que pour NH_4^+ la sensibilité maximale est atteinte à partir de $\text{NH}_4^+/\text{SO}_4^{2-} = 1$. Ces auteurs ont choisi d'utiliser NH_4^+ afin de limiter l'encrassement des cônes du MC-ICP-MS et de la membrane de désolvation. D'autre part, il a été montré que l'effet de matrice dû à Ca^{2+} est plus important lorsque des conditions de plasma sec sont utilisées (Liu et al., 2016).

Seulement 7 études sur 35 n'ont eu recours ni à une purification par échange d'ions ni à l'ajout d'un cation dans l'échantillon pour une correspondance de matrice avec l'étalon. Dans 2 de ces études, des échantillons avec une matrice très peu concentrée ont été analysés et n'ont donc pas nécessité de préparation d'échantillon (Bern et al., 2015; Hanousek et al., 2016b). Dans les 5 autres études, la stratégie employée pour corriger le biais de masse et les effets de matrice a été une normalisation interne au silicium. Clough *et al.* (2006) ont développé une méthode permettant la mesure des variations naturelles du $\delta^{34}\text{S}$ d'eaux minérales où les échantillons sont simplement dilués et acidifiés avec HNO_3 , puis dopés en Si pour une correction du biais de masse par normalisation interne. Clough *et al.* (2006) suggèrent qu'une normalisation avec $^{30}\text{Si}/^{28}\text{Si}$ (Si et S mesurés séquentiellement) permet de corriger efficacement le biais de masse jusqu'à 420 $\mu\text{g/g}$ de Na et 400 $\mu\text{g/g}$ de Ca. Giner Martínez-Sierra *et al.* (2010), ont analysé des échantillons de bière (riche en composés organiques) dilués dans HNO_3 1% avec une normalisation par le rapport $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ (mesuré simultanément à $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$). Ces méthodes ont permis l'analyse avec des incertitudes de 1 ‰ pour des échantillons contenant au moins 5 μg de soufre.

Les méthodes ainsi développées présentent l'avantage de ne nécessiter que peu d'analytes (100 ng - 5 μg de S) et permettent d'obtenir des incertitudes sur $\delta^{34}\text{S}$ de l'ordre de celles obtenues par les techniques IRMS (0,1-1 ‰). La normalisation interne au Si permet d'analyser des échantillons liquides sans purification de l'échantillon et une correction des effets de matrices. Cependant, les études utilisant ce type de correction du biais de masse ont obtenu des incertitudes de mesure plus élevées (1 ‰) que dans les autres études. Les méthodes comportant une étape de purification et utilisant un système de désolvation permettent généralement d'obtenir les plus faibles incertitudes (0,1-0,5 ‰) et limites de détection (100 – 320 ng de S) (Tableau 1-6).

Dans la plupart des études environnementales réalisées avec ce type de méthode, une purification par résine échangeuse d'ions a été effectuée, un système de désolvation a été utilisé et la correction du biais de masse a été réalisée par SSB (Tableau 1-7). Ces méthodes ont particulièrement été appliquées à l'analyse d'eaux naturelles (lacs, rivières, pluie) et des échantillons solides (coraux, calcite) dont la concentration en soufre est faible, et aussi à des échantillons dont la quantité est limitée tels que des échantillons médicaux ou des carottes de glace (Tableau 1-7). Généralement, c'est $\delta^{34}\text{S}$ du soufre total des échantillons qui est mesuré ou bien celui des sulfates.

CSIA hors-ligne par MC-ICP-MS :

Seules deux études ont utilisé ce type de méthode pour l'analyse de plusieurs espèces soufrées au sein d'un même échantillon (CSIA hors ligne). Sim *et al.* (2017, 2019a) ont étudié les variations du $\delta^{34}\text{S}$ des sulfures, des sulfites, des sulfates et de l'adénosine-5-phosphosulfate (APS) lors du mécanisme de réduction sulfato-bactérienne. Pour réaliser ces analyses, les sulfures ont été précipités en ZnS, le surnageant a été récupéré par centrifugation et du formaldéhyde a été ajouté pour prévenir l'oxydation des sulfites. Les sulfates, les sulfites et l'APS ont été séparés et collectés par chromatographie ionique (gradient KOH 1-60 mmol/L en 40 min). Le précipité de ZnS et les sulfites ont été convertis en sulfates par oxydation (H_2O_2 , 60°C) et l'APS par hydrolyse en milieu acide. Les sulfures sous forme de sulfates ont été purifiés par échange d'anions. Les échantillons ont ensuite été dilués à 20 $\mu\text{mol/L}$ de sulfates dans HNO_3 5% et NaOH a été ajouté pour correspondre à la matrice de l'étalon de bracketing Na_2SO_4 . Enfin, $\delta^{34}\text{S}$ a été mesuré par MC-ICP-MS en MR selon la méthode décrite par Paris *et al.* (2013). La séparation par chromatographie ionique a permis dans cette étude d'isoler les sulfates, les sulfites et l'APS. Cela a rendu possible la détermination du $\delta^{34}\text{S}$ des sulfures, des sulfates et de l'APS, mais les sulfites étaient en quantité insuffisante. Cette méthode d'analyse de différentes espèces soufrées d'un échantillon liquide offre une limite de détection meilleure (> 160 ng) qu'une précipitation séquentielle suivi d'une analyse par EA-IRMS (> 33 μg). De même que la précipitation séquentielle pour des analyses par IRMS, cette méthode de CSIA hors ligne comporte de nombreuses étapes de préparation.

Tableau 1-6 : Études publiées à ce jour sur le développement analytique de la détermination des rapports isotopiques du soufre par MC-ICP-MS (sans couplage). LR : Basse résolution, MR : Moyenne résolution, HR : Haute résolution, SSB : Sample-standard-bracketing, Si/Cl : Correction du biais de masse par mesure des rapports isotopiques de Si/Cl, CRM : Matériaux de référence certifiés, nd : non disponible.

| Analytes cibles | Échantillons | Préparation échantillon | Désolvation | Résolution | Correction du biais de masse |
|-----------------|---|--|-------------|---------------------------|------------------------------|
| Sulfates | Eaux minérales | Ajout de Si et acidification à 1 % de HNO ₃ . | Non | MR | Si |
| Soufre total | IAEA-S1 -S2 -S4 et NBS-123, anhydrite, pyrrhotite, chalcopyrite et pyrite | Minéralisation sur plaque chauffante et purification sur colonne à échange de cations (rendements 98 ± 4 %), puis dilution avec HNO ₃ 2 % jusqu'à 50 µg/g. | Non | HR | SSB |
| Soufre total | Comprimés d'un médicament | 10 mg du comprimé dissous dans 10 mL de HNO ₃ 1 % et addition de 5 µg/g de Si. | Non | MR | Si |
| Soufre total | IAEA-S1 -S4, NBS-123, méthionine | CRM minéralisés, méthionine dissous dans 1 % HNO ₃ . Addition de 10 µg/g de Si. | Non | MR | Si / SSB |
| Soufre total | Bières | CRM minéralisés. Addition de 5 µg/g de Si pour les CRM. Échantillons dilués 3 fois dans 1 % HNO ₃ . | Non | MR | Si |
| Sulfates | IAEA-S1 -S2 -S3, IAPSO-SW (eau de mer) | Purification sur résine échangeuse d'anions (Biorad AG-1X8, rendement de 100 ± 2 %). | Non | HR | SSB |
| Sulfates | Lixiviats de minerai d'uranium | Purification des lixiviats sur résine échangeuse d'anions (rendement >96%). Dilution avec 1 % HNO ₃ à 2 µg/g de S et ajout de 27 µg/g de Ag ⁺ (même matrice que l'étalon de bracketing IAEA-S1). | Oui | LR (m/Δm = 300) | SSB |
| Sulfates | BaSO ₄ , eaux naturelles, carbonates (coraux) | Purification sur résine échangeuse de cations (rendement 103 ± 5 %). NaCl ajouté pour faire correspondre [Na ⁺] à l'étalon de bracketing. | Oui | HR (m/Δm = 8000-10000) | SSB |
| Soufre total | Eau de mer et interstitielle des sédiments marins | Échantillons d'eau dilués 100 fois. Addition de NaCl à l'étalon de bracketing en même concentration que dans l'échantillon. | Non | MR (m/Δm = 3000) | SSB |

| Incertitude | Masse minimale de S | Résultats / Conclusions | Référence |
|--|---------------------|---|--|
| 1 ‰ | 5 µg | Correction efficace du biais de masse et des effets de matrices (jusqu'à 420 µg/g de Na et 400 µg/g de Ca) par Si pour la mesure de $\delta^{34}\text{S}$ et réduction du temps d'analyse par rapport à une correction par SSB. | (Clough et al., 2006) |
| 0,2 ‰ | nd | Montage permettant un étalonnage croisé LA/solution, $\delta^{34}\text{S}(\text{LA}) = \delta^{34}\text{S}(\text{solution}) \pm 0,2 \text{ ‰}$. Correction par SSB avec un étalon en solution de matrice identique. Une méthode de purification chimique applicable à une large gamme de sulfures et de sulfates en solution a également été décrite. Validation de la méthode par analyses de matériaux de référence certifiés et comparaison avec les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ déterminés par des techniques indépendantes. | (Craddock et al., 2008) |
| 1 ‰ | nd | La méthode MC-ICP-MS a permis de différencier des comprimés pharmaceutiques authentiques des comprimés. | (Santamaria-Fernandez et al., 2008) |
| 1 ‰ | nd | La normalisation interne par Si serait une option plus appropriée pour le Neptune. Pour les deux types de correction, l'incertitude composée est majoritairement due au $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ de l'échantillon, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ de l'étalon et $\delta^{34}\text{S}$ de l'étalon. | (Santamaria-Fernandez and Hearn, 2008) |
| 1 ‰ | nd | Effets de matrice corrigés de manière adéquate en utilisant la normalisation interne au Si. Mise en évidence de la variabilité isotopique naturelle du S dans les bières. | (Giner Martínez-Sierra et al., 2010) |
| 0,24 - 0,34 ‰ | 2 µg | Échange d'anions réduit la quantité de produit chimique utilisée, le temps de traitement des échantillons et les blancs de purification par rapport à l'échange de cations. 2 µg de S peuvent être purifiés et $\delta^{34}\text{S}$ peut être mesuré à $[\text{S}] = 2 \text{ µg/mL}$. | (Das et al., 2012b) |
| 0,45 - 1,9 ‰ | nd | Perte de SO_4^{2-} par désolvatation si aucun cation n'est ajouté. Sensibilité maximale pour $\text{Na}^+/\text{SO}_4^{2-}$ ou $\text{Ag}^+/\text{SO}_4^{2-} = 2$. $\delta^{34}\text{S}$ varie selon la forme du Na ajouté (NaCO_3 ou NaOH). | (Han et al., 2013) |
| 0,1-0,2 ‰ ($\delta^{34}\text{S}$), 0,1-0,3 ‰ ($\Delta^{33}\text{S}$) | 160 ng | Variations de $\text{Na}^+/\text{SO}_4^{2-} \Rightarrow$ variations de sensibilité et du $\delta^{34}\text{S}$ mesuré, pas de différence entre NaCl et NaOH . Cependant, pour une même quantité de Na^+ , les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ sont les mêmes \Rightarrow effet de matrice dépend plus de la quantité de Na^+ que de $\text{Na}^+/\text{SO}_4^{2-}$, tant que $\text{Na}^+/\text{SO}_4^{2-} > 2$. Méthode permettant de mesurer $\delta^{34}\text{S}$ et $\Delta^{33}\text{S}$ pour $> 5 \text{ nmol}$ de sulfates. | (Paris et al., 2013) |
| 0,1 ‰ | nd | Effet de matrice observé lors d'ajout de NaCl à un étalon, écart de $\delta^{34}\text{S}$ jusqu'à 2,1 ‰. Mesure de $\delta^{34}\text{S}$ par MC-ICPMS d'échantillon d'eau sans purification avec des étalons dont la matrice (salinité) est adaptée pour correspondre à celle de l'échantillon. | (Lin et al., 2014) |

| Analytes ciblés | Échantillons | Préparation échantillon | Désolvation | Résolution | Correction du biais de masse | Incertitude |
|---|---|--|-------------|--|---------------------------------|--|
| Soufre total | Solution synthétique, eau interstitielle de sédiments | Échantillon dilué 100 fois. Ajout de 200 mg/L de Cl ⁻ (NaCl) à l'étalon pour correspondre à la matrice des échantillons. | Non | MR (m/Δm = 3000) | SSB | 0,13 ‰ |
| Sulfates | RM, eau de mer, eau douce | CRM dissous dans HNO ₃ 2% avec [SO ₄ ²⁻] = 3 mg/L. RM d'eau de mer purifié sur résine échangeuse de cations. | Oui | MR (m/Δm = 3000) | SSB + étalonnage externe | 0,2-0,3 ‰ |
| Sulfates | Eau de pluie, de ruissellement et de sol | Purification sur résine échangeuse d'anions (rendement de 100 ± 1 %). | Oui | MR (m/Δm = 2700) | SSB | 0,5 ‰ |
| Sulfates | IAEA-S1, IAEA-S2, IAEA-S4, solution de K ₂ SO ₄ et H ₂ SO ₄ | Minéralisation micro-onde des CRM. | Oui | MR (m/Δm = 2700) / HR (m/Δm = 3000) | Si / SSB | 0,2 ‰ |
| Sulfates | Solution synthétique de sulfates | Acidification à 2% HNO ₃ . Ajout de Ca ⁺ à la solution étalon de sulfates. | Oui | MR (m/Δm = 3000) | SSB | 0,17 ‰ (0,30 mM) 1,81 ‰ (0,05 mM) |
| Sulfates, sulfites, sulfures, APS | Culture de bactéries sulfato-réductrices | Sulfures précipités en ZnS. SO ₄ ²⁻ , SO ₃ ²⁻ et APS séparés et collectés par chromatographie ionique. Tous les analytes ont été convertis en SO ₄ ²⁻ . Purification sur résine échangeuse d'anions, puis dilution à [SO ₄ ²⁻] = 20 μM dans HNO ₃ 5% et ajout de NaOH pour correspondre à la matrice de l'étalon de bracketing Na ₂ SO ₄ . | Oui | MR | SSB | 0,2 ‰ (δ ³⁴ S et δ ³³ S) |
| Sulfates, Sulfures (oxydés en sulfates) | Eaux interstitielles de sédiments marins, sulfure d'argent | Eaux interstitielles extrudées des sédiments marins et acidifiées avec HNO ₃ . Ag ₂ S minéralisés avec HCl/HNO ₃ à 70 °C. Purification sur colonne échangeuse d'anions. Ajout de Na ⁺ afin d'avoir Na/S = 2 en solution. | Oui | MR (m/Δm = 5000) | SSB | 0,18 ‰ (δ ³⁴ S) 0,10 ‰ (Δ ³³ S) |
| Soufre total | chalcopryrite, chalcocite, pyrite, pyrrhotite, molybdénite | Digestion HCl/HNO ₃ . Purification de S sur colonne à deux étages utilisant des résines échangeuses de cations et d'anions. Solution de S diluée à 20 mg/L avec HNO ₃ 2%. Intensités correspondent à l'étalon de bracketing IAEA-S1 à ± 10%. | Non | HR | SSB | 0,1-0,3 ‰ |

| Masse minimale de S | Résultats / Conclusions | Référence |
|---------------------|---|--------------------------|
| nd | L'effet de la concentration en soufre sur $\delta^{34}\text{S}$ a été évalué (-25,55 ‰ entre 10 et 1 ppm, +1,33 ‰ entre 10 et 20 ppm) et corrigé grâce à une droite d'étalonnage avec succès pour des solutions synthétiques et des eaux interstitielles. Cette méthode permet également de déterminer la concentration en soufre des échantillons. | (Bian et al., 2015) |
| nd | Différence de 0,72 à 2,35 ‰ entre SSB et SSB avec étalonnage externe pour $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates. Biais de masse des sulfates induit par le plasma et dû à son état de valence. Nouvelle méthode combinant SSB et étalonnage externe. La courbe d'étalonnage corrige le biais de masse résultant d'effets de matrice et spécifiques aux sulfates. | (Pribil et al., 2015) |
| nd | Ca, K, Li et Na causent un effet de matrice à partir d'un rapport massique (Cation/Soufre) de 5, 5 et 1, respectivement et d'une concentration de 1,1 mmol/L. La méthode de séparation a permis de pré-concentrer (facteur 3) les sulfates et de les isoler des cations et ainsi éviter le biais de masse induit par la matrice. L'addition de Cl^- et NO_3^- à plus de 5 mmol/L provoque un fractionnement isotopique pendant la séparation anionique et diminue le rendement jusqu'à 12 %. | (Hanousek et al., 2016a) |
| nd | Comparaison des performances de 3 ICP-MS quadripolaires, d'un ICP-MS haute-résolution et d'un ICP-MS à multicollecteur pour la mesure de $^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$. Correction au Si réduit le temps de mesure et les éventuels effets de matrice. Biais de masse instrumental potentiellement différent pour S et Si doit être pris en compte. L'utilisation d'instruments à collecteur unique pour la mesure des variations naturelles de $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ est limitée, mais de loin suffisante pour les mesures par dilution isotopique. | (Hanousek et al., 2016b) |
| nd | L'effet de matrice relatif au Ca sur $\delta^{34}\text{S}$ et l'intensité de ^{32}S est dépendant de la concentration absolue en Ca plutôt que du rapport Ca/S. $\delta^{34}\text{S}$ et l'intensité de ^{32}S diminuent avec l'augmentation de Ca/S et l'augmentation de la concentration absolue en Ca. En conditions de plasma sec les effets de matrice dû au Ca sont bien plus élevés (jusqu'à -19,5 ‰ et -70% de ^{32}S) qu'en plasma humide (jusqu'à -3,4 ‰ et -20% de ^{32}S). | (Liu et al., 2016) |
| nd | Mise au point d'une approche analytique optimisée pour déterminer $\delta^{34}\text{S}$ de plusieurs espèces : CSIA hors ligne . Utilisation de sulfates dopés en ^{33}S pour tracer les éventuelles contaminations grâce au $\delta^{33}\text{S}$. Étude du mécanisme de la sulfato-réduction bactérienne. | (Sim et al., 2017) |
| 100 ng | Analyse de $\delta^{34}\text{S}$ et $\Delta^{33}\text{S}$ avec des incertitudes respectives de 0,18 ‰ et 0,10 ‰ pour 3 nmol (100 ng) de soufre. Quantification des pertes de soufre pendant la préparation d'échantillon et la désolvatation par membrane. Réduction des effets mémoires par ajout de Na^+ à la solution de rinçage. Application à des eaux interstitielles de sédiments marins faiblement concentrées en soufre pour l'étude des bactéries sulfato-réductrices et de l'oxydation du méthane. | (Yu et al., 2017) |
| nd | Récupération quantitative de S (99,8%) et élimination efficace des éléments de la matrice. Les valeurs $\delta^{34}\text{S}$ des CRM IAEA S-2, S-3 et IAPSO-SW correspondent aux valeurs certifiées. Cette approche peut être utilisée avec différents types de minéraux sulfurés. | (Sun et al., 2018) |

Tableau 1-7 : Études publiées à ce jour sur les applications de la détermination des rapports isotopiques du soufre par MC-ICP-MS (sans couplage). LR : Basse résolution, MR : Moyenne résolution, HR : Haute résolution, SSB : Sample-standard-bracketing, Si/Cl : Correction du biais de masse par mesure des rapports isotopiques de Si/Cl, CRM : Matériaux de référence certifiés, nd : non disponible.

| Analytes cibles | Échantillons | Préparation échantillon | Désolvatation | Résolution | Correction du biais de masse |
|-----------------|--|---|---------------|---------------------------|------------------------------|
| Soufre total | Comprimés d'un médicament | CRM minéralisés. Comprimé Heptodin™ ont été dissous dans 10 mL de HNO ₃ à 1 %. Addition de 5 µg/g de Si. | Non | MR | Si |
| Sulfates | Eau de rivière | Purification sur colonne à échange de cations (rendements 98-100 %). | Non | HR | SSB |
| Sulfates | Carbonates (coraux) | Dissous dans HCl. Purification sur résine échangeuse d'anions. Na ⁺ (NaOH) ajouté aux échantillons pour correspondre [Na ⁺] de l'étalon de bracketing. | Oui | HR (m/Δm = 8000-10000) | SSB |
| Sulfates | Eau de mer et coquilles de foraminifères | Dissous dans HCl puis purifié sur résine échangeuse de cations (Biorad AG50X8). | Oui | HR (m/Δm = 8000-10000) | SSB |
| Sulfates | Eau lacustre | Les eaux sont acidifiées, puis purifiées sur une résine échangeuse de cations. NaCl est ajouté pour faire correspondre [Na ⁺] à l'étalon de bracketing. | Oui | HR (m/Δm = 8000-10000) | SSB |
| Soufre total | Eau de pluie | Acidification à 2 % de HNO ₃ . | Oui | MR | SSB |
| Sulfates | Micrite, coraux, calcite de brachiopodes | Échantillons dissous dans HCl 0,5 mol/L. Purification sur résine échangeuse d'anions. | Oui | HR (m/Δm = 8000-10000) | SSB |
| Sulfate | Sols | Extraction à l'eau puis purification sur résine échangeuse d'anions ou prélèvement avec échantillonneur DGT. Dilution à 1 mg-S/L. | Oui | MR (m/Δm = 2700) | SSB |
| Sulfate | Lixiviats de minerai d'uranium | Purifiés sur résine échangeuse d'anions. [S] ajustée à 2 mg/L. Ajout de Ag ⁺ (Ag ⁺ /SO ₄ ²⁻ : 4/1) pour correspondance de la matrice avec l'étalon de bracketing. | Oui | LR (m/Δm = 300) | SSB |

| Incertitude | Masse minimale de S | Résultats / Conclusions | Référence |
|--|---------------------|---|--------------------------------------|
| 1 ‰ | nd | Identification de comprimés contrefaits grâce à une empreinte multi-isotopique (C, N, S, Mg) propre aux antiviraux d'origine. | (Santamaria-Fernandez et al., 2009b) |
| 0,2 ‰ | nd | Identification des sources de sulfates de la rivière Kaoping, Taiwan. Mise en évidence d'effet de saisonnalité. | (Das et al., 2012a) |
| 0,22 ‰ ($\delta^{34}\text{S}$), 0,51 ‰ ($\Delta^{33}\text{S}$) | nd | Détermination de $\Delta^{33}\text{S}$ par MC-ICP-MS dans des carbonates néoarchéens à faible teneur en sulfates | (Paris et al., 2014a) |
| 0,2 ‰ | nd | Expériences de culture sur l'espèce planctonique <i>Orbulina universa</i> . La méthode utilise moins de 650 μg de carbonates par analyse. Fractionnement de -1‰ entre l'eau de mer et <i>O. universa</i> . | (Paris et al., 2014b) |
| 0,2 ‰ | nd | Estimation de la concentration en sulfates dans l'océan archéen à travers des modèles issus de l'étude d'un lac pauvre en sulfates analogue de l'océan archéen. | (Crowe et al., 2014) |
| 0,3 ‰ | nd | Des eaux de pluie ont pu être analysées avec une préparation minimale. Les sources de soufre dans les écosystèmes hawaïens ont été étudiées <i>via</i> $\delta^{34}\text{S}$. | (Bern et al., 2015) |
| 0,13-0,35 ‰ | 160 ng | $\delta^{34}\text{S}$ mesuré pour différents composants pétrographiques de sulfates associés à du carbonate. Étude de la relation entre $\delta^{34}\text{S}$ de la calcite de brachiopodes et $\delta^{34}\text{S}$ de sulfates d'eau de mer. | (Present et al., 2015) |
| 0,2 ‰ | nd | Adaptation de la DGT à l'échantillonnage des sulfates labiles d'échantillons de sol pour la séparation de matrice en une seule étape, évitant ainsi des interférences lors de la mesure par MC ICP-MS. $\delta^{34}\text{S}$ systématiquement inférieurs par DGT attribués à la minéralisation du S organique par rapport à une extraction à l'eau. | (Hanousek et al., 2016c) |
| nd | nd | Utilisation du $\delta^{34}\text{S}$ pour l'authentification nucléaire (origine ou processus) ont été étudiés. | (Krajko et al., 2016) |

| Analytes cibles | Échantillons | Préparation échantillon | Désolvatation | Résolution |
|----------------------------|---------------------------------------|--|---------------|---------------------------|
| Sulfates (après oxydation) | Sédiments | Extraction et séparation des phases selon leur polarité. Oxydation avec H ₂ O ₂ 30 % à 90 °C pendant 24 h et purification sur résine échangeuse d'anions. Ajout de Na ⁺ pour correspondance de la matrice. | Oui | MR (m/Δm = 8000) |
| Sulfate | Eaux de rivières | Les eaux sont purifiées sur une résine échangeuse de cations (Paris et al. 2013) ou d'anions (Paris et al. 2014a). NaCl est ajouté pour faire correspondre [Na ⁺] à l'étalon de bracketing. | Oui | HR (m/Δm = 8000-10000) |
| Sulfates | Carottes de glace | Les eaux sont acidifiées, évaporées à sec à 100 °C et diluées dans HCl à 0,25 %. Purification sur une résine échangeuse de cations. NaCl est ajouté pour faire correspondre [Na ⁺] à l'étalon de bracketing. | Oui | HR (m/Δm = 8000-10000) |
| Soufre total | Pyrite | Digestion avec HNO ₃ concentré à 100 °C et purification sur colonne à échange de cations, puis dilution avec HNO ₃ 0,28 mol/L. | Non | HR |
| Sulfates | Eaux de rivières | Eaux évaporées et reprise dans HCl 0,01 mol/L. Purification sur résine échangeuse d'anions. Na ⁺ (NaOH) ajouté aux échantillons pour correspondre [Na ⁺] de l'étalon de bracketing. | Oui | HR (m/Δm = 8000-10000) |
| Sulfate | calcite de foraminifères | Dissous dans HCl puis purifié sur résine échangeuse de cations. | Oui | HR (m/Δm = 8000-10000) |
| Sulfate | Eaux de rivières et eaux souterraines | Purification sur résine échangeuse d'anions. Na ⁺ (NaOH) ajouté aux échantillons pour correspondre [Na ⁺] de l'étalon de bracketing. | Oui | HR (m/Δm = 8000-10000) |
| Sulfites et APS | Solutions d'essais enzymatiques | Les sulfites et l'APS ont été séparés et collectés par chromatographie ionique puis convertis en sulfates. Dilué à 20 μmol/L dans HNO ₃ 5% pour correspondre à la concentration de l'étalon. | Oui | MR |
| Sulfures | Solution de sulfures | Les sulfures ont été précipités en ZnS, puis oxydé en sulfates par H ₂ O ₂ . Purification par échange d'anions, évaporation et dilution à 20 μmol/L dans HNO ₃ 5% pour correspondre à la concentration de l'étalon. | Oui | MR |

| Correction du biais de masse | Incertitude | Masse minimale de S | Résultats / Conclusions | Référence |
|------------------------------|----------------------------------|---------------------|---|--------------------------|
| SSB | 0,2 ‰ | nd | Étude des processus de sulfuration de la matière organique. | (Raven et al., 2016) |
| SSB | 0,2 ‰ | nd | Identification quantitative des sources de sulfates. | (Torres et al., 2016) |
| SSB | 0,42 ‰ ($\Delta^{33}\text{S}$) | nd | Étude paléo-climatique par les mesures de $\delta^{34}\text{S}$ et $\Delta^{33}\text{S}$ anormal. | (McConnell et al., 2017) |
| SSB | 0,16 ‰ | nd | Détermination des sources de pyrite. | (Moussa et al., 2017) |
| SSB | 0,2 ‰ | 640 ng | Estimation du budget global des isotopes du soufre fluvial. | (Burke et al., 2018) |
| SSB | 0,2 ‰ | nd | Utilisation de $\delta^{34}\text{S}$ pour des études paléo-climatiques. | (Rennie et al., 2018) |
| SSB | nd | nd | Utilisation de $\delta^{34}\text{S}$ et $\Delta^{33}\text{S}$ pour des études paléo-climatiques. | (Torres et al., 2018) |
| SSB | 0,2 ‰ | nd | Étude du fractionnement isotopique du soufre par des bactéries sulfato-réductrices a été déterminé. | (Sim et al., 2019a) |
| SSB | 0,2 ‰ | nd | Étude du fractionnement isotopique du soufre lors de la volatilisation des sulfures. | (Sim et al., 2019b) |

3.2.5. GC-MC-ICP-MS

D'autres auteurs ont couplé des techniques de séparation (GC ou LC) au MC-ICP-MS afin de réaliser des analyses CSIA en ligne. Les publications relatives aux analyses par GC-MC-ICP-MS sont présentées dans le Tableau 1-8 et le Tableau 1-9. Amrani *et al.* (2009) ont mis au point un couplage GC-MC-ICP-MS afin de déterminer la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ d'espèces organosoufrées volatiles dans des échantillons liquides ou solides. Le biais de masse a été corrigé par SSB grâce à l'injection de SF_6 en début et en fin de chromatogramme. Les auteurs ont montré que les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ n'étaient pas significativement différentes de celles obtenues par EA-IRMS pour 8 étalons de composés organosoufrés. L'incertitude des $\delta^{34}\text{S}$ obtenus était de 0,1 ‰ pour les analytes contenant plus de 1,3 ng de soufre et de 0,5 ‰ pour ceux contenant seulement 192 pg de soufre. Les auteurs ont montré que pour des pics chromatographiques dont l'intensité varie entre 1,5 V et 48 V l'incertitude est de 0,45 ‰. Ceci montre que cette méthode couplée permet de déterminer $\delta^{34}\text{S}$ pour des espèces présentes en concentrations différentes dans un même échantillon.

Cette méthode a également permis d'analyser des espèces organosoufrées difficiles à isoler en quantités suffisantes pour des analyses par EA-IRMS. Par exemple, les faibles concentrations naturelles de diméthyle de sulfure dans les eaux océaniques (généralement quelques nmol/L), sa volatilité et sa réactivité élevées rendent son extraction et son analyse par IRMS très difficile. Le couplage GC-MC-ICP-MS offre la sensibilité requise (< ng au lieu de quelques μg) et apparaît comme une méthode beaucoup plus simple pour l'analyse isotopique de traces de diméthyle de sulfure (Greenwood *et al.*, 2014). Pour l'analyse de espèces organosoufrées dans les sédiments (Raven *et al.*, 2016, 2015), la GC-MC-ICP-MS a permis de réduire la quantité d'échantillon de 200-250 g à environ 5 g et de réduire les étapes de préparation d'échantillon (HPLC) pour l'analyse par EA-IRMS par rapport à une précédente étude par CSIA hors ligne (Werne *et al.*, 2008). De plus, Raven *et al.* (2015) ont mis en évidence que les analyses des mêmes espèces issues du même échantillon de sédiment ont conduit à des valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ différentes (jusqu'à 30 ‰ de différence) entre les deux méthodes. Ces différences peuvent être imputées à la présence de soufre élémentaire dans les fractions isolées par HPLC. Ainsi, la GC-MC-ICP-MS a permis d'éviter des erreurs analytiques induites par la préparation d'échantillon lors des analyses par EA-IRMS.

Des incertitudes sur $\delta^{34}\text{S}$ plus élevées (1-2 ‰, Tableau 1-9), ont été obtenues lors de l'analyse d'échantillons dont la matrice est complexe (pétroles, sédiments). Cette augmentation des incertitudes est possiblement due à des effets de matrice causés par les espèces non soufrées qui coéluent avec les espèces organosoufrées (Amrani *et al.*, 2009). La méthode SSB utilisée dans ces études ne permet pas de corriger ces effets de matrice, néanmoins la séparation chromatographique permet de les limiter.

Depuis le développement initial de la GC-MC-ICP-MS il y a 10 ans, les applications se sont multipliées et ont permis d'étudier divers processus liés aux espèces organosoufrées volatiles au sein du cycle biogéochimique du soufre pour lesquels peu d'investigations avait été précédemment menées, principalement à cause de difficultés analytiques. Les analyses isotopiques des composés organosoufrés

contenus dans les échantillons de pétroles, de sédiments et d'eaux de mer représentent les applications principales de cette technique (Tableau 1-8 et Tableau 1-9).

Tableau 1-8 : Études publiées sur le développement analytique de la détermination des rapports isotopiques du soufre par GC-MC-ICP-MS. LR : Basse résolution, MR : Moyenne résolution, HR : Haute résolution, SSB : Sample-standard-bracketing, Si/Cl : Correction du biais de masse par mesure des rapports isotopiques de Si/Cl, CRM : Matériaux de référence certifiés nd : non disponible.

| Analytes cibles | Échantillons | Préparation échantillon | Séparation | Résolution | Correction du biais de masse |
|--|--|---|---|---------------------|------------------------------|
| SF ₆ | SF ₆ dilué dans de l'argon | Aucune | Colonne Restek MXT 1, He 50 mL/min, 35 °C. | LR | nd |
| dihexylsulfure, mono-/di-/4,6-diéthyl-dibenzothiophène, 1-octadécane-thiol, 3-octyl-/3-hexyl-thiophène, 1-dodécane-thiol | Pétrole brut à faible teneur en soufre | Dilution dans de l'hexane. | Colonne HP DB-5, He 1,2 mL/min, gradient 80-300 °C. | MR (m/Δm = 5000) | SSB |
| DMS et DMSP | Eaux de mer | Aucune ou acidifié avec HCl 37% | Colonne capillaire, 30 °C, He 2,5 mL/min. Échantillons purgés avec He et piégés (N ₂ liquide), puis injectés. | HR (m/Δm = 9800) | SSB |
| DMS et DMSP | Eaux de mer | Aucune ou acidifié avec HCl 37% | Colonne capillaire, 30 °C, He 2,5 mL/min. Échantillons purgés avec He et piégés (N ₂ liquide), puis injectés. | HR (m/Δm = 9800) | SSB |
| (Di-)Benzothiophènes, 2-thiaadamantane, thiadamantane, thiolanes | Pétroles | LC préparative. Pré-concentration par évaporation. | Colonne DB5-MS, gradient 60-320 °C, He 1,5 mL/min. Échantillons purgés avec He et piégés (N ₂ liquide), puis injectés. | MR/HR | SSB |
| Composés organosoufrés | Sédiments | Digestion micro-onde dichlorométhane/MeOH. Extraction des composés organosoufrés sur gel de silice. | Colonne HP DB-5, He 1,2 mL/min, gradient 80-300 °C. | HR (m/Δm = 9800) | SSB |

| Incertitude | Masse minimale de S | Résultats / Conclusions | Référence |
|-------------|---------------------|--|-------------------------------|
| 1 ‰ | 2 ng | Analyse au niveau du ng, combinant spéciation et rapport isotopique, pour un composé soufré volatil. RSD sur $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ de 0,6 % à 0,03 % pour 2 à 30 ng de S injectés. RSD < 0,4 % pour > 10 ng de S injectés pour les rapports isotopiques $^{32}\text{S}/^{33}\text{S}$ et $^{33}\text{S}/^{34}\text{S}$. | (Krupp et al., 2004) |
| 0,1-0,5 ‰ | 192 pg | Une méthode très sensible a été développée pour l'analyse de $\delta^{34}\text{S}$ de composés organiques par GC-MC-ICP-MS. SSB avec des pics de gaz de référence (SF_6). Augmentation des incertitudes lors de coélution de composés ne contenant pas de S. Les analyses d'échantillons de pétrole brut montrent une grande variabilité dans $\delta^{34}\text{S}$ et démontrent la robustesse et la précision de la méthode dans des échantillons environnementaux complexes. | (Amrani et al., 2009) |
| 0,4 ‰ | 640 pg | Méthode GC-MC-ICP-MS sensible et précise pour l'analyse de traces de DMS et de DMSP d'eaux. Méthode applicable pour l'estimation de la contribution de DMS et de DMSP aux aérosols de sulfates dans l'atmosphère. | (Amrani et al., 2013) |
| 0,1-0,3 ‰ | 830 pg | Le couplage d'un système de purge et piégeage avec un système GC-MC-ICPMS est une approche sensible, précise et robuste pour l'analyse de $\delta^{34}\text{S}$ de DMS et de DMSP (nmol/L) de solutions naturelles. | (Said-Ahmad and Amrani, 2013) |
| 1 ‰ | nd | La LC préparative n'induit pas de fractionnement isotopique dans les composés organosoufrés du pétrole. Étude de la thermo sulfato-réduction. | (Gvirtzman et al., 2015) |
| 0,8-1,8 ‰ | 1,6 ng | Les valeurs moyennes de $\delta^{34}\text{S}$ pour les étalons étaient égales aux valeurs publiées en EA-IRMS à $\pm 1,4$ ‰. $\delta^{34}\text{S}$ des composés organosoufrés beaucoup plus faibles que prévu par les modèles actuels. Les composés organosoufrés sont formés par au moins deux mécanismes. | (Raven et al., 2015) |

Tableau 1-9 : Études publiées sur les applications de la détermination des rapports isotopiques du soufre par GC-MC-ICP-MS. LR : Basse résolution, MR : Moyenne résolution, HR : Haute résolution, SSB : Sample-standard-bracketing, Si/Cl : Correction du biais de masse par mesure des rapports isotopiques de Si/Cl, CRM : Matériaux de référence certifiés nd : non disponible.

| Analytes cibles | Échantillons | Préparation échantillon | Séparation |
|--|--|--|---|
| Benzothiophène, dibenzothio-phènes, sulfure d'alcane, thiols | Pétroles | nd | Colonne HP DB-5, He 1,4 mL/min, gradient 60-300 °C |
| Dibenzothio-phène | Pétroles | La fraction aromatique est extraite par LC préparative. | nd |
| Benzothiophènes et dibenzothiophènes | Pétroles | Asphaltène précipités avec de l'éther de pétrole. LC préparative. | Colonne Perkin Elmer Velocity, gradient 60-320°C. |
| alkylthiaadamantanes, alkylthiophènes, alkylbenzothiophènes et alkylthiolanes ; H ₂ S et pétrole brut (EA-IRMS) | Pétroles | Asphaltènes précipités avec du n-hexane. LC préparative. Fraction sulfurique concentrée à 50-150 µL. | Colonne Agilent DB5-MS, gradient 60-320 °C avec He 1,5 mL/min. Échantillons purgés avec He et piégés (N ₂ liquide), puis injectés. |
| Benzothiophène, dibenzothiophène et 2-phénylthiophène | Échantillons d'essai de pyrolyse en tube d'or simulant la thermo-sulfato-réduction | Extraction au dichlorométhane. | Colonne DB5-MS, gradient 60-320 °C avec He 1,5 mL/min. |
| C ₂₀ -Thiophène et composé organosoufré non identifié | Sédiments | Lyophilisation, extraction dichlorométhane/méthanol et séparation des phases non polaire, moyennement polaire, polaire et fortement polaire sur gel de silice. Chaque phase est analysée en CSIA et en <i>bulk</i> . | Colonne HP DB-5, He 1,2 mL/min, gradient 80-300 °C |

| Résolution | Correction du biais de masse | Incertitude | Masse minimale de S | Résultats / Conclusions | Référence |
|-------------------------------|------------------------------|-------------|---------------------|--|--------------------------|
| MR ($m/\Delta m = 5000$) | SSB | 1 ‰ | 320 pg | Étude de la thermo sulfato-réduction. | (Amrani et al., 2012) |
| HR ($m/\Delta m = 9800$) | SSB | 1 ‰ | nd | Les valeurs $\delta^{34}\text{S}$ de pétrole (<i>bulk</i>) et DBT individuels ont permis de déterminer la roche mère (source) du pétrole, lorsque ce dernier n'a pas été altéré par des processus secondaires tels que la biodégradation, la thermo sulfato-réduction ou la bactéries sulfato-réductrices. | (Cai et al., 2015) |
| HR ($m/\Delta m = 9800$) | SSB | 1 ‰ | nd | Des variations significatives des $\delta^{34}\text{S}$ des composés individuels dans les pétroles. La CSIA du soufre pourrait indiquer l'ampleur de la thermo sulfato-réduction de pétrole profond. | (Li et al., 2015) |
| HR ($m/\Delta m = 9800$) | SSB | 1-2 ‰ | nd | CSIA du soufre de différents composés organosoufrés, détermination de l'origine de pétroles issus ou non de la thermo sulfato-réduction. | (Cai et al., 2016) |
| MR/HR | SSB | 1 ‰ | nd | Étude de la thermo sulfato-réduction.. | (Meshoulam et al., 2016) |
| MR ($m/\Delta m = 8000$) | SSB | 0,3-1 ‰ | 3,2 ng | Étude des processus de sulfuration de la matière organique. | (Raven et al., 2016) |

3.2.6. LC-MC-ICP-MS

Le couplage de techniques de séparation par chromatographie liquide à un MC-ICP-MS pour la détermination de rapports isotopiques du soufre n'a été que peu utilisé à ce jour. À notre connaissance, ce type de couplage a été employé seulement dans quatre études (Tableau 1-10).

Clough *et al.* (2006) et Santamaria-Fernandez *et al.* (2008) ont déterminé les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ d'une espèce organosoufrée contenu dans des médicaments par couplage entre chromatographie liquide haute performance (HPLC) et MC-ICP-MS. Dans les deux études l'analyte (le principe actif du médicament) a été séparé de la matrice sur une colonne en phase inverse C18. Les approches pour réduire les interférences spectrales et corriger le biais de masse ont été différentes dans ces deux études. Clough *et al.* (2006) ont réalisé les mesure de rapports isotopiques en mode basse résolution et ont utilisé un système de désolvatation afin de réduire les interférences. Pour corriger le biais de basse, ils ont employé la méthode SSB, mais le soufre dans l'étalon utilisé étant sous forme de sulfates il n'est pas clair s'il a été injecté *via* le système chromatographique ou analysé directement par MC-ICP-MS. Santamaria-Fernandez *et al.* (2008) ont utilisé un mode moyenne résolution et ont corrigé le biais de masse par un ajout post-colonne de Si et la mesure en continu du rapport $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$.

Dans ces deux études, les auteurs concluent que la détermination des valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ par HPLC-MC-ICP-MS leur a permis d'identifier des médicaments contrefaits car des différences significatives ont été obtenues rapport aux originaux. Malheureusement, dans aucune de ces études la justesse de la méthode n'a été vérifiée par l'analyse de matériaux de référence certifiés, il est par conséquent difficile de comparer les deux approches mises en œuvre. Santamaria-Fernandez *et al.* (2008) ont obtenus des incertitudes relativement élevées 1,7-5 ‰ par rapport à celle de 1 ‰ obtenue par Clough *et al.* (2006). Les études menées par Clough *et al.* (2006) et Santamaria-Fernandez *et al.* (2008) ont montré que le couplage HPLC-MC-ICP-MS pouvait être appliqué à la détermination de $\delta^{34}\text{S}$ d'espèces organosoufrées pour la détection de produits pharmaceutiques contrefaits. Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires pour démontrer la justesse des mesures réalisées.

Zakon *et al.* (2014) ont présenté un développement analytique permettant la détermination de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates et thiosulfates par un couplage chromatographie ionique et MC-ICP-MS en moyenne résolution. Plus récemment, Ullrich *et al.* (2018) ont étendu la méthode à l'analyse des sulfures, sulfates, thiosulfates et mono-, di-, tri- tétra- thioarsénates. Zakon *et al.* (2014) ont injectés 50 μL d'échantillons et séparés les analytes sur une colonne anionique avec une phase mobile KOH 30 mmol/L. Ensuite, l'échantillon a traversé un suppresseur de conductivité, où l'échange de cations avec H^+ a été réalisé, puis une solution tampon de $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ a été ajoutée afin d'éviter des pertes d'anions lors de la désolvatation. Le biais de masse a été corrigé par SSB avec une solution de Na_2SO_4 et n'est donc pas spécifique à chaque espèce. Les conditions analytiques dans l'étude de Ullrich *et al.* (2018) différent de la méthode de Zakon *et al.* (2014) par l'utilisation d'un gradient d'éluion (KOH 20-90 mmol/L) et un volume d'injection de 500 μL , soit 10 fois plus. Zakon *et al.* (2014) ont démontré la justesse pour $\delta^{34}\text{S}$

des sulfates par comparaison avec les valeurs reportées dans la littérature pour des échantillons synthétiques et des eaux naturelles. En revanche, la justesse des valeurs obtenues pour les autres espèces n'a pas été évaluée avec des matériaux de référence certifiés ou par comparaison avec une méthode indépendante. Ullrich *et al.* (2018) ont montré que la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ n'était pas significativement différente pour des intensités de pics comprises entre 1 et 20 V, ce qui correspond à une teneur en soufre entre 0,2 et 4 μg . Des incertitudes de 0,1-0,3 ‰ ont été obtenues pour des masses d'analytes à partir de 160 ng de soufre.

Ullrich *et al.* (2018) ont appliqué cette méthode dans le cadre de l'étude du mécanisme d'oxydation abiotique (réaction avec H_2O_2) des thioarsénates lors d'expériences en laboratoire. Elle a permis de contourner les limitations d'une préparation par précipitation séquentielle pour des analyses par EA-IRMS, notamment la co-précipitation partielle des thioarsénates avec les sulfures lors de l'ajout d'acétate de Zn. La LC-MC-ICP-MS a permis de déterminer en une seule analyse la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ de 7 espèces, ce qui offre un gain de temps significatif puisque les étapes de préparation conséquentes nécessaires à des analyses par CSIA hors ligne sont évitées.

À ce jour, les méthodes couplant séparation par chromatographie liquide sont encore peu développées mais les résultats des études pionnières sont prometteurs. Le couplage de la chromatographie liquide et d'une détection par MC-ICP-MS a permis la détermination des valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ spécifiques à plusieurs espèces soufrées présentes dans un échantillon liquide. Sur les quatre études réalisées, une seule étude a eu recours à une correction du biais de masse par le silicium. Mais il n'est pas clair si cette méthode présente un avantage par rapport au SSB pour ce type de couplage, d'autres investigations dans ce sens sont nécessaires. D'autre part, la justesse des mesures n'a pas été évaluée pour toutes les espèces mais seulement pour les sulfates. Par ailleurs, on peut se demander si l'analyse des sulfures par cette méthode serait pertinente pour des échantillons environnementaux, étant donnée la grande réactivité des sulfures en solution. De plus, il n'y a pas de méthode permettant la mesure des rapports isotopiques des sulfites, qui sont pourtant une espèce importante du cycle du soufre dans l'hydrosphère (voir parties 0 et 2 de ce chapitre).

Tableau 1-10 : Études publiées à ce jour sur la détermination des rapports isotopiques du soufre par LC-MC-ICP-MS. LR : Basse résolution, MR : Moyenne résolution, HR : Haute résolution, SSB : Sample-standard-bracketing, Si/Cl : Correction du biais de masse par mesure des rapports isotopiques de Si/Cl, CRM : Matériaux de référence certifiés, nd : non disponible.

| Analytes cibles | Échantillons | Préparation échantillon | Séparation et introduction de l'échantillon | Résolution | Correction du biais de masse |
|---|--|--|--|-------------------------------|------------------------------|
| sildénafil citrate | comprimés d'un médicament | Extraction du sildénafil citrate par un mélange méthanol/eau 50:50 | HPLC, colonne C18, gradient d'éluion eau-acétonitrile avec 0,05 % d'acide formique à 1 mL/min sur 30 min, désolvation . | LR ($m/\Delta m = 400$) | SSB |
| nd | comprimés d'un médicament | Comprimé dissous dans 10 mL de méthanol à 10 % | HPLC, colonne C18, Ac.NH ₄ 10 mmol/L 10 % méthanol pH=6,5 à 0,1 mL/min, Si ajouté post-colonne . | MR | Si |
| Sulfates et thiosulfates | Eaux naturelles et synthétiques | Aucune ou dilution dans H ₂ O | Chromatographie ionique, colonne AS11/AS19, KOH 30/50 mmol/L à 0,45 mL/min, suppresseur (échange des cations avec H ⁺) et ajout d'un tampon NaHCO ₃ /Na ₂ CO ₃ avant désolvation . | MR | SSB |
| Sulfures, sulfates, thiosulfates, mono- di- tri- tétra- thioarsénates | Solutions thioarsénates au cours d'une oxydation abiotique | Aucune | Chromatographie ionique, colonne AS16, gradient KOH 20-90 mmol/L à 0,45 mL/min, suppresseur (échange des cations avec H ⁺) et ajout d'un tampon NaHCO ₃ /Na ₂ CO ₃ avant désolvation . | MR ($m/\Delta m = 6000$) | SSB |

| Incertitude | Masse minimale de S | Résultats / Conclusions | Référence |
|---|---------------------|--|-------------------------------------|
| 1 ‰ | nd | Des différences de $\delta^{34}\text{S}$ significatives ont été observées entre des pilules de Viagra contrefaites et des pilules authentiques. Les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ obtenues pour le comprimé entier (LA-MC-ICP-MS) diffèrent des $\delta^{34}\text{S}$ obtenues pour les principes actifs (HPLC-MC-ICP-MS). Les auteurs ne concluent pas quant à la justesse de la méthode. | (Clough et al., 2006) |
| 1,7-5 ‰ | nd | Les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ obtenues par HPLC-MC-ICP-MS pour les comprimés authentiques concordaient avec celles obtenues par LA-MC-ICP-MS, confirmant ainsi que la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ est inhérente au principe actif. Le pouvoir discriminant de la technique a permis de différencier les comprimés authentiques des comprimés contrefaits. Les auteurs ne concluent pas quant à la justesse de la méthode. | (Santamaria-Fernandez et al., 2008) |
| 0,15 ‰ (SO_4^{2-}), 0,3 ‰ ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) | 160 ng | Mise au point d'une méthode pour une analyse précise de $\delta^{34}\text{S}$ d'espèces anioniques individuelles par IC-MC-ICPMS. Analyse simultanée de sulfates et thiosulfates. Les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ obtenues pour les sulfates, pour des échantillons synthétiques et des eaux environnementales correspondent aux valeurs reportées dans la littérature. | (Zakon et al., 2014) |
| 0,3 ‰ | 0,2-4 μg | Nouvelles méthode IC-MC-ICP-MS permettant la séparation et l'analyse de $\delta^{34}\text{S}$ en ligne de 7 espèces avec un volume d'échantillon et un temps d'analyse réduit. $\delta^{34}\text{S}$ n'était pas significativement différente pour des intensités de pics comprises entre 1 et 20 V. | (Ullrich et al., 2018) |

3.2.7. LA-MC-ICP-MS

Le couplage entre ablation laser et MC-ICP-MS est largement répandu pour l'analyse directe de solide (Tableau 1-11 et

Tableau 1-12). Cette méthode permet, en plus de la détermination de $\delta^{34}\text{S}$, de connaître la distribution spatiale des isotopes lors d'analyses de surface. La dimension du faisceau laser (spot) est comprise entre 10 μm et 150 μm et va conditionner la résolution spatiale. Mais la résolution spatiale dépend également de la quantité de soufre contenu dans l'échantillon analysé et de la quantité de soufre nécessaire pour déterminer $\delta^{34}\text{S}$ et du type de laser utilisé (Bendall et al., 2006; Fu et al., 2017). Les auteurs ont, dans la majorité des études, eu recours à des étalons de même matrice que les échantillons (Tableau 1-11). Lorsque la matrice de l'étalon est différente de celle de l'échantillon, des erreurs de justesse jusqu'à 3 ‰ ont pu être observées (Mason et al., 2006). Il a été observé que des différences de matrices, de concentration en soufre et de structure cristalline entre l'échantillon et l'étalon peuvent conduire à des résultats erronés (Chen et al., 2017). De plus, le flux de gaz vecteur, la taille des spots et la densité d'énergie du laser sont des paramètres qui peuvent également conduire à un fractionnement isotopique du soufre (Chen et al., 2017). Fu *et al.* (2017) ont comparé l'utilisation d'un laser nanoseconde et d'un laser femtoseconde. Les intensités mesurées pour ^{32}S étaient 1,4 à 2,4 fois plus élevées avec le laser femtoseconde, ceci est attribué à la taille plus petite des particules émises et à moins d'effets thermiques produits par le laser femtoseconde. A la même intensité, les incertitudes sur $\delta^{34}\text{S}$ obtenues avec le laser femtoseconde étaient 1,6 fois inférieures à celles obtenues avec le laser nanoseconde. Il en résulte que le laser femtoseconde permet d'atteindre une meilleure résolution spatiale et les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ étaient en accord avec les valeurs certifiées pour des matériaux de référence (à $\pm 0,15$ ‰ pour $\delta^{34}\text{S}$ et $\pm 0,45$ ‰ pour $\delta^{33}\text{S}$).

Le couplage LA-MC-ICP-MS est une méthode particulièrement adaptée à l'analyse d'échantillons géologiques. En effet, la plupart des applications sont dédiées à l'étude de minéraux (

Tableau 1-12). La résolution spatiale (entre 10 μm et 150 μm) de cette méthode a permis de mettre en évidence l'hétérogénéité de minerais suggérant différents processus de formation (Bendall et al., 2006) et de déterminer les sources et processus qui ont conduit à la formation de minéraux sulfurés (Okrusch et al., 2007). La technique LA-MC-ICP-MS a également été appliquée à l'étude de cheveux humains et il a été montré que les variations longitudinales du $\delta^{34}\text{S}$ pourrait être un indicateur de l'origine géographique et des mouvements récents (Santamaria-Fernandez et al., 2009a). En revanche cette technique ne permet pas d'intégrer des informations de spéciation et n'est pas appropriée à l'étude d'échantillon liquide, c'est pourquoi elle n'est ici que brièvement abordée.

Tableau 1-11 : Études publiées à ce jour sur le développement analytique de la détermination des rapports isotopiques du soufre par LA-MC-ICP-MS. LR : Basse résolution, MR : Moyenne résolution, HR : Haute résolution, SSB : Sample-standard-bracketing, Si/Cl : Correction du biais de masse par mesure des rapports isotopiques de Si/Cl, CRM : Matériaux de référence certifiés, nd : non disponible.

| Echantillons | Préparation échantillon | Conditions d'ablation et introduction de l'échantillon | Résolution | Correction du biais de masse |
|---|---|---|---|-------------------------------------|
| Pyrite, pyrrhotite, chalcopyrite, pentlandite | Les minéraux sulfurés ont été polis. | Laser New Wave LUV 213 nm, spot de 40-60 μm . | MR ($m/\Delta m = 4000$) | SSB |
| IAEA-S1 -S2 -S3 -S4, NBS127, pyrrhotite | Étalons préparés sous forme de pastilles grâce à une presse hydraulique. Les minéraux sulfurés ont été polis. | Laser CETAC LSX-200, spot de 80-100 μm , + HCl (20%) nébulisé à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ / Laser New Wave UP213, spot de 95 μm , + Si dans HNO₃ 2% et désolvatation. | LR ($m/\Delta m = 400$) + cellule de collision / MR ($m/\Delta m = 3000$) | Si + SSB / Cl + SSB |
| Sulfures et sulfates naturels, anhydrite, marcasite et pyrite | nd | Laser New Wave UP213 nm, spot de 60 μm , particules émises par le laser mélangées à 2 % de HNO ₃ . | HR | SSB |
| Authentification de comprimés d'un médicament | nd | Laser New Wave UP213 nm, spot de 10 μm , Si ajouté après désolvatation. | MR | Si |
| Cheveux humain, crins de cheval | Pré-ablation pour nettoyer la surface des cheveux. | Laser New Wave UP213 nm, spot de 12 μm , pré-ablation pour nettoyer la surface de l'échantillon. Solution de IAEA-S4 (5 $\mu\text{g}/\text{g}$) utilisée pour SSB ajoutée après désolvatation. | MR | SSB |
| Matériaux de référence, pyrite | Matériaux de référence préparés sous forme de pastille pressé. | Laser New Wave UP213 nm, spot de 40-55 μm . | MR ($m/\Delta m = 3000$) | SSB/SSB + étalonnage externe |
| Ag ₂ S, S élémentaire, pyrite, chalcopyrite, sphalérite, molybdénite, sulfure synthétique (Fe-Cu-Zn-S) | Préparée sous forme de pastille pressée ou cristaux uniques (sulfures naturels) et polis. | Laser Lambda Physik Geolas 2005, spot de 24-60 μm . | MR ($m/\Delta m = 4000$) | SSB |
| Sulfures | Films photographique insérés verticalement dans le sédiment et incubés 24 h à 22 °C dans l'obscurité. | Laser Analyte 193 ATLEX-SI, spot de 135 μm . | HR | SSB |

| Incertitude | Masse minimale de S | Résultats / Conclusions | Référence |
|--|---------------------|--|--------------------------------------|
| 0,4-0,6 ‰ | nd | Les analyses <i>in situ</i> ont permis de mettre en évidence des différences significatives de $\delta^{34}\text{S}$ entre les noyaux et les rebords d'un certain nombre de pyrites de Mina Colombia. | (Bendall et al., 2006) |
| 0,6 ‰ ($\delta^{34}\text{S}$) 1,5 ‰ ($\delta^{33}\text{S}$) | nd | Correction du biais de masse par mesure de Cl ou Si sur deux MC-ICP-MS différents. $\delta^{33}\text{S}$ ne peut être mesuré qu'avec le système 2, car interféré sur le système 1. $\delta^{34}\text{S}$ et $\delta^{33}\text{S}$ mesurés sont en accord avec les données de référence pour IAEA-S1 -S2 -S3 et un échantillon de pyrrhotite. Les effets de matrice limitent l'applicabilité de cette méthode à d'autres matériaux riches en S, tels que IAEA-S4 (erreur de justesse > 3 ‰). | (Mason et al., 2006) |
| 0,45 ‰ | 15 µg | Montage permettant un étalonnage croisé LA/solution, $\delta^{34}\text{S}(\text{LA}) = \delta^{34}\text{S}(\text{solution}) \pm 0,2 \text{ ‰}$. Capacité à déterminer les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ d'échantillons aqueux et solides pour une large gamme de matrices, avec une correction par SSB avec un étalon en solution de matrice identique. $\delta^{34}\text{S}$ sulfures et de sulfates naturels analysés par LA-MC-ICP-MS en accord avec les données publiées. | (Craddock et al., 2008) |
| 1 ‰ | nd | La valeur de $\delta^{34}\text{S}$ a permis de différencier les comprimés authentiques des comprimés contrefaits. La méthode LA-MC-ICP-MS présente donc un potentiel d'outil de dépistage rapide pour la détection et la classification des produits pharmaceutiques contrefaits. | (Santamaria-Fernandez et al., 2008) |
| 1,2-1,5 ‰ | nd | Mesure des variations isotopiques du S dans des cheveux humains. Des variations < 1,2 ‰ ont été détectées dans les mèches de cheveux de résidents britanniques, alors qu'un voyageur présentait des variations > 5 ‰. Ainsi, la mesure des $\delta^{34}\text{S}$ dans les cheveux pourrait être un indicateur de l'origine géographique et des mouvements récents. | (Santamaria-Fernandez et al., 2009a) |
| 0,1-0,4 ‰ ($\delta^{34}\text{S}$ et $\delta^{33}\text{S}$) | nd | Nouvelle méthode utilisant une correction d'étalonnage externe pour les sulfates. Différence de 0,72 à 2,35 ‰ entre SSB et SSB avec étalonnage externe pour $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates. Pas de fractionnement lors de l'analyse de sulfures par (LA-)MC-ICPMS. Fractionnement des sulfates induit par le plasma et dû à son état de valence. | (Pribil et al., 2015) |
| 0,15-0,45 ‰ ($\delta^{34}\text{S}$) 0,26-0,96 ‰ ($\delta^{33}\text{S}$) | nd | Nouvelle approche pour mesure <i>in situ</i> de $\delta^{34}\text{S}$ et $\delta^{33}\text{S}$ d'échantillons de sulfures et soufre élémentaire. L'utilisation d'un cône échantillonneur Jet et d'un cône écrêteur X améliore la sensibilité du soufre d'un facteur de 3,6. L'ajout de N_2 réduit efficacement les interférences poly-atomiques et stabilise le biais de masse. Réduction efficace de l'effet de matrice en utilisant l'ablation par balayage linéaire avec une cadence de tirs optimisée. $\delta^{33}\text{S}$ et $\delta^{34}\text{S}$ de 12 matériaux de référence sont rapportées. | (Fu et al., 2016) |
| nd | nd | Mesure de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfures aqueux dans les eaux naturelles à haute résolution spatiale (<1 mm ²) pour des concentrations de 0,01–20 mmol/L, par capture des sulfures sur films photographiques noir et blanc couplé au LA-MC-ICP-MS. Application à une incubation anaérobie d'eau de mer et de sédiments, cartographie de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfures à deux dimensions (535 µm × 535 µm). | (Goodridge and Valentine, 2016) |

Tableau 1-12 : Études publiées à ce jour sur les applications de la détermination des rapports isotopiques du soufre par LA-MC-ICP-MS. LR : Basse résolution, MR : Moyenne résolution, HR : Haute résolution, SSB : Sample-standard-bracketing, Si/Cl : Correction du biais de masse par mesure des rapports isotopiques de Si/Cl, CRM : Matériaux de référence certifiés, nd : non disponible.

| Échantillons | Préparation échantillon | Conditions d'ablation et introduction de l'échantillon | Résolution | Correction du biais de masse |
|--|---|--|-------------------------------|------------------------------|
| Chalcopyrite, bornite, tennantite et énérgite | Les minéraux sulfurés ont été polis. | Laser New Wave LUV 213 nm, spot de 60 µm. | HR | SSB |
| Carottes de forage et anhydrites du fond marin | Les sections d'anhydrite ont été polies. | Laser New Wave UP213 nm, spot de 60 µm. | HR | SSB |
| Minéraux de sulfates et sulfures | Les minéraux ont été polis. | Laser New Wave LUV 213 nm, spot de 60 µm. | MR ($m/\Delta m = 4000$) | SSB |
| Pyrite, chalcopyrite et pyrrhotite | IAEA-S1, IAEA-S3, NBS127 et NBS123 préparé en pastilles avec une presse manuelle. Les cristaux de NBS123, BSB-py et BSB-cpy et des échantillons naturels ont été polis. | Laser New Wave UP213 nm, spot de 125-150 µm. | MR | SSB |
| Pyrite, pyrrhotite, chalcopyrite, bornite, galène, pentlandite, baryte | RM préparés sous forme pastilles avec une presse manuelle. Échantillons naturels polis. | Laser New Wave UP213 nm, spot de 125-150 µm. | MR | SSB |

| Incertitude | Masse minimale de S | Résultats / Conclusions | Référence |
|--|---------------------|--|---------------------------|
| 0,4-0,6 ‰ | nd | Les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ ont permis de mettre en évidence l'origine de minéraux de sulfures. | (Okrusch et al., 2007) |
| 0,45 ‰ | 15 μg | L'analyse élémentaire de terres rares et isotopique (Sr et S) dans les anhydrites des fonds marins et sous-marins a fourni des informations sur les processus régissant la formation et l'évolution des fluides hydrothermaux dans le bassin de Manus lié à la subduction, en Papouasie Nouvelle Guinée. | (Craddock and Bach, 2010) |
| 0,4-0,6 ‰ | nd | Dans 30% des grains des minéraux, la répétabilité est supérieure à 1,5 ‰ et dépasse la reproductibilité des étalons (0,5-1,0 ‰). Cela implique une hétérogénéité isotopique à l'échelle du grain. Résultats insatisfaisants pour les minéraux de galène, probablement dus à des effets de matrice. Les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ ont permis de mieux comprendre les processus de mélange de fluides à l'interface socle-couverture. | (Wagner et al., 2010) |
| 0,32 ‰ ($\delta^{34}\text{S}$), 0,34 ‰ ($\delta^{33}\text{S}$), 0,46 ‰ ($\Delta^{33}\text{S}$) | nd | L'ablation laser MC-ICP-MS peut fournir des $\delta^{34}\text{S}$, $\delta^{33}\text{S}$ et $\Delta^{33}\text{S}$ précis et exacts. FIM dépend de la source et de l'âge (> 2,45 Ga) du S. | (Bühn et al., 2012) |
| 0,1-0,5 ‰ | nd | $\delta^{34}\text{S}$ a permis d'étudier la formation de roches. | (Gomide et al., 2013) |

3.3. Autres techniques

D'autres techniques, moins répandues, ont aussi été employées pour des mesures isotopiques du soufre, telles que la spectrométrie de masse à ionisation secondaire (SIMS : *Secondary Ion Mass Spectrometry*), la spectrométrie de masse par ionisation thermique à multi-collecteurs (MC-TIMS) ou la spectroscopie à source laser (*tunable laser spectroscopy*).

Le SIMS (ou nano-SIMS) a été utilisé pour des analyses de surface d'échantillons solides. Un faisceau primaire de césium (Cs^+) est utilisé pour pulvériser l'échantillon afin de produire des ions secondaires négatifs, les rapports isotopiques sont mesurés sur l'ion S^- (Weber et al., 2002). C'est une méthode complexe qui peut permettre (selon la résolution de l'instrument) l'analyse de $\delta^{33}\text{S}$, $\delta^{34}\text{S}$ et $\delta^{36}\text{S}$ avec des incertitudes respectives de 0,3 ‰, 0,3 ‰ et 0,7 ‰ et une résolution spatiale de l'ordre de 100 nm à 5 μm (Weber et al., 2002; Zhang et al., 2014).

Une autre technique, basée sur la spectroscopie laser, a été développée pour les analyses *in situ* et comme potentiel instrument de terrain. Pour l'instant, cette technique permet seulement d'atteindre des incertitudes de 4 ‰ pour $\delta^{34}\text{S}$ et nécessite donc des améliorations (Christensen et al., 2007). Le MC-TIMS permet de déterminer $\delta^{34}\text{S}$ avec une incertitude inférieure à 0,1 ‰ pour des quantités inférieures à 1 $\mu\text{g-S}$ (Mann and Kelly, 2005). Cependant, des étapes de préparations fastidieuses sont nécessaires pour convertir l'échantillon sous la forme de As_2S_3 en solution car les rapports sont ici calculés sur l'ion AsS^+ . De plus, c'est une technique coûteuse puisqu'elle repose sur un ajout de ^{33}S et ^{36}S purs (*double spike*) qui permet de corriger le biais de masse.

Synthèse de l'étude des différentes stratégies d'analyse de $\delta^{34}\text{S}$ pour les espèces inorganiques du soufre en milieu aqueux

Il existe deux principaux appareils permettant la mesure des rapports isotopiques du soufre : l'IRMS et le MC-ICP-MS.

Analyse IRMS :

L'analyse par DI-IRMS est sans doute la méthode la plus fastidieuse car elle nécessite le plus de préparation d'échantillon hors-ligne et la moins adaptée à l'analyse d'échantillons liquides.

Le couplage EA-IRMS est la méthode la plus répandue car elle permet de limiter les étapes de préparation et de diminuer considérablement le temps d'analyse. Environ 33 μg de soufre par espèce sont nécessaires pour réaliser une analyse, les incertitudes de la méthode sont généralement de 0,1-0,5 ‰.

Pour l'analyse d'échantillon liquide il est nécessaire de convertir les espèces du soufre sous forme solide. L'analyse de plusieurs espèces du soufre en solution représente donc une préparation d'échantillon longue et complexe. La plupart des protocoles existant se focalise sur l'analyse des sulfates et des sulfures, parfois du soufre élémentaire. Les protocoles permettant l'analyse des thiosulfates ou des sulfites sont bien moins développés.

Analyse MC-ICP-MS :

L'avantage de cette méthode est que les échantillons peuvent être introduits directement sous forme liquide. L'inconvénient majeur de cette méthode est le biais en masse qu'il est nécessaire de corriger. Pour cela plusieurs méthodes existent, la plus répandue est celle du standard-sample-bracketing, une autre est la correction par la mesure du rapport isotopique du silicium. Cette dernière présente l'avantage de corriger également les effets de matrice. Les analyses isotopiques par MC-ICP-MS sont possibles à partir de 160 ng de soufre par espèce avec des incertitudes de 0,1-0,5 ‰.

Pour analyser plusieurs espèces en solution, il est possible de coupler une séparation par chromatographie liquide à une détection par MC-ICP-MS. Cela permet de réduire considérablement les étapes de préparation d'échantillon, cependant il nécessite un développement de méthode considérable. À ce jour ce type de couplage n'a été que très peu développé.

4. Objectifs et démarche de ce travail

L'identification des processus biogéochimiques à l'origine des transferts et des changements de spéciation du soufre représente un challenge majeur dans l'étude du cycle du soufre.

L'isotopie du soufre est un indicateur de choix pour étudier le cycle biogéochimique du soufre et les mécanismes qui le régissent. En effet, les analyses isotopiques du soufre permettent d'identifier les sources du soufre dans un réservoir et de quantifier les flux entrants et sortants. De plus, les analyses isotopiques du soufre permettent d'étudier les mécanismes tels que la sulfato-réduction bactérienne, l'oxydation biotique ou abiotique des sulfures et des espèces de valence intermédiaire telles que le soufre élémentaire, les thiosulfates ou les sulfites. Toutefois, ces mécanismes sont difficiles à caractériser car ils impliquent un grand nombre d'espèces dont la mesure des rapports isotopiques n'est pas toujours possible de par leurs faibles concentrations, les quantités d'échantillon limitées ou encore le manque de méthode adaptée pour isoler les différentes espèces. Il n'existe à ce jour aucune méthode permettant la mesure des rapports isotopiques des sulfures, des sulfates, des sulfites et des thiosulfates dans un même échantillon. La mesure des rapports isotopiques des différentes espèces du soufre représente donc un verrou technique pour la compréhension des mécanismes du cycle du soufre dans l'hydrosphère.

On peut alors se demander quelle approche analytique convient à la mesure des rapports isotopiques des différentes espèces susceptibles d'intervenir dans des processus biogéochimiques.

L'EA-IRMS est la technique la plus répandue pour les analyses isotopiques du soufre. Elle est relativement facile à mettre en œuvre et les analyses sont rapides. Cependant, il est nécessaire d'isoler les différentes espèces à analyser à travers des étapes de préparation hors-ligne. La séparation des espèces peut être envisagée de deux manières. La première consiste à mettre au point un schéma de précipitation séquentielle où chaque espèce est précipitée individuellement (Fry et al., 1985; Smock et al., 1998). La seconde consiste à réaliser une séparation chromatographique, où les fractions correspondant à chaque espèce sont collectées, puis à précipiter les espèces isolées (Sim et al., 2017).

Le MC-ICP-MS permet des analyses isotopiques précises d'échantillons liquides contenant des quantités de soufre de l'ordre du μg . Sim *et al.* (2017) ont mis en évidence que l'analyse des fractions collectées à la suite d'une séparation chromatographique représente une alternative avantageuse pour des analyses CSIA hors-ligne. D'autre part, il a également été montré qu'une séparation chromatographique peut être directement couplée au MC-ICP-MS, ce qui offre l'avantage de réduire le temps d'analyse et supprime la préparation d'échantillon (Ullrich et al., 2018; Zakon et al., 2014). Cette méthode permet également de réaliser en ligne les analyses de spéciation et d'isotopie du soufre. En revanche cette approche étant actuellement très peu répandue, elle nécessite des développements analytiques conséquents. Il est nécessaire de mettre en place une méthode de séparation des espèces sulfurées ainsi qu'une méthodologie permettant de corriger le biais de masse et les effets de matrice.

Cette thèse a donc pour objectif de mettre en place des méthodes pour des analyses CSIA des espèces inorganiques du soufre dans des échantillons liquides.

Dans un premier temps, une méthode d'analyse CSIA hors-ligne a été développée. Elle a consisté en l'isolation des sulfures, des thiosulfates et des sulfates par une précipitation séquentielle, qui sera suivie d'une analyse par EA-IRMS. Cette méthode a été appliquée à l'analyse d'échantillons d'eaux de surface et souterraines, puis au suivi cinétique de la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ lors de la sulfato-réduction de la souche *Desulfotomaculum profundum* sp. nov. cultivée en laboratoire. Comme vu dans la première partie de ce chapitre, cette application représente un vrai challenge car elle implique différentes espèces sulfurées qui pourront éventuellement être présentes à l'état de traces dans un milieu réducteur anoxique complexe.

Dans un deuxième temps, un développement analytique pour réaliser des analyses CSIA en ligne pour des quantités de soufre de l'ordre du μg a été réalisé. Une méthode par couplage chromatographie liquide et MC-ICP-MS a été mise au point pour la séparation et l'analyse en ligne de la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ du soufre des sulfites, des sulfates et des thiosulfates.

Chapitre 2 –
Spéciation et analyses
isotopiques du soufre :
approche hors-ligne

1. Introduction

Les sulfates, les sulfures, les thiosulfates et les sulfites sont des espèces jouant un rôle majeur dans le cycle biogéochimique du soufre et en particulier en milieu anaérobique où elles sont impliquées dans les mécanismes de sulfato-réduction bactérienne, de dismutation et d'oxydation biotique ou abiotique (voir paragraphe 1.2 du chapitre 1). Les analyses isotopiques spécifiques à différentes espèces chimiques du soufre sont indispensables pour comprendre le cycle biogéochimique de cet élément. En effet, la spéciation du soufre et les analyses isotopiques apportent des informations complémentaires permettant d'identifier les différents mécanismes mis en jeu (voir paragraphe 2.4 du chapitre 1). Pour mesurer les rapports isotopiques de plusieurs espèces chimiques, il est nécessaire de les séparer avant leur analyse. La difficulté de la mise en place de tels protocoles est de réussir à récupérer chaque espèce présente dans l'échantillon à analyser sans causer de fractionnement isotopique. À ce jour, il existe très peu de méthodes permettant de mesurer les rapports isotopiques des thiosulfates et des sulfites, le plus souvent seuls les sulfates et les sulfures sont analysés (voir paragraphe 3.1.1 du chapitre 1). C'est pourquoi nous avons choisi dans ce travail de nous intéresser à ces quatre espèces.

Deux approches analytiques complémentaires ont été investiguées, à savoir les analyses de spéciation et les analyses isotopiques des espèces inorganiques du soufre. Le premier objectif est de mettre en place une méthode analytique pour déterminer la spéciation du soufre en solution, car la spéciation est d'une grande importance lors des mécanismes de réduction des sulfates en milieu anaérobie. De plus, la quantification des espèces du soufre permet de déterminer quelles seront les espèces dont on pourra mesurer les rapports isotopiques et d'évaluer le volume d'échantillon nécessaire pour réaliser ces analyses. Le deuxième objectif est de mettre au point une méthodologie pour réaliser l'analyse isotopique des sulfures, des sulfates et des thiosulfates dans un échantillon liquide.

Afin de pouvoir identifier et quantifier les espèces inorganiques du soufre présentes en solution, nous avons tout d'abord développé une méthode de spéciation en ligne. Celle-ci se base sur le couplage d'une séparation par chromatographie liquide et d'une détection par ICP-MS haute résolution. Ensuite, la mise en place d'une stratégie analytique pour la mesure des rapports isotopiques des sulfures, des sulfates et des thiosulfates par EA-IRMS a été réalisée. Comme vu au chapitre 1 (paragraphe 3.1), l'analyse isotopique du soufre par EA-IRMS est une méthode qui ne peut être appliquée qu'à des échantillons solides. Aussi, afin de mesurer les rapports isotopiques des sulfures, des sulfates et des thiosulfates dissous par cette méthode, une étape de préparation d'échantillons par précipitation sélective et séquentielle a été mise au point. Enfin, afin de valider la méthodologie développée, nous avons analysé différents types d'échantillons. En premier lieu, nous avons déterminé les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates dans des eaux de surface. Ensuite, nous avons déterminé les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates et des sulfures d'eaux souterraines provenant d'un aquifère profond utilisé pour le stockage de gaz naturel dans lequel se développent des bactéries sulfato-réductrices. Enfin, nous avons suivi la spéciation et le

fractionnement isotopique du soufre au cours de la croissance de bactéries sulfato-réductrices provenant d'une souche isolée à partir d'une communauté microbienne d'un aquifère profond.

2. Matériels et méthodes

2.1. Réactifs

De l'eau ultra-pure (18.2 M Ω cm) obtenue à partir d'un système Milli-Q (Millipore) a été utilisée pour préparer toutes les solutions et diluer les échantillons lorsque nécessaire. Le formaldéhyde (HCHO, ACS, 37%), l'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH, 30%), le nitrate d'ammonium (NH₄NO₃, >99,5%), le sulfite de sodium (Na₂SO₃, *analytical standard*), le sulfate d'ammonium ((NH₄)₂S₂O₃, >99%), le thiosulfate de sodium pentahydraté (Na₂S₂O₃.5H₂O, ACS), le thiosulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄, >98%), l'acétate de zinc dihydraté (ACS), l'acide acétique (100%), l'acétate d'ammonium (>98%), l'éthylène diamine tétra-acétate de tétra-sodium (EDTA, >98%) et l'hypochlorite de calcium (Ca(ClO)₂, *technical grade*) proviennent de Sigma-Aldrich. Le sulfate de sodium (Na₂SO₄, >99%), le chlorure de sodium (NaCl, ACS) et le chlorure de baryum dihydraté (BaCl₂.2H₂O >99,5%) proviennent de VWR Prolabo. Le sulfure de sodium (Na₂S.xH₂O, x = 7-9, 35% de Na₂S) provient de Merck. Le nitrate d'argent (AgNO₃, extra pur) provient de chez Sharlau. L'acide nitrique (HNO₃, ultra-pur, 70%) et l'acide chlorhydrique (HCl, ultra-pur, 36,5%-38%) ont été fournis par J.T Baker. Le pentoxyde de vanadium (V₂O₅) et le perchlorate de magnésium (MgClO₄) proviennent de Thermo Scientific. Les gaz hélium, (He 5.0), dioxygène (O₂ 5.0) et dioxyde de soufre (SO₂ 3.8) proviennent de Linde. Un kit de réactifs (diéthyl-p-phénylène diamine et dichromate de potassium) Palintest a été utilisé pour les mesures de concentrations en sulfures.

2.2. Solutions étalons et matériaux de référence

2.2.1. Solutions étalons

Pour les analyses de spéciation, des solutions mères à 100 μ g-S/g ont été réalisées pour chaque espèce soufrée (sulfites, sulfates et thiosulfates) et ont été utilisées pour la préparation de solutions étalons *via* une dilution dans la phase mobile, et ce, avant chaque session analytique. 1% de formaldéhyde a été ajouté à la solution de sulfites à 100 μ g-S/g afin de dériver et stabiliser les ions sulfites.

Pour les tests de précipitation des sulfures, des solutions étalons à 10 mmol-S/L de sulfures préparées à partir de Na₂S dans de l'eau ultra-pure ont été utilisées. Pour les tests de précipitation des sulfates, des solutions étalons à 20 mmol-S/L préparées avec (NH₄)₂SO₄ dans de l'eau ultra-pure ont été utilisées. Pour les tests d'oxydation chimique des thiosulfates, des solutions étalons à 20 mmol-S/L de thiosulfates préparées avec (NH₄)₂S₂O₃ dans de l'eau ultra-pure ont été utilisées. Pour les tests d'oxydation électrochimique des thiosulfates, des solutions étalons à 20 mmol-S/L de thiosulfates préparées avec (NH₄)₂S₂O₃ ou Na₂S₂O₃.5H₂O dans un tampon acétate 1 mol/L à pH 5 ont été utilisées. Pour les tests de précipitation séquentielle, une solution de contenant 20 mmol-S/L de chaque espèce préparée avec Na₂S, (NH₄)₂SO₄ et (NH₄)₂S₂O₃ dans de l'eau ultra-pure et une solution contenant 20 mmol-S/L de chaque espèce préparée dans un milieu de culture bactérien ont été utilisées.

2.2.2. Matériaux de référence certifiés

Du sulfanilamide ($C_6H_8N_2O_2S$, Thermo Scientific) et de l'acide sulfamique (H_3NO_3S , OEA Labs) certifiés en composition élémentaire par les fabricants ont été utilisés pour l'étalonnage du TCD en EA-IRMS, leur teneur en soufre est de $18,62 \pm 0,20 \%$ et $33,10 \pm 0,59 \%$, respectivement.

Les matériaux de référence, dont la valeur de $\delta^{34}S$ est certifiée par l'agence internationale de l'énergie atomique (IAEA), IAEA-S1, IAEA-S3, IAEA-S4 et NBS-127 provenant du National Institute of Standards and Technology (NIST), ont été utilisés pour l'étalonnage de l'IRMS. Ils ont également été utilisés pour évaluer la justesse des mesures par EA-IRMS. Les valeurs de $\delta^{34}S$ des matériaux de référence certifiés sont reportées dans le Tableau 2-1.

2.2.3. Matériaux de référence internes

Les matériaux de référence internes S-Julen (échantillon de soufre élémentaire), H_3NO_3S (OEA Labs), HTS ($BaSO_4$ précipité à partir d'un échantillon d'eau de source) ont également été utilisés pour l'étalonnage de l'IRMS. Les valeurs de $\delta^{34}S$ de ces matériaux ont été déterminées au laboratoire à l'aide des matériaux de référence certifiés susmentionnés et leur stabilité dans le temps a été évaluée (paragraphe 3.2.1). Les valeurs de $\delta^{34}S$ des matériaux de référence internes sont reportées dans le Tableau 2-1.

Tableau 2-1 : Liste des matériaux de référence utilisés pour réaliser l'étalonnage ($\delta^{34}S$) de l'IRMS.

| Matériaux de référence | Type de référence | Formule chimique | $\delta^{34}S$ (‰) |
|------------------------|------------------------|------------------|---------------------------|
| IAEA-S1 | Certifiée | Ag_2S | -0,3 (exact) ^a |
| IAEA-S3 | Certifiée | Ag_2S | $-32,49 \pm 0,17^a$ |
| IAEA-S4 | Certifiée | S élémentaire | $16,86 \pm 0,03^a$ |
| NBS127 | Certifiée | $BaSO_4$ | $21,17 \pm 0,09^a$ |
| S-Julen | Interne au laboratoire | S élémentaire | $16,84 \pm 0,23^b$ |
| H_3NO_3S | Interne au laboratoire | H_3NO_3S | $0,55 \pm 0,19^b$ |
| HTS | Interne au laboratoire | $BaSO_4$ | $21,26 \pm 0,39^b$ |

^a Valeurs certifiées, ^b Valeurs déterminées au laboratoire

2.3. Préparation d'échantillon pour les analyses isotopiques

2.3.1. Précipitation

Un protocole de séparation des espèces dissoutes (sulfures, sulfates et thiosulfates) qui s'inspire des travaux de Fry *et al.* (1985) et Smock *et al.* (1998) a été mis au point. Cette procédure consiste à séparer par précipitation d'abord les sulfures, puis les sulfates et enfin les thiosulfates.

Des filtres 0,45 µm en acétate de cellulose Sartorius ou Millipore ont été utilisés pour les filtrations.

Les sulfures

La précipitation des sulfures est réalisée par ajout, à l'échantillon, d'une solution d'acétate de Zn en excès ($Zn^{2+}/HS^- > 2$) ce qui permet d'obtenir un précipité blanc correspondant à du sulfure de zinc (ZnS). Ce précipité est filtré sous vide à 0,45 µm, puis rincé avec 10 mL d'acide acétique à 1 mol/L, puis 10 mL d'eau. Le rinçage est répété 3 fois afin de dissoudre d'éventuelles impuretés telles que le phosphate de zinc et de se débarrasser de l'excès de Zn. Le rétentat obtenu est transféré dans un flacon en verre. Une solution de $AgNO_3$ est ajoutée en excès ($Ag^+/HS^- > 4$), puis la solution est laissée 12 h dans le noir afin de réaliser un échange ionique entre Zn et Ag, et ainsi d'obtenir un précipité bleu-noir correspondant à du sulfure d'argent (Ag_2S). La solution est ensuite filtrée sous vide à 0,45 µm, puis rincée successivement avec 10 mL d'acide acétique à 1 mol/L, 10 mL d'eau, 10 mL de NH_4OH à 1 mol/L et à nouveau 10 mL d'eau, comme recommandé par Leavitt *et al.* (2014). Après 3 lavages, le rétentat est collecté dans un flacon en verre et séché à l'étuve à 70 °C pendant au moins 12 h jusqu'à masse constante. Le précipité est ensuite homogénéisé dans un mortier avec un pilon ou directement avec la spatule dans le flacon en verre si la quantité est faible (< 100 mg).

Afin de la valider, cette méthode a été appliquée à des solutions de 100 mL de sulfures à 10 mmol/L.

Les sulfates

La précipitation des sulfates est effectuée par ajout d'une solution de chlorure de baryum ($BaCl_2$) après avoir neutralisé les ions carbonates. Pour cela, l'échantillon est acidifié à pH 3-4 avec HNO_3 à 10 %, puis porté à ébullition sur une plaque chauffante afin d'éliminer les éventuelles traces de carbonates. Une solution de $BaCl_2$ à 0,5 mol/L est ensuite ajoutée à l'échantillon conduisant à la formation d'un précipité blanc, $BaSO_4$. La solution est alors filtrée sous vide à 0,45 µm et lavée avec 200 mL d'eau ultra-pure très chaude (sans toutefois atteindre l'ébullition), afin d'éliminer l'excédent de $BaCl_2$ et autres traces de sels ($NaCl$, KCl ...). Enfin, le précipité est récupéré à l'aide d'une spatule puis transféré dans un flacon en verre et séché à l'étuve à 70 °C pendant au moins 12 h jusqu'à masse constante. Le précipité est ensuite homogénéisé dans un mortier avec un pilon ou directement avec la spatule dans le flacon en verre si la quantité est faible (< 100 mg).

Afin de la valider, cette méthode a été appliquée à des solutions de 20 mL de sulfates à 20 mmol/L.

2.3.2. Oxydation des thiosulfates

Pour précipiter quantitativement les thiosulfates, il est au préalable nécessaire de les oxyder en sulfates. Ils peuvent être ensuite précipités en BaSO₄, selon la méthode présentée pour les sulfates. Trois méthodes d'oxydation des thiosulfates ont été envisagées : (1) une oxydation électrochimique, (2) une oxydation chimique avec H₂O₂ et (3) une oxydation chimique par réaction avec l'ion ClO⁻. Les tests ont été réalisés pour des quantités de thiosulfates équivalentes à environ 100 mg de BaSO₄, afin de s'assurer d'avoir une quantité suffisante pour réaliser des analyses par EA-IRMS.

Électrochimique

Pour les mesures électrochimiques, un potentiostat PGSTAT101 Autolab a été utilisé. Un système à trois électrodes a été utilisé, comprenant : une électrode de travail constituée d'une tige de carbone vitreux (2,64 cm²), une contre-électrode de platine et une électrode de référence Ag/AgCl/KCl 3 mol/L (Metrohm), cette dernière étant placée dans une allonge remplie d'électrolytes (tampon acétate 1 mol/L pH 5) afin d'éviter toute contamination de la solution par l'électrode de référence.

Le protocole d'oxydation des thiosulfates par voie électrochimique a été adapté et modifié à partir des méthodes publiées par Feng *et al.* (1995) et Belobaba *et al.* (2008). Il consiste en une électrolyse réalisée sous agitation magnétique à un potentiel de 1,2 V pendant 24 h, afin d'obtenir l'oxydation totale des thiosulfates en sulfates.

Afin de valider cette méthode, elle a été appliquée à 20 mL d'une solution de thiosulfates à 20 mmol/L.

Chimique

Oxydation par du peroxyde d'hydrogène

Plusieurs essais d'oxydation des thiosulfates par du peroxyde d'hydrogène dans différentes conditions de température ont été effectués (-15, 25 et 70-95 °C) (Jeyakumar et al., 2002; Sato et al., 2003).

Différentes solutions de Na₂S₂O₃.5H₂O ou (NH₄)₂S₂O₃ ont été préparées et ajustées à un pH de 11,5 avec NH₄OH 30% afin d'éviter la formation de tétrathionates. Puis, H₂O₂ 30% (soit 9 mol/L) a été ajouté en excès (relation molaire H₂O₂/S₂O₃²⁻ > 400) afin d'éviter que H₂O₂ limite la réaction. Le tube de réaction a ensuite été conditionné à la température choisie pour une durée déterminée.

Afin de la valider, cette méthode a été appliquée à des solutions de 20 mL de thiosulfates à 20 mmol/L.

Oxydation par des ions hypochlorites

L'oxydation des thiosulfates a été réalisée en ajoutant 10 mL d'une solution de ClO^- 400 mmol/L aux échantillons à température ambiante et à pH 7. Le temps de réaction était de 1 h.

Afin de la valider, cette méthode a été appliquée à des solutions de 20 mL de thiosulfates à 20 mmol/L.

2.3.3. Précipitation séquentielle des sulfures, des sulfates et des thiosulfates

L'objectif étant la détermination de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfures, des sulfates et des thiosulfates présents au sein d'un même échantillon, les méthodes de précipitation individuelles ont ensuite été optimisées pour être mises en œuvre en séquence. Pour cela, une solution de chaque espèce à 20 mmol-S/L a été préparée dans de l'eau. Les sulfures ont été précipités par ajout de 400 μL d'acétate de Zn à 1 mol/L puis un échange d'ions a été réalisé par ajout de 400 μL de AgNO_3 à 2 mol/L. Le filtrat a été récupéré et transféré dans un flacon avant de réaliser les lavages du précipité de ZnS . Les sulfates contenus dans le filtrat ont ensuite été précipités par ajout de 1,7 mL de BaCl_2 à 0,5 mol/L. Le filtrat a été récupéré avant le lavage du BaSO_4 précipité. Le filtrat a ensuite subi une oxydation électrochimique et un ajout de 1,7 mL de BaCl_2 à 0,5 mol/L afin de précipiter les thiosulfates. Les précipités obtenus ont ensuite été analysés par EA-IRMS.

Un deuxième essai de précipitation séquentielle a été optimisé pour pouvoir être appliqué à un milieu de culture bactérienne non inoculé. Les mêmes concentrations de sulfures, sulfates et thiosulfates, soient 20 mmol-S/L de chaque espèce que dans le test précédent, ont été ajoutées à 20 mL d'un milieu de culture bactérienne. Les espèces soufrées ont été précipitées comme précédemment, exceptée l'oxydation des thiosulfates qui a été réalisée pendant 1 h à température ambiante par ajout de 10 mL de ClO^- à 400 mmol/L. Les précipités obtenus ont ensuite été analysés par EA-IRMS.

2.4. Méthodes d'analyse

2.4.1. Analyses de spéciation

Les analyses qualitatives et quantitatives des espèces inorganiques soufrées en solution ont été réalisées par couplage d'une séparation par échange d'anions en chromatographie liquide (LC) et d'une détection par ICP-MS haute résolution (HR-ICP-MS).

Le système chromatographique utilisé est une chromatographie liquide LC 1260 Infinity Bio-Inert de Agilent avec une colonne échangeuse d'anions Dionex IonPac AS15 (4 × 250 mm) et une pré-colonne AG15 (4 × 50 mm) dont les phases stationnaires consistent en un polymère éthylvinylbenzène/divinylbenzène comportant des groupes ammonium quaternaires et dont la taille des particules est de 9 μm . Tous les tubes et connexions utilisés étaient en polyétheréthercétone (PEEK).

Une méthode de séparation adaptée des travaux de Lin et Jiang (2009) a été utilisée. La séparation isocratique a été effectuée grâce à une phase mobile de NH_4NO_3 à 60 mmol/L et à 0,1 % de

formaldéhyde à pH 7 (ajusté avec NH₄OH). Le débit de la phase mobile a été fixé à 1 mL/min et un *split* 1/2 est ajouté en sortie de colonne afin d'obtenir un débit de 0,5 mL/min à l'entrée du spectromètre, correspondant aux spécifications du nébuliseur conikal et permettant une nébulisation efficace. Un volume de 100 µL d'échantillon a été injecté *via* un échantillonneur automatique.

La mesure de blancs analytiques a été réalisée par injection de phase mobile. La phase mobile a été dégazée dans un bain ultrasons pendant 15 min avant chaque session d'analyses.

La détection a été réalisée grâce à un spectromètre de masse à plasma à couplage inductif haute résolution (HR-ICP-MS) Thermo Scientific Element XR utilisé en mode moyenne résolution ($\Delta m/m \approx 5000$), permettant de détecter l'isotope 32 du soufre en s'affranchissant des interférences isobariques. Un nébuliseur conikal a été utilisé avec une chambre de nébulisation Scott double-pass, un injecteur de 1,75 mm et des cônes (échantillonneur et écrêteur) en nickel. Le flux d'argon, la position de la torche et la position des lentilles ont été optimisés avant chaque session d'analyses pour assurer une sensibilité optimale. Les conditions analytiques types sont présentées dans le Tableau 2-2.

Tableau 2-2 : Paramètres de mesures et d'acquisition des analyses LC-HR-ICP-MS.

| Paramètres de Chromatographie Liquide | |
|---------------------------------------|---|
| Colonne | Dionex IonPac AS15, 4 × 250 mm + AG15, 4 × 50 mm |
| Phase mobile | NH ₄ NO ₃ 60 mmol/L + 0.1% HCOH, pH = 7 |
| Programme | 20 min isocratique |
| Débit | 1 mL/min |
| Volume d'injection | 100 µL |
| Split | 1/2 |
| Paramètres de l'ICP-MS Element XR | |
| RF power | 1500 W |
| Débit du gaz de refroidissement (Ar) | 16 L/min |
| Débit du gaz auxiliaire (Ar) | 0,9 L/min |
| Débit du gaz échantillonneur (Ar) | 0,9 – 1,0 L/min |
| Cônes échantillonneur et écrêteur | Ni |
| Voltage d'extraction | -2000 V |
| Mode de résolution | Moyenne ($\Delta m/m \approx 5000$) |
| Isotope mesuré | ³² S |
| Fenêtre d'intégration | 80 % |
| Paramètres d'acquisition | sample time: 50 ms, sample per peak: 20, runs: 960 |

2.4.2. Analyses isotopiques

Les analyses isotopiques ($\delta^{34}\text{S}$) et de quantification élémentaire (%S) ont été réalisées grâce à un analyseur élémentaire (EA) Flash HT Plus connecté à un spectromètre de masse à rapport isotopique (IRMS) Delta V Plus *via* un Conflo IV (Thermo Scientific). Des réacteurs en quartz remplis d'oxyde de tungstène (WO_3) et de copeaux ou tiges de cuivre pur séparés par de la laine de quartz ont été utilisés pour la combustion des échantillons. Un insert en quartz a été ajouté dans la partie haute du réacteur où a lieu la combustion pour permettre le retrait régulier des cendres. Les réacteurs et inserts utilisés proviennent de chez OEA Labs. Le réacteur a été changé tous les 150-200 échantillons, l'insert en quartz a été vidé tous les 30-40 échantillons. L'insert a été remplacé lorsque des fissures apparaissaient dans le quartz au niveau de la zone de combustion et/ou lorsqu'une quantité importante de résidus d'étain étaient collés aux parois, généralement après 80-120 analyses. Des capsules en étain provenant de OEA Labs ou Thermo Scientific ont été utilisées. Une colonne en acier inoxydable Porapak QS traitée au Sulfinert (50/80 mesh, 2m, D.I. 5.4 mm, Restek) a été utilisée pour la séparation des gaz produits lors de la combustion.

Une quantité d'échantillon équivalente à environ 50 μg de S est introduite dans une capsule en étain qui est scellée minutieusement à l'aide de pinces. La capsule est ensuite introduite dans l'analyseur élémentaire. Le réacteur de combustion est chauffé à 1020 °C et la colonne de chromatographie gazeuse à 90 °C. Le flux du gaz vecteur (He) est fixé à 100 mL/min, un *pulse* de O_2 de 3s à 250 mL/min est introduit dans le réacteur simultanément à l'échantillon.

Le programme de l'EA-IRMS est présenté dans le Tableau 2-3.

Tableau 2-3 : Programme EA-IRMS lors d'une analyse de $\delta^{34}\text{S}$

| Temps (s) | Evènement |
|-----------|---|
| 50 – 70 | Pulse de SO_2 |
| 120 – 140 | Pulse de SO_2 |
| 121 | Introduction de l'échantillon et du pulse de O_2 dans l'EA |
| 190 – 210 | Pulse de SO_2 |
| 260-280 | Pulse de SO_2 |
| 740 | Fin de l'acquisition |

2.5. Traitement des données

2.5.1. Analyses de spéciation

Le traitement des données et l'intégration des pics chromatographiques ont été réalisés grâce à un algorithme que nous avons développé sur Visual Basic dans Microsoft Excel. Ce programme calcule le bruit de fond du chromatogramme en calculant la moyenne des intensités sur une plage sélectionnée, généralement sur les 100 premières secondes d'analyse. Ensuite, le bruit de fond est soustrait à chaque point de mesure du chromatogramme (les valeurs négatives sont considérées comme nulles). Le programme détecte ensuite tous les pics dont l'intensité dépasse 2000 mV après soustraction du bruit de fond (au besoin, ce minimum d'intensité peut être modifié dans le programme). Pour chaque pic détecté, le programme considère le premier point d'intensité égale à zéro précédant le pic comme le début du pic et le premier point d'intensité égale à zéro suivant comme la fin du pic. Le temps de rétention moyen, la largeur de pic et l'intensité maximum de chaque pic sont ensuite déterminés et l'aire du pic est calculée par la méthode des trapèzes. Une fonction du programme permet de calculer l'aire d'un pic dont le début et la fin sont fixés par l'utilisateur, ce qui permet notamment de calculer l'aire d'un pic pour lequel le signal ne retourne pas à la ligne de base, par exemple dans le cas où deux pics se chevauchent. Les aires des pics des solutions étalons servent ensuite à construire une droite d'étalonnage.

2.5.2. Analyses isotopiques

La valeur de $\delta^{34}\text{S}$ a été systématiquement exprimée par rapport à l'échelle internationale Vienna-Cañion Diablo Troilite (V-CDT). La valeur de $\delta^{34}\text{S}$ a tout d'abord été calculée par rapport au gaz de référence (SO_2) qui a été injecté sous la forme de *pulses* au début du chromatogramme selon l'Équation 2-1 :

$$\text{Équation 2-1 : } \delta^{34}\text{S}_{\text{Gaz de référence}} = \left(\frac{{}^{34}\text{S}/{}^{32}\text{S}_{\text{Echantillon}}}{{}^{34}\text{S}/{}^{32}\text{S}_{\text{Gaz de référence}}} - 1 \right) \times 1000 (\text{‰})$$

La valeur de $\delta^{34}\text{S}$ a ensuite été normalisée par rapport à l'échelle V-CDT grâce à une droite d'étalonnage réalisée avec des matériaux de référence (certifiés et/ou internes) analysés au cours de la séquence.

2.6. Échantillons

2.6.1. Échantillons d'eaux

Eaux de surface

Des échantillons d'eaux naturelles, dont les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates ont été préalablement déterminées par EA-IRMS par un laboratoire extérieur, ont été analysés dans le but d'évaluer la méthode mise au point sur des échantillons réels. Ces échantillons sont des eaux de sources provenant du Bassin de Sivas en Turquie et sont décrits dans les travaux de Pichat *et al.* (2018). Leur concentration en sulfates varie de 17 à 46 mmol/L, leur salinité varie de 1 % à 43 % en masse. Les échantillons d'eau ont été stockés à 4 °C avant analyse. 8 échantillons d'eaux ont été préparés au laboratoire selon le protocole de

précipitation des sulfates présenté au paragraphe 2.3.1, puis analysés par EA-IRMS. Les résultats obtenus ont ensuite été comparés aux valeurs rapportées.

Eaux souterraines

Les échantillons étudiés proviennent de l'aquifère aquitain dit des « sables infra-molassiques », et plus précisément de sa zone la plus à l'ouest exploitée pour le stockage de gaz. Une biodégradation des BTEX a été mise en évidence dans la zone de stockage de gaz de cet aquifère et est liée à une forte activité bactérienne (Caumette et al., 2017). Les bactéries dégradant les BTEX sont typiquement des bactéries sulfato-réductrices (Berlendis et al., 2010; Bolliger et al., 2001; Knöller et al., 2006). Nous avons alors étudié les rapports isotopiques du soufre dans ces échantillons et leur possible usage en tant que traceurs de biodégradation. Trois échantillons d'eau de sites périphériques au stockage de gaz ont également été analysés et comparés à ceux issus du stockage de gaz. Les échantillons d'eau ont été prélevés dans différents puits lors de 4 campagnes d'échantillonnage en mars 2017, octobre 2017, avril 2018 et octobre 2018. Les échantillons ont été filtrés sous vide à 0,45 µm sur site puis stockés à 4 °C dans des flacons en polyéthylène de 1 L avec double fermeture, contenant 4 mL d'acétate de Zn à 1 mol/L afin de précipiter les sulfures (sous forme de ZnS) et d'éviter leur oxydation. Au laboratoire, 1 mL d'échantillon a été prélevé après filtration de ZnS pour réaliser les analyses de spéciation.

2.6.2. Culture de bactéries sulfato-réductrices

Une culture pure de bactéries sulfato-réductrices *Desulfotomaculum profundum* Bs107^T a été réalisée avec des sulfates comme unique accepteur d'électrons et du pyruvate comme unique donneur d'électrons. La souche *Desulfotomaculum profundum* Bs107^T (*D. profundum*) a été isolée à partir d'une communauté microbienne hydrocarbonoclaste d'un aquifère profond (Berlendis et al., 2016).

Le milieu de culture est composé d'une base minérale comprenant, pour 1 L de milieu, 1,0 g de NH₄Cl, 1,0 g de NaCl, 0,1 g de CaCl₂.2H₂O, 0,5 g de MgCl₂.6H₂O, 0,3 g de K₂HPO₄, 0,3 g de KH₂PO₄, 3 µg Na₂SeO₃, 1 mL de solution d'oligoéléments (Tableau A1) (Widdel and Pfennig, 1981) et 2,2 g de pyruvate de sodium soit 20 mmol/L. La base minérale est stérilisée par autoclave 20 minutes à 121°C, et dégazée à chaud avec du diazote afin d'être en conditions anoxiques. À température ambiante, 2,0 g de NaHCO₃, 10 mL de solution de vitamines (Tableau A2) (Balch et al., 1979) et 3 g de sulfate de sodium, soient 20 mmol/L sont ajoutés en conditions stériles et anoxiques. Le pH est ajusté à 7,2 avec une solution anoxique d'HCl 5 mol/L. Préalablement, une pré-culture de 45 mL *D. profundum* a été réalisée afin de servir d'inoculum pour l'étude. Le milieu a été inoculé à 10% et distribué dans des tubes en verre (15 mL par tube), fermés par un septum en caoutchouc et scellés par une capsule en aluminium. Enfin, les tubes ont été immédiatement dégazés avec N₂ et incubés à 45°C. Quinze tubes ont été préparés, afin de réaliser cinq points de prélèvement de trois répliques chacun. Les prélèvements ont été réalisés à différents temps d'incubation afin d'être représentatifs des différentes phases de croissance. Six tubes contenant du milieu de culture non inoculé ont également été préparés, trois d'entre eux ont été analysés

à $t = 0$ afin de connaître la composition initiale du milieu sans bactérie et les trois tubes restants ont été incubés afin de vérifier l'absence de contamination au cours de l'expérience.

Lors du prélèvement, l'échantillon a été filtré à $0,22\ \mu\text{m}$ afin d'en retirer les bactéries. Le filtre a été mis en suspension dans 10 mL d'eau milliQ et sous agitation magnétique pendant 10 minutes afin de remettre les bactéries en solution. La solution bactérienne obtenue a été centrifugée à 4000 g pendant 30 minutes. Le culot bactérien a été récupéré et séché à l'étuve à $70\ ^\circ\text{C}$ pendant au moins 12 h jusqu'à masse constante avant d'être analysé par EA-IRMS.

1 mL de solution sans cellule bactérienne (filtrat) a été prélevé et acidifié pour la quantification du pyruvate, de l'acétate, des sulfates et des thiosulfates. Le reste de la solution a été transféré dans un flacon contenant 2 mL d'acétate de Zn à $0,5\ \text{mol/L}$ afin de précipiter les sulfures et de prévenir leur oxydation. Dans le tube contenant la culture, après le prélèvement, 2 mL d'acétate de Zn ont été ajoutés afin de précipiter les sulfures présents dans la phase gazeuse. Les sulfures précipités ont été ajoutés au flacon précédant. Les échantillons ont été conservés à $4\ ^\circ\text{C}$ avant analyse.

La densité optique (DO) à 580 nm des milieux de cultures a été mesurée avec un spectrophotomètre Spectronic Campsec M107 pour suivre la croissance bactérienne. Pour la filtration des cellules bactériennes, des filtres Stérivex $0,22\ \mu\text{m}$ (Millipore) ont été utilisés. Les sulfures ont été quantifiés par dosage colorimétrique selon un protocole adapté de la méthode décrite par Cline (1969), un photomètre Palintest 7500 a été utilisé à une longueur d'onde de 640 nm. La quantification du pyruvate, de l'acétate, des sulfates et des thiosulfates a été réalisée par chromatographie ionique par un laboratoire extérieur. Pour les analyses isotopiques, 3 répliques prélevés au même temps d'incubation ont été mélangés ensemble afin d'obtenir une quantité de matière suffisante. Les sulfures, les sulfates et les thiosulfates ont été précipités individuellement comme décrit au paragraphe 2.3.3 puis analysés par EA-IRMS.

3. Résultats et discussion

3.1. Analyses de spéciation par LC-HR-ICP-MS : Optimisation de la séparation

Dans une première étape, un travail de mise au point et d'optimisation d'une méthode de spéciation a été réalisé, les espèces cibles pour ce travail étant les sulfites, les sulfates et les thiosulfates. Des essais afin d'inclure les sulfures ont également été effectués. Ce développement de méthode a été réalisé par couplage LC-HR-ICP-MS. Un ICP-MS haute résolution en mode moyenne résolution ($\Delta m/m \approx 5000$) a été utilisé pour la détection du soufre, ce qui permet d'obtenir un signal libre d'interférence pour l'ion $^{32}\text{S}^+$. Pour cela, différentes méthodes de séparation des espèces ont été testées.

3.1.1. Phase mobile d'EDTA

Différentes phases mobiles ont été testées afin d'optimiser la séparation des sulfates, des sulfites et des thiosulfates. L'EDTA est un agent complexant bien connu et utilisé dans les phases mobiles pour la séparation d'oxyanions de métaux et métalloïdes tel que Cr(III) et Cr(VI) ou As(III), As(V), Sb(III), Sb(V), Se(VI) et Se(IV) (Catalani et al., 2015; Wu and Pichler, 2014). De plus, Hassan (1994) a montré que par ses propriétés anti-oxydantes, l'EDTA permettait d'empêcher l'oxydation des sulfites au cours de la chromatographie. Nous avons donc testé une séparation des sulfates et des sulfites en utilisant une phase mobile d'EDTA ajustée à pH 9,9 avec NH_4OH 30% en utilisant la colonne AS15 et la pré-colonne AG15. Une concentration en EDTA de 2 mmol/L a été testée.

La Figure 2-1 présente le chromatogramme obtenu lors de l'analyse d'une solution de sulfites et d'une solution de sulfates en utilisant l'EDTA comme phase mobile. Les conditions testées ici montrent que les sulfites et les sulfates ont le même temps de rétention. De plus, l'EDTA utilisé induit une ligne de base élevée (>300000 cps), ce qui signifie que la concentration minimale susceptible d'être détectée dans ces conditions est d'environ 135 $\mu\text{g/L}$. Le recours à cette phase mobile pour séparer les espèces n'a donc pas été retenu.

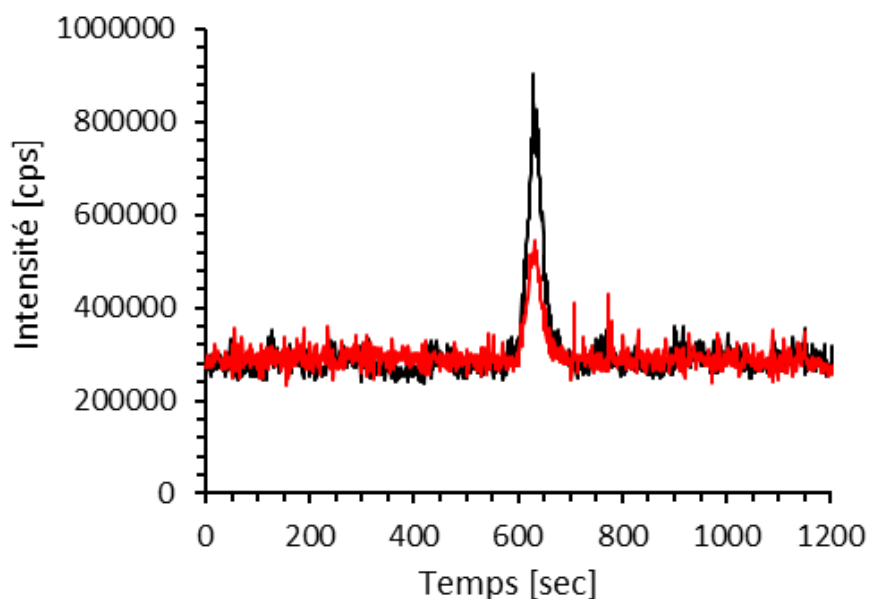
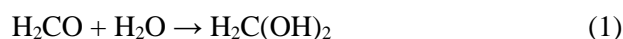


Figure 2-1 : Analyse LC-HR-ICPMS avec une phase mobile d'EDTA à 2 mmol/L et pH = 9,9 ; - 1 µg-S/g de sulfates, - 2 µg-S/g de sulfites.

3.1.2. Phase mobile de nitrate d'ammonium : méthode de Lin et Jiang

Analyse des sulfites, des sulfates et des thiosulfates

Lin et Jiang (2009) ont publié une méthode permettant la séparation des trois anions sulfites, sulfates et thiosulfates et leur détection par ICP-MS. Afin d'éviter la coélution des sulfites et des sulfates, les sulfites subissent une dérivation avant analyse qui consiste à les faire réagir avec du formaldéhyde pour former de l'hydroxyméthanesulfonate (HMS) selon les réactions suivantes :



Cette dérivation permet également de prévenir l'oxydation des sulfites au contact de l'air (Michigami and Ueda, 1994). Le produit formé, HMS, est stable en milieu acide et neutre mais se dissocie en milieu basique. Si le pH est inférieur à 10,7 les sulfites présents seront au moins partiellement sous forme de HMS (Michigami and Ueda, 1994; O'Reilly et al., 2001). Il sera donc important de vérifier la stabilité de ce composé. Le HMS a un temps de rétention bien plus faible que les sulfites, ce qui permet d'obtenir une bonne séparation avec les sulfates.

Afin d'améliorer la méthode de séparation des espèces proposée par Lin et Jiang, nous l'avons d'abord adaptée sur un ensemble pré-colonne AG15 (50 mm) et colonne AS15 (250 mm). Cette colonne possède les mêmes groupes fonctionnels que la colonne PRP-X100 (Hamilton, 150 mm) utilisée par Lin et Jiang, mais étant plus longue la rétention est plus forte (225 µeq contre 152 µeq).

Une phase mobile contenant 60 mmol/L de NH_4NO_3 et 0,1 % de formaldéhyde a été testée pour la séparation des sulfites, des sulfates et des thiosulfates et a permis d'obtenir le chromatogramme présenté Figure 2-2. Les 3 espèces sont nettement séparées et éluées en 15 minutes. L'analyse d'un blanc (Figure 2-3) a systématiquement présenté une contamination en sulfates. L'injection successive de 5 blancs n'ayant pas permis d'éliminer cette contamination, on suppose que la contamination provient du système HPLC utilisé. L'aire du blanc étant constante, elle a donc systématiquement été soustraite à celle des sulfates des échantillons analysés.

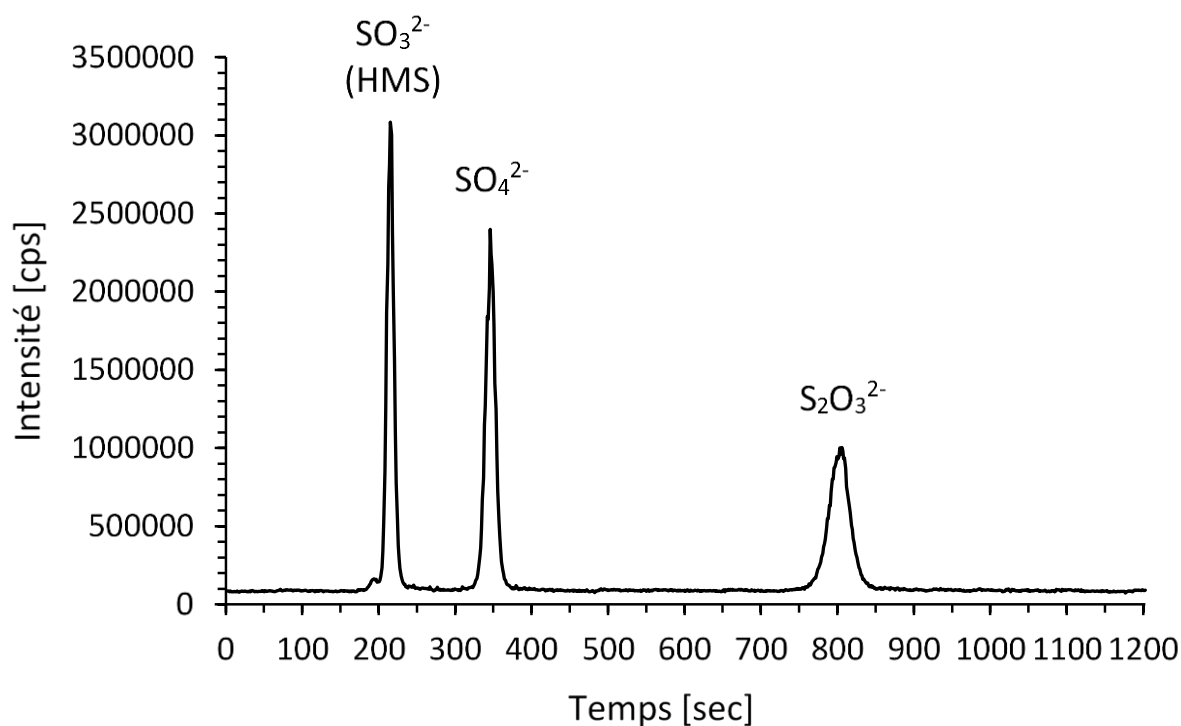


Figure 2-2 : Analyse LC-HR-ICP-MS de 1 $\mu\text{g-S/g}$ de sulfites, sulfates et thiosulfates. Elution isocratique avec 60 mmol/L de NH_4NO_3 et 0,1 % de formaldéhyde à pH 7.

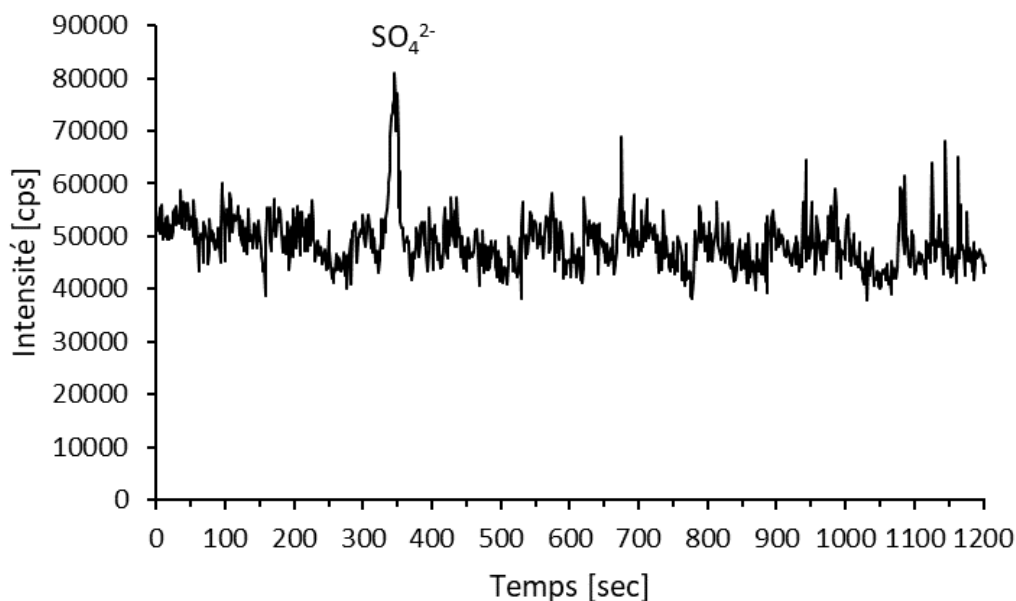


Figure 2-3 : Analyse LC-HR-ICP-MS d'un blanc (phase mobile). Elution isocratique avec 60 mmol/L de NH_4NO_3 et 0,1 % de formaldéhyde à pH 7. Présence d'une contamination en sulfates.

Analyse des sulfures

Ensuite, la méthodologie a été adaptée pour pouvoir analyser également les sulfures, ce qui n'a pas été réalisé par Lin et Jiang. Un premier test dans les conditions précédentes a montré que les sulfures et les sulfates ont des temps de rétention très proches comme illustré sur la Figure 2-4. Il a aussi révélé que la sensibilité (aire/ng-S/g) des sulfures était bien plus élevée que celle des autres ions puisque pour 100 ng-S/g, l'aire du pic des sulfures était 4,6 fois plus élevée que celle du pic des sulfates à la même concentration. Ceci s'explique par les constantes d'acidité des sulfures ($\text{pK}_{a1}(\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-) = 7,04$ et $\text{pK}_{a2}(\text{HS}^-/\text{S}^{2-}) = 12,2-15^\dagger$). À pH 7, 48,9 % des sulfures sont sous forme de HS^- et 50,1 % sous forme de H_2S dissous. Une partie du H_2S peut donc être volatilisée lors de la nébulisation et directement entraînée par le gaz d'argon jusqu'au plasma. Des sulfures sous forme gazeuse sont donc introduits en plus de ce qui est introduit *via* l'aérosol produit par le nébuliseur, phénomène également observé par Divjak et Goessler (1999). La volatilisation de H_2S n'est pas un problème lors de la nébulisation puisqu'elle augmente la sensibilité pour la détection de ce composé. En revanche, à pH 7 il est également possible que H_2S se volatilise dans le flacon de l'échantillon (température d'ébullition de H_2S : $-60,20^\circ\text{C}$ (David R. Lide, 2007)). Dans ce cas-là, la volatilisation de H_2S entraînerait une diminution de la concentration en sulfures dans l'échantillon et donc la quantification serait sous-estimée. Il est donc préférable pour les analyses de sulfures de travailler dans des conditions de pH où les sulfures sont sous forme de HS^- uniquement. À pH 11, 99,99 % des sulfures sont sous forme de HS^- .

[†]Selon la source la valeur donnée pour pK_{a2} varie de 12,2 à 15 (Sillén et al., 1964), une valeur plus haute de 19 a aussi été donnée (David R. Lide, 2007).

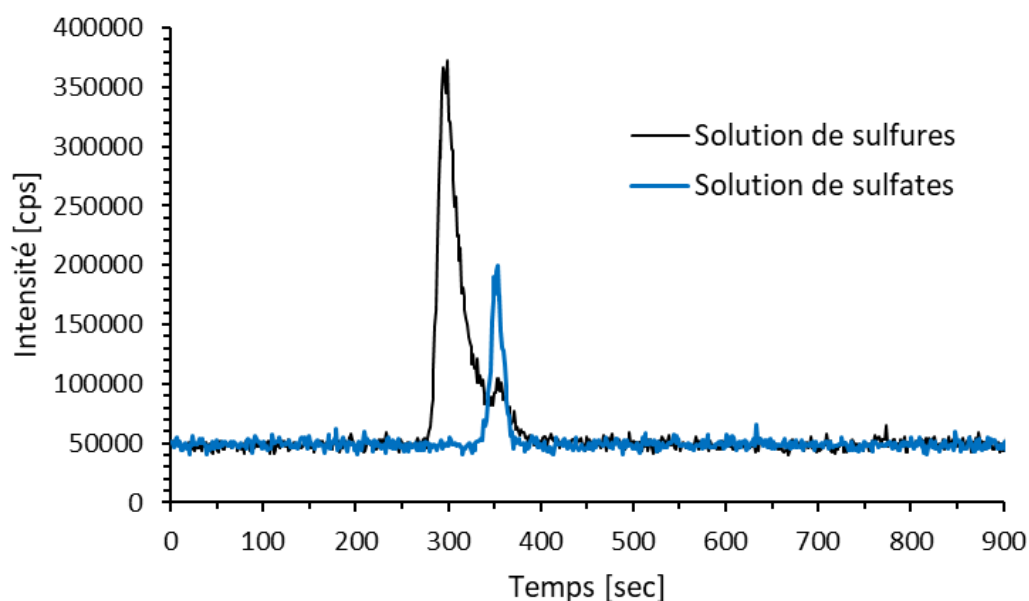


Figure 2-4 : Analyse LC-HR-ICP-MS de 50 ng-S/g de sulfures et 50 ng-S/g de sulfates. Élué avec 60 mmol/L de NH_4NO_3 et 0,1 % de formaldéhyde à pH 7.

Afin de séparer les 4 espèces du soufre, une phase mobile à pH 11 a été utilisée et les conditions d'élué suivantes ont été testées :

- Élué isocratique avec NH_4NO_3 de 60 mmol/L et 0,1 % de formaldéhyde
- Gradient d'élué de 42 à 60 mmol/L de NH_4NO_3 (0-3 min : 42 à 60 mmol/L, 7-20 min : 60 mmol/L) avec 0,1 % de formaldéhyde
- Gradient d'élué de 42 à 60 mmol/L de NH_4NO_3 (0-3 min : 42 mmol/L, 3-7 min : 42 à 60 mmol/L, 7-20 min : 60 mmol/L) avec 0,1 % de formaldéhyde

Les chromatogrammes correspondants sont présentés sur la Figure 2-5 (A, B et C). L'élué isocratique a conduit à une coélué partielle des sulfures et des sulfates comme le montre la Figure 2-5A. L'utilisation d'un gradient de 42 à 60 mmol/L de NH_4NO_3 entre 0 et 3 min (Figure 2-5B) a permis d'améliorer la séparation des sulfures et des sulfates mais une coélué partielle demeure. L'élué avec un gradient de 42 à 60 mmol/L de NH_4NO_3 entre 3 et 7 min (Figure 2-5C) a permis de séparer complètement les 4 espèces.

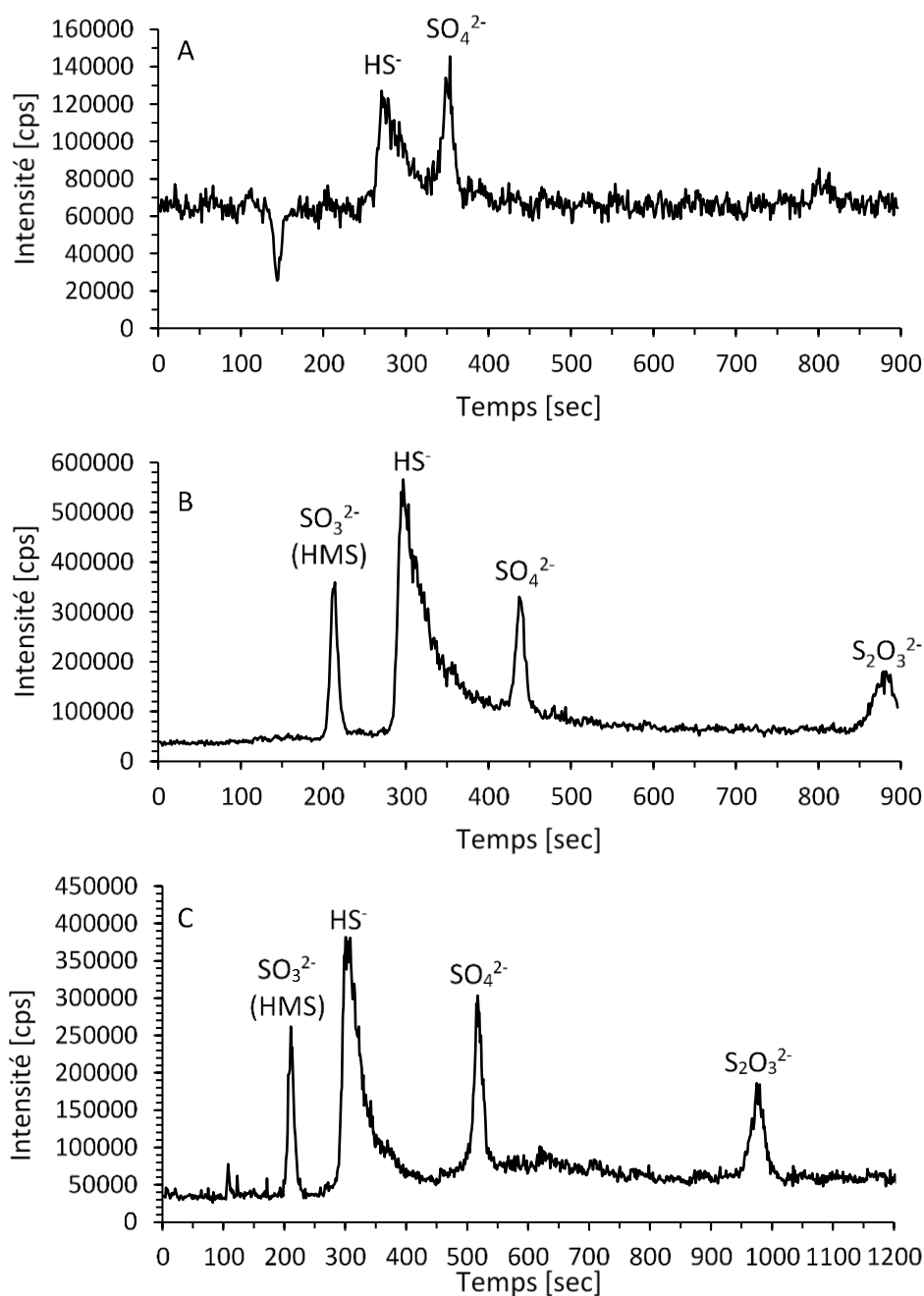


Figure 2-5 : Analyses LC-HR-ICP-MS de A) 25 ng-S/g de sulfures et 25 ng-S/g de sulfates. Élu­tion isocratique avec 60 mmol/L de NH_4NO_3 et 0,1 % de formaldéhyde à pH 11. B) 100 ng-S/g de sulfites, sulfates et thiosulfates et 224 ng-S/g de sulfures. Élu­tion avec un gradient de 42 à 60 mmol/L de NH_4NO_3 et 0,1 % de formaldéhyde à pH 11 (0-3 min : 42 à 60 mmol/L, 7-20 min : 60 mmol/L). C) 100 ng-S/g de sulfites, sulfates et thiosulfates et 224 ng-S/g de sulfures. Élu­tion avec un gradient de 42 à 60 mmol/L de NH_4NO_3 et 0,1 % de formaldéhyde à pH 11 (0-3 min : 42 mmol/L, 3-7 min : 42→60 mmol/L, 7-20 min : 60 mmol/L).

A pH 11, la totalité des sulfures devrait théoriquement se trouver sous la forme HS^- , or la sensibilité (aire/ng-S/g) des sulfures apparait environ 2 fois supérieure à celle des sulfates, des sulfites et des thiosulfates (Figure 2-5). Ceci suggère que même dans ces conditions de pH, la nébulisation favorise la formation et la volatilisation de H_2S et conduit à un gain en sensibilité pour les sulfures, ce qui constitue un avantage pour sa détection. Les sensibilités pour les sulfites, les sulfates et les thiosulfates obtenues dans les conditions optimisées (Figure 2-5C) ont été comparées avec celles obtenues lors de la séparation avec une phase mobile de NH_4NO_3 60 mmol/L à pH 7 (Figure 2-2). Les sensibilités pour les sulfates et les thiosulfates sont égales (facteurs relatifs de 1,02 et 1,03 respectivement) à celles obtenues dans les conditions précédentes. A l'inverse, celle des sulfites (détectée sous forme de HMS) a diminué (facteur relatif de 0,74). Ceci pourrait être attribué au fait que HMS se dissocie en sulfites et formaldéhyde en milieu basique (Michigami and Ueda, 1994; O'Reilly et al., 2001). Dans ces conditions, on peut estimer qu'environ 26 % de HMS a été décomposé. Cependant, dans ces conditions les ions sulfites libres coéluent avec les sulfates, or nous n'avons pas observé d'augmentation de l'aire du pic de sulfates. Ainsi, on peut penser que la diminution de la sensibilité de HMS est due aux changements de conditions chromatographiques (pH 11, utilisation d'un gradient). Ces conditions ne sont pas idéales pour la détection des sulfites sous forme de HMS mais représentent un compromis permettant de détecter également les sulfures.

La stabilité des sulfures en solution dans la phase mobile a été évaluée. Pour cela, 3 injections successives (20 minutes entre 2 injections) d'une même solution étalon de sulfures à 200 ng-S/g préparée dans la phase mobile, ont été réalisées. La Figure 2-6 montre une diminution de la concentration des sulfures à 104 ng-S/g au 2^{ème} réplica et 4 ng-S/g au 3^{ème} réplica, soit 51 % et 2 % de la concentration initiales respectivement. Parallèlement à la diminution de la concentration en sulfures, une apparition de sulfates et thiosulfates a été observée, ils représentent respectivement 12 % et 10 % de la concentration initiale en sulfures lors du 2^{ème} réplica et 14 % et 28 % lors du 3^{ème} réplica. Cela signifie qu'il y a un défaut de bilan de masse de 28 % lors du 2^{ème} réplica et de 57 % lors du 3^{ème} réplica. Les sulfures sont très volatiles, mais à pH 11 ils sont sous la forme HS^- , la volatilisation des sulfures est donc limitée dans ces conditions. Les sulfures s'oxydent rapidement lorsqu'ils sont exposés à l'oxygène de l'air, en outre Chen et Morris (1972) ont montré que les vitesses d'oxydation atteignent un maximum à pH 11. Une réaction d'oxydation des sulfures au contact de l'oxygène de l'air dans le flacon d'injection pourrait donc expliquer la rapide diminution de la concentration en sulfures. La présence de sulfates et de thiosulfates suggère une oxydation partielle des sulfures en sulfates et thiosulfates, ce qui est en accord avec l'étude de Motellier et Descotes (2001). Ceux-ci ont en effet observé une oxydation immédiate des sulfures en sulfates, thiosulfates et sulfites lors de l'injection en électrophorèse capillaire à pH 9. D'après Chen et Morris (1972) et Fischer et al. (1997), les thiosulfates sont le produit principal de l'oxydation à un pH supérieur à 8,5 et la quantité de sulfites produits diminue avec l'augmentation du pH, ce qui expliquerait que contrairement à Motellier et Descotes (2001) nous n'observons pas de

sulfites. Dans le 2^{ème} et le 3^{ème} réplica, la quantité initiale de soufre n'est pas retrouvée. D'après Chen et Morris (1972), l'oxydation des sulfures fait intervenir des intermédiaires de réaction tel que le soufre élémentaire et les polysulfures (S_x^{2-} , $x = 2-5$). La formation de ces espèces pourrait expliquer les défauts de bilan de masse que nous observons.

L'oxydation des sulfures dans la phase mobile exposée à l'oxygène de l'air est très rapide (1 h), par conséquent cette méthode n'est pas adaptée à l'analyse des sulfures. Néanmoins, ces tests révèlent que l'élimination des sulfures présents dans un échantillon est indispensable pour analyser les ions sulfites, sulfates et thiosulfates en utilisant la méthode adaptée de Lin et Jiang afin d'éviter une surestimation des concentrations des sulfates et des thiosulfates. Celle-ci pourrait être due, d'une part à la coélution des sulfures avec les sulfates à pH 7 et d'autre part à l'oxydation des sulfures en sulfates et thiosulfates dans la phase mobile.

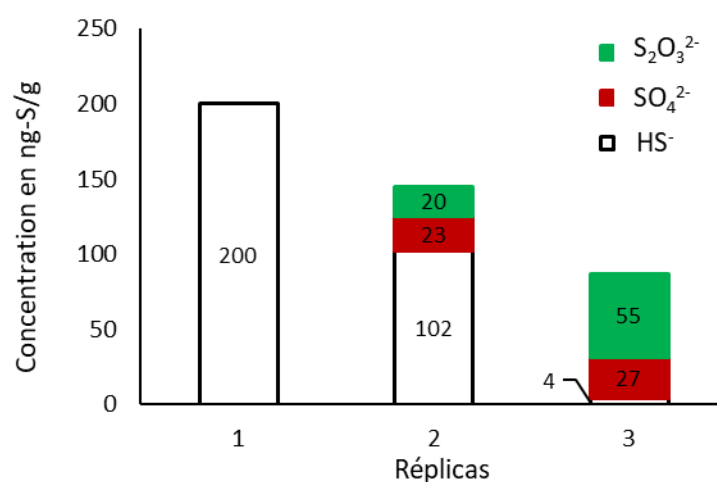


Figure 2-6 : Analyses successives d'un étalon de sulfures à 200 ng-S/g.

La méthode de séparation retenue après développement consiste en une élution isocratique avec une phase mobile de NH_4NO_3 à 60 mmol/L avec 0,1% de formaldéhyde ajustée à pH = 7 avec du NH_4OH 30%.

Performances

Des droites d'étalonnage ont été réalisées afin d'évaluer la gamme de linéarité de la méthode. Comme le montre la Figure 2-7, la relation entre aire de pic et concentration est linéaire de 25 ng-S/g à 500 ng/g pour les 3 espèces.

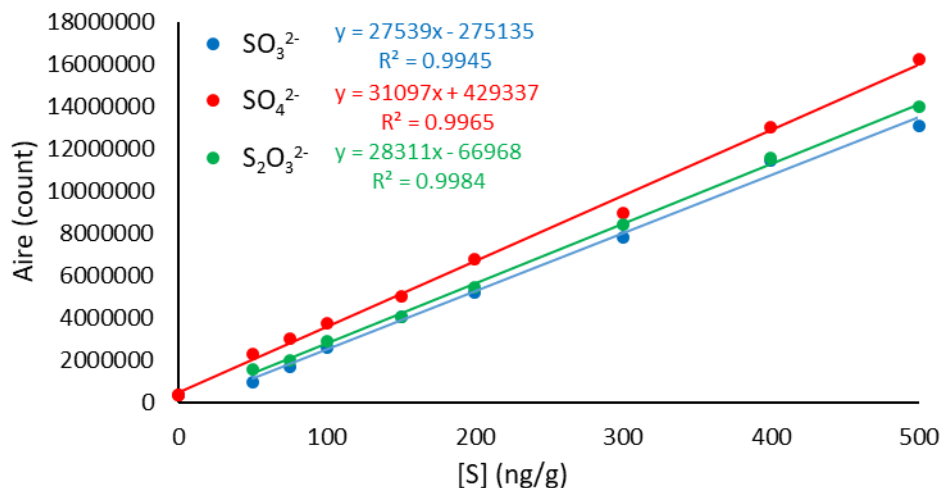


Figure 2-7 : Droites d'étalonnage LC-HR-ICP-MS réalisées avec des solutions étalons de sulfites, sulfates et thiosulfates entre 25 ng-S/g et 500 ng-S/g préparées dans la phase mobile à 60 mmol/L de NH_4NO_3 et 0,1 % de formaldéhyde à pH 7.

Les limites de détection (LD, calculées comme 3 fois l'écart-type du blanc) sont de 20, 28 et 18 ng-S/g respectivement pour les sulfites, les sulfates et les thiosulfates. Les limites de quantification (LQ, calculées comme 10 fois l'écart-type du blanc) sont de 36, 48 et 37 ng-S/g respectivement pour les sulfites, les sulfates et les thiosulfates. Les LD sont supérieures à celles obtenues par Lin et Jiang (3,9 ; 3,6 et 4,6 ng-S/g). Ces différences s'expliquent par le fait que le flux à l'entrée du spectromètre et le volume d'injection sont tous deux divisés par 2 par rapport aux travaux de Lin et Jiang. La quantité d'analytes atteignant le nébuliseur est donc divisée par 4. D'autre part, les LD et LQ des sulfates sont plus importantes du fait de la contamination en sulfates dans le blanc. Le transfert de la méthode sur la colonne AS15 a conduit à des analyses plus longues, puisque 15 minutes ont été nécessaires à l'élution des trois anions alors que l'élution durait 4 minutes dans les travaux de Lin et Jiang (2009). Les facteurs de résolution ont été calculés selon l'équation suivante :

$$\text{Équation 2-2 : } R_{1/2} = 2(t_{R1} - t_{R2})/(\omega_1 + \omega_2)$$

Avec t_R le temps de rétention des pics, ω la largeur à la base des pics.

Dans cette étude $R_{\text{SO}_3^{2-}/\text{SO}_4^{2-}} = 3,0$ et $R_{\text{SO}_3^{2-}/\text{S}_2\text{O}_3^{2-}} = 6,4$ alors que $R_{\text{SO}_3^{2-}/\text{SO}_4^{2-}} = 1,3$ et $R_{\text{SO}_4^{2-}/\text{S}_2\text{O}_3^{2-}} = 1,8$ dans les conditions analytiques de Lin et Jiang. D'après Weiss (2016), une résolution de $R = 0,5$ permet de distinguer deux pics, et une résolution de $R = 2$ est nécessaire pour des analyses de quantification, ainsi les facteurs de résolution obtenus par Lin et Jiang étaient insuffisants pour quantifier les sulfites,

les sulfates et les thiosulfates avec précision. Les modifications apportées ont donc permis d'améliorer significativement la séparation des pics et permettent une quantification.

Afin de s'assurer de la stabilité des sulfites dérivés sous forme de HMS, des répliques d'analyse d'une solution à 1 µg-S/g de HMS préparée dans la phase mobile ont été réalisées à différents intervalles de temps sur une période de 24 h. Nous avons observé que le HMS était stable jusqu'à 1 h, mais qu'au-delà un deuxième pic apparaît, qui élué avant le HMS, comme illustré sur la Figure 2-8. Nous avons pour chaque analyse quantifier la proportion du pic dédoublé en calculant le rapport entre son aire et la somme des aires des deux pics de HMS. Les résultats sont présentés sur la Figure 2-9. Au cours de la première heure, le pic de HMS ne s'est pas dédoublé. À 2 h 40 le pic éluant le premier représente 1,2 % de l'aire totale du pic de HMS. Après 4 h, le pic dédoublé représente 1,6 % de l'aire totale et après 24 h, il représente 2,8 %. Ce test révèle que HMS est stable dans la phase mobile seulement pendant 1 h après sa préparation, il est donc préférable de réaliser les mesures dans l'heure qui suit la préparation d'un échantillon. Néanmoins, l'apparition du pic dédoublé est lente puisque son aire représente seulement 2,8 % de l'aire totale après 24h. D'autre part, l'aire totale du HMS (somme des deux pics) est restée constante à ± 3 % pendant ce test, ce qui signifie que le dédoublement de pic, sur une période de 24 h, entraîne un biais très faible dans la quantification. Dans la mesure du possible, les analyses devront être réalisées sur des solutions fraîches (moins d'une heure après préparation).

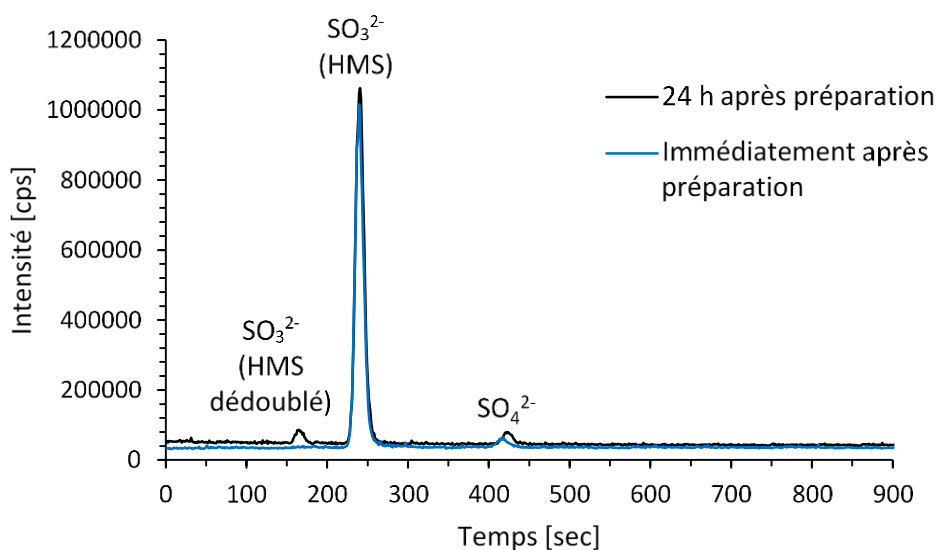


Figure 2-8 : Analyse LC-HR-ICP-MS de d'une solution étalon 1 µg-S/g de sulfites préparée dans la phase mobile, analysée immédiatement après sa préparation et 24 h après, présence d'un deuxième pic de HMS.

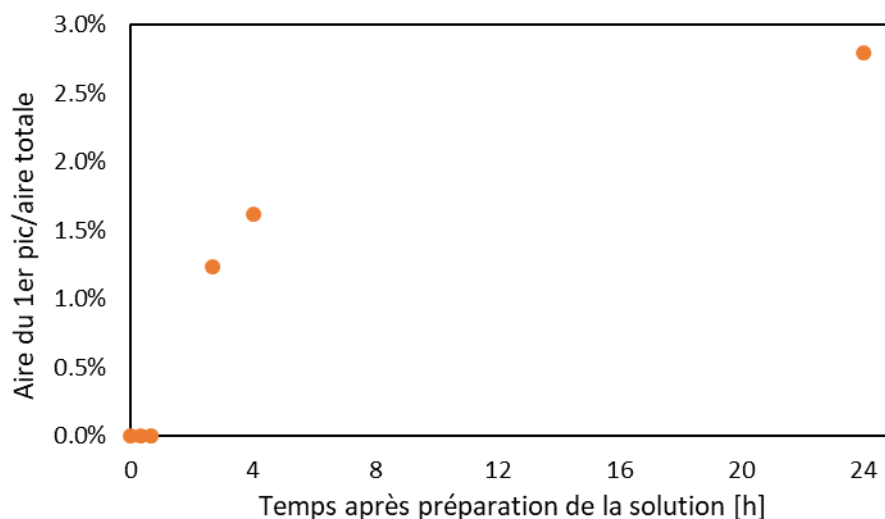


Figure 2-9 : Test de stabilité des sulfites dérivés en HMS à 1 $\mu\text{g-S/g}$ dans 60 mmol/L NH_4NO_3 et 0,1 % de formaldéhyde. La proportion que représente le pic qui élue en premier par rapport à l'aire totale de HMS est représentée en fonction du temps après préparation de la solution.

Analyses de spéciation - À retenir :

Avec une phase mobile d'EDTA à 2 mmol/L les sulfates et les sulfites présentent le même temps de rétention.

La séparation en moins de 20 minutes des sulfites, des sulfates et des thiosulfates a été réalisée avec une phase mobile de 60 mmol/L de NH_4NO_3 et 0,1 % de formaldéhyde à pH 7.

Une amélioration significative de la séparation par rapport à l'étude de Lin et Jiang (2009) a été obtenue.

Les LD sont de 20, 28 et 18 ng-S/g respectivement pour les sulfites, les sulfates et les thiosulfates.

Les sulfites sont dérivés par le formaldéhyde, le composé formé, HMS, est stable dans la phase mobile pendant 2 h, après un double pic apparaît. Sur une période de 24 h, l'aire totale des deux pics est constante à $\pm 3\%$.

Dans ces conditions les sulfures coéluent avec les sulfates, ils doivent donc être éliminés des échantillons avant analyse.

3.2. Analyses isotopiques par EA-IRMS

Comme vu dans la partie 2 du chapitre 1, les analyses de $\delta^{34}\text{S}$ par EA-IRMS nécessitent l'introduction d'un échantillon sous forme solide. Donc, pour analyser des espèces dissoutes, une préparation d'échantillons est nécessaire afin de les précipiter. Dans ce paragraphe, la méthode d'analyse EA-IRMS et la préparation d'échantillons liquides sont présentées.

3.2.1. Estimation des performances de l'EA-IRMS

Dans un premier temps les performances de la méthode ont été évaluées afin de déterminer si les mesures réalisées étaient justes, répétables et reproductibles. Tout d'abord, les effets de la variation de l'intensité des pics obtenus sur la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ ont été investigués par analyse du gaz de référence. Ensuite, la justesse, la répétabilité et la reproductibilité de la méthode ont été évaluées à travers l'analyse de matériaux de référence certifiés. Enfin, une série de matériaux de référence internes a été constituée, la répétabilité, la reproductibilité et la stabilité de ces matériaux ont été évaluées.

Influence de l'intensité du pic de SO_2 sur la précision du $\delta^{34}\text{S}$

L'influence de l'intensité des pics de SO_2 sur la précision a été évaluée afin de déterminer avec quelle intensité de pic il était préférable de travailler. Pour cela, les rapports isotopiques de *pulses* de gaz de référence avec différentes intensités ont été mesurés. L'écart-type des valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des *pulses* de gaz de référence a été calculé à différentes intensités. Des séries de 10 *pulses* successifs ont été réalisées dans lesquelles le 3^{ème} *pulse* est utilisé comme référence avec $\delta^{34}\text{S} = 0 \text{ ‰}$, les séries ont des intensités de 500 mV à 8000 mV. Les résultats de cette expérience sont illustrés sur la Figure 2-10. L'écart-type des valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ est de $\pm 0,04 \text{ ‰}$ lorsque l'intensité est supérieure à 1500 mV, de $\pm 0,07 \text{ ‰}$ lorsque l'intensité est comprise entre 1000 et 1500 mV et de $\pm 0,1 \text{ ‰}$ lorsque l'intensité est inférieure à 1000 mV. La masse d'échantillon introduite dans les capsules en étain pour les analyses devra donc être ajustée de façon à obtenir une intensité supérieure à 1500 mV et ainsi garantir une précision optimale des mesures. L'intensité des pics de SO_2 est corrélée linéairement avec la masse de soufre (Figure A2), une intensité de 1500 mV correspond à une masse minimum de $27 \pm 2 \text{ } \mu\text{g}$ de soufre. Dans la suite du travail, nous avons choisi d'ajuster la masse d'échantillon pour avoir 50 μg de soufre et ainsi obtenir un signal de 3000 mV sans dilution. C'est un compromis qui nous permet d'avoir une marge d'erreur sur la pesée des échantillons et de minimiser la quantité de cendre qui se forme lors de la combustion dans le réacteur de combustion et donc d'augmenter sa longévité.

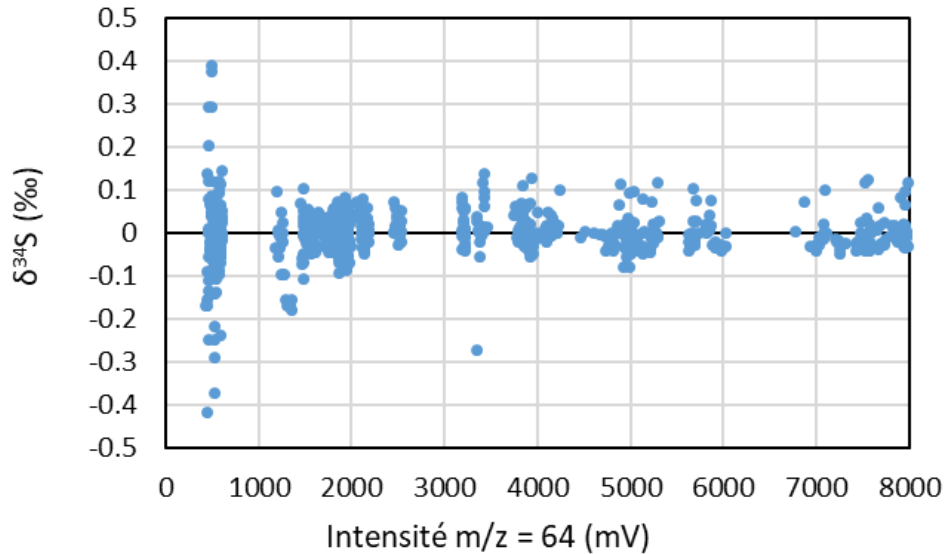


Figure 2-10 : Variabilité du $\delta^{34}\text{S}$ des pulses de gaz de référence en fonction de leur intensité.

Évaluation de la justesse, de la répétabilité et de la reproductibilité

La justesse des mesures isotopiques, la répétabilité (plusieurs mesures lors d'une session analytique) et la reproductibilité (plusieurs mesures lors de différentes sessions analytiques) ont été évaluées sur les matériaux de référence certifiés IAEA-S1, IAEA-S3, IAEA-S4 et NBS127. Pour tester ces performances, des masses d'environ 50 μg de soufre ont été analysées. Lors des sessions analytiques réalisées pour ces tests, 4 réplicas ont été réalisés pour chaque matériel de référence. Un réplica pour chaque matériel a été utilisé pour construire la droite d'étalonnage et les autres ont été traités comme des échantillons inconnus. Sur la Figure 2-11, un exemple de droite d'étalonnage est présenté et montre la relation linéaire entre les valeurs de $\delta^{34}\text{S}_{\text{Gaz de référence}}$ déterminées *via* l'Équation 2-1 et les valeurs de $\delta^{34}\text{S}_{\text{V-CDT}}$ certifiées. Un test de justesse par écart normalisé (E_N) a été utilisé afin de définir si l'écart entre la valeur certifiée et la valeur mesurée est significatif (Rivier and Lalere, 2003).

$$E_N = \left| \frac{\delta^{34}\text{S}_{\text{Mesurée}} - \delta^{34}\text{S}_{\text{Référence}}}{\sqrt{u_{\text{Mesurée}}^2 - u_{\text{Référence}}^2}} \right|$$

Avec u l'écart-type. Si $E_N > 2$, l'erreur de justesse est considérée comme significative. Si $E_N < 2$, l'erreur de justesse n'est pas significative.

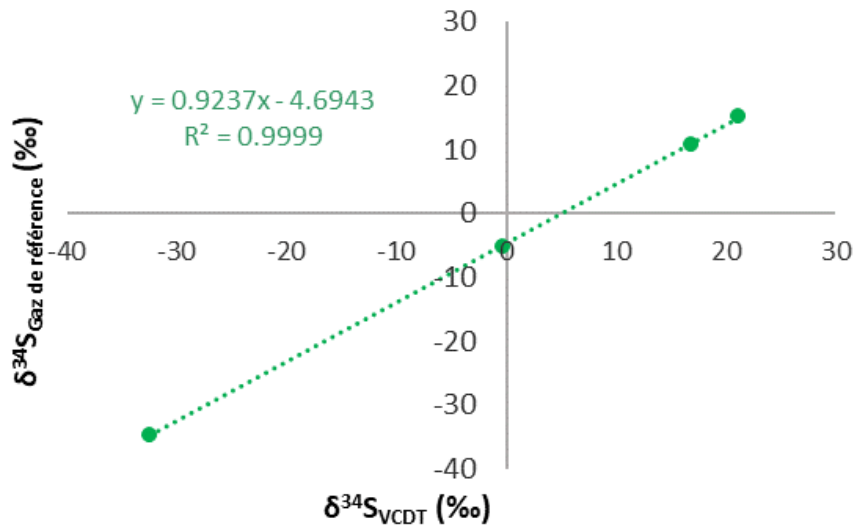


Figure 2-11 : Droite d'étalonnage réalisée avec les matériaux de référence pour la normalisation du $\delta^{34}\text{S}$ sur l'échelle V-CDT. Dans cet exemple les matériaux de références utilisés sont IAEA-S1, IAEA-S3, IAEA-S4 et NBS127. $\delta^{34}\text{S}_{\text{Gaz de référence}}$ correspond à la valeur déterminée via l'Équation 2-1 et $\delta^{34}\text{S}_{\text{V-CDT}}$ à la valeur de référence certifiées.

Les résultats des tests de répétabilité et de reproductibilité sont présentés dans le Tableau 2-4. Pour les tests de répétabilité, E_N varie de 0,11 à 0,99 et pour les tests de reproductibilité il varie de 0,20 à 0,63. E_N est inférieur à 2 pour tous les matériaux, pour les tests de répétabilité et de reproductibilité, les valeurs de référence et les valeurs mesurées ne sont donc pas significativement différentes. La justesse de la méthode est donc vérifiée.

Les écart-types de répétabilité pour $n = 3$ sont compris entre 0,12 et 0,28 ‰. Les écart-types de reproductibilités sont compris entre 0,24 et 0,40 ‰. Les précisions mesurées sont satisfaisantes et en accord avec celles données dans la littérature pour la méthode EA-IRMS, à savoir 0,1-0,5 ‰ (Giesemann et al., 1994; Grassineau, 2006).

Tableau 2-4 : Mesures de répétabilité et de reproductibilité pour les matériaux de référence certifiés.

| Nom | IAEA-S1 | IAEA-S3 | IAEA-S4 | NBS127 |
|---|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Formule chimique | Ag_2S | Ag_2S | S | BaSO_4 |
| $\delta^{34}\text{S}_{\text{Référence}}$ (‰) | -0,3 (exact) | $-32,49 \pm 0,17$ | $16,86 \pm 0,03$ | $21,17 \pm 0,09$ |
| Répétabilité (1 écart-type, $n = 3$) (‰) | $-0,33 \pm 0,26$ ($E_N = 0,11$) | $-32,28 \pm 0,12$ ($E_N = 0,99$) | $16,75 \pm 0,28$ ($E_N = 0,38$) | $21,20 \pm 0,17$ ($E_N = 0,14$) |
| Reproductibilité (1 écart-type, $n = 10$) (‰) | $-0,38 \pm 0,40$ ($E_N = 0,20$) | $-32,61 \pm 0,30$ ($E_N = 0,35$) | $16,62 \pm 0,39$ ($E_N = 0,63$) | $21,11 \pm 0,24$ ($E_N = 0,25$) |

Matériaux de référence interne

Actuellement, un laboratoire peut recevoir un aliquote de matériel de référence certifié distribué par l'IAEA seulement une fois tous les trois ans. Ce contrôle assure que chaque matériel sera disponible pendant plusieurs décennies. Comme les matériaux de référence certifiés sont disponibles en quantités limitées, il est préférable d'utiliser des matériaux de référence internes (Dunn and Carter, 2018).

Afin de constituer des matériaux de référence internes, différents matériaux ont été analysés et calibrés par rapport aux matériaux de référence dont la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ est certifiée. Les matériaux choisis sont du soufre élémentaire (S-Julen), de l'acide sulfamique ($\text{H}_3\text{NO}_3\text{S}$) et du sulfate de baryum précipité à partir d'une eau de source (HTS). Les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ de ces matériaux ont été déterminées par EA-IRMS sur plusieurs séries d'analyses, les résultats sont présentés dans le Tableau 2-4. Ces trois matériaux permettent de couvrir la gamme supérieure de l'échelle V-CDT, S-Julen a une valeur identique à IAEA-S4, $\text{H}_3\text{NO}_3\text{S}$ a une valeur proche de IAEA-S1 et HTS a une valeur proche de NBS127. Cependant, aucun matériel de référence interne n'a de valeur négative, IAEA-S3 a été utilisé pour compléter la gamme de $\delta^{34}\text{S}$ lorsque cela a été nécessaire. Comme pour les matériaux de référence certifiés, nous avons procédé à des tests de répétabilité et de reproductibilité. Les écart-types de répétabilité pour les matériaux de référence internes sont compris entre 0,17 et 0,28 ‰ et les écart-types de reproductibilités sont compris entre 0,15 et 0,27 ‰. La répétabilité et la reproductibilité des mesures pour les matériaux de référence internes sont donc du même ordre de grandeur que celles obtenues pour les matériaux de référence certifiés.

Tableau 2-5 : Caractérisation par EA-IRMS des matériaux de référence internes.

| Nom | S-Julen | $\text{H}_3\text{NO}_3\text{S}$ | HTS |
|--|------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| Formule chimique | S | $\text{H}_3\text{NO}_3\text{S}$ | BaSO_4 |
| Valeur de $\delta^{34}\text{S}$ assignée (‰) | $16,84 \pm 0,23$ (n = 17) | $0,55 \pm 0,19$ (n = 13) | $21,26 \pm 0,39$ (n = 23) |
| Répétabilité (1 écart-type, n = 3) (‰) | $16,78 \pm 0,17$ | $0,45 \pm 0,28$ | $21,33 \pm 0,19$ |
| Reproductibilité (1 écart-type, n = 10) (‰) | $16,94 \pm 0,15$ | $0,52 \pm 0,25$ | $21,08 \pm 0,27$ |

Un suivi de la stabilité dans le temps des matériaux de référence internes a été effectué, ils ont régulièrement été analysés par rapport aux matériaux de référence certifiés. Le suivi dans le temps de ces matériaux de référence interne est présenté sur les cartes de contrôle de la Figure 2-12. Les limites de contrôle supérieures (valeur moyenne plus 3 fois son écart-type) et inférieures (valeur moyenne moins 3 fois son écart-type) ainsi que les limites d'alerte supérieure (valeur moyenne plus 2 fois son écart-type) et inférieure (valeur moyenne moins s fois son écart-type) sont reportées sur ce graphique comme recommandé par le guide « Good practice guide for isotope ratio mass spectrometry, 2nd ed. » (Dunn and Carter, 2018). Le nombre de mesures réalisées pour HTS est inférieur aux deux autres matériaux

car il n'a été utilisé comme matériel de référence interne qu'à partir de 2018. Pour les trois matériaux, les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ déterminées entre mars 2017 et octobre 2018 sont réparties aléatoirement en dessous et au-dessus de la valeur moyenne, les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ déterminées sont comprises entre les limites de contrôle ($< \delta^{34}\text{S}_{\text{Réf}} + 3\sigma$ et $> \delta^{34}\text{S}_{\text{Réf}} - 3\sigma$). Des valeurs supérieures aux limites d'alerte ($> \delta^{34}\text{S}_{\text{Réf}} + 2\sigma$ ou $< \delta^{34}\text{S}_{\text{Réf}} - 2\sigma$) ont été mesurées pour $\text{H}_3\text{NO}_3\text{S}$ et S-Julen, mais il n'y a jamais eu deux valeurs supérieures aux limites d'alerte et consécutives pour chaque matériau. De plus, aucune variation des valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ au cours du temps n'a été observée, ce qui montre la stabilité de ces matériaux sur cette période. Compte tenu de la répétabilité, de la reproductibilité et de la stabilité des valeurs de $\delta^{34}\text{S}$, ces matériaux peuvent être utilisés comme matériaux de référence interne. Toutefois, leur stabilité doit faire l'objet d'un suivi régulier.

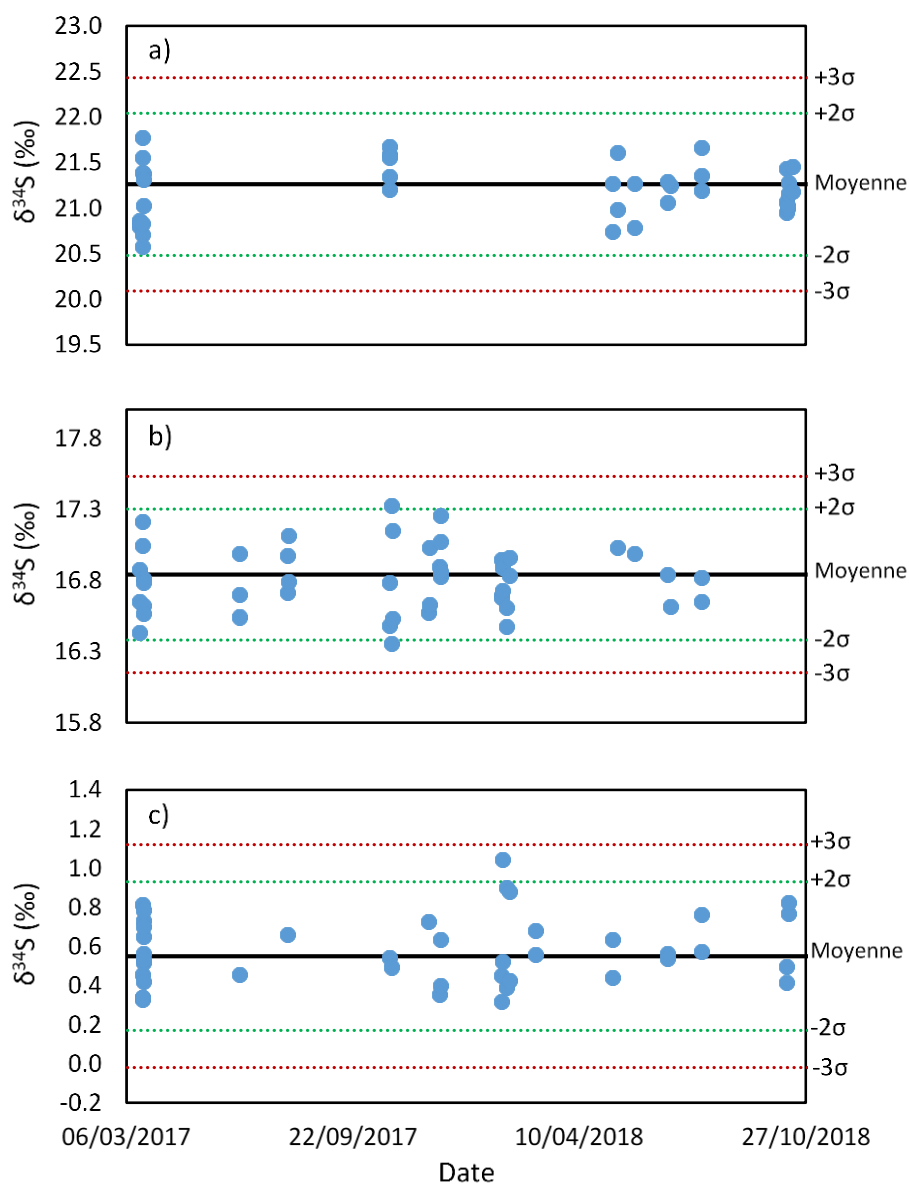


Figure 2-12 : Cartes de contrôle des matériaux de référence internes. a) HTS ; b) S-Julen ; c) $\text{H}_3\text{NO}_3\text{S}$. La ligne noire centrale représente la valeur moyenne déterminée pour $\delta^{34}\text{S}$, limites de contrôle : $\pm 2\sigma$, limites d'alerte : $\pm 3\sigma$.

3.2.2. Optimisation de la préparation d'échantillons

L'analyse isotopique par EA-IRMS de plusieurs espèces soufrées dissoutes, présentes simultanément dans un échantillon, nécessite de mettre au point un protocole permettant d'isoler et de précipiter individuellement chaque espèce (sulfures, sulfates et thiosulfates). Un protocole de précipitation séquentielle a donc été développé. Il s'inspire des travaux de Fry *et al.* (1985) et Smock *et al.* (1998) et consiste à précipiter en premier lieu les sulfures, puis les sulfates et enfin à oxyder les thiosulfates afin de les convertir en sulfates et de les précipiter. Les étapes de précipitation de chaque espèce ont d'abord été étudiées individuellement dans des solutions contenant 20 mmol-S/L de sulfures, sulfates ou thiosulfates, puis un test de précipitation séquentielle a été réalisé dans une solution étalon contenant 20 mmol-S/L de chaque espèce. Enfin, un test de précipitation séquentielle a été réalisé dans une matrice plus complexe, à savoir un milieu de culture bactérienne, contenant 20 mmol-S/L de chaque espèce. Lors de ces tests, nous avons évalué si les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ déterminées pour les espèces précipitées correspondaient aux valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des étalons introduits en solution.

Précipitation des sulfures

En premier lieu, nous avons déterminé la teneur en soufre des filtres utilisés en analysant environ 1 mg de filtre en acétate de cellulose par EA-IRMS. Aucune trace de soufre n'a été détectée. Sachant que la limite de détection est de 3,8 μg de soufre, cela signifie que les filtres contiennent moins de 0,38 % de soufre. Ensuite, différents tests ont été réalisés afin de mettre au point une procédure de précipitation des sulfures.

Les sulfures sont généralement précipités sous forme de ZnS , puis filtrés et ensuite une réaction d'échange d'ions est réalisée afin de produire Ag_2S (Rye *et al.*, 1981; Leavitt, 2014). Ag_2S est préféré à ZnS car il est beaucoup moins soluble, plus stable et il ne s'oxyde pas en présence d'air. C'est donc cette procédure que nous avons choisie d'appliquer dans cette étude.

Le protocole ne peut être validé directement par comparaison des valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ de l'étalon et du précipité car aucun sel de sulfures à la fois soluble dans l'eau et analysable par EA-IRMS n'est disponible. En effet, Na_2S ne peut être analysé par EA-IRMS car le sodium provoque des problèmes de combustion entraînant un dédoublement du pic de SO_2 et à terme une dégradation du réacteur de combustion (Figure A3).

Afin de valider la procédure de précipitation des sulfures, elle a été comparée à une procédure de précipitation directe. Les différents protocoles de précipitation sont présentés à travers la Figure 2-13. Dans la procédure 1, les sulfures sont précipités directement en Ag_2S . Nous faisons l'hypothèse que la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ déterminée avec cette procédure (Figure 2-13) correspond à celui du Na_2S utilisé pour préparer les solutions car Ag_2S peut être considéré comme totalement insoluble ($K_S(\text{Ag}_2\text{S}) = 8.10^{-51}$) et que les ions Ag^+ ont été introduits en excès par rapport aux HS^- . Par conséquent la précipitation des sulfures peut être considérée comme totale.

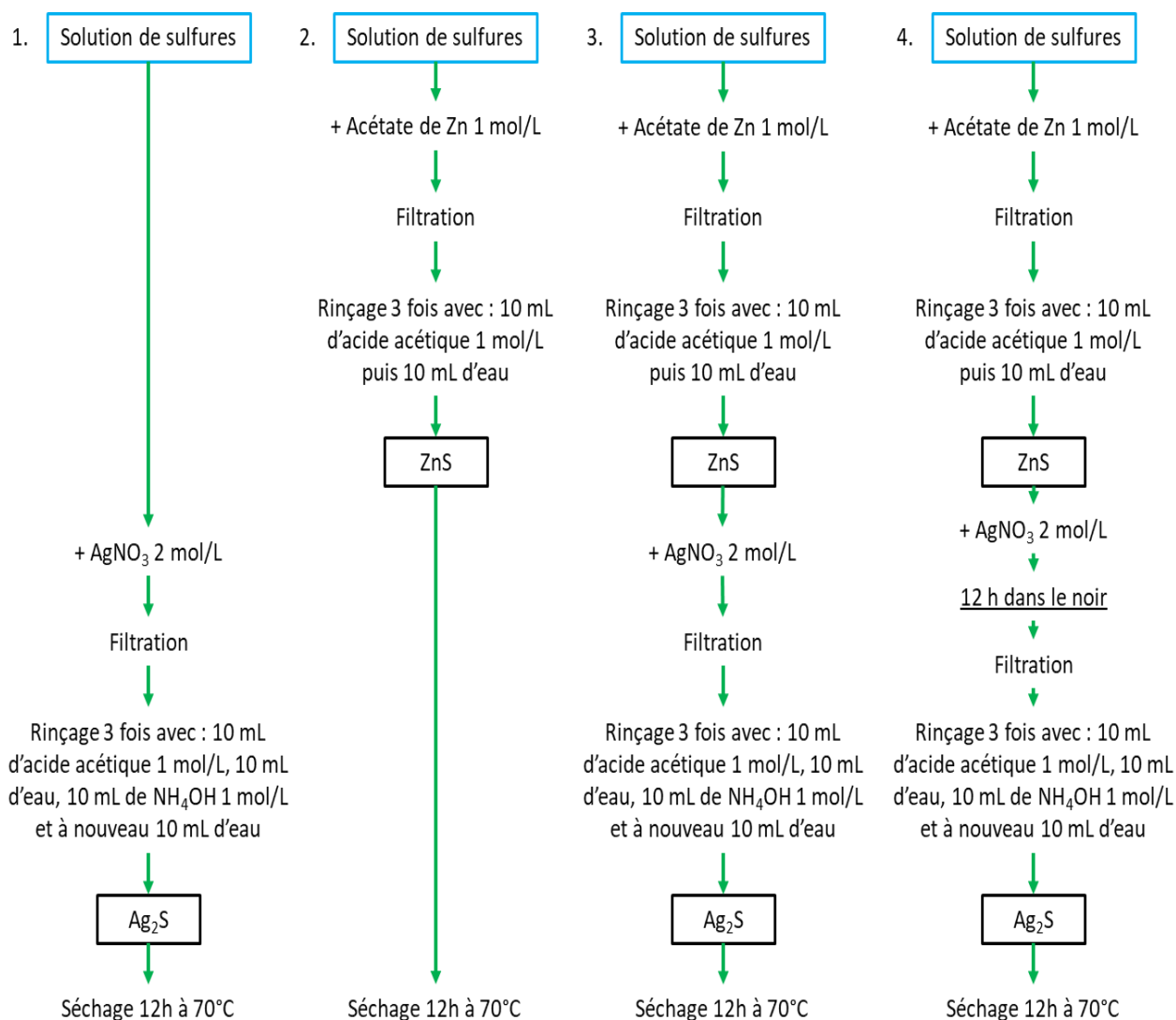


Figure 2-13 : Procédures comparées pour la précipitation des sulfures en solution. Dans la procédure 1, les sulfures sont précipités en Ag_2S alors que dans la procédure 2, ils sont précipités en ZnS . Dans les procédures 3 et 4, les sulfures sont d'abord précipités en ZnS , puis, une réaction d'échange d'ions est réalisée pour former Ag_2S . Dans la procédure 4, l'échantillon est laissé 12h dans le noir pendant l'échange d'ions. La procédure 4 est celle retenue pour le traitement des échantillons.

Dans la procédure 2, les sulfures sont précipités en ZnS alors que dans les procédures 3 et 4, les sulfures sont précipités en ZnS , puis une réaction d'échange d'ions est réalisée pour former Ag_2S . Dans la procédure 4, la solution est laissée 12 h dans le noir pendant la réaction d'échange d'ions. Pour assurer une précipitation totale, Zn^{2+} et Ag^+ ont été ajoutés en excès par rapport à la quantité de sulfures, de sorte que Zn^{2+}/HS^- soit supérieur à 2 et que Ag^+/HS^- soit supérieur à 4. Les précipités obtenus ont ensuite été analysés par EA-IRMS.

Nous avons remarqué que pour plusieurs solutions préparées à partir de Na_2S et précipité avec la procédure 1, les valeurs de $\delta^{34}S$ obtenues variaient légèrement ($\pm 0,5 \%$). Ceci peut être attribué à

l'hétérogénéité des cristaux de Na₂S. En conséquence, pour chaque test, la procédure 1 a été répétée en parallèle des autres procédures afin d'établir une valeur de référence de la solution utilisée.

Comme présenté dans le Tableau 2-6, la teneur en soufre dans le précipité de Ag₂S obtenu par précipitation directe avec la procédure 1 est de 13,1 ± 0,4 %, ce qui correspond bien à la valeur théorique de 12,94 % calculée à partir des masses molaires. Le pourcentage de soufre dans ZnS mesuré en EA est de 22 ± 3 % alors que le pourcentage théorique est de 32,9 %, ceci indique la présence d'impuretés dans les précipités ou bien que la combustion des échantillons de ZnS n'est pas totale. En revanche, pour les précipités de Ag₂S après échange d'ions, un pourcentage de S de 12,8 ± 0,2 % est mesuré, ce qui correspond à la composition théorique de 12,94 % de soufre. Les précipités de Ag₂S sont donc purs et leur combustion est totale. Les procédures de précipitation 1 et 2 conduisent à des δ³⁴S qui ne sont pas significativement différents. La valeur de δ³⁴S déterminée lors de la procédure 3 est significativement différente de celle déterminée lors de la précipitation directe avec AgNO₃ (procédure 1), ce qui suggère que la réaction d'échange d'ions n'est pas totale. Ceci traduit un enrichissement en isotope lourd, ce qui est généralement le cas lors des réactions de précipitation (Holser and Kaplan, 1966; Raab and Spiro, 1991).

Tableau 2-6 : Analyse EA-IRMS de sulfures selon différentes procédures de précipitation (pour chaque test n = 9)

| Procédure de précipitation | Nature du précipité | [S] _{Théorique} (%) | [S] _{Mesurée} (%) | δ ³⁴ S (‰) |
|----------------------------|---------------------|------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| 1 | Ag ₂ S | 12,94 | 13,1 ± 0,4 | 0,84 ± 0,15 |
| 2 | ZnS | 32,9 | 22 ± 3 | 0,98 ± 0,13 |
| 3 | Ag ₂ S | 12,94 | 12,8 ± 0,2 | 1,15 ± 0,15 |

Afin d'obtenir une réaction totale pour l'échange d'ions, nous avons augmenté le temps de réaction. Pour cela, nous avons suivi la méthode proposée par Leavitt *et al.* (2014) (procédure 4, Figure 2-13), qui est similaire à la procédure 3 mais dans laquelle l'échantillon est laissé 12h dans le noir après l'ajout de AgNO₃ sur le précipité de ZnS. La procédure 4 a été testée en parallèle aux procédures 1 et 3 sur des solutions de 100 mL à 10 mmol/L préparées à partir d'une nouvelle solution de Na₂S à 0,5 mol/L. Les résultats sont présentés dans le Tableau 2-7. Pour les précipités obtenus avec les procédures 1, 3 et 4, la teneur en soufre correspond à la valeur théorique, ils ne contiennent donc pas d'impuretés. La valeur de δ³⁴S déterminée pour le précipité obtenu à partir de la procédure 3 est significativement différente de celles déterminées pour les procédures 1 et 4, alors que les valeurs de δ³⁴S déterminées avec les procédures 1 et 4 ne sont pas significativement différentes. Ceci suggère que l'échange d'ions n'est pas immédiat et qu'un temps de réaction suffisant est nécessaire pour que la réaction soit totale. Il

est dans ce cas nécessaire d'attendre 12 h après l'ajout de AgNO_3 , ainsi la procédure 4 est choisie pour la préparation de Ag_2S pour les analyses isotopiques.

Tableau 2-7 : Analyse EA-IRMS de sulfures selon les procédures de précipitation 1, 3 et 4 ($n = 9$)

| Procédure de précipitation | Nature du précipité | [S] _{Théorique} (%) | [S] _{Mesurée} (%) | $\delta^{34}\text{S}$ (‰) |
|----------------------------|-----------------------|------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 1 | Ag_2S | 12,94 | $13,1 \pm 0,3$ | $0,70 \pm 0,05$ |
| 3 | Ag_2S | 12,94 | $13,6 \pm 0,7$ | $0,84 \pm 0,08$ |
| 4 | Ag_2S | 12,94 | $13,1 \pm 0,2$ | $0,66 \pm 0,03$ |

Précipitation des sulfures - À retenir :

La procédure de précipitation des sulfures optimisée avec une réaction d'échange d'ions pendant 12 h est choisie :

- * Ajout d'acétate de Zn en excès
- * Filtration 0,45 μm sous vide
- * 3 lavages avec 10 mL d'acide acétique 1 mol/L et 10 mL d'eau
- * Collection du précipité dans un flacon en verre
- * Ajout de AgNO_3 en excès
- * 12 h de réaction dans le noir
- * Filtration 0,45 μm sous vide
- * 3 lavages avec 10 mL d'acide acétique 1 mol/L, 10 mL d'eau, 10 mL de NH_4OH 1 mol/L, 10 mL d'eau
- * Collection du précipité dans un flacon en verre
- * Séchage au moins 12 h dans une étuve à 70 °C

La valeur de $\delta^{34}\text{S}$ déterminée après échange d'ions est égale à celle déterminée après précipitation directe avec AgNO_3 .

Précipitation des sulfates

Lors de la précipitation des sulfates, la précipitation des isotopes lourds est favorisée, un fractionnement isotopique ($< 2 \text{ ‰}$) entre les sulfates dissous dans la solution initiale et le précipité formé peut avoir lieu (Holser and Kaplan, 1966; Raab and Spiro, 1991). Pour éviter cela, il est nécessaire que la réaction soit totale. Pour assurer une réaction totale, BaCl_2 doit être ajouté en excès par rapport à la quantité de sulfates présents ($\text{Ba}^{2+}/\text{SO}_4^{2-} > 1$), nous avons choisi d'ajouter BaCl_2 de telle sorte que $n(\text{Ba}^{2+}) = 2 n(\text{SO}_4^{2-})$.

Afin de déterminer si ce protocole permet de déterminer les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates dissous, 20 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 20 mmol/L ont été préparés, puis les sulfates ont été précipités par ajout de 1,7 mL de BaCl_2 à 0,5 mol/L comme décrit précédemment. Ce test a été répété deux fois.

Lors du premier test, nous avons déterminé le rendement de la précipitation en mesurant la concentration en sulfates par LC-HR-ICP-MS. La concentration en sulfates était de 19,5 mmol/L avant précipitation et de 0,03 mmol/L dans le filtrat après précipitation (avant lavage). Cela signifie que le rendement de la réaction était de 99,9 % et donc que la réaction a été totale.

Le sel de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ utilisé pour préparer la solution et les précipités de BaSO_4 obtenus ont ensuite été analysés par EA-IRMS afin de comparer leur $\delta^{34}\text{S}$. Les résultats sont présentés dans le Tableau 2-8. Il n'y a pas de différence significative entre les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ obtenues pour $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, BaSO_4 1 et BaSO_4 2. Ceci montre que les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ déterminées pour les BaSO_4 précipités correspondent bien à la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ du sel de sulfates $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ utilisé pour préparer les solutions. La procédure de précipitation a donc été retenue pour réaliser des mesures de $\delta^{34}\text{S}$ de sulfates dissous. La récupération du précipité a été réalisée sur filtre sec et sur filtre humide (respectivement BaSO_4 1 et BaSO_4 2), aucune différence significative n'a été observée concernant la valeur de $\delta^{34}\text{S}$. D'un point de vue technique, il est plus pratique de collecter le précipité avant séchage, c'est donc cette méthode que nous avons retenue.

Tableau 2-8 : Analyse EA-IRMS de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et des BaSO_4 précipités à partir de solutions synthétiques de sulfates à 4,3 mmol/L préparées avec $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

| Échantillon | S (% m/m) | $\delta^{34}\text{S}$ (‰) |
|------------------------------|------------------------|---------------------------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | $24,1 \pm 2,0$ (n = 9) | $2,64 \pm 0,29$ (n = 9) |
| BaSO_4 1 | $11,3 \pm 2,1$ (n = 5) | $2,37 \pm 0,11$ (n = 5) |
| BaSO_4 2 | $13,7 \pm 2,2$ (n = 4) | $2,43 \pm 0,27$ (n = 4) |

Précipitation des sulfates - À retenir :

Précipitation d'une solution de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:

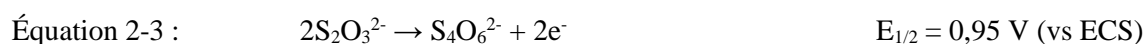
- * Rendement de précipitation de 99,9 %.
- * Pas de différence significative entre $\delta^{34}\text{S}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et pour le BaSO_4 précipité.

Oxydation des thiosulfates

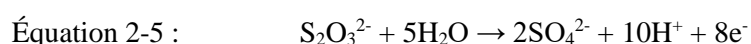
Pour précipiter les thiosulfates, il est nécessaire de les oxyder au préalable afin de les convertir en sulfates. Deux voies d'oxydation ont été envisagées, la première est une oxydation électrochimique qui consiste à appliquer un potentiel constant dans la solution de thiosulfates. La seconde est une oxydation chimique, qui consiste à faire réagir un réactif oxydant avec les thiosulfates. Deux types de réactif ont été testés, le peroxyde d'hydrogène et les ions hypochlorites. Les différentes méthodes ont été évaluées et comparées pour leur efficacité et leur applicabilité à des échantillons réels.

Oxydation électrochimique

D'après les travaux de Feng *et al.* (1995), il est possible de convertir quantitativement les thiosulfates en sulfates par une électrolyse en deux étapes. La première consiste en l'application d'un potentiel constant de 1,0 V (vs ECS : électrode au calomel saturée en KCl), permettant l'oxydation des thiosulfates en tétrathionates ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$). Lors de la deuxième étape, un potentiel de 1,6 V (vs ECS), qui permet la conversion des tétrathionates en sulfates, est appliqué. Ces deux étapes correspondent aux deux réactions suivantes :



La réaction globale du processus d'oxydation des thiosulfates étant :



Afin de mettre en place cette méthode, les potentiels de pic anodiques ($E_{1/2}$) ont d'abord été déterminés par rapport à l'électrode de référence utilisée, à savoir Ag/AgCl/KCl 3 mol/L. Pour cela, une solution de thiosulfates à 20 mmol-S/L, tamponnée à pH 5 afin d'éviter la décomposition des thiosulfates en sulfites et soufre élémentaire (Kerker, 1951), a été préparée. La voltampérométrie cyclique, réalisée entre 0,8 et 1,8 V et présentée sur la Figure 2-14, montre deux pics anodiques bien définis avec des $E_{1/2}$ respectifs de 1,03 V et 1,37 V (vs Ag/AgCl/KCl 3 mol/L), ce qui est en accord avec les valeurs données dans la littérature, à savoir 0,95 V et 1,4 V (vs ECS) soit 0,98 V et 1,43 V (vs Ag/AgCl/KCl 3 mol/L) (Feng *et al.*, 1995).

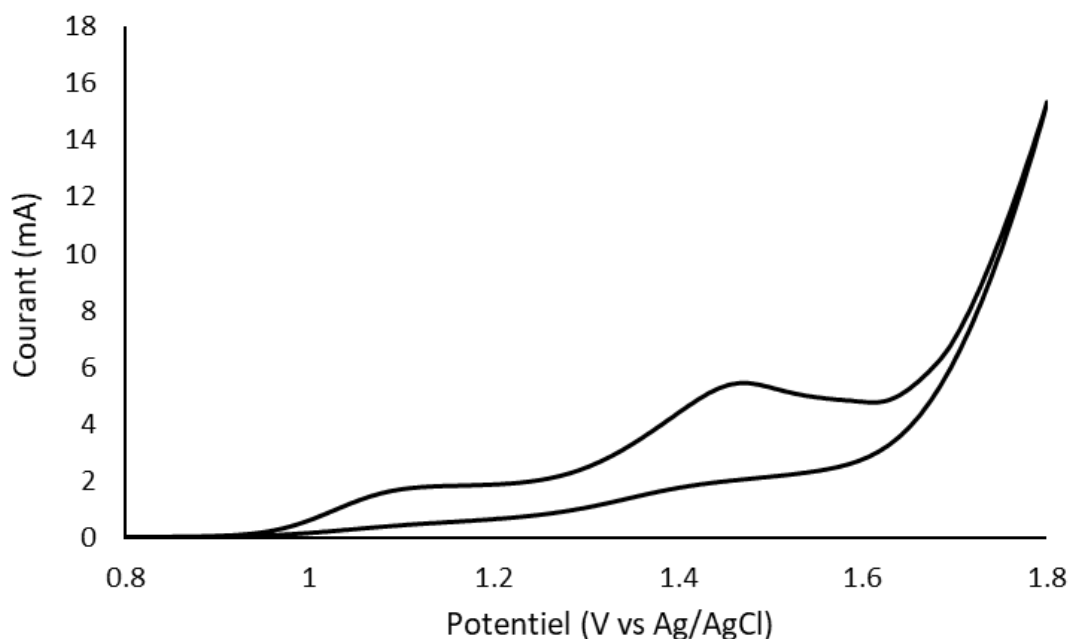


Figure 2-14 : Voltampérométrie cyclique d'une solution de 20 mmol-S/L de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dans un tampon acétate à 1 mol/L (pH 5) (sans agitation).

Ensuite, une électrolyse en deux étapes a été réalisée. Afin d'augmenter la vitesse de réaction et d'obtenir une conversion quantitative des thiosulfates en sulfates, nous avons choisi dans un premier temps de réaliser une électrolyse à un potentiel de 1,2 V lors de la première étape, puis à 1,65 V lors de la seconde étape. En effet, Belobaba *et al.* (2008) ont montré que des valeurs de potentiels largement supérieures aux valeurs de pics anodiques permettaient une diminution plus rapide de la concentration en thiosulfates. Chaque étape a été maintenue pendant 12 h, jusqu'à ce que le courant enregistré soit équivalent au courant mesuré pour un blanc. Pour favoriser l'apport d'ions à la surface de l'électrode, la solution a été maintenue sous agitation magnétique durant toute l'électrolyse. Le chronoampérogramme présenté sur la Figure 2-15 montre la variation du courant au cours du temps pendant les deux étapes de l'électrolyse. Pour chaque étape, le courant diminue au cours de la réaction, par ailleurs le courant initial est deux fois plus important pour la 2^{ème} étape ce qui traduit un plus grand nombre d'électrons échangés d'après la loi de Faraday. Des analyses de voltampérométrie cyclique ont été réalisées après chaque étape. Après la 1^{ère} étape, le premier pic anodique ($E_{1/2} = 1,03$ V) n'apparaît pas sur le voltampérogramme (Figure 2-16.A), ce qui indique une oxydation totale des thiosulfates. Le deuxième pic anodique ($E_{1/2} = 1,37$ V) est toujours présent et un 3^{ème} pic de faible intensité apparaît vers 1,6 V, suggérant la formation d'une autre espèce soufrée de nature inconnue. Sur le voltampérogramme réalisé après la 2^{ème} étape d'électrolyse (Figure 2-16.B), plus aucun pic n'est présent, indiquant que les tétrathionates formés à la 1^{ère} étape ont été entièrement convertis en sulfates. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Feng *et al.* (1995).

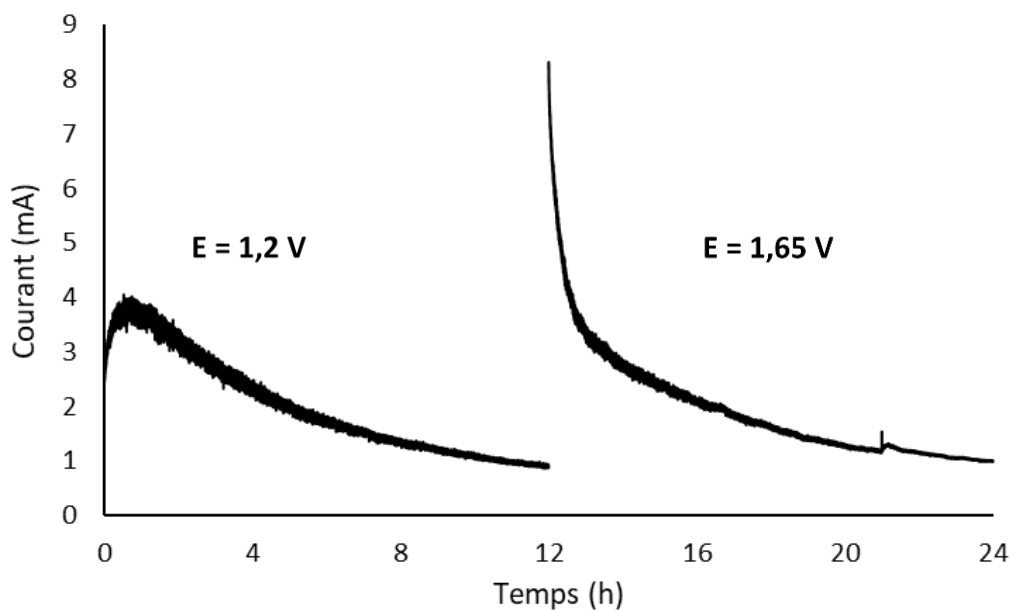


Figure 2-15 : Chronoampérométrie d'une solution de 20 mmol-S/L de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dans un tampon acétate à 1 mol/L (pH 5) (sous agitation) à 1,2 V pendant 12 h puis à 1,65 V pendant 12 h.

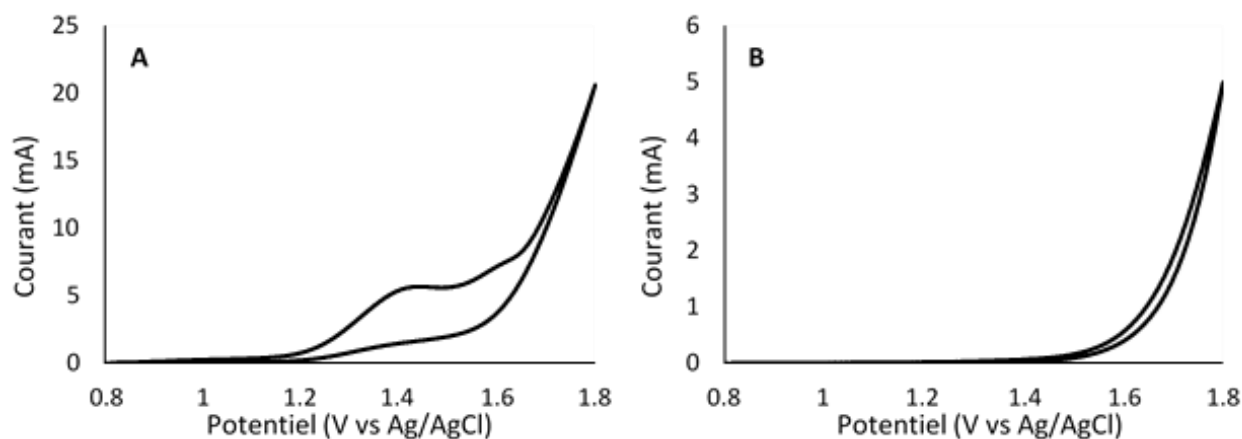


Figure 2-16 : Voltampérométrie cyclique d'une solution de 20 mmol-S/L de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dans un tampon acétate à 1 mol/L (pH 5) (sans agitation). A : Après 12h d'électrolyse à 1,2 V. B : Après 12h d'électrolyse à 1,2 V et 12h à 1,65 V.

Des prélèvements de 20 μL ont été réalisés avant électrolyse et après chaque étape. Les aliquotes obtenus ont été dilués 50 fois dans NH_4NO_3 60 mmol/L et 0,1% de formaldéhyde puis analysés par LC-HR-ICP-MS selon la méthode précédemment décrite. Avant électrolyse, il n'y avait que des thiosulfates en solution (l'aire du pic des sulfates étant inférieure à celle du blanc analytique) (Figure 2-17.A).

Après 12 h d'électrolyse à 1,2 V, la Figure 2-17.B montre qu'il y avait en solution des sulfates et des thiosulfates, représentant respectivement $61 \pm 1 \%$ et $4,1 \pm 0,3 \%$ de la quantité de soufre (thiosulfates) présent initialement dans la solution. 34,40% du soufre initial n'a pas été détecté (les tétrathionates n'étant pas détectés avec cette méthode). D'autre part, après cette première électrolyse, il

n'y a eu aucune preuve visuelle de formation de S^0 , alors que Feng *et al.* (1995) ont observé la formation d'une suspension colloïdale de soufre élémentaire (S^0) lors d'une l'électrolyse directe des thiosulfates à 1,6 V. La présence de sulfates après la première électrolyse suggère qu'à un potentiel de 1,2 V, les deux réactions (1) et (2) se produisent simultanément.

À l'issue de l'étape 2 (électrolyse à 1,65 V), la formation de différentes espèces a été mise en évidence comme le montre la Figure 2-17.C. Ainsi deux espèces coéluent à 220 s, temps de rétention qui correspond à celui des sulfites, une espèce de nature inconnue apparaît à 400 s, et une autre vers 1100 s. Après la seconde électrolyse, $99,9 \pm 0,1$ % des thiosulfates initiaux ont été oxydés mais seulement 84 ± 1 % ont été convertis en sulfates. Les espèces inconnues et les sulfites représentent $6,7 \pm 0,1$ % du soufre initial et 9 ± 1 % du soufre initial n'a pas été détecté. Ces résultats vont à l'encontre des hypothèses formulées précédemment, basées sur les travaux de Feng *et al.* (1995) ainsi que sur les voltampérogrammes obtenus au laboratoire, à savoir la conversion des thiosulfates en tétrathionates au potentiel d'électrolyse de 1,2 V dans un premier temps, puis la conversion des tétrathionates en sulfates au potentiel d'électrolyse de 1,65 V dans un deuxième temps. Les différences entre les observations de Feng *et al.* (1995) et celles de cette étude pourraient être expliquées par les potentiels d'électrolyse plus élevés qui ont été appliqués (afin d'accroître la vitesse de réaction) dans cette étude par rapport à ceux appliqués par Feng *et al.* (1995).

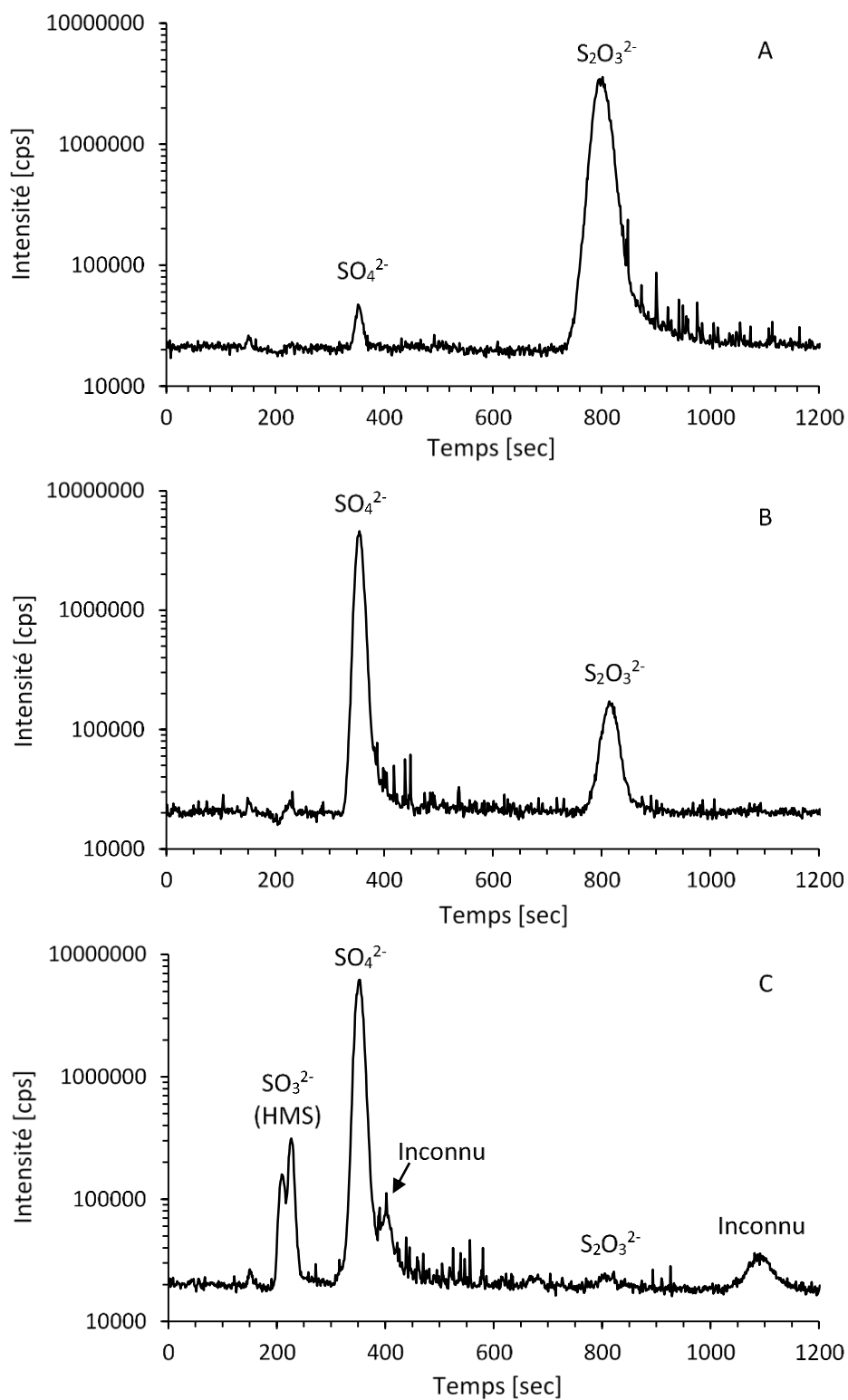


Figure 2-17 : Analyse LC-HR-ICP-MS d'une solution de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ à 20 mmol-S/L dans du tampon acétate 1 mol/L (diluée 50 fois dans la phase mobile), A : Avant électrolyse, B : Après 12h à 1,2 V, C : Après 12h à 1,2 V et 12h à 1,65 V. L'intensité est en échelle logarithmique.

Au vu de ces premiers résultats, l'expérience a été reproduite en appliquant un potentiel de 1,2 V pendant 24 h à une solution de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$ 20 mmol-S/L dans un tampon acétate 1 mol/L (pH 5). Des prélèvements de 20 μL de solution ont été effectués à différents intervalles de temps au cours de l'électrolyse afin de réaliser un suivi de l'avancement de la réaction par analyse LC-HR-ICP-MS. Une voltampérométrie cyclique a été réalisée avant l'électrolyse et présente une forme identique à celle de la Figure 2-14. Le chronoampérogramme de l'électrolyse et le suivi des concentrations en sulfates et en thiosulfates sont présentés Figure 2-18. Le chronoampérogramme montre que le courant enregistré diminue rapidement durant les 4 premières heures puis ralentit de plus en plus, traduisant un appauvrissement des ions à la surface de l'électrode. D'après la première loi de Faraday (Strong, 1961), le courant enregistré à l'instant t est proportionnel au nombre de moles oxydées à l'instant t . Ceci implique que, lorsque tous les thiosulfates sont oxydés, le courant mesuré est égal au courant résiduel. Or, à la fin de l'électrolyse (Figure 2-18, $t = 24$ h), le courant enregistré ($I_{t=24\text{h}} - I_{\text{Résiduel}} = 0,16$ mA) est proche du courant résiduel enregistré dans un blanc (Figure A4) ce qui suggère que tous les thiosulfates initialement présents en solution ont été oxydés. De plus, le voltampérogramme obtenu après l'électrolyse est similaire à celui obtenu pour un blanc (solution de tampon acétate 1 mol/L) (Figure A5). D'un point de vue électrochimique, les résultats montrent que tous les thiosulfates initialement présents en solution ont été oxydés.

La concentration en soufre total qui correspond à la somme des concentrations des différentes espèces en solution est théoriquement égale à la concentration initiale en thiosulfates (20 mmol-S/L). Or la concentration en soufre total déterminée par LC-HR-ICP-MS diminue pendant les 4 premières heures d'électrolyse jusqu'à $13,4 \pm 0,2$ mmol-S/L puis augmente et atteint $19,6 \pm 0,3$ mmol-S/L après 24 h d'électrolyse. Ceci signifie qu'une espèce intermédiaire, non détectée par LC-HR-ICP-MS, est formée au cours de la réaction puis convertie en sulfates, ce qui corrobore l'hypothèse de Feng *et al.*, selon laquelle les tétrathionates sont un intermédiaire de réaction lors de l'oxydation des thiosulfates en sulfates. La concentration en thiosulfates diminue proportionnellement au courant (Figure 2-19), en effet, courant et concentration en thiosulfates sont fortement corrélés (polynôme du 2nd degré, $R^2 = 0,9974$). La concentration en sulfates est inversement proportionnelle au courant (polynôme du 2nd degré, $R^2 = 0,9757$) comme le montre la Figure 2-19. Le courant peut donc servir à estimer les concentrations en thiosulfates et sulfates au cours de l'oxydation en utilisant les équations (linéaires ou polynomiales respectivement) présentées sur la Figure 2-19. Après 24 h d'électrolyse, la concentration en thiosulfates est de $0,038 \pm 0,003$ mmol-S/L, le rendement de l'oxydation est donc de $99,81 \pm 0,02$ %, la concentration de sulfates est de $19,5 \pm 0,3$ mmol-S/L, le rendement de conversion en sulfates est donc de 98 ± 2 %. Compte tenu des incertitudes de mesures, l'électrolyse à 1,2 V a permis de convertir quantitativement les thiosulfates en sulfates. Les analyses LC-HR-ICP-MS confirment donc les résultats obtenus par mesures électrochimiques.

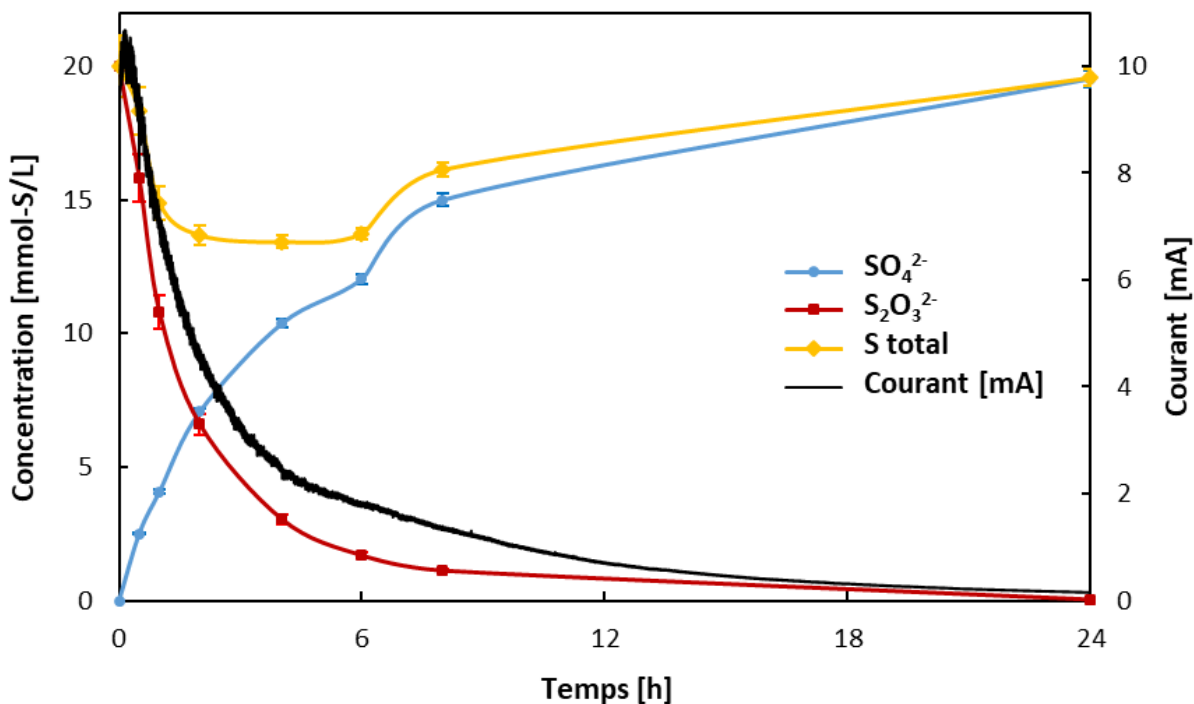


Figure 2-18 : Suivi cinétique de la chronoampérométrie d'une solution de 20 mmol-S/L de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$ dans un tampon acétate à 1 mol/L (pH 5) (sous agitation magnétique) à 1,2 V. Des prélèvements de 20 μL de solution à différents temps ont permis de suivre la concentration en sulfates et thiosulfates par LC-HR-ICP-MS. S total représente la somme des espèces détectées en LC-HR-ICP-MS.

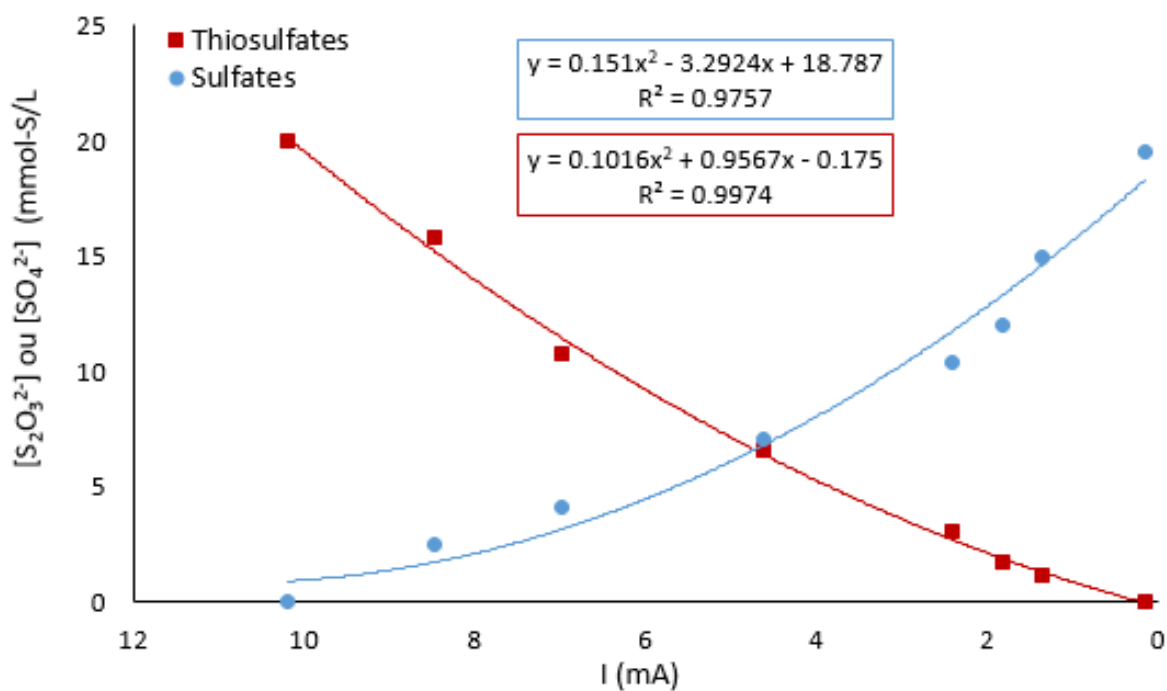


Figure 2-19 : Corrélation entre le courant mesuré au cours de l'électrolyse et la concentration en thiosulfates et sulfates.

Les sulfates produits ont ensuite été précipités par BaCl₂ selon la procédure décrite au paragraphe 2.3.1 et analysé par EA-IRMS. La valeur obtenue de $\delta^{34}\text{S} = 3,97 \pm 0,56 \text{ ‰}$ (n = 5) est tout à fait en accord avec celle obtenue pour le composé initial (NH₄)₂S₂O₃, $\delta^{34}\text{S} = 4,05 \pm 0,40 \text{ ‰}$ (n = 16). Ceci démontre que la procédure d'oxydation des thiosulfates par électrolyse peut être utilisée pour des mesures isotopiques. De plus, cette méthode possède l'avantage de permettre le suivi de l'avancement de la réaction *via* le courant mesuré. D'autre part, cette méthode d'oxydation des thiosulfates est intéressante du point de vue économique et environnemental, car elle ne nécessite pas l'utilisation de produits chimiques coûteux ou dangereux pour l'environnement, mais uniquement de l'électricité et une solution d'acétate d'ammonium tamponnée à pH 5.

Oxydation chimique

Oxydation par le peroxyde d'hydrogène :

Plusieurs études décrivent une oxydation des thiosulfates par du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en milieu basique conduisant à la formation de sulfates selon la réaction (Bean, 2000; Jeyakumar et al., 2002; Sato et al., 2003) :



Sato *et al.* (2003), ont oxydé 50 µmol/L (soit 100 µmol-S/L) de thiosulfates avec 1000 µmol/L de H₂O₂ à pH 10 et à -15 °C. Ils ont observé que 90 minutes étaient nécessaires pour que la réaction soit totale. En revanche, à un pH de 6 et à -15 °C, ils ont observé que le produit majoritairement formé était du tétrathionate. Jeyakumar *et al.* (2002) ont oxydé des solutions de thiosulfates par ajout de NH₄OH et de H₂O₂, les échantillons ont été chauffés jusqu'à évaporation totale puis repris dans de l'eau.

En se basant sur ces travaux, nous avons réalisé différents tests d'oxydation des thiosulfates par le peroxyde d'hydrogène à pH 11,5 (ajusté avec NH₄OH) afin d'éviter la formation de tétrathionate. Les tests ont été réalisés sur des solutions de 30 mL avec des concentrations en thiosulfates ((NH₄)₂S₂O₃) de 6,67 ou 13,33 mmol-S/L, de sorte que si l'oxydation est totale, la précipitation par ajout de BaCl₂ conduise à la formation d'environ 50 ou 100 mg de BaSO₄. Les solutions ont été analysées par LC-HR-ICP-MS avant et après l'oxydation pour quantifier le rendement d'oxydation des thiosulfates et la production de sulfates.

Les différentes conditions des tests sont présentées dans le Tableau 2-9. Lors de ces tests la diminution de la concentration en thiosulfates a entraîné une augmentation quantitative de la concentration en sulfates, qui était le seul produit d'oxydation. Afin d'optimiser le rendement de la réaction, différents paramètres ont été testés. À 25 °C et à -15 °C (test 1, 2 et 3, Tableau 2-9), des rendements d'oxydation inférieur à 2 % ont été obtenus. Ces résultats sont différents de ceux de Sato *et al.* (2003), cela pourrait être dues aux fortes concentrations en thiosulfates employées ici (133 fois plus élevées que dans leur étude).

L'augmentation de la température nous a permis d'obtenir des rendements plus élevés, supérieurs à 11 % (test 4 à 7, Tableau 2-9). On peut alors penser que l'augmentation de la température rend la réaction thermodynamiquement favorable et a permis l'amélioration du rendement.

Nous avons ensuite montré qu'un temps de réaction plus long permettait d'augmenter le rendement. En effet, un rendement d'oxydation de 16 ± 1 % a été obtenu pour le test 5, soit une augmentation d'environ 5 % pour une augmentation du temps de réaction de 2 h par rapport au test 4. En se basant sur les résultats des tests 4 et 5 et en les extrapolant selon un modèle logarithmique (en supposant une réaction d'ordre 1), on peut calculer qu'environ 400 h seraient nécessaires pour que la réaction soit totale.

De plus, nous avons montré qu'augmenter le rapport de concentration entre peroxyde d'hydrogène et thiosulfates permettait d'augmenter le rendement. En effet, des rendements de $20,2 \pm 0,5$ % et 21 ± 4 % ont été obtenus pour les tests 6 et 7, respectivement. Le test 7 a été réalisé dans les mêmes conditions de température et de temps de réaction que le test 4 et le rendement obtenu pour le test 7 est environ 2 fois celui du test 4. Ceci suggère que doubler le rapport $\text{H}_2\text{O}_2/\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ permet de doubler le rendement.

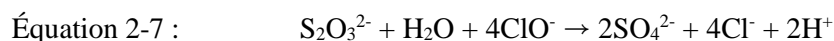
Quelles que soient les conditions, le rendement de conversion des thiosulfates en sulfates n'a jamais dépassé 21 %, cela semble être dues aux fortes concentrations en thiosulfates utilisées qui nécessitent un temps de réaction beaucoup plus long pour être oxydées. Une oxydation totale n'a pas pu être obtenue, cette approche n'a donc pas été retenue.

Tableau 2-9 : Oxydation des thiosulfates par du peroxyde d'hydrogène. Les concentrations présentées sont celles après mélange des solutions de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ et de H_2O_2 .

| Test | $[\text{S}_2\text{O}_3^{2-}]$ (mmol-S/L) | $[\text{H}_2\text{O}_2]$ (mol/L) | Conditions de réaction | Rendement de l'oxydation % |
|------|---|-------------------------------------|--|-------------------------------|
| 1 | 13,33 | 3 | 3 h à 25 °C | 0 |
| 2 | 13,33 | 3 | 90 min à -15 °C | $1,3 \pm 0,5$ |
| 3 | 13,33 | 3 | 100 h à -15 °C | $1,8 \pm 0,4$ |
| 4 | 13,33 | 3 | 5 h à 70 °C puis 3 h à 95 °C, flacons ouverts, évaporation à sec puis reprise dans 15 mL H_2O | $11,3 \pm 0,7$ |
| 5 | 13,33 | 3 | 5 h à 70 °C, flacons fermés, puis 5 h à 95 °C, flacons ouverts, évaporation à sec puis reprise dans 15 mL H_2O | 16 ± 1 |
| 6 | 13,33 | 6 | 5 h à 95 °C, flacon ouvert, évaporation à sec puis reprise dans 15 mL H_2O | $20,2 \pm 0,5$ |
| 7 | 6,67 | 3 | 5 h à 70 °C puis 3 h à 95 °C, flacons ouverts, évaporation à sec puis reprise dans 15 mL H_2O | 21 ± 4 |

Oxydation par l'ion hypochlorite :

Yokosuka *et al.* (1975) ont présenté une méthode d'oxydation des thiosulfates par des ions hypochlorites en milieu neutre (pH = 7) et acide (pH = 4). Un rendement de 100% a été obtenu en ajoutant 270 mmol/L de ClO^- à une solution de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ à 3,12 mmol/L (soit 6,24 mmol-S/L et $\text{ClO}^-/\text{S}_2\text{O}_3^{2-} = 86$) à 25 °C. La réaction d'oxydation est la suivante :



En se basant sur ces travaux, nous avons réalisé l'oxydation de 20 mL d'une solution de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$ à 20 mmol-S/L à température ambiante et pH 7 en ajoutant 10 mL d'une solution de ClO^- à 400 mmol/L. Les concentrations finales en solution après mélange sont 13,33 mmol-S/L pour $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ et 133 mmol pour ClO^- (soit $\text{ClO}^-/\text{S}_2\text{O}_3^{2-} = 20$). Des analyses LC-HR-ICP-MS ont été réalisées sur des aliquotes de 20 μL prélevés immédiatement après l'ajout de ClO^- et après 1 h et 2 h de réaction, afin de quantifier les espèces en solution et de suivre l'avancement de la réaction.

Sur la Figure 2-20 est représenté le chromatogramme obtenu immédiatement après l'ajout de ClO^- . La concentration en thiosulfates est inférieure à la limite de détection (18 ng-S/g), les thiosulfates ont été complètement oxydés. Environ 1,3 mmol/L (soit 9,6 %) des thiosulfates initiaux ont été oxydés sous la forme de sulfites et d'une espèce inconnue qui élue entre les sulfites et les sulfates (Figure 2-20). La concentration en sulfates est d'environ 5,3 mmol/L, ce qui représente environ 40 % de la concentration initiale en thiosulfates. Deux espèces inconnues qui éluent après les sulfates et après les thiosulfates représentent environ 0,8 % et 0,6 %, respectivement, de la concentration initiale en thiosulfates. La concentration en soufre total détectée est d'environ 6,8 mmol/L, ce qui représente environ 51 % de la concentration en soufre initialement en solution (13,33 mmol/L). Ceci suggère que des espèces du soufre qui ne sont pas détectées se sont formées, ce qui est en accord avec les travaux de Yokosuka *et al.*, qui ont détecté des trithionates et des tétrathionates comme intermédiaires de réaction pouvant représenter jusqu'à 50 % de la concentration totale en soufre. On peut donc supposer que le soufre non détecté dans notre expérience est sous la forme de trithionates et de tétrathionates.

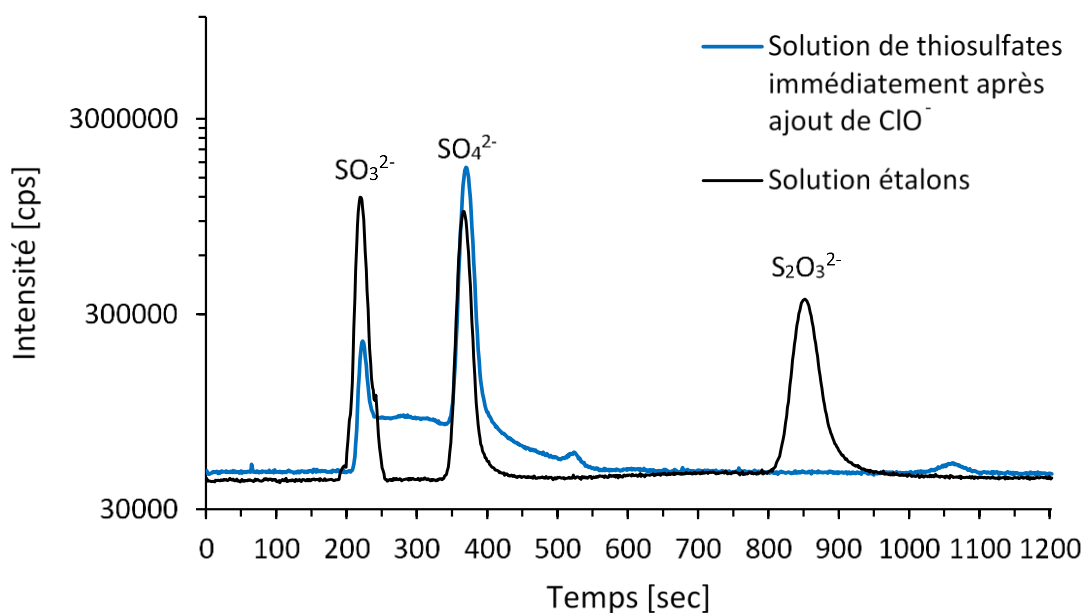


Figure 2-20 : Analyse LC-HR-ICP-MS d'une solution (20 mL) de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$ à 20 mmol-S/L immédiatement après l'ajout de 10 mL de ClO^- à 400 mmol/L à température ambiante et d'une solution étalons à 1 $\mu\text{g-S/g}$ de sulfites, sulfates et thiosulfates. L'intensité est en échelle logarithmique.

La Figure 2-21 montre qu'après 1 h d'oxydation, les espèces majoritaires sont les sulfites ($2,1 \pm 0,1$ mmol/L) et les sulfates ($11,2 \pm 0,3$ mmol/L) qui représentent 16 ± 1 % et 83 ± 2 %, respectivement, de la concentration initiale en thiosulfates. Les deux espèces inconnues représentent $0,6 \pm 0,1$ % et $0,4 \pm 0,1$ %, respectivement, de la concentration initiale en thiosulfates. La concentration totale en soufre est de $13,4 \pm 0,5$ mmol/L, ce qui correspond bien à la concentration initiale en thiosulfates. Après 2 h d'oxydation, les sulfates, les sulfites et les espèces inconnues sont présents dans les mêmes proportions qu'après 1 h d'oxydation ce qui montre que la solution est stable à partir d'1 h de réaction.

Ces résultats sont différents de ceux de Yokosuka *et al.* (1975), qui n'ont pas observé de formation de sulfites. Dans l'étude de Yokosuka *et al.* (1975), les sulfates ont été quantifiés par gravimétrie, en les précipitant avec BaCl_2 , or les sulfites précipitent également avec BaCl_2 . Ainsi, si des sulfites ont été formés dans leur étude, ils ont alors été détectés comme des sulfates. Une autre hypothèse est que le rapport $\text{ClO}^-/\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ plus important dans l'étude de Yokosuka *et al.* (86 contre 20 dans cette étude) a permis une oxydation totale des thiosulfates en sulfates.

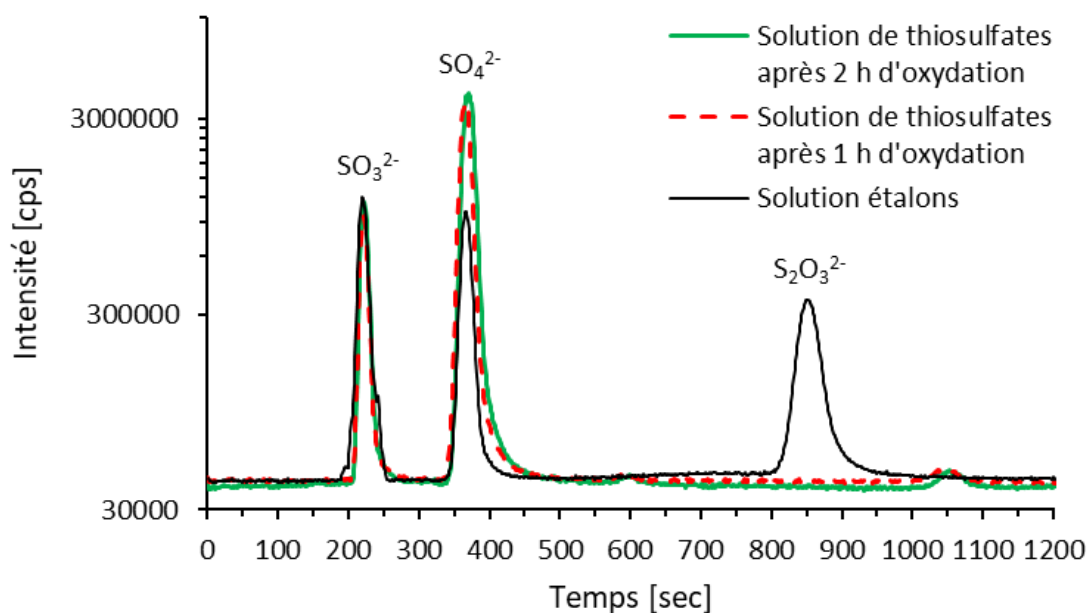


Figure 2-21 : Analyse LC-HR-ICP-MS d'une solution (20 mL) de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$ à 20 mmol-S/L oxydée par 10 mL de ClO^- à 400 mmol/L à température ambiante après 1 h et 2 h de réaction et d'une solution étalons à 1 $\mu\text{g-S/g}$ de sulfites, sulfates et thiosulfates. L'intensité est en échelle logarithmique.

Néanmoins, le protocole que nous avons mis en place permet d'oxyder totalement les thiosulfates et permet également sa précipitation puisque les sulfites précipitent également avec BaCl_2 pour former du BaSO_3 . La procédure de précipitation décrite au paragraphe 2.3.1 a été suivie afin de co-précipiter les sulfites et les sulfates présents dans la solution oxydée. Le précipité obtenu ($\text{BaSO}_3/\text{BaSO}_4$) a été analysé par EA-IRMS. La valeur de $\delta^{34}\text{S}$ déterminée est de $3,56 \pm 0,31 \text{ ‰}$ ($n = 4$), ce qui n'est pas significativement différent de la valeur du sel $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$ utilisé pour préparer la solution, $4,05 \pm 0,40 \text{ ‰}$ ($n = 16$). Ce protocole permet donc d'oxyder totalement les thiosulfates dissous en sulfates et sulfites et *in fine* de déterminer la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des thiosulfates. De plus, cette préparation d'échantillon est très facile à mettre en œuvre.

Oxydation et précipitation des thiosulfates - À retenir :

Les thiosulfates ont pu être oxydés quantitativement en sulfates par électrolyse à 1,2 V dans un tampon acétate à pH 5 ou par réaction avec une solution d'ion ClO^- à pH 7, en revanche la réaction avec H_2O_2 à pH 11,5 n'a pu conduire à une oxydation totale des thiosulfates dans les concentrations et conditions expérimentales testées.

Les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ déterminées pour les thiosulfates précipités sous forme de BaSO_4 ou $\text{BaSO}_3/\text{BaSO}_4$ après oxydation par électrolyse ou par ClO^- ne présentaient pas de différence significative avec la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$.

La méthode d'oxydation par électrolyse présente l'avantage de suivre l'avancement de la réaction grâce à la mesure du courant et ne nécessite que peu de réactifs. Cependant, c'est une méthode qui est relativement lente, puisqu'il faut 24 h pour oxyder complètement 1 échantillon de 20 mL à 20 mmol-S/L de thiosulfates.

La méthode d'oxydation par ajout de ClO^- est au contraire une méthode facile et rapide puisqu'il suffit d'1 h pour oxyder 20 mL à 20 mmol-S/L de thiosulfates.

Toutefois, il sera nécessaire de tester ces deux méthodes dans le cadre d'une précipitation séquentielle sulfures-sulfates-thiosulfates, afin de s'assurer de leur compatibilité avec les procédures de précipitation des sulfures et des sulfates qui doivent être réalisées avant l'oxydation des thiosulfates.

3.2.3. Précipitation séquentielle

Optimisation dans l'eau ultra-pure

Un essai de précipitation séquentielle sulfures-sulfates-thiosulfates a été réalisé sur une solution étalon préparée dans de l'eau ultra-pure contenant 20 mmol-S/L de Na₂S, 20 mmol-S/L de (NH₄)₂SO₄ et 20 mmol-S/L de (NH₄)₂S₂O₃. Les sulfures puis les sulfates ont d'abord été précipités comme décrit précédemment, les thiosulfates ont été oxydés par électrolyse. Pour les sulfures, les valeurs de δ³⁴S obtenues pour une solution pure de sulfures (préparée à partir de la même solution mère que celle utilisée pour le test de précipitation séquentielle) précipités par ajout de AgNO₃ (procédure 1, Figure 2-13) sont considérées comme les valeurs de référence. Pour les sulfates, les valeurs de δ³⁴S obtenues pour (NH₄)₂SO₄ sont considérées comme les valeurs de référence. Les résultats obtenus pour les sulfures et les sulfates, présentés dans le Tableau 2-10, montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les valeurs isotopiques de référence et celles déterminées par précipitation séquentielle. La procédure séquentielle mise au point est donc valide pour la mesure des valeurs isotopiques des sulfures et des sulfates présents simultanément dans une solution aqueuse.

Tableau 2-10 : Analyses EA-IRMS des sulfures et des sulfates d'une solution contenant 50 mmol-S/L de Na₂S, 20 mmol-S/L de (NH₄)₂SO₄ et 20 mmol-S/L de (NH₄)₂S₂O₃.

| δ ³⁴ S (‰) | Sulfures | Sulfates |
|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Référence | 1,2 ± 0,2 (n = 3) ^a | 2,6 ± 0,3 (n = 9) ^b |
| Précipitation séquentielle | 1,2 ± 0,3 (n = 3) | 2,6 ± 0,6 (n = 3) |

^a Déterminée à partir de la même solution de Na₂S précipitée avec AgNO₃, ^b déterminée par analyse directe de (NH₄)₂SO₄.

En revanche, il n'a pas été possible de déterminer la valeur isotopique des thiosulfates. En effet, l'oxydation par voie électrochimique n'a pas fonctionné, car dans ces conditions, un courant inférieur à 40 µA a été enregistré pendant l'électrolyse (Figure A6) alors qu'un courant de 20 mA avait été mesuré lors de l'oxydation d'une solution de thiosulfates préparée dans un tampon acétate (Figure 2-18). D'autre part, aucun précipité n'a été formé suite à l'ajout à la solution de BaCl₂. Il semble que lors de la précipitation séquentielle, l'oxydation des thiosulfates n'ait pas lieu. La solution après précipitation des sulfures et des sulfates contient des ions Zn²⁺, Ba²⁺ et Cl⁻ qui n'étaient pas présents lors de l'oxydation d'une solution de thiosulfates préparée dans un tampon acétate. Il est possible que la présence de l'un de ces trois ions inhibe l'oxydation électrochimique des thiosulfates. Afin de déterminer l'origine de ce problème, une solution de thiosulfates à 20 mmol-S/L a été préparée dans 20 mL de tampon acétate à laquelle 100 µL de BaCl₂ 0,5 mol/L ont été ajoutés, soit une concentration de 2,5 mmol/L. Sur les mesures réalisées en voltampérométrie cyclique (Figure 2-22), les deux pics anodiques ne sont pas détectés. En chronoampérométrie (Figure A6), l'intensité mesurée dans ces conditions est aussi faible

que lors de l'électrolyse de la solution après précipitation séquentielle des sulfures et sulfates. La présence de BaCl_2 en solution empêche donc le bon déroulement de la réaction électrochimique. L'expérience a été renouvelée avec un ajout de $100 \mu\text{L}$ d'une solution de NaCl à 1 mol/L . En présence de NaCl , sur le voltampérogramme obtenu (Figure 2-22), les deux pics anodiques sont bien détectés comme lors de l'analyse d'une solution de thiosulfates préparée dans un tampon acétate (Figure 2-14). Ce test montre que la présence de Cl^- ne perturbe pas l'oxydation électrochimique des thiosulfates. L'inhibition de l'oxydation observée lors de la précipitation séquentielle peut donc être attribuée à la présence des ions Ba^{2+} . Ces-derniers étant indispensables à la précipitation des sulfates, cette méthode ne peut donc pas être utilisée dans le cadre d'une précipitation séquentielle sulfates – thiosulfates. Néanmoins, cette méthode demeure utilisable pour l'oxydation de solutions de thiosulfates ne contenant pas de Ba^{2+} . Pour une précipitation séquentielle sulfures-sulfates-thiosulfates, l'oxydation des thiosulfates sera donc réalisée par oxydation chimique avec les ions ClO^- .

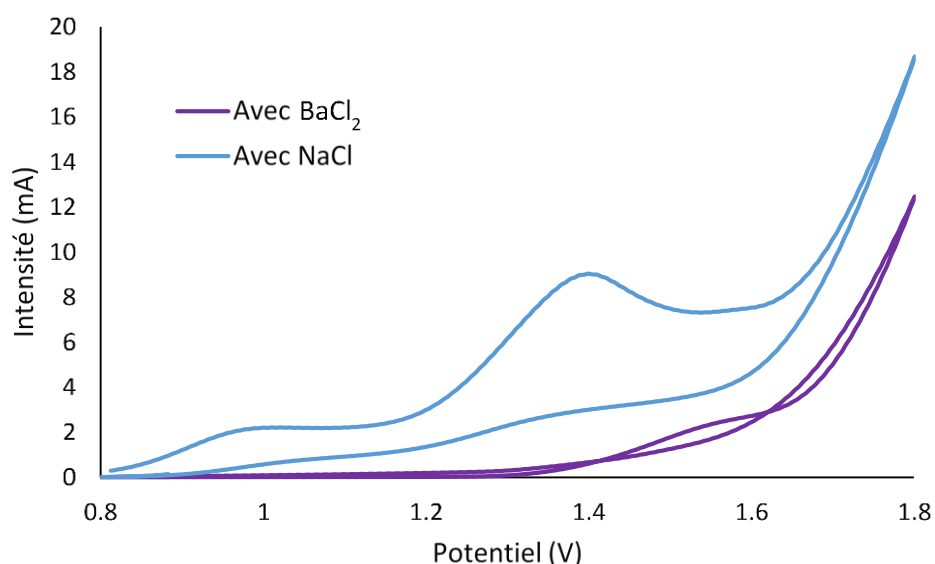


Figure 2-22: Voltampérométrie cyclique (sans agitation) d'une solution de 20 mmol-S/L de thiosulfates et $2,5 \text{ mmol/L}$ de BaCl_2 et d'une solution de 20 mmol-S/L de thiosulfates et 5 mmol/L de NaCl . Les deux solutions ont été préparée dans un tampon acétate à 1 mol/L ($\text{pH } 5$).

Optimisation pour une solution de milieu de culture bactérien

Un test de précipitation séquentielle des sulfures, sulfates et thiosulfates a été réalisé pour une matrice complexe, à savoir un milieu de culture bactérien non inoculé. Une solution contenant 20 mmol-S/L de chaque composé (Na_2S , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$) a été préparée dans un milieu de culture bactérien, dont la composition est décrite au paragraphe 2.6.2, et chaque espèce a été précipitée individuellement. La Figure 2-23 présente la procédure utilisée : dans une première étape, les sulfures ont été précipités sous forme de sulfure d'argent (Ag_2S) ; dans une seconde étape les sulfates ont été

précipités par ajout de BaCl_2 et enfin dans une troisième étape, les thiosulfates ont été oxydés par une solution de ClO^- , puis précipité par ajout de BaCl_2 .

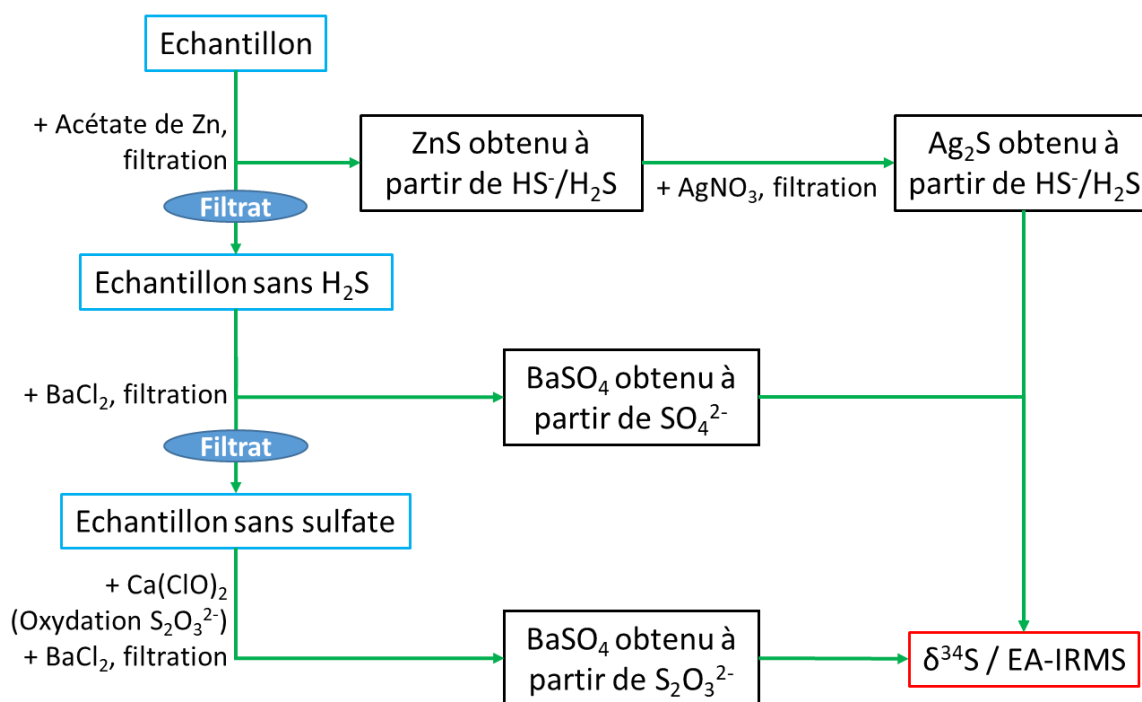


Figure 2-23 : Schéma général de la précipitation séquentielle des sulfures, des sulfates et des thiosulfates pour leur analyse en EA-IRMS.

La procédure de précipitation a également été conduite sur un milieu de culture bactérien sans ajout de source de soufre afin d'évaluer si d'autres espèces chimiques précipitent lors de cette procédure. Lors de l'ajout d'acétate de Zn au milieu sans soufre, un précipité s'est formé. Celui-ci peut être attribué à la présence de phosphates dans le milieu qui forme un produit insoluble avec le zinc ($\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$, $K_S = 10^{-32}$). Ce précipité a ensuite été filtré, un lavage avec 10 mL d'acide acétique 1 mol/L a permis de dissoudre complètement ce précipité. Lors de l'ajout de BaCl_2 au filtrat et après oxydation avec ClO^- , aucun précipité n'a été formé. Le milieu de culture bactérien contient 4 $\mu\text{mol/L}$ de sulfate de fer, mais cette quantité (équivalente à 19 μg de BaSO_4 pour 20 mL de solution) est bien trop faible pour constituer un précipité observable.

L'ajout de ClO^- a permis l'oxydation des thiosulfates et sa précipitation en BaSO_4 , après précipitation des sulfures et des sulfates. Les précipités obtenus à partir du milieu bactérien contenant 20 mmol-S/L de chaque composé (Na_2S , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$) ont été analysés par EA-IRMS, les résultats sont présentés dans le Tableau 2-11. Pour les sulfures, les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ obtenues pour une solution pure de sulfures (préparée à partir de la même solution mère que celle utilisée pour le test de précipitation séquentielle) précipités par ajout de AgNO_3 (procédure 1, Figure 2-13) sont considérées comme les valeurs de référence. Pour les sulfates et les thiosulfates, les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ obtenues pour

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$, respectivement, sont considérées comme les valeurs de référence. Les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ obtenues sont en accord avec les valeurs de référence.

Tableau 2-11 : Analyse EA-IRMS d'une solution de milieu de culture bactérien dopée avec 20 mmol-S/L de Na_2S , 20 mmol-S/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et 20 mmol-S/L de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$.

| $\delta^{34}\text{S}$ (‰) | Sulfures | Sulfates | Thiosulfates |
|----------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Référence | $0,75 \pm 0,16^a$ (n = 3) | $2,64 \pm 0,29^b$ (n = 9) | $4,05 \pm 0,40^b$ (n = 16) |
| Précipitation séquentielle | $0,82 \pm 0,08$ (n = 3) | $2,79 \pm 0,26$ (n = 3) | $3,82 \pm 0,14$ (n = 4) |

^a Déterminé à partir de la même solution de Na_2S par précipitation avec AgNO_3 , ^b déterminer par analyse directe de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Ces résultats démontrent que la méthode de préparation d'échantillons pour les analyses isotopiques des sulfures, des sulfates et des thiosulfates permet de déterminer les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ avec précision et sans induire de biais pour une solution de matrice complexe. Les conditions et la méthodologie utilisées dans ce test, illustrées sur la Figure 2-23, ont donc été retenues pour la précipitation séquentielle des sulfures, des sulfates et des thiosulfates. Dans ce travail, une procédure spécifique à la précipitation des sulfites n'a pas été mise en place. Toutefois, dans le cas d'une éventuelle présence de sulfites, ils seraient co-précipités avec les sulfates lors de la procédure que nous avons établie.

3.3. Analyses d'échantillons réels

Trois types d'échantillons ont été sélectionnés afin de tester la méthodologie mise au point pour les analyses isotopiques des différentes espèces soufrées susceptibles d'être rencontrées en milieux aqueux sur des échantillons réels.

Dans la première étude, nous avons analysé des échantillons d'eaux de source dont la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates a été déterminée par un laboratoire extérieur (Pichat et al., 2018), afin de comparer les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ que nous avons déterminées à celles de la littérature.

Dans les deux études suivantes, nous nous sommes intéressés au fractionnement isotopique généré par des bactéries sulfato-réductrices. La première concerne l'analyse d'eaux souterraines dans lesquelles des bactéries sulfato-réductrices peuvent se développer. Les rapports isotopiques des sulfates et des sulfures ont été déterminés dans des échantillons d'eau provenant d'un aquifère profond (-500 m), *via* des piézomètres placés proche de la bulle de gaz naturel stockée et de deux sites périphériques, afin d'évaluer si l'isotopie du soufre permettait de tracer l'activité bactérienne. Dans la deuxième étude, un consortium de bactéries sulfato-réductrices provenant elles aussi d'un aquifère profond utilisé pour le stockage de gaz naturel a été préalablement cultivé en laboratoire dans des conditions contrôlées pour être ensuite utilisé pour les expérimentations. Afin de mieux comprendre le mécanisme de sulfato-réduction, la spéciation et les rapports isotopiques du soufre ont été suivis au cours de la croissance des bactéries.

3.3.1. Eaux de surfaces

Les sulfates des échantillons d'eaux naturelles ont été précipités selon la procédure décrite au paragraphe 2.3.1. Les résultats présentés sur la Figure 2-24 montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ déterminées et ceux reportés par Pichat *et al.* (2018). Cela montre que la méthode de préparation et de mesure de $\delta^{34}\text{S}$ mise au point est valide pour des échantillons liquides dont la salinité varie de 1 % à 43 % en masse.

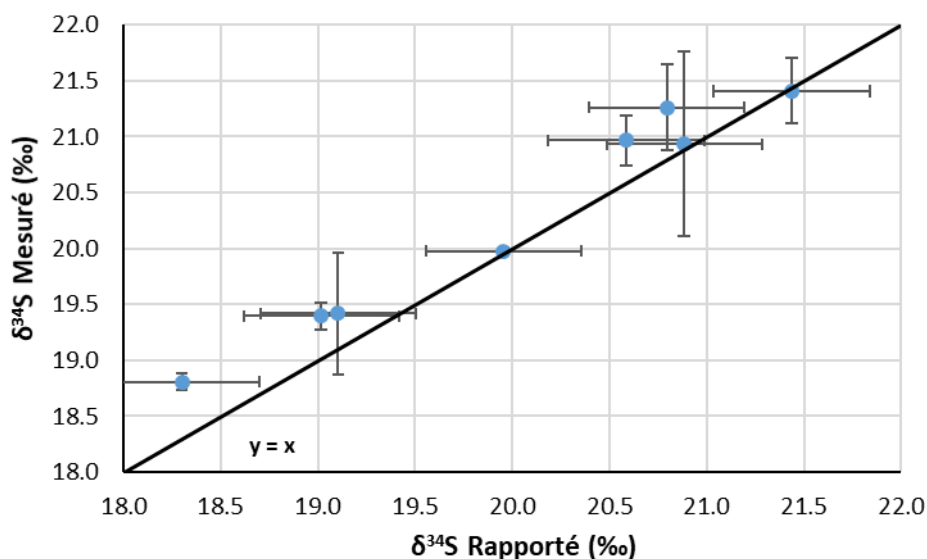


Figure 2-24 : Valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ déterminées au laboratoire pour la série d'eaux naturelles en fonction des valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ déterminées par un autre laboratoire (Pichat et al., 2018). Les données numériques relative à ce graphique sont consultables dans l'Annexe 6.

3.3.2. Eaux souterraines

Les rapports isotopiques du soufre des sulfates et des sulfures ont été mesurés dans des échantillons d'eaux provenant d'un aquifère profond où se développent des bactéries sulfato-réductrices.

Les méthodes développées pour la spéciation et l'analyse isotopique du soufre ont été appliquées à l'analyse d'eaux souterraines. Les différentes eaux de puits de l'aquifère de stockage de gaz naturel ont été prélevées en mars 2017, octobre 2017, avril 2018 et octobre 2018. Seuls des sulfates ont été détectés lors des analyses de spéciation par LC-HR-ICP-MS. Les concentrations mesurées sont présentées dans le Tableau 2-12, les sulfates n'ont pas été quantifiés pour les échantillons prélevés en octobre 2018. Les concentrations en sulfates varient de 0,22 à 51,5 mg-S/L, ce qui nous a permis de tester la méthode développée sur une large gamme de concentrations en sulfates.

Les concentrations en thiosulfates de tous les échantillons étaient en dessous de la limite de détection de la méthode LC-HR-ICP-MS (à savoir 18 ng-S/g).

Tableau 2-12 : Concentrations en sulfates dissous des eaux souterraines. n.d. : non déterminé. n.p. : non prélevé.

| Date échantillonnage | Concentration Sulfates (mg-S/L) | | | |
|----------------------|---------------------------------|--------------|-------------|--------------|
| | Mars 2017 | Octobre 2017 | Avril 2018 | Octobre 2018 |
| G2 | 6,23 ± 0,06 | n.p. | 6,12 ± 0,04 | n.d. |
| G5 | 4,62 ± 0,04 | 0,64 ± 0,02 | 2,19 ± 0,01 | n.d. |
| G46 | 5,02 ± 0,04 | 5,35 ± 0,04 | 3,44 ± 0,03 | n.d. |
| G57 | n.p. | 7,1 ± 0,2 | 0,22 ± 0,01 | n.d. |
| P1 | 4,26 ± 0,04 | n.p. | 4,79 ± 0,06 | n.d. |
| P2 | 42,9 ± 0,6 | 40,2 ± 0,5 | 51,5 ± 0,6 | n.d. |
| P102 | 19,1 ± 0,2 | 18,0 ± 0,2 | 20,1 ± 0,2 | n.d. |

En 2017, les analyses isotopiques des sulfates ont pu être réalisées sur les échantillons de l'eau périphérique P2, mais pas sur les autres échantillons car seul 250 mL d'eau ont été prélevés et la quantité de BaSO₄ était insuffisante pour les échantillons moins concentrés. Afin d'obtenir des quantités de BaSO₄ plus importantes, deux litres d'eau ont été prélevés par puits en avril et octobre 2018. L'augmentation des volumes prélevés a permis de déterminer les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates de P102 et des sulfures de G5 en avril et octobre 2018. Malgré une précipitation totale (voir 3.2.2), un problème de récupération du BaSO₄ a été rencontré. Pour des masses théoriques de BaSO₄ entre 34 et 370 mg, généralement une perte d'environ 35 mg a été constatée, limitant l'analyse des échantillons les moins concentrés. Pour les échantillons G5 et G46 prélevés en Avril 2018, afin de maximiser la récupération de BaSO₄ sur le filtre, celui-ci a été mis en suspension dans de l'eau sous agitation magnétique afin de mettre en solution les particules de BaSO₄ retenues dans les pores du filtre, la solution a ensuite été évaporée. Ceci a permis de récupérer une quantité d'environ 1 mg permettant de réaliser une analyse EA-IRMS. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 2-13.

Les valeurs mesurées pour les sulfates dans les deux eaux (G5 et G46) situées en zone de stockage de gaz sont très similaires (16,21 et 17,08 ‰) mais très différentes des valeurs mesurées pour les eaux périphériques (-26,2 à -29,08 ‰) ce qui suggèrent que différents processus affectent ces eaux. On peut supposer que des réactions de sulfato-réduction bactérienne qui conduisent à des enrichissements en ³⁴S des sulfates (voir paragraphe 2.3 du chapitre 1) ont lieu dans les eaux en zone de stockage de gaz mais pas dans les eaux périphériques. Pour l'eau G5, la concentration importante en sulfures a permis de déterminer sa composition isotopique et par conséquent le fractionnement isotopique apparent par $^{34}\epsilon_{\text{HS-SO}_4} = \delta^{34}\text{S}_{\text{HS}} - \delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ (équation 13, Mariotti et al., 1981). Pour G5 en 2018, $^{34}\epsilon_{\text{HS-SO}_4} = -39,9 \text{ ‰}$, ce qui correspond au fractionnement isotopique sulfures-sulfates représentatif des bactéries sulfato-réductrices rencontrées dans l'environnement, et notamment dans un aquifère contaminé en BTEX (Einsiedl et al., 2015). D'autre part, ce fractionnement isotopique est cohérent avec

ceux de -35,26 à -48,45 ‰ observés précédemment dans les zones de sulfato-réduction de cet aquifère (André et al., 2002).

Les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ déterminées pour les eaux périphériques sont très négatives comme dans l'étude de André *et al.* réalisée en 2000. Toutefois, les valeurs mesurées sont inférieures de 12,3 ‰ et de 6,6 ‰ respectivement pour les eaux Périphérique 2 et 102 par rapport à celles de cette précédente étude. Au contraire pour G5, la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ est supérieure d'environ 17,8 ‰ à celle obtenue dans l'étude de André *et al.* La valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfures de G5 est égale à celle obtenue par André *et al.* Dans l'étude précédente, André *et al.* n'avaient pas classifié ce puits comme une zone d'activité bactérienne, pourtant le fractionnement isotopique de $^{34}\epsilon_{\text{HS-SO}_4} = -22,1$ ‰ est dans la gamme des fractionnements isotopiques observés lors des processus de sulfato-réduction bactérienne dans les eaux souterraines (-65 à -10 ‰, voir Figure 7 du chapitre 1). On peut alors émettre l'hypothèse que l'augmentation de $^{34}\epsilon_{\text{HS-SO}_4}$ correspond à une intensification de l'activité bactérienne dans ce puits entre 2000 et 2018.

Cette étude nous a permis de tester la méthode de précipitation des sulfates sur une large gamme de concentrations. Il apparaît que cette méthode nécessite de prendre des précautions et d'être capable de prélever des quantités plus importantes lorsque les échantillons sont faiblement concentrés en sulfates (< 10 mg-S/L). Néanmoins, nous avons pu mettre en évidence des différences significatives entre les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des eaux situées en zone de stockage de gaz et les eaux périphériques. De plus, un fractionnement isotopique entre sulfates et sulfures correspondant à une activité de sulfato-réduction bactérienne a pu être observé dans un échantillon d'eau situé dans la zone de stockage de gaz.

Tableau 2-13 : Valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates et des sulfures des eaux souterraines. *La quantité de BaSO_4 récupérée (< 1 mg) n'a permis de faire qu'une analyse.

| Date | $\delta^{34}\text{S}(\text{SO}_4^{2-})$ (‰) | | | | | $\delta^{34}\text{S}(\text{HS}^-)$ (‰) | | |
|-------------|---|--------------|---------------|--------------|--------------------------------------|--|--------------|--------------------------------------|
| | Mars 2017 | Octobre 2017 | Avril 2018 | Octobre 2018 | Mars-Avril 2000 (André et al., 2002) | Avril 2018 | Octobre 2018 | Mars-Avril 2000 (André et al., 2002) |
| G5 | n.d. | n.d. | 16,21* | n.d. | -1,63 | -23,7 ± 0,5 | -23,0 ± 0,3 | -24,05 |
| G46 | n.d. | n.d. | 17,08* | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| P2 | -28,5 ± 0,6 | -28,5 ± 0,2 | -29,08 ± 0,02 | -26,2 ± 0,4 | -15,80 | n.d. | n.d. | -32,25 |
| P102 | n.d. | n.d. | -26,9 ± 0,2 | -26,5 ± 0,2 | -20,12 | n.d. | n.d. | 4,28 |

3.3.3. Cultures de bactéries sulfato-réductrices

Des bactéries sulfato-réductrices issues d'un aquifère ont été cultivées dans des conditions de laboratoire permettant une dégradation rapide des sulfates. Dans cette étude, la spéciation et le fractionnement isotopique du soufre ont été suivis au cours de la croissance des bactéries. L'objectif était de comprendre le mécanisme de la sulfato-réduction bactérienne et de déterminer le fractionnement isotopique dû à la réduction des sulfates.

La procédure analytique mise en place pour cette expérience est illustrée sur la Figure 2-25. Ce protocole est adapté de la précipitation séquentielle développée pour les analyses isotopiques des sulfures, des sulfates et des thiosulfates, qui a été modifiée afin d'y inclure une séparation des cellules bactériennes de l'échantillon et la mesure de paramètres supplémentaires tels que les concentrations en pyruvate, acétate et sulfures.

Les bactéries sulfato-réductrices ont été cultivées avec de l'acétate comme source de carbone et donneur d'électrons et des sulfates comme accepteurs d'électrons ; la culture a été réalisée dans des conditions anaérobies représentatives d'un aquifère. Les bactéries ont été cultivées dans 15 tubes différents qui constituent des répliques. À différents temps, correspondants aux différentes phases de croissance, 3 tubes ont été prélevés pour être analysés.

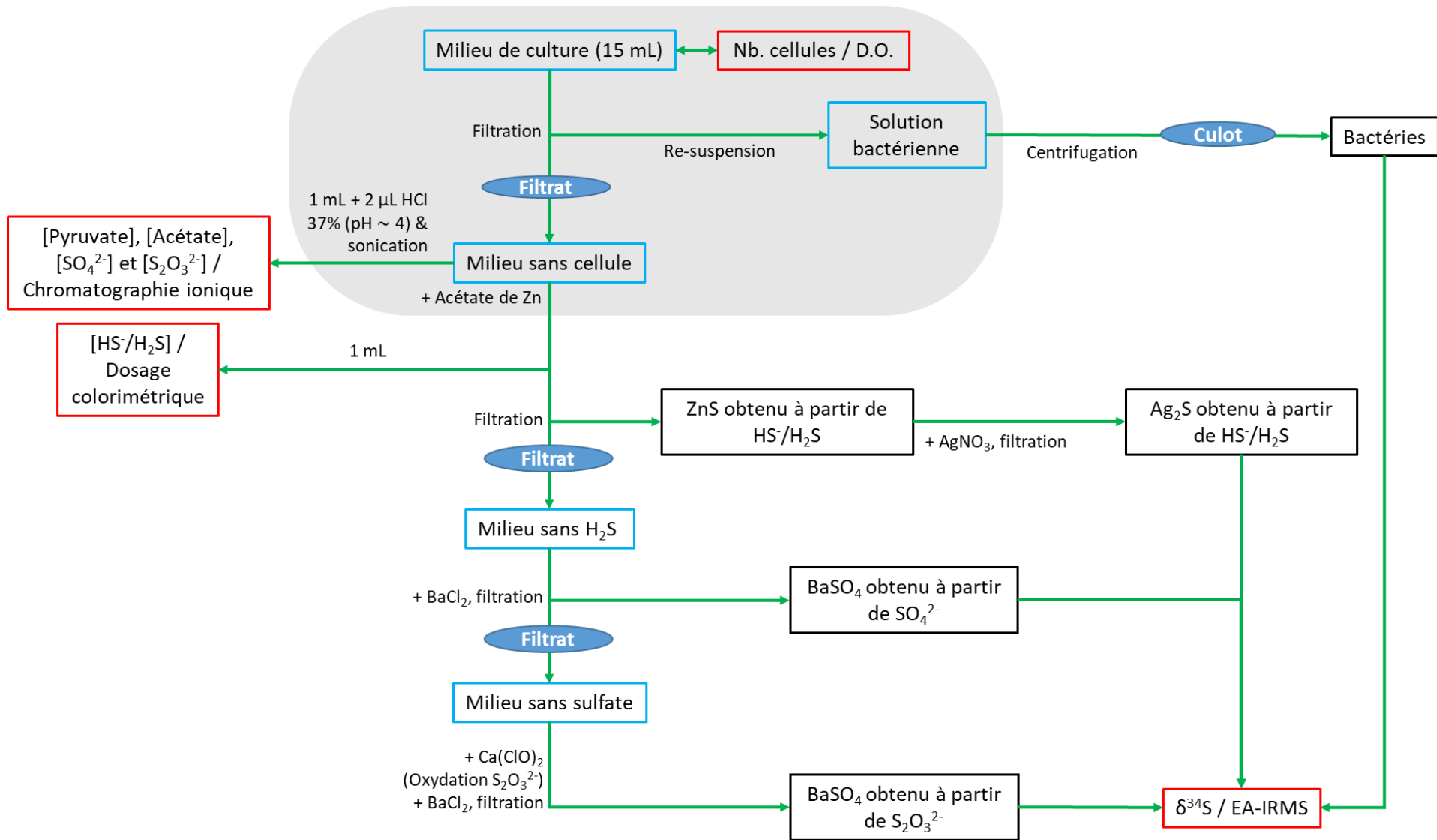


Figure 2-25 : Organigramme de la préparation des échantillons et des analyses chimiques pour le suivi de la spéciation et de l'isotopie du soufre dans une culture de bactéries sulfato-réductrices. Les traitements dans la zone grisée ont été réalisés lors du prélèvement.

Afin de suivre la croissance des bactéries, une droite d'étalonnage reliant la DO à la concentration cellulaire avait préalablement été établie (Figure 2-26).

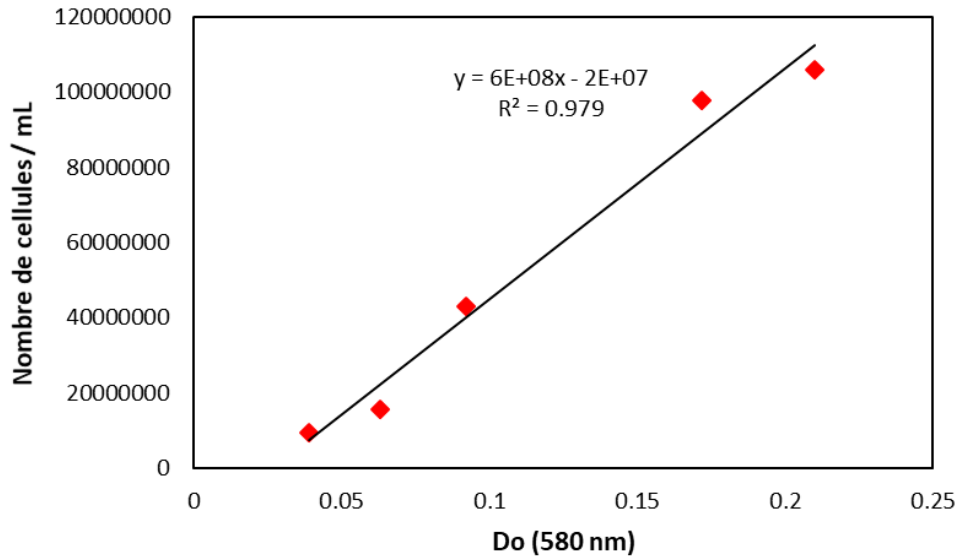


Figure 2-26 : Courbe d'étalonnage du nombre de cellule en fonction de la densité optique (Do) à 580 nm

La croissance des bactéries a été homogène dans tous les tubes, comme le montre la courbe de croissance sur la Figure 2-27. Le nombre de cellules a augmenté exponentiellement jusqu'à 48 h d'incubation, mais le nombre de cellules a par la suite chuté drastiquement à partir de 66 h d'incubation signifiant la mort des cellules.

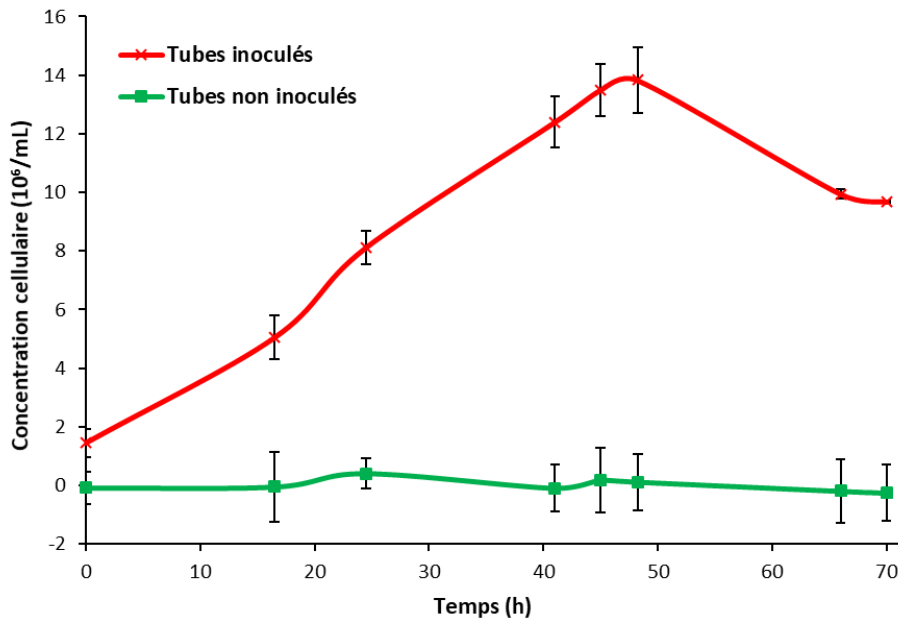


Figure 2-27 : Suivi de la croissance bactérienne moyenne. Le nombre de cellules dans les tubes inoculés augmente jusqu'à 48 h 15 min d'incubation puis diminue.

La perte de réactifs et la génération de produits ont été quantifiées pour chaque tube de culture prélevé, permettant de suivre le bilan de masse à chaque instant. La Figure 2-28 présente le suivi de la croissance bactérienne (nombre de cellules/mL mesuré à chaque prélèvement) et des concentrations en pyruvate et en acétate au cours de la croissance des bactéries. Au cours de la croissance, le pyruvate qui représente le seul donneur d'électrons dans cette expérience a été oxydé en acétate par les bactéries, ce qui situe cette souche parmi les sulfato-réducteurs oxydateurs incomplets (Berlendis et al., 2016). La diminution de 35 % du nombre de cellules après 70 h de culture est concomitante à une consommation totale du pyruvate. Sans donneur d'électrons, la sulfato-réduction ne peut plus avoir lieu ce qui explique la diminution rapide du nombre de bactéries après 48,25 h de culture. Toutefois, Il est intéressant de noter que des défauts de bilan de masse de $16 \pm 3 \%$ et $14 \pm 4 \%$ ont été observés pour les prélèvements réalisés à 48,25 h et 70 h.

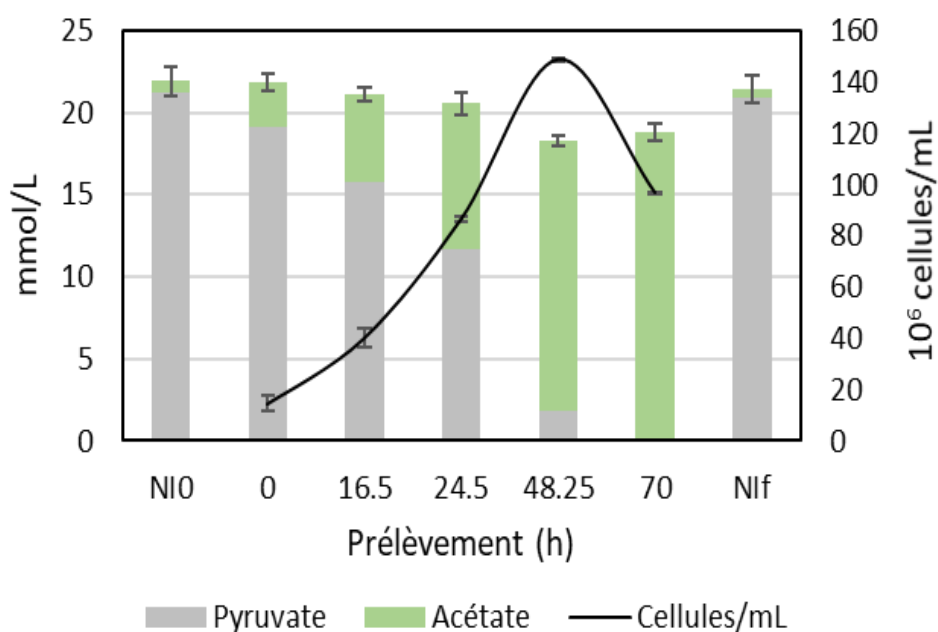


Figure 2-28 : Suivi de la concentration en pyruvate et en acétate et du nombre de cellules par mL au cours de la croissance des bactéries. NIO et NIf représentent les tubes non inoculés prélevés respectivement au début et à la fin de l'expérience. L'écart-type donné sur le cumul des concentrations de pyruvate et d'acétate correspond à la somme des écart-types de ces deux concentrations.

Les concentrations en sulfates, thiosulfates et sulfures mesurées au cours de l'expérience sont présentées Figure 2-29. Les sulfates ont été réduits au cours de la croissance bactérienne et des sulfures ont été produits majoritairement, des thiosulfates ont également été formés en faibles quantités. Il apparaît que les bilans massiques pour toutes les espèces de soufre aqueuses pour $t = 16,5 - 70$ h excèdent de plus de 5 % le bilan massique à $t = 0$, et jusqu'à 35 % pour $t = 48,25$ h. La différence entre les bilans massiques de N10 et N1f (tubes non inoculés à $t = 0$ et $t = 70$ h) est inférieure à 5 %, ce qui exclue une contamination extérieure pendant l'expérience. En revanche, la différence entre les concentrations totales en soufre à l'instant t et à $t = 0$ est fortement corrélée à la concentration en sulfures (Figure 2-30). Les sulfures sont rapidement oxydés en présence d'oxygène (Chen and Morris, 1972) et le prélèvement n'ayant pas été réalisé dans une chambre anaérobie, il est possible que les sulfures présents dans l'aliquote prélevé pour les analyses de chromatographie ionique aient été ré-oxydés. Si les produits de ré-oxydation des sulfures sont des sulfates et/ou des thiosulfates, ce qui est généralement le cas (Chen and Morris, 1972; Zhang and Millero, 1993), alors cela peut expliquer la surestimation de la concentration totale en soufre.

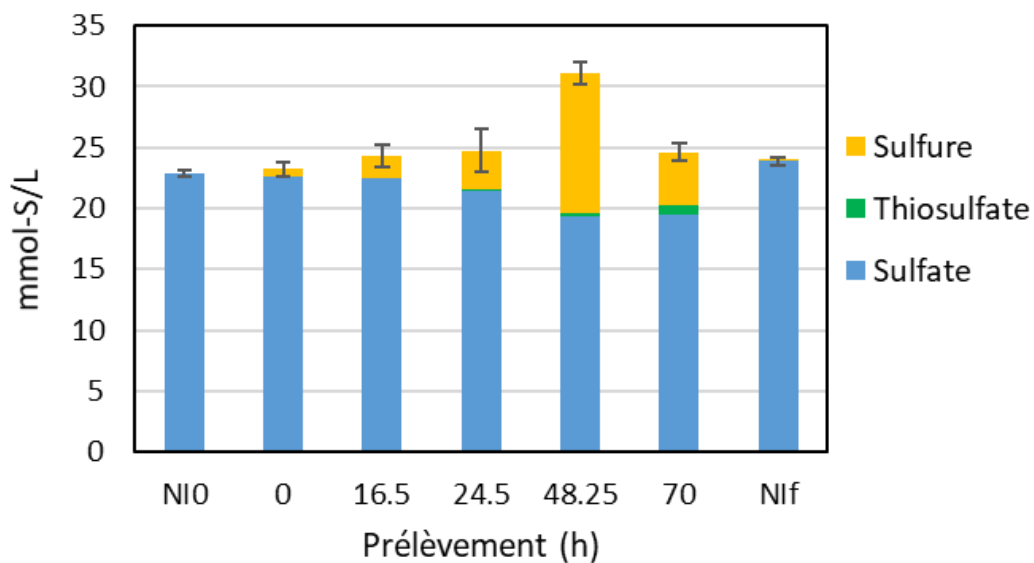


Figure 2-29 : Concentrations mesurées en sulfates, thiosulfates et sulfures au cours de la croissance des bactéries. N10 et N1f représentent les tubes non inoculés prélevés respectivement au début et à la fin de l'expérience. L'écart-type donné sur le cumul des concentrations des espèces soufrées correspond à la somme des écart-types de ces concentrations.

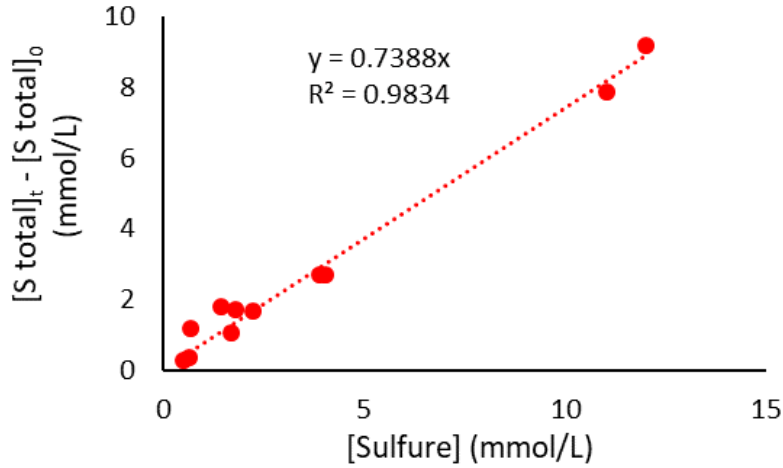


Figure 2-30: Corrélation entre la différence de concentration en soufre total à l'instant t et à t = 0 avec la concentration en sulfures.

La pente de la droite entre la concentration en sulfures et l'excédent calculé par rapport à la concentration initiale en soufre total (Figure 2-30) peut être utilisée pour corriger les concentrations en sulfates et thiosulfates selon les équations suivantes :

$$\text{Équation 2-8 : } [\text{SO}_4^{2-}]_{\text{corrigée}} = [\text{SO}_4^{2-}]_{\text{mesurée}} - y \times [\text{HS}^-] \times 0,7388$$

$$\text{Équation 2-9 : } [\text{S}_2\text{O}_3^{2-}]_{\text{corrigée}} = [\text{S}_2\text{O}_3^{2-}]_{\text{mesurée}} - z \times [\text{HS}^-] \times 0,7388$$

Avec $y + z = 1$.

Si l'on considère l'hypothèse où les thiosulfates détectés seraient entièrement issus de la ré-oxydation des sulfures, c'est-à-dire le cas où $[\text{S}_2\text{O}_3^{2-}]_{\text{corrigée}} = 0$, alors on aurait $y = 0,97$ et $z = 0,03$. Afin de confirmer cette hypothèse, nous nous sommes appuyés sur les données isotopiques. Selon le modèle de distillation de Rayleigh dans un système fermé, les sulfures, s'ils sont les seuls produits formés, devraient s'enrichir en ^{34}S au fur et à mesure de la réaction pour finalement avoir la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates initiaux. Les sulfures à $t = 0$ proviennent de la pré-culture, or celle-ci a été cultivée avec la même source de soufre que dans cette expérience, donc la valeur $\delta^{34}\text{S}$ globale de la pré-culture est égale à la valeur $\delta^{34}\text{S}$ du milieu non inoculé ($\delta^{34}\text{S}_{\text{NI}}$: moyenne de $\delta^{34}\text{S}_{\text{NI0}}$ et de $\delta^{34}\text{S}_{\text{NI1}}$) et par conséquent, la valeur $\delta^{34}\text{S}$ globale à chaque instant ($\delta^{34}\text{S}_t$) est égale à $\delta^{34}\text{S}_{\text{NI}}$. À chaque instant le bilan isotopique est vérifié par :

$$\text{Équation 2-10 : } \delta^{34}\text{S}_t = \delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4,t} \times f_{\text{SO}_4,t} + \delta^{34}\text{S}_{\text{HS},t} \times f_{\text{HS},t}$$

Avec $\delta^{34}\text{S}_t$ la valeur isotopique globale à l'instant t, $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4,t}$ et $\delta^{34}\text{S}_{\text{HS},t}$ les valeurs isotopiques des sulfates et des sulfures respectivement et $f_{\text{SO}_4,t}$ et $f_{\text{HS},t}$ les fractions molaires respectives des sulfates et des sulfures avec $f_{\text{SO}_4,t} + f_{\text{HS},t} = 1$. Cette équation a été utilisée pour calculer $\delta^{34}\text{S}_{\text{HS}}$ à partir des $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ mesurés. Ensuite, ces $\delta^{34}\text{S}_{\text{HS}}$ calculés ont été comparés aux $\delta^{34}\text{S}_{\text{HS}}$ mesurés (Tableau 2-14). Les valeurs de $\delta^{34}\text{S}_{\text{HS}}$ calculées sont significativement différentes des $\delta^{34}\text{S}_{\text{HS}}$ déterminées par EA-IRMS. Les données isotopiques ne confirment donc pas l'hypothèse que les sulfures soient les seuls produits de réduction des sulfates et que les thiosulfates soient issus de la ré-oxydation des sulfures.

Tableau 2-14 : Valeurs de $\delta^{34}S$ déterminées pour les sulfates et les sulfures et valeurs de $\delta^{34}S$ des sulfures calculées par bilan de masse à partir de la valeur de $\delta^{34}S$ des sulfates, dans l'hypothèse d'une absence de thiosulfates.

| Temps (h) | $\delta^{34}S_{SO_4}$ (‰) | $\delta^{34}S_{HS}$ (‰) | $\delta^{34}S_{HS}$ calculé par bilan de masse (‰) |
|--------------|------------------------------|----------------------------|--|
| NiO | $0,01 \pm 0,08$ | | |
| 0 | $0,46 \pm 0,10$ | n.d. | $-16,05 \pm 4,77$ |
| 16,5 | $0,99 \pm 0,10$ | $-12,18 \pm 0,50$ | $-5,72 \pm 1,75$ |
| 24,5 | $1,27 \pm 0,18$ | $-12,91 \pm 0,09$ | $-0,69 \pm 1,27$ |
| 48,25 | $2,97 \pm 0,05$ | $-13,40 \pm 0,17$ | $-0,41 \pm 0,35$ |
| NiF | $0,38 \pm 0,10$ | | |

L'hypothèse où les thiosulfates détectés sont issus de la ré-oxydation des sulfures n'étant à priori pas valide, nous avons donc émis l'hypothèse que les sulfates étaient les seuls produits de ré-oxydation des sulfures. Les concentrations en sulfates ont été recalculées selon l'Équation 2-8 avec $y = 1$. Les concentrations corrigées sont présentées sur la Figure 2-31.

Durant l'expérience, la concentration en sulfates a diminué de $22,2 \pm 0,4$ à $11,1 \pm 0,3$ mmol-S/L après 48,25 h, signifiant que près de 50 ± 2 % des sulfates initiaux ont été consommés par les bactéries sulfato-réductrices. Simultanément, la concentration en sulfures a augmenté de $0,6 \pm 0,1$ mmol-S/L à $t = 0$ (sulfures provenant de la pré-culture qui a servi à inoculer le milieu de culture) à $11,5 \pm 0,7$ mmol-S/L après 48,25 h. Après 48,25 h, une augmentation de la concentration en sulfates et une diminution de la concentration en sulfures sont observées, ce qui confirme l'arrêt de la sulfato-réduction.

En raison de l'arrêt de la sulfato-réduction après le prélèvement à $t = 48,25$ h, le point de mesure à 70 h n'a pas été pris en compte pour les calculs et interprétations qui suivent.

À $t = 0$ et au prélèvement réalisé à 16,5 h, les thiosulfates étaient en dessous de la limite de détection (0,03 mmol-S/L) estimée par le laboratoire ayant réalisée les analyses de chromatographie ionique. La concentration en thiosulfates augmente ensuite de $0,06 \pm 0,06$ mmol-S/L à 24,5 h à $0,25 \pm 0,02$ mmol-S/L à 48,25 h. Dans les études menées par McCready (1975), Chambers *et al.* (1976) et Detmers *et al.* (2001) sur d'autres espèces du genre *Desulfatamaculum*, les seuls produits observés ont été des sulfures. Davidson *et al.* (2009) ont détecté seulement des sulfures comme produits de réduction des sulfates lors de culture de *Desulfatamaculum Putei* dans un système fermé. En revanche, ils ont observé la formation de thiosulfates (jusqu'à 0,6 mmol-S/L) lorsque cette même bactérie a été cultivée dans un rétentostat² (système ouvert) avec un apport en lactate (4 mmol/L) limité par rapport

² Un rétentostat est un bioréacteur alimenté continuellement en milieu de culture frais et où le milieu de culture est retiré simultanément pour maintenir le volume constant, un filtre retient la biomasse du flux sortant dans le bioréacteur.

aux sulfates (20 mmol/L). Dans cette étude, les sulfures sont les produits majoritairement formés mais des thiosulfates ont également été formés lorsque la concentration en pyruvate est devenue inférieure à 12 mmol/L. On peut alors supposer que les bactéries du genre *Desulfatamaculum* forment des thiosulfates lorsque la concentration en donneur d'électrons est faible. D'autre part, la présence des thiosulfates traduit un mécanisme de réduction en plusieurs étapes faisant intervenir des intermédiaires (sulfites, thiosulfates, trithionates) de réaction comme mis en évidence par les études de Bradley *et al.* (2011) et Brunner et Bernasconi (2005).

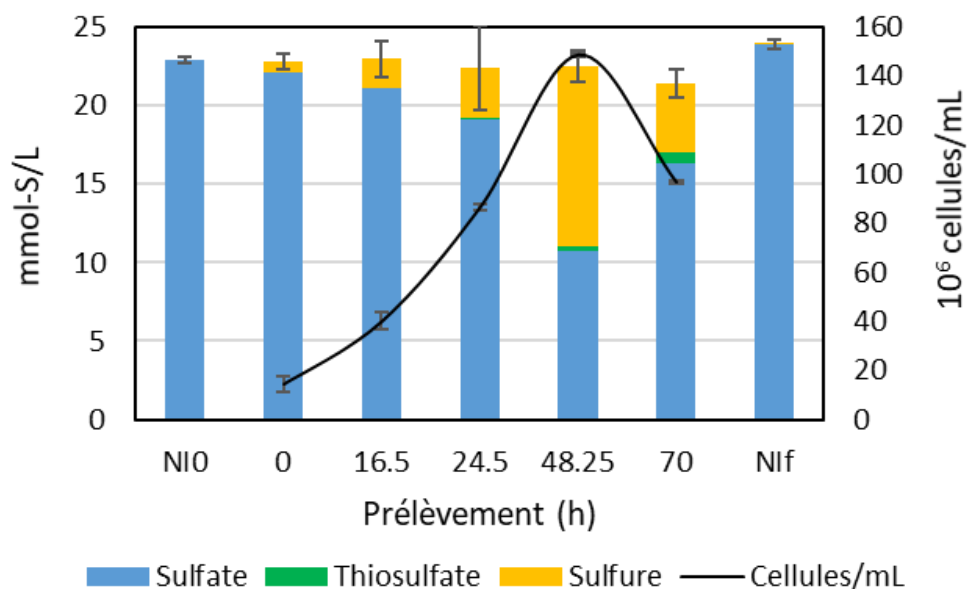


Figure 2-31 : Suivi de la concentration en sulfates, thiosulfates et sulfures et du nombre de cellule par mL au cours de la croissance des bactéries. N10 et N1f représentent les tubes non inoculés prélevés respectivement au début et à la fin de l'expérience. L'écart-type donné sur le cumul des concentrations des espèces soufrées correspond à la somme des écart-types de ces concentrations.

Les données isotopiques sont présentées dans le Tableau 2-15. Les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfures à $t = 0$ et des thiosulfates n'ont pas pu être mesurées par EA-IRMS à cause d'une quantité insuffisante de Ag_2S ou BaSO_4 . A $t = 0$, la somme des 3 répliques conduit en théorie à une quantité de 6,2 mg de Ag_2S , or cette quantité est insuffisante pour être récupérée sur le filtre dans de l'eau. Il en est de même pour les thiosulfates, où la quantité théorique de BaSO_4 pour la somme des répliques à $t = 48,25$ h est de 873 μg . Les quantités de soufre total des culots bactériens récoltées étaient en dessous de la limite de détection du TCD.

Les résultats des analyses isotopiques montrent que les sulfates s'enrichissent en ^{34}S au fur et à mesure que la sulfato-réduction bactérienne progresse alors que les sulfures s'appauvrissent très faiblement en ^{34}S entre $t = 16,5$ h et $t = 48,25$ h. Selon le modèle de distillation de Rayleigh dans un système fermé, les sulfures devraient s'enrichir au fur et à mesure de la réaction pour finalement atteindre la valeur isotopique des sulfates initiaux. Cette prédiction n'est cependant valable que dans le cas où seul un produit est formé, or ici deux produits sont générés. Comme expliqué précédemment, les

sulfures à $t = 0$ proviennent de la pré-culture, or celle-ci a été cultivée avec la même source de soufre que dans cette expérience. Par conséquent, la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ globale de la pré-culture ($\delta^{34}\text{S}_{\text{PC}}$) est égale au $\delta^{34}\text{S}$ du milieu non inoculé ($\delta^{34}\text{S}_{\text{NI}}$: moyenne de $\delta^{34}\text{S}_{\text{NI0}}$ et de $\delta^{34}\text{S}_{\text{NI}t}$) et par conséquent, la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ global à chaque instant ($\delta^{34}\text{S}_t$) est égale $\delta^{34}\text{S}_{\text{NI}}$. De plus, à chaque instant le bilan isotopique est vérifié par :

$$\text{Équation 2-11 : } \delta^{34}\text{S}_t = \delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4,t} \times f_{\text{SO}_4,t} + \delta^{34}\text{S}_{\text{HS},t} \times f_{\text{HS},t} + \delta^{34}\text{S}_{\text{S}_2\text{O}_3,t} \times f_{\text{S}_2\text{O}_3,t}$$

Avec $\delta^{34}\text{S}_t$ la valeur isotopique globale à l'instant t , $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4,t}$, $\delta^{34}\text{S}_{\text{HS},t}$ et $\delta^{34}\text{S}_{\text{S}_2\text{O}_3,t}$ les valeurs isotopiques des sulfates, sulfures et thiosulfates respectivement et $f_{\text{SO}_4,t}$, $f_{\text{HS},t}$ et $f_{\text{S}_2\text{O}_3,t}$ les fractions molaires respectives des sulfates, sulfures et thiosulfates avec $f_{\text{SO}_4,t} + f_{\text{HS},t} + f_{\text{S}_2\text{O}_3,t} = 1$.

L'Équation 2-11 et $\delta^{34}\text{S}_{\text{NI}}$ permettent donc d'estimer $\delta^{34}\text{S}_{\text{HS},0}$ et $\delta^{34}\text{S}_{\text{S}_2\text{O}_3,24,5}$ et $\delta^{34}\text{S}_{\text{S}_2\text{O}_3,48,25}$ (voir Tableau 2-15) ; les incertitudes associées ont été calculées par la méthode de Kragten (Kragten, 1994). Les faibles concentrations mesurées pour les thiosulfates conduisent à de très grandes incertitudes sur ces valeurs isotopiques calculées. Les thiosulfates produits sont enrichis en ^{34}S de 282 à 483 ‰, ce qui est en opposition avec ceux de Davidson *et al.* (2009) qui ont calculé des $\delta^{34}\text{S}$ pour les thiosulfates entre -20 et -100 ‰. Toutefois, ces valeurs étant calculées et non mesurées, et étant donné les grandes incertitudes qui y sont associées, elles sont à considérer avec la plus grande prudence.

Tableau 2-15 : Données biologiques, chimiques et isotopiques de l'expérience de culture de bactéries sulfato-réductrices. *Ces valeurs ont été calculées par bilan isotopique, voir Équation 2-10. N.d. : non déterminé.

| Temps (h) | Cellules/mL ($10^6/\text{mL}$) | $[\text{SO}_4^{2-}]$ (mM-S) | $[\text{S}_2\text{O}_3^{2-}]$ (mM-S) | $[\text{HS}^-]$ (mM-S) | csSRR (fmol/cell/jour) | $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ (‰) | $\delta^{34}\text{S}_{\text{HS}}$ (‰) | $\delta^{34}\text{S}_{\text{S}_2\text{O}_3}$ (‰) |
|-----------------|----------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|------------------------|------------------------|---|---------------------------------------|--|
| NI0 | | $22,9 \pm 0,2$ | < LD | < LD | | $0,01 \pm 0,08$ | | |
| 0 | 15 ± 3 | $22,2 \pm 0,4$ | < LD | $0,6 \pm 0,1$ | | $0,46 \pm 0,10$ | n.d. (-16,05 ± 4,77)* | |
| 16,5 | 40 ± 4 | $21,2 \pm 0,8$ | < LD | $1,8 \pm 0,4$ | 52 ± 12 | $0,99 \pm 0,10$ | $-12,18 \pm 0,50$ | |
| 24,5 | 87 ± 1 | 19 ± 1 | $0,06 \pm 0,06$ | 3 ± 1 | 94 ± 11 | $1,27 \pm 0,18$ | $-12,91 \pm 0,09$ | n.d. (282 ± 54)* |
| 48,25 | $148,5 \pm 0,4$ | $11,1 \pm 0,3$ | $0,25 \pm 0,02$ | $11,5 \pm 0,7$ | 69 ± 5 | $2,97 \pm 0,05$ | $-13,40 \pm 0,17$ | n.d. (483 ± 42)* |
| NI _t | | $23,9 \pm 0,2$ | < LD | < LD | | $0,38 \pm 0,10$ | | |

La sulfato-réduction conduisant à la formation de deux produits, le fractionnement isotopique global entre les produits formés et les sulfates ($^{34}\epsilon_{\text{P-SO}_4}$) devrait être distinct du fractionnement isotopique entre les sulfures et les sulfates ($^{34}\epsilon_{\text{HS-SO}_4}$) et du fractionnement isotopique entre les thiosulfates et les

sulfates ($^{34}\epsilon_{S_{2O_3-SO_4}}$). Nous avons testé cette hypothèse, en calculant le fractionnement isotopique global $^{34}\epsilon_{P-SO_4}$ et le fractionnement isotopique sulfures-sulfates $^{34}\epsilon_{HS-SO_4}$. Il faut toutefois prendre en considération les limitations expérimentales, à savoir la ré-oxydation des sulfures impactant les mesures de concentrations, lors de l'interprétation de ces calculs.

$^{34}\epsilon_{P-SO_4}$ a été calculé selon l'Équation 2-12 (équation 7, Mariotti et al., 1981) :

$$\text{Équation 2-12 : } \epsilon_{P-SO_4,t}^{34} = 1000 \times \ln\left[\frac{(\delta^{34}S_{SO_4,t} + 1000)}{(\delta^{34}S_{SO_4,0} + 1000)}\right] / \ln(f)$$

Avec $f = [SO_4^{2-}]_t / [SO_4^{2-}]_0$

$^{34}\epsilon_{HS-SO_4}$ a été calculé selon l'Équation 2-13 (adapté de l'équation 11 de Mariotti et al., 1981)

$$\text{Équation 2-13 : } \epsilon_{HS-SO_4,t}^{34} = (\delta^{34}S_{SO_4,NiO} - \delta^{34}S_{HS,t}) \times (1 - f) / (f \ln(f))$$

Dans ce cas $f = 1 - ([HS^-]_t - [HS^-]_0) / [SO_4^{2-}]_0$ afin que seul les sulfates ayant été réduits en sulfures soit pris en compte.

$^{34}\epsilon_{P-SO_4}$ et $^{34}\epsilon_{HS-SO_4}$ sont illustrés sur la Figure 2-32. $^{34}\epsilon_{P-SO_4}$ varie de $-11,86 \pm 3,22$ ‰ lorsque 4 % des sulfates ont été réduits à $-3,64 \pm 0,16$ ‰ lorsque 50 % des sulfates ont été réduits. $^{34}\epsilon_{HS-SO_4}$ varie de $-12,84 \pm 0,54$ ‰ lorsque 4 % des sulfates ont été réduits à $-19,18 \pm 0,79$ ‰ lorsque 50 % des sulfates ont été réduits. Les fractionnements isotopiques calculés pour *D. profundus* sont dans l'ordre de grandeur de ceux calculés pour d'autres espèces du genre *Desulfotomaculum* cultivées en système fermé, entre -27,8 et -5,5 ‰ (McCready, 1975; Chambers et al., 1976; Detmers et al., 2001; Davidson et al., 2009). Lorsque seulement 4 % des sulfates ont été réduits, $^{34}\epsilon_{P-SO_4}$ et $^{34}\epsilon_{HS-SO_4}$ ne sont pas significativement différents. Ceci s'explique par le fait que seuls des sulfures ont été formés à ce stade de la croissance. Au cours de la phase de croissance exponentielle des bactéries, le fractionnement isotopique global entre les produits et les sulfates diminue alors que le fractionnement isotopique sulfures-sulfates augmente. Ceci concorde avec les résultats de Davidson *et al.* (2009) pour la culture de *Desulfotomaculum Putei* en rétentostat. Il est surprenant que $^{34}\epsilon_{HS-SO_4}$ soit parfaitement corrélé avec $1-f_{SO_4}$ et que $^{34}\epsilon_{P-SO_4}$ soit faiblement corrélé avec $1-f_{SO_4}$. Ceci pourrait être expliqué par un changement de mécanisme de réduction au cours de l'expérience, un premier mécanisme conduisant uniquement à la formation de sulfures et un second conduisant à la co-formation de thiosulfates lorsque la concentration en donneur d'électrons devient inférieure à 12 mmol/L.

Les données de concentrations en sulfates combinées aux concentrations cellulaires ont permis de calculer les taux de sulfato-réduction spécifiques par cellule (csSRR : *cell-specific sulfate reduction rates*) (Detmers et al., 2001). Ces taux expriment la quantité de sulfates consommés par cellule et par jour. Les csSRR (en fmol/cellule/jour) ont été calculés en utilisant la variation de la concentration en sulfates et du nombre de cellules (NC) entre deux prélèvements successifs aux temps t_1 et t_2 selon :

Équation 2-14 :

$$csSRR = \frac{[SO_4^{2-}]_1 - [SO_4^{2-}]_2}{\left(\frac{NC_1 + NC_2}{2}\right) \times (t_2 - t_1)}$$

Certains auteurs ont observé une corrélation entre les fractionnements isotopiques et les csSRR (Canfield, 2001). Dans cette étude, il n'y a pas de corrélation entre $^{34}\epsilon$ et csSRR, confortant les observations précédentes sur le genre *Desulfatamaculum* (Davidson et al., 2009; Detmers et al., 2001).

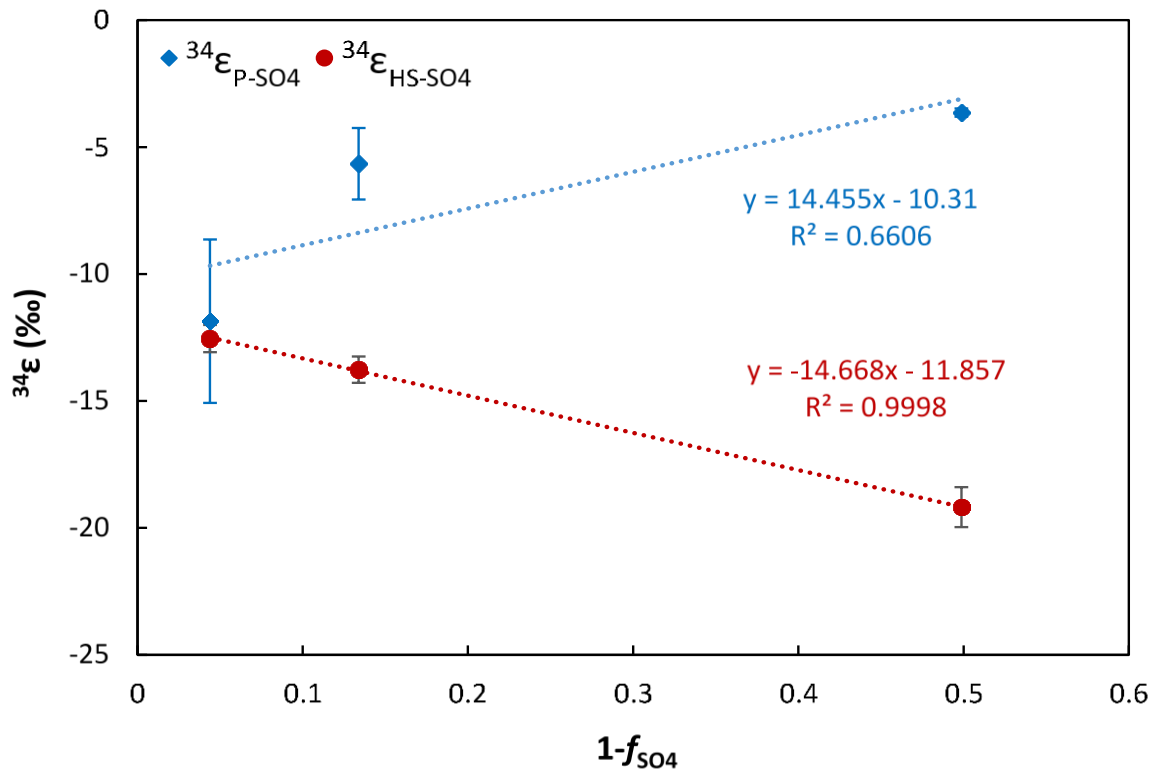


Figure 2-32 : Fractionnement isotopique global des sulfates ($^{34}\epsilon_{P-SO4}$) et sulfures-sulfates ($^{34}\epsilon_{HS-SO4}$) en fonction de la quantité de sulfates consommés par la sulfato-réduction ($1-f_{SO4}$).

Cette étude a permis de montrer que la méthode de précipitation séquentielle que nous avons mise au point est valide pour l'étude du fractionnement isotopique du soufre dans des cultures de bactéries sulfato-réductrices en anaérobie. De plus, cela nous a permis d'établir des premières données de fractionnement isotopique du soufre pour la bactérie *D. profundus*.

4. Conclusion du chapitre

Dans cette étude une méthode simple permettant la spéciation et la quantification des sulfites, des sulfates et des thiosulfates par LC-HR-ICP-MS a été mise en place. Les limites de détection sont égales à 20, 28 et 18 ng-S/g respectivement pour les sulfites (détectés sous forme de HMS), les sulfates et les thiosulfates. Il n'a pas été possible d'adapter cette méthode pour inclure les sulfures aux espèces détectées, mais nous avons montré l'importance de neutraliser les sulfures par précipitation avant la réalisation de ces analyses. Cette méthode de spéciation a été appliquée à des échantillons d'eaux provenant d'un aquifère profond, où seul les sulfates ont été détectés, les sulfites et les thiosulfates étant en dessous des limites de détection.

Une méthode d'analyse de $\delta^{34}\text{S}$ par EA-IRMS a ensuite été déployée, pour laquelle la justesse et la précision des résultats obtenus ont été déterminées à travers l'analyse de matériaux de référence. Afin de réaliser des analyses isotopiques par EA-IRMS sur des espèces dissoutes présentes simultanément dans un échantillon, une méthodologie basée sur la précipitation sélective et séquentielle des espèces dissoutes a été développée. Les protocoles classiques de précipitation des sulfures sous forme de Ag_2S et des sulfates sous forme de BaSO_4 ont été utilisés. La précipitation des sulfates a été testée sur une série d'échantillons d'eaux naturelles préalablement analysés par un autre laboratoire et les résultats obtenus étaient en accord avec les valeurs rapportées. Deux méthodes permettant l'oxydation des thiosulfates en sulfates pour sa précipitation ultérieure sous forme de BaSO_4 ont été développées. L'analyse LC-HR-ICP-MS a permis de vérifier que ces deux méthodes conduisaient à une oxydation complète des thiosulfates. La première méthode a consisté en une électrolyse quantitative des thiosulfates à un potentiel de 1,2 V. Cette méthode s'est avérée avantageuse car elle permet un suivi instantané de l'avancement de la réaction et l'utilisation de réactifs chimiques coûteux et dangereux pour l'environnement n'est pas nécessaire. Cependant cette méthode est incompatible avec la précipitation préalable des sulfates par du BaCl_2 . Elle a néanmoins pu être utilisée dans le cas d'une précipitation sélective non séquentielle. Une deuxième méthode, reposant sur l'oxydation chimique des thiosulfates par des ions hypochlorites, a donc été développée et choisie pour la réalisation de précipitation séquentielle sulfures-sulfates-thiosulfates.

La procédure de précipitation séquentielle a d'abord été validée sur une solution synthétique, composée d'un milieu de culture bactérien et de sels de sulfures, de sulfates et de thiosulfates, en comparant les valeurs $\delta^{34}\text{S}$ des composés précipités à partir de la solution synthétique à celles des sels analysés par EA-IRMS. Elle a ensuite été appliquée à l'analyse isotopique du soufre inorganique dissous contenu dans des eaux souterraines, puis au suivi du fractionnement isotopique du soufre lors d'une expérimentation dans un milieu de culture en conditions de biodégradation anaérobie du pyruvate par un consortium de bactéries sulfato-réductrices.

À travers ces applications, un inconvénient majeur des analyses isotopiques par EA-IRMS a pu être mis en évidence. En effet, il n'a pas toujours été possible d'obtenir suffisamment de BaSO_4 pour réaliser

une analyse isotopique dans les échantillons d'eaux souterraines contenant moins de 10 mg-S/L de sulfates. Pour obtenir des quantités de BaSO₄ plus importantes, il a été nécessaire d'augmenter les volumes d'échantillon traités. D'autre part, il s'est avéré que la quantité de BaSO₄ récupérée était généralement inférieure à la quantité théorique calculée à partir des concentrations, expliquée par la difficulté de récupérer l'intégralité du BaSO₄ retenu sur le filtre. Si non de grandes quantités d'échantillon (> 2 L) sont nécessaires. Pour les analyses des cultures bactériennes où seulement 15 mL d'échantillon étaient disponibles, le même constat a été fait. Les sulfures produits en début de croissance des bactéries n'ont pas pu être analysés car il n'y a pas eu suffisamment de Ag₂S produit et les faibles concentrations de thiosulfates n'ont pas non plus permis de réaliser des analyses isotopiques sur cette espèce. Lorsque les quantités d'échantillons disponibles sont limitées (< 1 L) et que les concentrations des espèces soufrées sont faibles (10 mg-S/L), leurs analyses par EA-IRMS ne sont pas possibles. Pour de tels échantillons, il est nécessaire de mettre en place des méthodes plus performantes permettant l'analyse de faibles concentrations de soufre. Dans le chapitre suivant sera donc présenté le développement d'une méthode permettant l'analyse en ligne d'espèces dissoutes sans préparation d'échantillon. Une méthode de séparation par chromatographie liquide adaptée de celle développée dans ce chapitre sera couplée à un MC-ICP-MS pour la mesure de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfites, des sulfates et des thiosulfates pour des quantités de l'ordre du μg de soufre.

Chapitre 3 – Mesure de
rapport isotopique du
soufre par espèce :
Couplage
chromatographie liquide
- ICP-MS multicollecteur

1. Introduction

Nous avons vu précédemment que les analyses isotopiques du soufre par EA-IRMS nécessitent une préparation d'échantillon pour convertir les espèces du soufre en solution sous forme solide. Lorsque la détermination de $\delta^{34}\text{S}$ de plusieurs espèces dissoutes est requise, des volumes d'échantillon importants sont nécessaires en plus d'une préparation de l'échantillon complexe et laborieuse pour séparer et précipiter les différentes espèces à analyser (chapitre 2). Des études récentes ont montré que l'ICP-MS à multicollecteur pouvait être un outil de choix pour des mesures isotopiques du soufre précises (0,1-1 ‰) et pour des quantités de soufre en solution de l'ordre du μg (Albalat et al., 2016; Giner Martínez-Sierra et al., 2010; Hanousek et al., 2016a; Paris et al., 2013; Yu et al., 2017). Un couplage entre chromatographie liquide et MC-ICP-MS pourrait permettre de réaliser en ligne des mesures de rapports isotopiques sur différentes espèces du soufre en solution. À ce jour, ce type de couplage n'a été que très peu étudié (Clough et al., 2006; Santamaria-Fernandez et al., 2008; Zakon et al., 2014; Ullrich et al., 2018) (voir paragraphe 3.2.6 du chapitre 1). Un tel couplage représente une alternative avantageuse à la stratégie analytique hors-ligne (précipitation séquentielle et analyse par EA-IRMS) proposée au chapitre 2. En effet, ce type de couplage pourrait être appliqué directement à l'analyse de solutions, évitant ainsi de longues étapes de préparation. De plus, cela permettrait également de déterminer la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ pour des échantillons faiblement concentrés en soufre.

Nous avons, à travers ce chapitre, développé un couplage entre la chromatographie liquide et le MC-ICP-MS dans le but de réaliser en ligne des mesures de rapport isotopique du soufre de plusieurs espèces au sein d'un même échantillon.

Dans le chapitre 2, l'analyse de spéciation du soufre inorganique en phase aqueuse a été réalisée en ligne à travers un couplage chromatographie liquide et ICP-MS. La méthode de séparation anionique précédemment développée sert de base aux travaux réalisés dans ce chapitre et elle est adaptée pour le couplage avec le MC-ICP-MS.

Lors d'analyses isotopiques par ICP-MS, le biais de masse constitue la principale erreur (voir paragraphe 3.2.3 du chapitre 1). Dans la plupart des études, celui-ci est corrigé par *Sample-Standard-Bracketing*. Cette méthode consiste à injecter un étalon, dont le rapport isotopique est connu, avant et après l'échantillon ce qui permet de corriger le rapport isotopique de l'échantillon par rapport à celui de l'étalon (Albarède et al., 2004). La moyenne des deux injections de l'étalon est utilisée pour calculer la valeur de $\delta^{34}\text{S}$. Une autre méthode consiste à mesurer le rapport isotopique d'un autre élément, de masse proche de celle de l'analyte et dont le rapport isotopique est connu (i.e. le silicium dans le cas du soufre), simultanément au rapport isotopique d'intérêt pour corriger le biais de masse (Mason et al., 2006; Clough et al., 2006; Santamaria-Fernandez and Hearn, 2008; Giner Martínez-Sierra et al., 2010). Ces deux méthodes de correction ont été retenues et comparées à une nouvelle approche de correction du biais de masse développée dans ce travail et basée sur l'addition d'un étalon interne à l'échantillon.

La première partie de ce chapitre présente une étude préliminaire consacrée au développement d'une méthode de détermination en ligne de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates et des thiosulfates par couplage LC-MC-ICP-MS. Le biais de masse est corrigé par la mesure du rapport isotopique $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ et par l'analyse d'un étalon interne dont la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ est connue. La méthode a été testée sur une solution synthétique et un échantillon d'eau naturelle, et les résultats ont été comparés à ceux obtenus par EA-IRMS.

La seconde partie de ce chapitre présente, à travers l'article « Anion Specific Sulfur Isotope Analysis by Liquid Chromatography Coupled to Multicollector-ICPMS » (Martinez *et al.*, accepté dans le journal « Analytical Chemistry »), un couplage LC-MC-ICP-MS permettant la détermination de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfites, des sulfates et des thiosulfates. Dans un premier temps, différentes méthodes de correction du biais de masse ont été comparées, à savoir l'étalonnage interne, le *sample-standard bracketing* non spécifique, le *sample-standard bracketing* par espèce spécifique et l'étalonnage interne combiné à une droite d'étalonnage externe. Ensuite, nous avons comparé l'utilisation de différentes zones des pics chromatographiques pour le calcul des rapports isotopiques dans le but d'améliorer la précision des mesures. Enfin, des échantillons synthétiques et des eaux naturelles ont été analysés et les résultats ont été comparés à ceux obtenus par EA-IRMS.

2. Analyse des sulfates et thiosulfates

2.1. Matériels et méthodes

2.1.1. Réactifs

La solution de silicium à 1000 mg/L (TraceCERT), l'hydroxyde d'ammonium (30%) et le nitrate d'ammonium (>99,5%) ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Le thiosulfate de sodium pentahydrate (ACS) provient de Probus, le sulfate de sodium de Merck (Reag. Ph Eur) et l'acide sulfamique ($\text{H}_3\text{NO}_3\text{S}$, Analytical Standard) de OEA Labs. De l'eau ultra-pure (18.2 M Ω cm) obtenue à partir d'un système Milli-Q (Millipore) a été utilisée pour préparer toutes les solutions. Des solutions à 1000 ng-S/g ont été préparées pour chaque espèce soufrée (acide sulfamique, sulfates et thiosulfates) et ont été utilisées pour préparer des solutions étalons par dilution dans la phase mobile à chaque session analytique.

2.1.2. Instrumentation

La séparation chromatographique a été pilotée par une pompe Dionex DX-120. Une colonne Dionex IonPac AS9-HC (2 × 250 mm) avec un diamètre de particules de 7 μm et dont la phase stationnaire est constituée de groupements ammonium quaternaire greffés sur un polymère éthylvinylbenzène/divinylbenzène a été choisie pour la séparation. Une boucle d'injection de 100 μL a été utilisée en combinaison avec une valve Rheodyne 6 voies. Tous les tubes et connexions utilisés sont en polyétheréthercétone (PEEK).

Un MC-ICP-MS Neptune Plus (Thermo-Fisher Scientific) équipé de 9 cages de Faradays en mode moyenne résolution a été utilisé pour la mesure des rapports isotopiques. La configuration des cages de Faradays est détaillée au paragraphe 2.1.5. Un nébuliseur Micromist et une chambre de nébulisation Scott double-pass ont été utilisés. Les paramètres de mesure sont décrits dans la section 2 de l'article « Anion Specific Sulfur Isotope Analysis by Liquid Chromatography Coupled to Multicollector-ICPMS ».

2.1.3. Séparation chromatographique

La méthode développée au chapitre 2 a été transférée sur une colonne AS9-HC d'un diamètre de 2 mm, le débit de phase mobile a été réduit de 1 mL/min à 0,24 mL/L afin d'être en phase avec les spécifications du nébuliseur sans avoir recours à un *split* 1/2. La phase mobile a été modifiée en ajoutant du silicium. La séparation isocratique a été réalisée avec un éluant de nitrate d'ammonium à 60 mmol/L, contenant 10 $\mu\text{g/g}$ de Si et ajustée à pH 7 avec NH_4OH 30%, à température ambiante. Les sulfites n'étant pas analysés, le formaldéhyde n'a pas été utilisé ici. Le volume d'injection était de 100 μL .

2.1.4. Correction du biais de masse

Dans ce travail, nous avons choisi de corriger le biais de masse sur le rapport isotopique $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ du soufre par une correction par la mesure du rapport $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ du silicium, comme décrit dans la littérature (Mason et al., 2006; Santamaria-Fernandez et al., 2008). Le biais de masse est corrigé pour chaque pic par interpolation du rapport $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ et du rapport $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ selon l'équation de Russel (Ingle et al., 2003) :

Équation 3-1 :

$$\left(\frac{^{34}\text{S}}{^{32}\text{S}}\right)^{\text{Corrigé}} = \left(\frac{\left(\frac{^{34}\text{S}}{^{32}\text{S}}\right)^{\text{Mesuré}}}{\left(\frac{\left(\frac{^{30}\text{Si}}{^{29}\text{Si}}\right)^{\text{Mesuré}}}{\left(\frac{^{30}\text{Si}}{^{29}\text{Si}}\right)^{\text{Référence}}}\right)^{\left(\frac{\ln\left(\frac{\text{Masse}^{34}\text{S}}{\text{Masse}^{32}\text{S}}\right)}{\ln\left(\frac{\text{Masse}^{30}\text{Si}}{\text{Masse}^{29}\text{Si}}\right)}\right)}} \right)$$

Les masses des isotopes reportées dans les tables IUPAC (de Laeter et al., 2003) ont été utilisées : Masse ^{29}Si = 28,97649468(22) uma, Masse ^{30}Si = 29,97377018(22) uma, Masse ^{32}S = 31,97207073(15) uma, Masse ^{34}S = 33,96786687(14) uma (les chiffres entre parenthèses représente l'incertitude sur les deux derniers chiffres).

Le rapport isotopique naturel moyen du silicium a été utilisé comme rapport isotopique de référence (de Laeter et al., 2003) : $\left(\frac{^{30}\text{Si}}{^{29}\text{Si}}\right)^{\text{Référence}} = 0,659978655$. En utilisant ces données numériques, l'Équation 1-15 devient :

$$\left(\frac{^{34}\text{S}}{^{32}\text{S}}\right)^{\text{Corrigé}} = \left(\frac{\left(\frac{^{34}\text{S}}{^{32}\text{S}}\right)^{\text{Mesuré}}}{\left(\frac{\left(\frac{^{30}\text{Si}}{^{29}\text{Si}}\right)^{\text{Mesuré}}}{0,659978655}\right)^{1,78949089}} \right)$$

Nous avons choisi d'ajouter le silicium directement dans la phase mobile. Pour vérifier que le silicium n'était pas retenu par la colonne, nous avons analysé une solution de Si à 6 $\mu\text{g/g}$ par LC-MC-ICP-MS (avec une phase mobile de 60 mmol/L NH_4NO_3 à pH 7 sans Si). Le silicium a ensuite été ajouté à une concentration de 10 $\mu\text{g/g}$ dans la phase mobile pour les analyses isotopiques du soufre.

2.1.5. Configuration du détecteur

Pour réaliser une correction du biais de masse sur le rapport $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ par la mesure du rapport $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$, les quatre isotopes doivent être mesurés simultanément. La mesure des quatre isotopes ^{29}Si , ^{30}Si , ^{32}S et ^{34}S , a été réalisée sur les cages de Faradays L4, L1, H1 et H4, respectivement (Figure 3-1). Afin d'éviter les interférences poly-atomiques de $^{14}\text{N}_2^{1}\text{H}^+$, $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+$, $^{16}\text{O}_2^+$ et $^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+$, sur les signaux de ^{29}Si , ^{30}Si , ^{32}S et ^{34}S , respectivement (voir paragraphe 3.2.2 du chapitre 1), le mode moyenne résolution du Neptune Plus a été utilisé. Pour assurer une détection sans interférence, il a également été nécessaire d'ajuster la position des cages de Faradays sur la trajectoire des ions d'intérêt. En effet, les ions interférents sont séparés des analytes de quelques centièmes de rapport m/z. Un balayage en masse typique pour une solution contenant 5 $\mu\text{g/g}$ de S et de Si analysée par MC-ICP-MS, présenté Figure 3-2, montre la présence d'une zone de mesure « plate » exempte d'interférence à m/z compris entre 31,06 et 31,07. Lorsque les deux espèces (analyte + interférent) arrivent au détecteur, il se forme une autre zone dont le signal est la somme de la contribution de l'analyte et de l'interférent (région m/z = 31,08-31,14 de la Figure 3-2) et enfin, aux masses plus élevées (> m/z = 31,14), seul l'interférent contribue au signal mesuré. La configuration des cages de Faradays a donc été ajustée de sorte que le signal pour chacun des quatre isotopes d'intérêt soit mesuré sur ce plateau libre d'interférence. Pour cela, le rapport m/z de la cage centrale (C) a été fixé à 31,065.

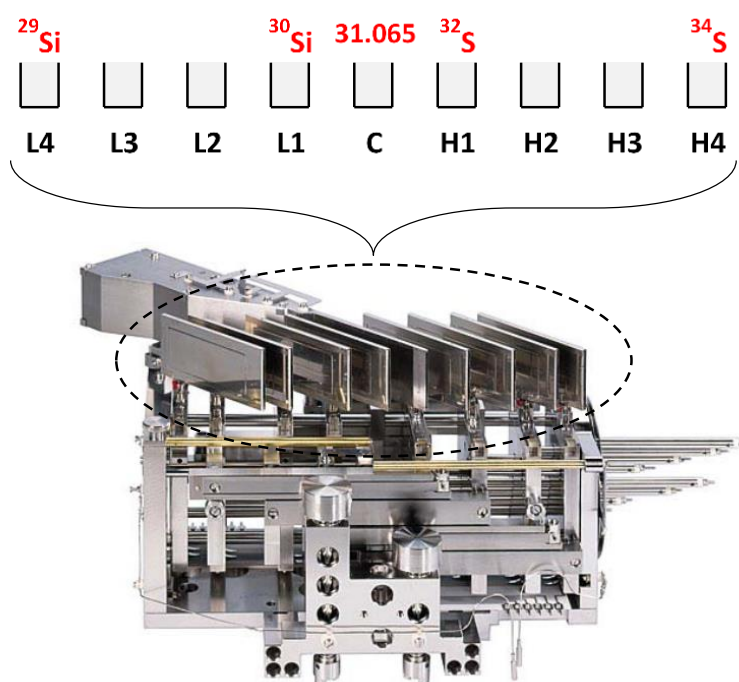


Figure 3-1 : Configuration des cages de Faradays pour la mesure simultanée des rapports $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ et $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ sur le MC-ICP-MS Neptune Plus.

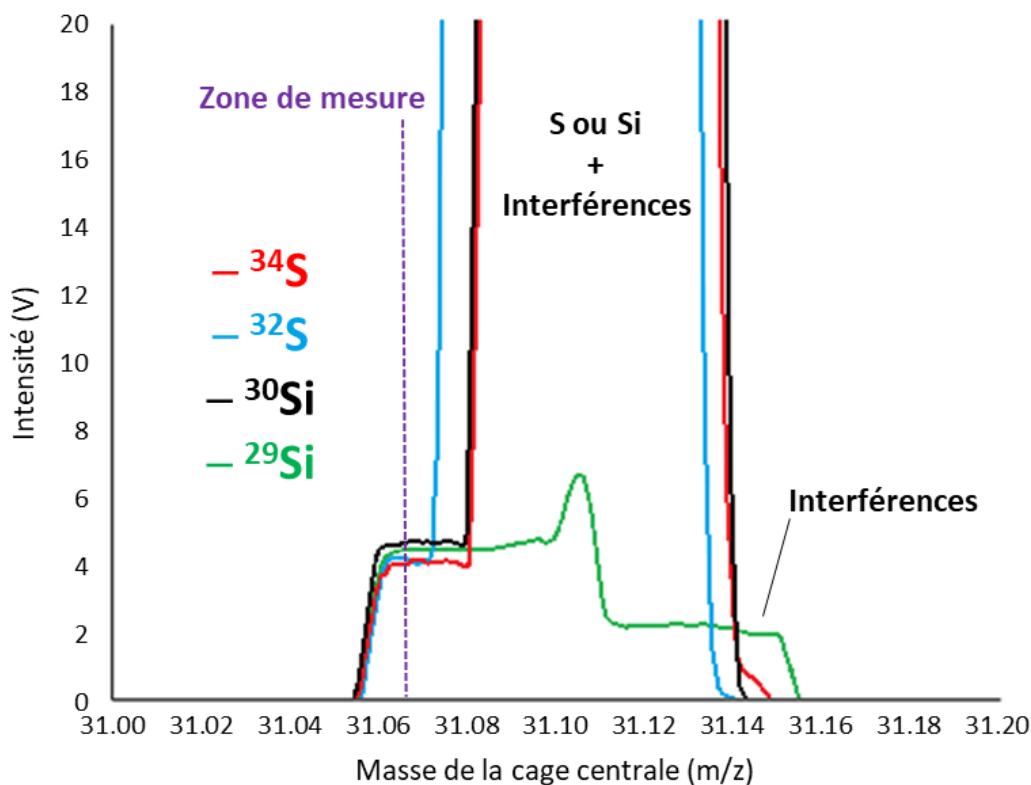


Figure 3-2 : Balayage en masse d'une solution à 5 µg/g de S et 5 µg/g de Si analysée par MC-ICP-MS en auto-aspiration en mode moyenne résolution. La cage centrale de Faraday a été fixée à $m/z = 31,065$ pour permettre la mesure simultanée sans interférence des isotopes ^{29}Si , ^{30}Si , ^{32}S , et ^{34}S .

2.1.6. Méthode de calcul des rapports isotopiques

Pour calculer les rapports isotopiques du soufre et du silicium, nous avons utilisé la méthode de la régression linéaire (LRS) mise au point par Fietzke *et al.* (2008). Son application est relativement simple, pour un pic donné, la pente entre le signal de l'isotope ^{34}S et celui du ^{32}S est calculée selon l'Équation 3-2 :

$$\text{Équation 3-2 : } \quad {}^{34}\text{S} = a \times {}^{32}\text{S} + b$$

La pente a correspond directement au rapport isotopique, l'ordonnée à l'origine correspond à la contribution de la ligne de base (Figure 3-3b). Pour le silicium, la pente entre le signal de l'isotope ^{30}Si et celui de ^{29}Si correspond au rapport isotopique et est calculée selon l'Équation 3-3 :

$$\text{Équation 3-3 : } \quad {}^{30}\text{Si} = a \times {}^{29}\text{Si}$$

Pour le silicium, le signal étant constant, l'ordonnée à l'origine est égale à zéro, (Figure 3-3c). Cette méthode ne nécessite pas de soustraction du bruit de fond. Les rapports isotopiques ont donc été calculés par régression linéaire selon la méthode des moindres carrés entre les intensités mesurées pour ^{34}S et ^{32}S (Figure 3-3b) ou ^{30}Si et ^{29}Si (Figure 3-3c).

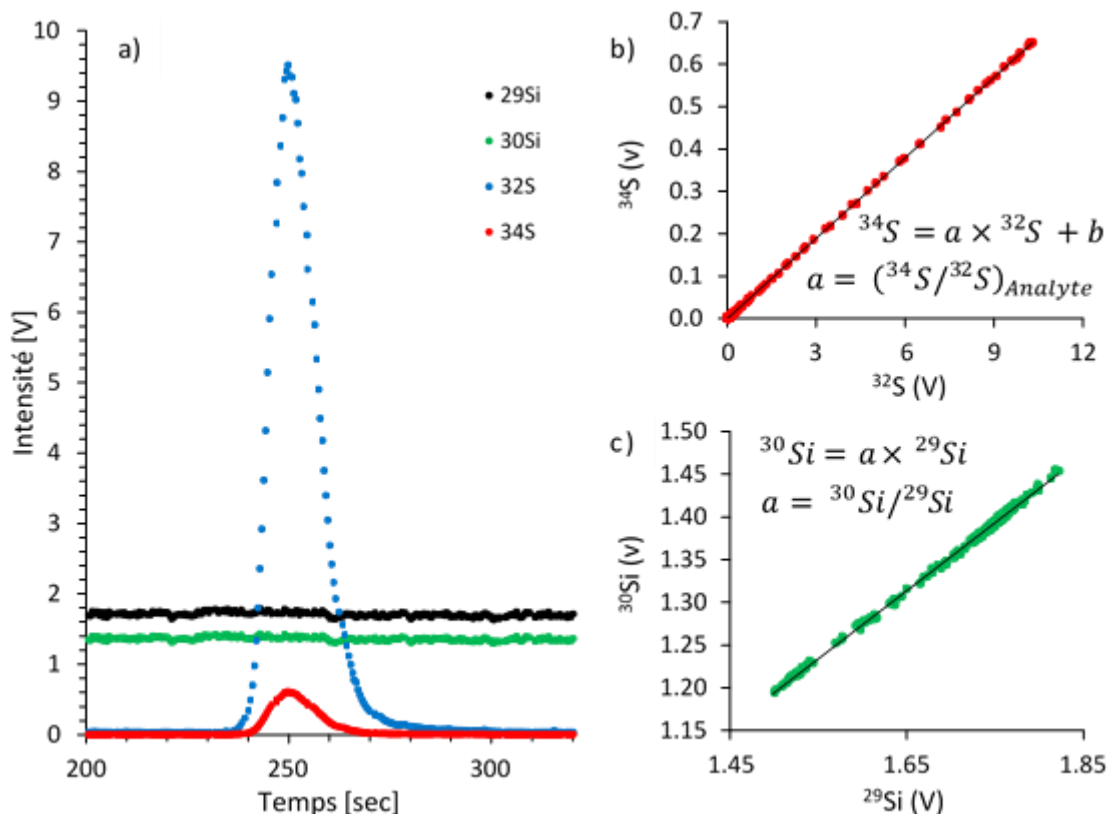


Figure 3-3 : Illustration du calcul des rapports isotopiques du silicium et du soufre par LRS. a) Zone du chromatogramme où élué un analyte et utilisée pour le calcul des rapports isotopiques, b) Calcul du rapport isotopique du soufre de l'analyte $(^{34}\text{S}/^{32}\text{S})_{\text{Analyte}}$ avec (a) la pente et (b) l'ordonnée à l'origine de la droite de régression linéaire, c) Calcul du rapport isotopique du silicium $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ avec (a) la pente de la droite de régression linéaire, $b = 0$.

2.1.7. Calcul de la valeur de $\delta^{34}\text{S}$

Dans les études précédentes, la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ a été calculée par *Sample-Standard-Bracketing* (SSB) (Clough et al., 2006; Santamaria-Fernandez et al., 2008; Zakon et al., 2014). Afin d'éviter l'injection supplémentaire d'un étalon avant et après l'échantillon comme l'implique la méthode SSB, et ainsi réduire le temps d'analyse, nous nous sommes inspirés de la méthode mise en œuvre pour des analyses en EA-IRMS, où $\delta^{34}\text{S}$ est calculé par comparaison avec un *pulse* de gaz de référence (SO_2) injecté en début de chromatogramme (chapitre 2). Nous avons ajouté un étalon interne, dont la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ est connue, aux échantillons pour jouer le rôle du *pulse* de SO_2 et ainsi déterminer la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des échantillons selon l'échelle internationale V-CDT. L'acide sulfamique a été choisi comme étalon interne. Nous avons préalablement déterminé la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ de ce composé par EA-IRMS, à savoir $0,55 \pm 0,19 \text{ ‰}$.

Les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates et des thiosulfates ont été calculées selon l'Équation 3-4 et sont exprimées en ‰ :

Équation 3-4 :

$$\delta^{34}\text{S}_{\text{Analyte}} = \left(\left(\left(\frac{^{34}\text{S}}{^{32}\text{S}} \right)_{\text{Analyte}} / \left(\frac{^{34}\text{S}}{^{32}\text{S}} \right)_{\text{H}_3\text{NO}_3\text{S}} \right) \times (\delta^{34}\text{S}_{\text{H}_3\text{NO}_3\text{S}} + 1) - 1 \right)$$

Avec $\left(\frac{^{34}\text{S}}{^{32}\text{S}} \right)_{\text{Analyte}}$ le rapport isotopique des sulfates ou des thiosulfates, $\left(\frac{^{34}\text{S}}{^{32}\text{S}} \right)_{\text{H}_3\text{NO}_3\text{S}}$ le rapport isotopique de l'étalon interne acide sulfamique, $\delta^{34}\text{S}_{\text{H}_3\text{NO}_3\text{S}}$ la valeur de delta de l'acide sulfamique mesurée par EA-IRMS. Pour chaque analyse, la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ a été calculée selon l'Équation 3-4 sans correction du biais de masse par Si, puis avec correction du biais de masse par Si en utilisant dans l'Équation 3-4 les rapports isotopiques $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ corrigés par l'Équation 1-15.

2.1.8. Calculs des incertitudes

Dans cette étude, différents types d'incertitudes sont exprimés, il apparaît donc nécessaire de les définir. Nous utiliserons le vocabulaire suivant, défini comme suit.

Incertitude de mesure des rapports isotopiques (En anglais : « measurement uncertainty of the isotopic ratio »)

Dans le guide « Vocabulaire international de métrologie – Concepts fondamentaux et généraux et termes associés (VIM) » (2012), l'incertitude de mesure est définie de la façon suivante :

« Paramètre non négatif qui caractérise la dispersion des valeurs attribuées à un mesurande, à partir des informations utilisées. Le paramètre peut être, par exemple un écart-type appelé incertitude-type. L'incertitude de mesure comprend en général de nombreuses composantes. »

Dans cette étude, les rapports isotopiques du soufre et du silicium ont été calculés par régression linéaire

$y = ax + b$ où x et y sont le dénominateur (^{32}S ou ^{29}Si) et le numérateur (^{34}S ou ^{30}Si) du rapport isotopique, respectivement; a est la pente de la droite de régression linéaire représentant le rapport isotopique; b est l'ordonnée à l'origine de la droite. En accord avec le guide VIM, nous avons donc considéré que l'écart-type sur la pente (u_a) représentait l'incertitude de mesure d'un rapport isotopique (Epo et al., 2010; Fietzke et al., 2008).

Incertitude de mesure sur la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ (En anglais : « standard deviation of the delta value »)

L'écart-type est calculé sur la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ pour un nombre n donné de répétitions de mesure par LC-MC-ICP-MS correspondant à n injections d'un échantillon. En accord avec le guide VIM, nous avons considéré que cet écart-type correspondait à l'incertitude de mesure sur la valeur de $\delta^{34}\text{S}$.

Incertitude composée sur la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ (En anglais : « combined uncertainty »)

Dans le guide « Vocabulaire international de métrologie – Concepts fondamentaux et généraux et termes associés (VIM) » (2012), l'incertitude composée est définie de la façon suivante :

« Incertitude-type obtenue en utilisant les incertitudes-types individuelles associées aux grandeurs d'entrée dans un modèle de mesure. »

Dans ce travail, nous avons calculé l'incertitude composée (u_c) pour la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ déterminée à partir d'une seule injection. L'incertitude composée a été calculée selon la loi de propagation des incertitudes en utilisant la méthode de Kragten (Kragten, 1994) comme recommandé par le guide EURACHEM/CITAC – Quantifier l'incertitude dans les mesures analytiques, deuxième édition (2000). Les incertitudes de mesure (u_a) sur les rapports $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ et $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ de l'analyte et de l'étalon ont été prises en compte pour ces calculs. L'écart-type sur la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ de l'étalon (écart-type sur les mesures réalisées en EA-IRMS) n'a pas été pris en compte pour ce calcul, l'objectif étant d'évaluer l'incertitude composée provenant uniquement des mesures réalisées par LC-MC-ICP-MS. Les incertitudes sur les masses des isotopes du soufre et du silicium ont été négligées car elles sont tellement faibles (incertitude sur la 7^{ème} décimale) que leur contribution à l'incertitude composée peut être considérée comme nulle. Pour un niveau de confiance approximatif de 95 %, un facteur d'élargissement $k = 2$ a été utilisé dans ce calcul.

Méthode Kragten

La méthode de Kragten, basée sur la loi de propagation des incertitudes, est une méthode numérique permettant de calculer l'incertitude composée à partir d'incertitudes de mesure. Cette méthode facilite les calculs puisqu'elle évite les calculs différentiels de la loi de propagation générale et minimise le risque d'erreurs de calcul, avec un gain de temps substantiel. De plus, elle permet de calculer facilement la contribution de chaque source d'incertitude dans l'incertitude composée.

Un exemple de calcul de u_c est illustré dans le Tableau 3-1 pour la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates calculée sans correction du biais de masse par le Si. Dans les colonnes A à C sont données respectivement les variables prises en compte pour le calcul d'incertitude composée, leur valeur moyenne et leur écart-type. La ligne 2 correspond au rapport isotopique $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ de l'étalon acide sulfamique ($\text{H}_3\text{NO}_3\text{S}$) et la ligne 3 au rapport isotopique $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ des sulfates (SO_4^{2-}). En B4, la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates $\delta^{34}\text{S}(\text{SO}_4^{2-})$ est calculée avec l'Équation 3-4 à partir des rapports isotopiques ($^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) mesurés pour les sulfates et l'étalon, et de la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ de l'étalon acide sulfamique. Dans les colonnes E et F, à la ligne 1 sont reportées les noms des variables, pour chaque variable, une valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates est recalculée (en E4 et F4) à partir de la valeur moyenne de la variable incrémentée de son incertitude (en rouge, par ex. $E2 = B2 + C2$). Ensuite, la différence entre le $\delta^{34}\text{S}$ « normal » et chaque $\delta^{34}\text{S}$ « recalculé » est calculée pour chaque variable ($E5 = E4 - B4$ et $F5 = F4 - B4$). En E6 et F6, les carrés de ces différences sont calculés ($E6 = E5^2$) et à la ligne 7 est calculée la somme de ces carrés ($E7 = E6 + F6$). A la ligne 8, la racine carrée de cette somme multipliée par le facteur d'élargissement $k = 2$

donne u_c ($E8 = 2\sqrt{E7}$). A la dernière ligne, les contributions en pourcentage de chaque variable à u_c sont calculées par le rapport $(\text{Différence})^2/\Sigma(\text{Différence}^2)$ ($E9 = E6/E7$ et $F9 = F6/E7$). Ce calcul permet de déterminer le poids de chaque terme dans l'incertitude composée.

Tableau 3-1 : Calcul d'une incertitude composée selon la méthode de Kragten (1994) pour $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates sans correction du biais de masse par le silicium. La colonne B correspond aux valeurs moyennes de chaque variable et la colonne C à leur écart-type. Dans les colonnes E et F, pour chaque variable les valeurs moyennes incrémentées de leur écart-type sont reportées en rouge. A la ligne 4, la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates est calculée selon l'Équation 3-4 à partir des valeurs des variables ligne 2 et 3. La valeur de l'incertitude composée est en E8. Le détail des calculs est décrit dans le texte.

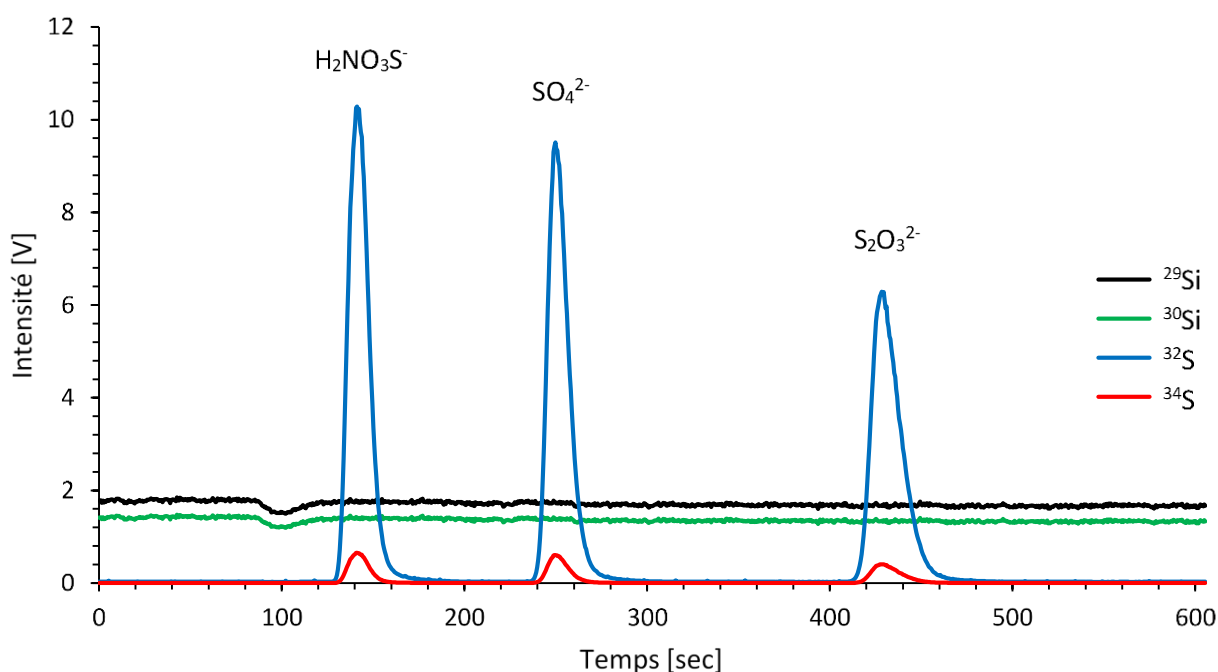
| | A | B | C | D | E | F |
|---|---|-------------------------------|---------------------------|--|---|--|
| 1 | Variable | Valeur moyenne de la variable | Écart-type de la variable | Variable → | $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ ($\text{H}_3\text{NO}_3\text{S}$) | $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ (SO_4^{2-}) |
| 2 | $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ ($\text{H}_3\text{NO}_3\text{S}$) | 0,064936 | 0,000006 | | 0,064942 | 0,064936 |
| 3 | $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ (SO_4^{2-}) | 0,065323 | 0,000009 | | 0,065323 | 0,065332 |
| 4 | $\delta^{34}\text{S}(\text{SO}_4^{2-})$ 'Normal' (‰) | 6,51 | | $\delta^{34}\text{S}(\text{SO}_4^{2-})$ recalculé (‰) | 6,42 | 6,64 |
| 5 | | | | Différence ($\delta^{34}\text{S}$ recalculé - $\delta^{34}\text{S}$ normal) (‰) | -0,09 | 0,13 |
| 6 | | | | (Différence) ² | 0,01 | 0,02 |
| 7 | | | | $\Sigma(\text{Différence}^2)$ | 0,03 | |
| 8 | | | | Incertitude composée (u_c) (‰) | 0,32 | |
| 9 | | | | Contribution à u_c | 30 % | 70 % |

2.2. Résultats et discussion

2.2.1. Séparation chromatographique

La première étape de ce développement analytique a été d'adapter la méthode de séparation anionique présentée au chapitre 2 sur une colonne de diamètre interne plus faible de manière à séparer les sulfates et les thiosulfates avec un débit d'élution plus faible (0,24 mL/min contre 1 mL/min dans la méthode du chapitre 2) compatible avec le nébuliseur du MC-ICP-MS et également d'éviter l'utilisation d'un *split* qui conduit à une perte de sensibilité. Le second objectif a été d'intégrer un étalon interne à la séparation anionique afin de l'utiliser pour calculer les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates et des thiosulfates. Nous avons choisi l'acide sulfamique comme étalon interne, car à pH 7 il est sous forme d'anion monovalent ($\text{pKa}(\text{H}_3\text{NO}_3\text{S}/\text{H}_2\text{NO}_3\text{S}^-) = 1,05$ (David R. Lide, 2007)) et élue donc avant les sulfates (anion divalent) en chromatographie anionique.

Le chromatogramme obtenu dans les conditions présentées au paragraphe 2.1.3 montre que la méthode permet de bien séparer l'étalon interne (acide sulfamique), les sulfates et les thiosulfates avec des temps de rétention (t_R) respectifs de 142 s, 250 s et 429 s (Figure 3-4). Le transfert de la méthode développée au chapitre 2 sur la colonne AS9-HC permet de réduire le temps d'élution des sulfates et des thiosulfates à moins de 10 minutes au lieu de 20 minutes avec la colonne AS15 utilisée dans le chapitre 2. Le temps d'analyse par échantillon est donc divisé par 2. Par ailleurs, l'acide sulfamique peut être utilisé en tant qu'étalon interne pour calculer les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates et des thiosulfates.



2.2.2. Correction du biais de masse par ajout de silicium

Le calcul du $\delta^{34}\text{S}$ (Équation 3-4) étant un calcul relatif, il implique intrinsèquement une correction du biais de masse si l'on fait l'hypothèse que le biais de masse est identique lors de la mesure de l'étalon et de l'échantillon. Lorsque ce n'est pas le cas, une correction supplémentaire du biais de masse est nécessaire.

La correction du biais de masse peut se faire par la mesure d'un rapport isotopique connu d'un autre élément introduit en même temps que l'échantillon. Pour le soufre, Clough *et al.* (2006) ont montré que la mesure du rapport isotopique $^{30}\text{Si}/^{28}\text{Si}$ du silicium (Si) permettait de corriger les effets de biais de masse. La géométrie de l'instrument Neptune ne permet pas la mesure simultanée d'isotopes dont la différence de masse relative est supérieure à environ 17 % (Mason *et al.*, 2006). Ainsi dans l'étude de Clough *et al.* (2006), les rapports $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ et $^{30}\text{Si}/^{28}\text{Si}$ sont mesurés en deux temps en utilisant deux configurations du détecteur différentes. Dans le cas d'un couplage LC-MC-ICP-MS, l'introduction de l'échantillon *via* un système de chromatographie liquide va générer des signaux transitoires, c'est-à-dire des signaux rapides et variables dans le temps au cours de l'analyse. Il est donc impératif que la mesure des différents isotopes soit simultanée. C'est pourquoi dans cette étude, nous avons choisi de mesurer le rapport $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ pour corriger le rapport $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$, ces rapports pouvant être mesurés simultanément sur le MC-ICP-MS Neptune (Mason *et al.*, 2006; Santamaria-Fernandez *et al.*, 2008).

Dans la seule étude précédente, dédiée à la détermination des rapports isotopiques du soufre par couplage LC-MC-ICP-MS et où le silicium a été utilisé pour corriger le biais de masse sur les rapports isotopiques du soufre, le silicium a été ajouté en post-colonne (Santamaria-Fernandez *et al.*, 2008). Un ajout post-colonne du Si entraîne une dilution du flux sortant de la colonne de chromatographie et donc diminue la concentration des espèces soufrées avant leur nébulisation. Afin d'éviter cet inconvénient, nous avons choisi d'ajouter le silicium directement dans la phase mobile. Cela a aussi pour effet de faciliter le montage de la chaîne analytique. Une solution de 6 $\mu\text{g/g}$ de Si a été analysée par LC-MC-ICP-MS (avec une phase mobile de 60 mmol/L NH_4NO_3 à pH 7 sans Si) afin de vérifier la faisabilité de cette méthodologie. La Figure 3-5 montre que dans ces conditions le Si élué avec le volume mort à 100 s. Le silicium n'est donc pas retenu par la colonne et peut donc être introduit directement dans la phase mobile. Cet élément a donc été ajouté à la phase mobile à une concentration de 10 $\mu\text{g/g}$, permettant d'avoir un signal continu d'environ 1,8 V pour ^{29}Si et 1,4 V pour ^{30}Si (Figure 3-4).

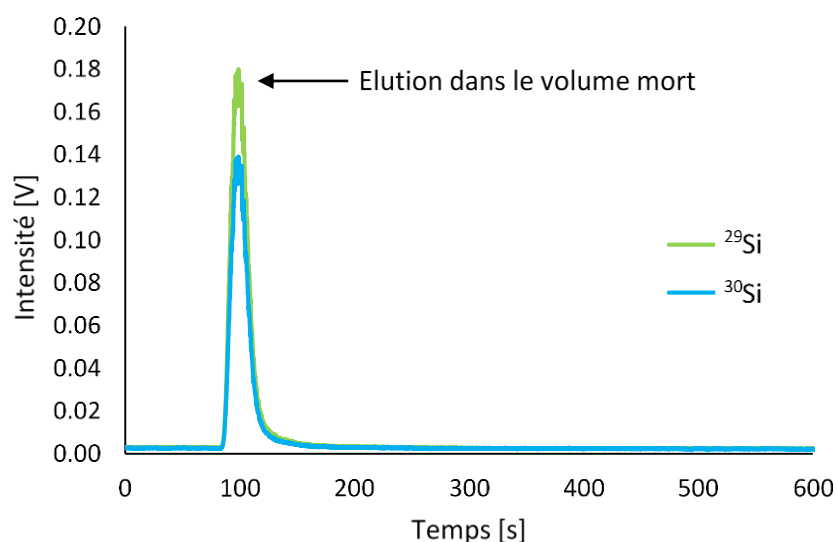


Figure 3-5 : Analyse LC-MC-ICPMS d'une solution de Si à 6 $\mu\text{g/g}$ avec une phase mobile de 60 mmol/L NH_4NO_3 à pH 7 sans Si.

2.2.3. Optimisation du calcul des rapports isotopiques par LRS

Avant de déterminer la valeur de $\delta^{34}\text{S}$, il est d'abord nécessaire de calculer la valeur des rapports isotopiques des différents pics du chromatogramme. Il existe différentes méthodes permettant de calculer les rapports isotopiques pour des signaux transitoires, à savoir la méthode du point par point (Point-By-Point - PBP), la méthode par aire de pic (Peak Area Integration - PAI) et la méthode par régression linéaire (Linear Regression Slope - LRS). La méthode PBP consiste à calculer le rapport isotopique du pic détecté en faisant la moyenne des rapports isotopiques calculés pour chaque point sur un intervalle donné (généralement 10-40 points) (Epov et al., 2008). La méthode PAI consiste à mesurer l'aire du pic pour chaque isotope et à calculer le rapport isotopique comme le rapport des aires mesurées pour chaque isotope (Krupp et al., 2004). Cette méthode est actuellement la plus utilisée pour le traitement de données chromatographiques (Rodríguez-González et al., 2012). La troisième méthode LRS consiste à calculer les rapports isotopiques par régression linéaire entre le signal des deux isotopes. C'est une méthode de calcul qui a initialement été développée par Fietzke *et al.* (2008) pour des mesures isotopiques du strontium déterminées par ablation laser couplée à un MC-ICP-MS et qui s'est récemment étendue aux analyses de spéciation (Epov et al., 2010; Guéguen et al., 2017; Rodríguez-Castrillón et al., 2012; Yang et al., 2014). La LRS est une méthode de calcul particulièrement adaptée aux signaux transitoires générés par la chromatographie liquide puisqu'elle permet la pondération de chaque point du pic en fonction de son intensité. Plusieurs études ont comparé la précision des méthodes PBP, PAI et LRS (Guéguen et al., 2017, 2015; Rodríguez-Castrillón et al., 2012). Epov *et al.* (2010) ont observé que pour le couplage entre chromatographie gazeuse et MC-ICP-MS, la LRS donnait un écart-type pour la valeur de $\delta^{202}\text{Hg}$ équivalent ou plus faible que les méthodes PAI et PBP (0,28 ‰ par LRS et PAI, > 0,5 ‰ par PBP). Pour des analyses par LC-MC-ICP-MS, Guéguen *et al.* (2017) ont également

observé que la méthode LRS donnait les écart-types les plus faibles (< 1,1 ‰ par LRS et < 2,4 ‰ par PAI pour $\delta^{152-160}\text{Gd}$). C'est donc la méthode LRS que nous avons choisi pour ce travail.

Les rapports isotopiques ont été calculés par régression linéaire (LRS) du signal mesuré pour chaque isotope au cours de l'élution d'un pic chromatographique. On peut alors se demander quels sont les points des pics chromatographiques à prendre en compte pour ce calcul, faut-il prendre tous les points du pic ou bien exclure les points les moins intenses ? Faut-il prendre en compte des points de la ligne de base ? Afin de répondre à ces questions, nous avons déterminé les incertitudes sur les rapports isotopiques mesurés pour différents nombres de points utilisés pour le calcul LRS. Pour cela, les rapports isotopiques d'une solution contenant 5 $\mu\text{g-S/g}$ d'acide sulfamique, de sulfates et de thiosulfates ont été calculés en utilisant différents nombres de points centrés sur le maximum du pic. Le nombre maximum de points a été fixé de sorte que la zone du chromatogramme utilisée pour un pic ne chevauche pas celle des pics voisins. Un maximum de 205 points (139 % de la largeur à la base du pic) a été déterminé pour l'acide sulfamique et les sulfates, et de 339 points (209 % de la largeur du pic) pour les thiosulfates. Le minimum a arbitrairement été fixé à 21 points (13-14 % de la largeur du pic). L'incrémentations du nombre de points utilisés pour la régression linéaire a été réalisée avec un pas de 2 points, c'est-à-dire qu'un calcul de régression linéaire a été réalisée en utilisant 21 points, puis de 23 points, puis 25 points et ainsi de suite jusqu'au maximum fixé. La Figure 3-6 montre la variation de l'incertitude de mesure pour les rapports $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ et $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ en fonction du nombre de points utilisés pour les calculs de régression linéaire. Comme Epov *et al.* (2010) ont pu le montrer, on constate que l'incertitude de mesure des rapports isotopiques diminue avec l'augmentation du nombre de points utilisés dans la régression linéaire. De plus, on observe que la diminution des incertitudes de mesure pour $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ est plus importante (environ un facteur 10 entre 21 et 100 points) que la diminution des incertitudes de mesure pour $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ (environ un facteur 2 entre 21 et 100 points). Cette différence est probablement due à la différence de nature des signaux, transitoires pour le soufre et continus pour le silicium. Epov *et al.* (2010) ont observé que les incertitudes de mesure des rapports isotopiques du mercure diminuaient jusqu'à 100 % des points du pic utilisé pour le calcul LRS. Nous observons également que les incertitudes de mesure pour $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ diminuent jusqu'à 100 % des points du pic (147 points pour l'acide sulfamique et les sulfates et 163 points pour les thiosulfates sur la Figure 3-6). De plus, les incertitudes de mesure pour $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ diminuent encore lorsque l'on inclue des points supplémentaires qui correspondent à la ligne de base (à partir de 148 points pour l'acide sulfamique et les sulfates et de 164 pour les thiosulfates sur la Figure 3-6). Ainsi, inclure tous les points du pic chromatographique et des points de la ligne de base permet de diminuer les incertitudes de mesure des rapports isotopiques. Nous avons choisi d'utiliser pour les calculs LRS le nombre de points qui conduit à l'incertitude de mesure minimale pour $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ et $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$. Ainsi 195 points (soit 132 % de la largeur du pic) ont été utilisés pour le calcul des rapports isotopiques de l'acide sulfamique et des sulfates, et 321 points (soit 198 % de la largeur du pic) pour les thiosulfates.

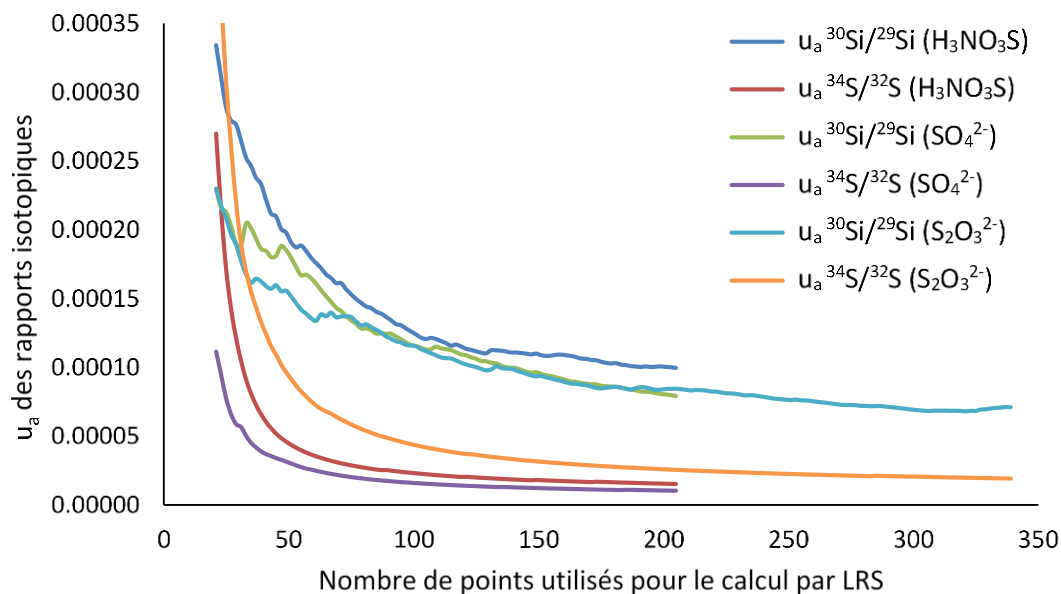


Figure 3-6 : Variation de l'incertitude de mesure (u_a) des rapports isotopiques $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ et $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ déterminés par LC-MC-ICP-MS pour une solution à 5 $\mu\text{g-S/g}$ d'acide sulfamique, 5 $\mu\text{g-S/g}$ de sulfates et 5 $\mu\text{g-S/g}$ de thiosulfates en fonction du nombre de points des pics chromatographiques utilisés pour le calcul par LRS.

En résumé, la procédure mise au point consiste tout d'abord en la séparation de l'étalon interne et des analytes par chromatographie liquide (Figure 3-4), puis leur détection en ligne par MC-ICP-MS. Ensuite, les rapports $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ et $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ sont déterminés par LRS, puis le rapport $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ est corrigé du biais de masse grâce au rapport $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ (Équation 1-15) et enfin, les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates et des thiosulfates sont calculés par rapport à l'étalon interne (Équation 3-4).

Mise au point du couplage LC-MC-ICP-MS - À retenir :

- ✱ Correction du biais de masse par ajout de silicium directement dans la phase mobile.
- ✱ Séparation en moins de 10 minutes de l'acide sulfamique, des sulfates et des thiosulfates avec une phase mobile de NH_4NO_3 60 mmol/L, 10 $\mu\text{g/g}$ de Si à pH 7.
- ✱ Calcul des rapports isotopiques par LRS, optimisation du nombre de points utilisés dans ce calcul pour chaque anion.

2.2.4. Test méthodologique sur deux types d'échantillons : solutions synthétiques et eaux naturelles

La méthode LC-MC-ICP-MS mise au point a été testée avec une solution de Na_2SO_4 et de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ à 5 $\mu\text{g-S/g}$ (par espèce) et à 1 $\mu\text{g-S/g}$ (par espèce) préparées dans la phase mobile et un échantillon d'eau de source provenant du bassin de Sivas en Turquie (Pichat et al., 2018) dilué à 5 $\mu\text{g-S/g}$ dans la phase mobile. Une solution d'acide sulfamique a été ajoutée aux échantillons à la même concentration que les analytes. En parallèle, ces échantillons ont été analysés par EA-IRMS selon la méthode décrite au chapitre 2 pour effectuer une validation par une autre technique. Brièvement, Na_2SO_4 a été mis en solution et SO_4^{2-} a été précipité sous forme de BaSO_4 par ajout de BaCl_2 , le $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ du $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ a été oxydé par électrolyse en SO_4^{2-} puis précipité sous forme de BaSO_4 . L'EA-IRMS a été considérée ici comme la méthode de référence car elle a été validée par l'analyse de matériaux de référence certifié (voir paragraphe 3.2.1 du chapitre 2), la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ obtenue par EA-IRMS a donc été considérée comme la valeur de référence. Sur la Figure 3-7, les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ moyennes et leur écart-type ($n = 3$) obtenues pour les analyses des solutions à 5 $\mu\text{g-S/g}$ et 1 $\mu\text{g-S/g}$ par LC-MC-ICP-MS (avec et sans correction du biais de masse par Si) et EA-IRMS sont représentées. Pour l'échantillon d'eau de source, la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ déterminée par LC-MC-ICP-MS (avec et sans correction du biais de masse par Si) et son incertitude composée est représentée car une seule analyse a été réalisée. La valeur de $\delta^{34}\text{S}$ déterminée pour l'échantillon d'eau de source par EA-IRMS par Pichat *et al.* (2018) est également représentée. Le Tableau 3-2 fourni les valeurs numériques présentées sur la Figure 3-7, mais également les incertitudes composées pour les différentes valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ déterminées.

Comme illustré sur la Figure 3-7, sans correction du biais de masse par le silicium, les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ obtenues pour les sulfates dans la solution synthétique à 5 et 1 $\mu\text{g-S/g}$ ne sont pas significativement différentes du $\delta^{34}\text{S}$ mesuré par EA-IRMS. Toutefois, les valeurs obtenues sont affectées d'un très grand écart-type ($> 1,5 \text{ ‰}$) limitant la fiabilité de ces résultats. Pour les sulfates dans l'échantillon d'eau naturelle, la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ obtenue n'est pas significativement différente de celle mesurée par EA-IRMS. La Figure 3-7 montre que les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ obtenues avec correction du biais de masse par le silicium, pour les sulfates dans la solution synthétique à 5 $\mu\text{g-S/g}$ et dans l'eau naturelle sont en accord avec les valeurs obtenues en EA-IRMS. De plus, on peut remarquer que la correction du biais de masse par le silicium permet de réduire l'écart-type sur la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ pour la solution synthétique. Par contre, la valeur obtenue avec correction du biais de masse par le silicium pour les sulfates dans la solution synthétique à 1 $\mu\text{g-S/g}$ est supérieure d'environ 2 ‰ à celle obtenue par EA-IRMS. Il semble donc qu'une concentration de 5 $\mu\text{g-S/g}$ soit requise et que la correction du biais de masse par le silicium soit nécessaire pour réaliser des mesures justes et précises pour les sulfates. En revanche, pour les thiosulfates dans les solutions synthétiques à 5 et 1 $\mu\text{g-S/g}$, la Figure 3-7 montre clairement que les valeurs obtenues par LC-MC-ICP-MS sont toutes significativement différentes de celles mesurées par EA-IRMS.

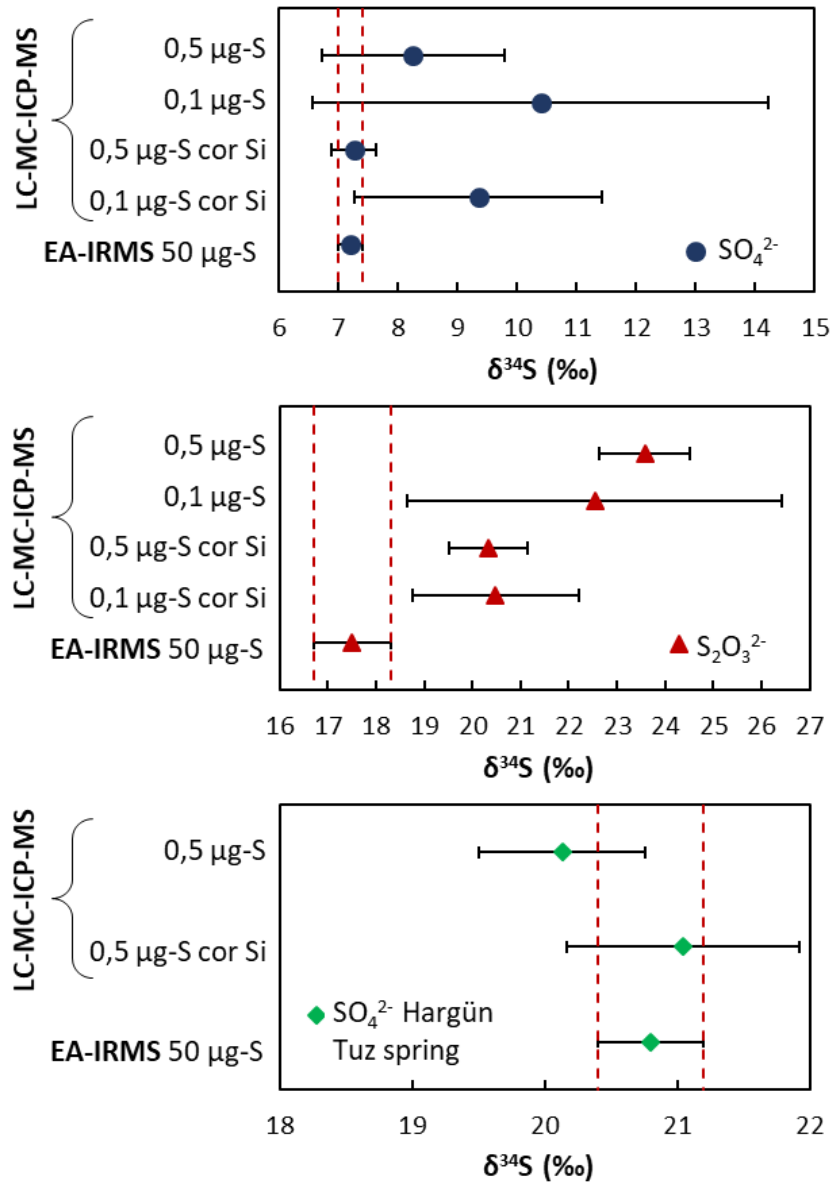


Figure 3-7 : Analyses LC-MC-ICP-MS et EA-IRMS de solutions de Na_2SO_4 et $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ et d'un échantillon d'eau de source diluée 250 fois de façon à avoir une concentration finale de 5 $\mu\text{g-S/g}$. L'incertitude représentée correspond à l'écart-type (1 SD) pour 3 répliques sauf pour Hargün Tuz spring analysé par LC-MC-ICP-MS où l'incertitude composée est représentée car des répliques d'analyse n'ont pas pu être réalisés. $\delta^{34}\text{S}$ EA-IRMS de Hargün Tuz spring déterminé par (Pichat et al., 2018). En ordonnée sont indiquées la technique utilisée et la masse de soufre analysée. Cor Si signifie qu'une correction au silicium a été appliquée. Les lignes pointillées rouge indiquent les valeurs de $\delta^{34}\text{S} \pm 1$ SD déterminées par EA-IRMS.

Tableau 3-2 : Analyses LC-MC-ICP-MS de solutions de Na_2SO_4 et $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ à 5 $\mu\text{g-S/g}$ et 1 $\mu\text{g-S/g}$ et d'un échantillon d'eau de source à 5 $\mu\text{g-S/g}$. Analyse EA-IRMS de Na_2SO_4 après précipitation sous forme BaSO_4 et de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ après oxydation et précipitation sous forme BaSO_4 . L'incertitude donnée représente l'écart-type (1 SD) pour 3 réplicas. *Une seule analyse LC-MC-ICP-MS a été faite pour l'échantillon Hargün Tuz spring qui a été dilué 250 fois de façon à avoir une concentration finale en sulfates de 5 $\mu\text{g-S/g}$ et dopé en acide sulfamique à 5 $\mu\text{g-S/g}$ - ** $\delta^{34}\text{S}$ EA-IRMS déterminé par (Pichat et al., 2018).

| Méthode | LC-MC-ICP-MS | | | | | EA-IRMS | | |
|-----------------------------------|--------------------------------------|--|---|--|---|--------------------------------------|--|---|
| | Masse de S injecté (μg) | Sans correction du biais de masse par Si | | Avec correction du biais de masse par Si | | Masse de S injecté (μg) | $\delta^{34}\text{S}$ (SO_4^{2-}) (‰) | $\delta^{34}\text{S}$ ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) (‰) |
| | | $\delta^{34}\text{S}$ (SO_4^{2-}) (‰) | $\delta^{34}\text{S}$ ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) (‰) | $\delta^{34}\text{S}$ (SO_4^{2-}) (‰) | $\delta^{34}\text{S}$ ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) (‰) | | | |
| Solution 5 $\mu\text{g-S/g}$ | 0,5 | 8,3 ± 1,5 ($u_c = 0,5$) | 23,6 ± 0,9 ($u_c = 0,7$) | 7,3 ± 0,4 ($u_c = 0,6$) | 20,3 ± 0,8 ($u_c = 0,8$) | 50 | 7,2 ± 0,2 | 17,5 ± 0,8 |
| Solution 1 $\mu\text{g-S/g}$ | 0,1 | 10,4 ± 3,8 ($u_c = 4,8$) | 22,5 ± 3,9 ($u_c = 4,8$) | 9,4 ± 2,1 ($u_c = 4,8$) | 20,5 ± 1,7 ($u_c = 4,8$) | 50 | 7,2 ± 0,2 | 17,5 ± 0,8 |
| Hargün Tuz spring (eau de source) | 0,5 | 20,1 ($u_c = 0,6$) | | 21,0* ($u_c = 0,9$) | - | 50 | 20,8 ± 0,4** | - |

Comme on pouvait s'y attendre la correction du biais de masse par le silicium n'améliore pas les incertitudes composées puisque la contribution des incertitudes de $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ vient s'ajouter à l'incertitude composée, néanmoins l'augmentation de l'incertitude composée ne dépasse pas 0,1 ‰ (Tableau 3-2). Il était également prévisible que les écart-types et les incertitudes composées soient plus grands pour une quantité de soufre de 0,1 μg que pour 0,5 μg .

L'écart-type de la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates dans la solution à 5 $\mu\text{g-S/g}$ ($\text{SD} = 0,4$ ‰) est dans l'ordre de grandeur des écart-types généralement obtenus en EA-IRMS (0,1-0,5 ‰) (Giesemann et al., 1994; Grassineau et al., 2001). Ces résultats suggèrent que les analyses LC-MC-ICP-MS permettent d'atteindre des écart-types équivalents à l'EA-IRMS pour des quantités de sulfates 100 fois plus faibles et sans préparation de l'échantillon. En outre, $\delta^{34}\text{S}$ mesuré par LC-MC-ICP-MS pour les sulfates de l'échantillon d'eau de source (21,0 ‰) n'est pas significativement différent de celui mesuré par EA-IRMS (20,8 ± 0,4 ‰), il semble donc que cette technique puisse être utilisée sur des échantillons réels pour la mesure de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates.

L'utilisation d'un étalon interne pour calculer la valeur de $\delta^{34}\text{S}$, donne des résultats justes et précis pour les sulfates en solution à une concentration de 5 $\mu\text{g-S/g}$. Cependant, $\delta^{34}\text{S}$ mesuré pour les thiosulfates à la même concentration est significativement différent de celui mesuré en EA-IRMS, il y

a donc une erreur de justesse significative pour cette espèce. Certains auteurs ont rapporté qu'un fractionnement isotopique dépendant de la masse pouvait avoir lieu pendant la séparation chromatographique. Ce fractionnement isotopique conduit à un phénomène de dérive des rapports isotopiques au cours de l'élution du pic chromatographique se traduisant par une différence (jusqu'à 5,7 %) entre le rapport isotopique en début et en fin de pic (Gourgiotis et al., 2017; Guéguen et al., 2015; Martelat et al., 2017). Les rapports isotopiques du soufre au cours de l'élution du pic, représentés sur la Figure 3-8, montrent qu'il y a une dérive du rapport isotopique du soufre pour les trois espèces. Les dérives du rapport $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ (calculées comme une différence relative de $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ au début du pic et de $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ à la fin du pic) sont de respectivement 0,5, 1,1 et 2,6 % pour l'acide sulfamique, les sulfates et les thiosulfates. L'utilisation de silicium ne permet pas de corriger ce phénomène puisque celui-ci est injecté de façon continue et n'est pas retenu par la colonne. Les résultats obtenus suggèrent donc que la différence entre la dérive de l'étalon (0,5 %) et celle des thiosulfates (2,6 %) est la principale cause de l'erreur obtenue sur la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des thiosulfates. Une correction supplémentaire, telle qu'un étalonnage externe par des thiosulfates, est donc nécessaire afin de corriger la dérive des rapports isotopiques.

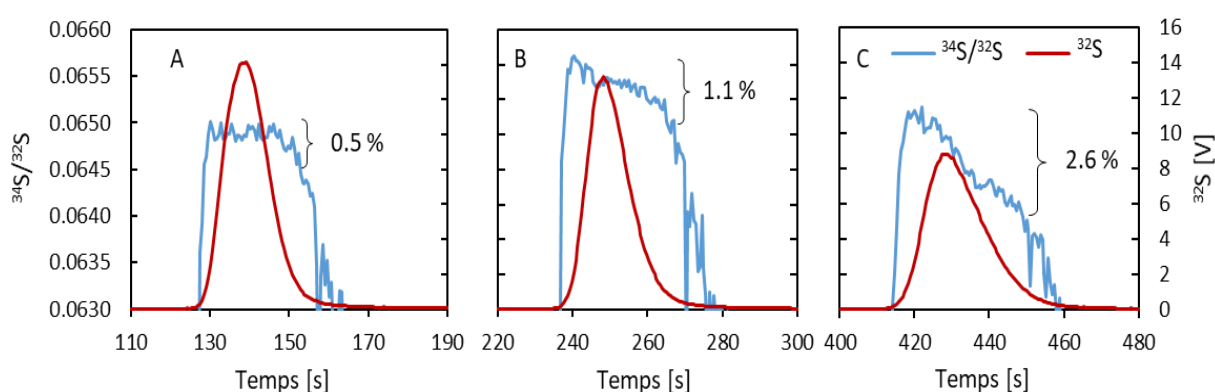


Figure 3-8 : Dérive du rapport $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ pour les pics d'acide sulfamique(A), des sulfates (B) et des thiosulfates (C) obtenus en LC-MC-ICP-MS ($[S] = 5 \mu\text{g/g}$).

2.2.5. Évaluation des sources d'incertitudes

Une étude des sources d'incertitudes basée sur le calcul de la contribution de chaque terme du calcul de l'incertitude composée des valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ obtenues avec correction du biais de masse par le silicium pour les solutions synthétiques à 5 et 1 $\mu\text{g-S/g}$ a été réalisée (détail des calculs au paragraphe 2.1.8). La Figure 3-9A et la Figure 3-9B présentent les contributions en pourcentage que représente chaque incertitude prise en compte pour le calcul de l'incertitude composée sur la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates et des thiosulfates pour la solution à 5 $\mu\text{g-S/g}$ et pour la solution à 1 $\mu\text{g-S/g}$, respectivement. Comme illustré sur la Figure 3-9A, pour la solution à 5 $\mu\text{g-S/g}$, 35 et 30 % de l'incertitude composée des sulfates (0,6 ‰) sont dus aux écart-types sur les rapports $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ et $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ mesurés pour le pic des sulfates et, 21 et 15 % sont dus aux écart-types sur les rapports $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ et $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ mesurés pour le pic d'acide sulfamique. Pour les thiosulfates, le constat est différent, 76 % de l'incertitude composée (0,8 ‰) sont dus au rapport $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ mesuré pour le pic de thiosulfates. L'incertitude sur la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des thiosulfates est donc majoritairement due à l'incertitude sur le rapport isotopique des thiosulfates. La différence entre les sulfates et les thiosulfates peut s'expliquer par la dérive isotopique plus importante pour les thiosulfates, ou bien par l'intensité de pic plus faible pour les thiosulfates (6 V) que pour les sulfates (9,8 V).

Pour la solution à 1 $\mu\text{g-S/g}$, pour les sulfates comme pour les thiosulfates, 98 % de l'incertitude composée proviennent des incertitudes de mesure sur les rapports $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ de l'étalon et de l'analyte, confirmant que pour les trois pics la faible intensité enregistrée (pour ^{32}S : 0,9 V pour l'acide sulfamique, 0,8 V pour les sulfates et 0,6 V pour les thiosulfates) est la cause de l'augmentation des incertitudes sur $\delta^{34}\text{S}$.

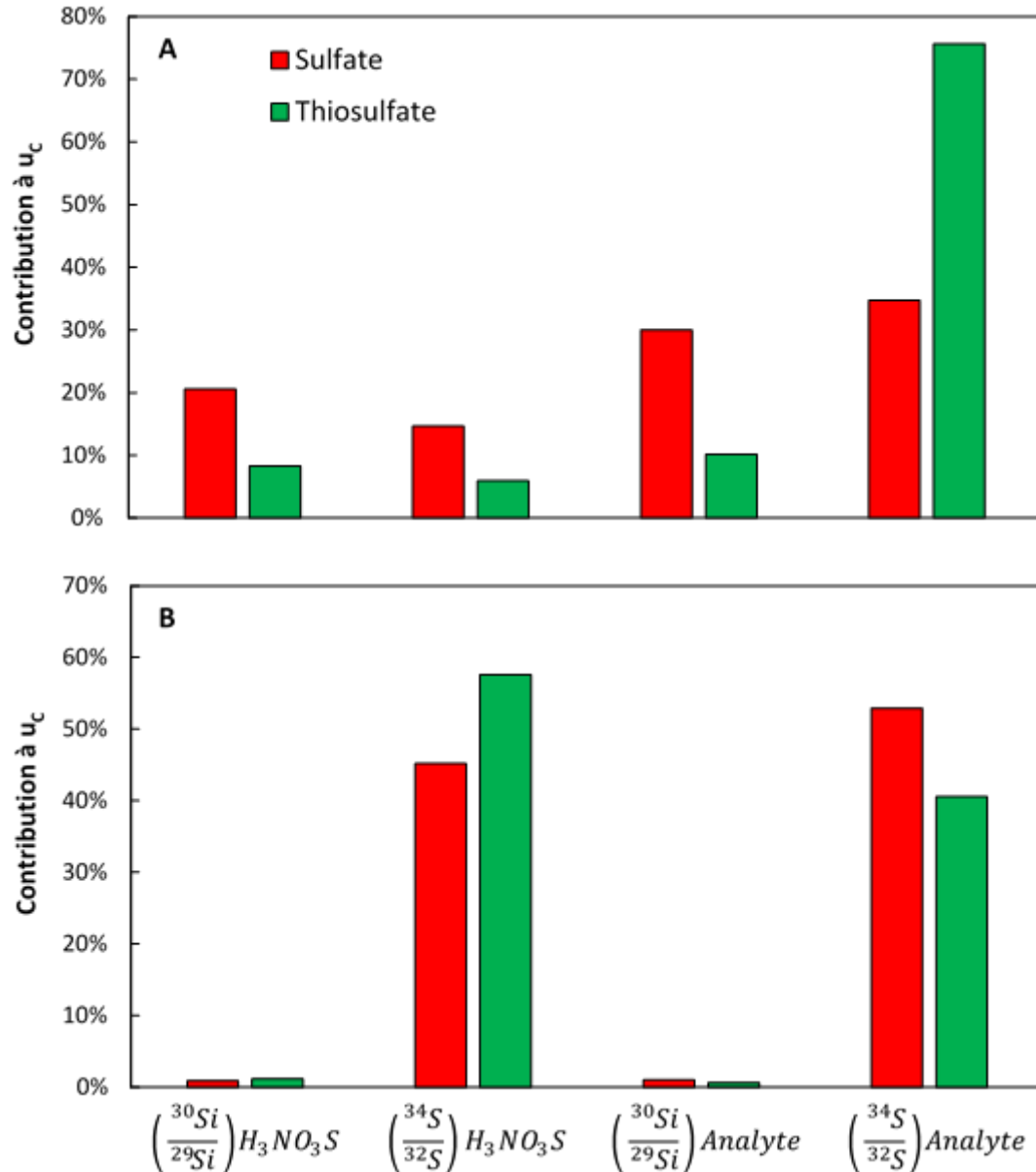


Figure 3-9 : Contribution en % des incertitudes de mesure des rapports isotopiques $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ et $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ de l'étalon interne ($\text{H}_3\text{NO}_3\text{S}$) et de l'analyte (sulfates ou thiosulfates) et de l'écart-type du $\delta^{34}\text{S}$ de l'étalon interne à l'incertitude composée u_c . A : Solution d'acide sulfamique, de sulfates et de thiosulfates à 5 $\mu\text{g-S/g}$; B : Solution d'acide sulfamique, de sulfates et de thiosulfates à 1 $\mu\text{g-S/g}$.

Résultats des analyses LC-MC-ICP-MS - À retenir :

La correction du biais de masse par le silicium permet de réduire les écart-types et améliore la justesse sur les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ pour les sulfates uniquement.

Résultats prometteurs pour les sulfates dans la solution synthétique et dans un échantillon réel pour 0,5 μg de S injecté, pas de différence significative avec les valeurs $\delta^{34}\text{S}$ déterminées par EA-IRMS.

Pour les thiosulfates, les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ sont significativement différentes de celles mesurées en EA-IRMS. L'hypothèse est que cette erreur provient de la dérive du rapport isotopique du soufre au cours de l'éluion de l'anion. Une correction supplémentaire tel qu'un étalonnage externe pourrait permettre de corriger cette erreur.

Il y a une forte augmentation des écart-types et des incertitudes composées pour une quantité de soufre injectée de 0,1 μg . L'augmentation de l'incertitude composée est essentiellement due à une augmentation de l'incertitude de mesure pour $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ de l'étalon interne et de l'analyte. La faible intensité mesurée ($< 1 \text{ V}$) conduit à une incertitude de mesure élevée sur les rapports isotopiques du soufre.

2.3. Conclusion de la partie 1

Ce premier développement analytique a permis de montrer le potentiel du couplage LC-MC-ICP-MS pour la détermination de $\delta^{34}\text{S}$ en CSIA dans des échantillons d'eau pour des quantités de soufre de 0,5 μg , avec une préparation d'échantillon minimale. Le biais de masse a été corrigé par ajout de silicium directement dans la phase mobile et le calcul du $\delta^{34}\text{S}$ a été réalisé par une nouvelle approche reposant sur l'utilisation d'un étalon interne. Les résultats pour les sulfates en solution à 5 $\mu\text{g-S/g}$ étaient satisfaisants, la valeur mesurée, avec un écart-type de 0,4 ‰, n'étant pas significativement différente de celle obtenue en EA-IRMS. Cependant, la méthode mise au point n'a pas permis de déterminer avec justesse la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des thiosulfates. Les résultats suggèrent que : (1) le biais sur la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des thiosulfates provient de la dérive du rapport isotopique au cours de l'élution du pic qui est plus importante que celle des deux autres espèces ; (2) la dérive isotopique augmente avec le temps de rétention. Un échantillon d'eau naturelle a été analysé par LC-ICP-MC-MS et la valeur $\delta^{34}\text{S}$ déterminée pour les sulfates a été confirmée par des analyses par EA-IRMS réalisées par un autre laboratoire. La procédure analytique développée semble donc prometteuse pour l'analyse isotopique des sulfates dans des échantillons réels.

3. Anion Specific Sulfur Isotope Analysis by Liquid Chromatography Coupled to Multicollector-ICPMS

Les travaux concernant la détermination en ligne des valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfites, des sulfates et des thiosulfates par LC-MC-ICP-MS ont fait l'objet d'une publication acceptée dans le journal « Analytical Chemistry » et sont présentés à travers l'article « Anion Specific Sulfur Isotope Analysis by Liquid Chromatography Coupled to Multicollector-ICPMS ». Le résumé ci-dessous synthétise la démarche et les résultats obtenus.

Résumé de la publication en français :

Le but de cette étude a été de résoudre le problème de justesse lié à la détermination du $\delta^{34}\text{S}$ des thiosulfates et d'étendre la méthode à l'analyse des sulfites. Dans ce but, la méthode de séparation par chromatographie liquide présentée dans le chapitre 2 (partie II) permettant la séparation des ions sulfites, sulfates et thiosulfates a été couplée à un MC-ICP-MS. La méthode a été adaptée sur une colonne AS15 d'un diamètre interne de 2 mm permettant ainsi de réduire le débit d'élution à 0,25 mL/min afin d'être compatible avec les spécifications du nébuliseur du MC-ICP-MS et d'augmenter la quantité d'analyte atteignant le plasma. L'acide sulfamique coéluant avec les sulfites dans ces conditions de séparation, un autre étalon interne a donc été recherché. Le triméthylsulfoxonium (TMSO), qui est sous forme cationique et n'est donc pas retenu par la colonne, a été choisi comme étalon interne. Il a été inclus à la méthode de séparation afin de réaliser une correction du biais de masse par étalonnage interne comme présenté dans la partie 2 de ce chapitre. La séparation chromatographique a été réalisée grâce à un gradient d'élution de 40 à 100 mmol/L de NH_4NO_3 et 0,1 % de formaldéhyde. Du silicium a été ajouté à la phase mobile (10 $\mu\text{g/g}$) pour réaliser une correction du biais de masse basée sur la mesure du rapport $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$, mais une grande instabilité du rapport isotopique mesuré pour le silicium a été observée. Par conséquent, la correction n'a pas pu être réalisée avec succès. Les raisons de ces instabilités ne sont pas bien comprises, mais il est possible qu'elles soient dues aux changements des conditions chromatographiques (colonne exerçant une plus forte rétention, utilisation d'un gradient). La correction par le silicium n'a donc pas été retenue. Plusieurs méthodes de mesures du $\delta^{34}\text{S}$ et de correction du biais de masse ont été comparées, à savoir :

- L'étalonnage interne (IS : *Internal Standardization*) comme présenté dans la partie 2 de ce chapitre, qui consiste à ajouter un étalon soufré dont la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ est connue pour calculer les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfites, sulfates et thiosulfates
- Le *Sample-Standard-Bracketing* par espèce non-spécifique, où l'étalon n'est pas la même espèce chimique que l'analyte (CUB : *Compound Unspecific Bracketing*)
- Le *Sample-Standard-Bracketing* par espèce spécifique (CSB : *Compound Specific Bracketing*), où l'étalon utilisé est de la même espèce chimique que l'analyte

- L'étalonnage interne combiné à une droite d'étalonnage externe spécifique à chaque analyte (ISEC : *Internal Standardization combined to an External Calibration*).

L'étalonnage interne combiné à une correction par un étalonnage externe spécifique à chaque analyte est apparu comme la méthode la plus adaptée à ce couplage.

Ensuite, le choix de la zone du pic (nombre de points) utilisée pour le calcul des rapports isotopiques par LRS a été optimisé. Pour cela, la justesse (en considérant la valeur déterminée par EA-IRMS comme référence) et les incertitudes composées obtenues pour différentes zones de pic ont été comparées. Cette optimisation a permis d'obtenir des incertitudes composées inférieures à 0,25 ‰ et des reproductibilités inférieures à 0,5 ‰ pour 1 µg de soufre injecté. Cette méthode a ensuite été appliquée avec succès à des solutions synthétiques et des échantillons réels (eaux de source et de rivière provenant du bassin de Sivas en Turquie) et les résultats obtenus ont été comparés aux valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ de la littérature ou déterminées par EA-IRMS. Dans certains échantillons d'eaux naturelles, des effets de matrices dus à de fortes concentrations en Na^+ ont été observés et ont été discutés. La procédure analytique développée a permis de simplifier l'analyse $\delta^{34}\text{S}$ d'échantillons environnementaux liquides puisque les étapes de préparation n'ont pas été nécessaires, et l'analyse de plusieurs espèces contenant du soufre a pu être réalisée en une seule injection.

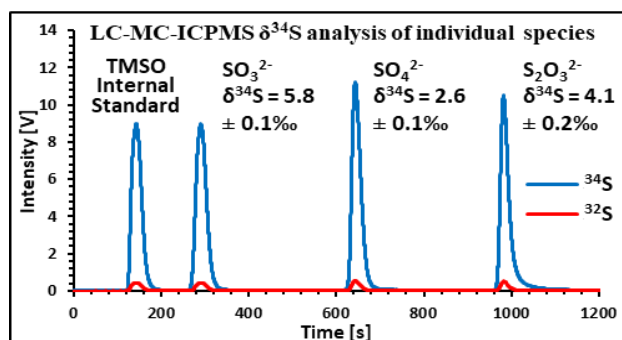
Anion-specific sulfur isotope analysis by liquid chromatography coupled to multicollector ICPMS

Mathieu Martinez¹, Jose Ignacio Garcia-Alonso², Corinne Parat¹, Jorge Ruiz Encinar², Isabelle Le Hécho*¹

¹CNRS / Univ. Pau & Pays de l'Adour / E2S UPPA, Institut des Sciences Analytiques et de Physico-Chimie pour l'Environnement et les Matériaux, UMR 5254, 2 avenue Pierre Angot, Pau, 64000, France

²Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería 8, 33006, Oviedo, Spain

ABSTRACT: An accurate method has been developed to measure, in a single analytical run, $\delta^{34}\text{S}$ in sulfite, sulfate and thiosulfate in water samples by liquid chromatography combined with multicollector inductively coupled plasma mass spectrometry (MC-ICPMS). The method is based on the anionic exchange separation of sulfur species prior to their online isotope ratio determination by MC-ICPMS. Mass bias correction was accomplished by a novel approach based on the addition of an internal sulfur-containing standard to the sample. This innovative approach was compared to the sample-standard bracketing procedure. On-column isotopic fractionation was observed and therefore corrected by external calibration. Isotopic ratios were calculated by linear regression slope (LRS), an advantageous method for transient signals, leading to a combined uncertainty of $\delta^{34}\text{S}$ below 0.25‰ and a reproducibility below 0.5‰ for the injection of 1 μg of S. The method was successfully applied to the measurement of $\delta^{34}\text{S}$ in synthetic solutions and environmental water samples. Matrix effects leading to $\delta^{34}\text{S}$ overestimation were observed for sulfate in some samples with high sodium/sulfate mass ratios. The developed analytical procedure simplifies the $\delta^{34}\text{S}$ analysis of liquid environmental samples since preparation steps are no longer required and allows the analysis of several sulfur-containing species in a single run.



Sulfur is a key component of many natural environments, is involved in natural biogeochemical processes^{1,2} and can play an important role in the biodegradation of contaminants.³ Sulfur is highly reactive and can exist in different redox states (-II to +VI). Both reduction and oxidation of sulfur lead to large isotopic fractionation effects, which result in changes in the isotopic composition ($\delta^{34}\text{S}$) of individual sulfur species (sulfite, sulfate, thiosulfate, elemental sulfur, and tetrathionate).⁴⁻⁷ Thus, measurement of the sulfur isotopic composition of specific molecules is potentially very useful for understanding the isotope fractionation associated with the numerous redox reactions that characterize the modern sulfur cycle since the results combine molecular and isotopic information associated with fractionation mechanisms.

The conventional approach for sulfur isotopic analysis is based on the conversion of a sample to SO_2 by combustion in an elemental analyzer (EA) and determination of the $^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$ ratio in an isotope ratio mass spectrometer (IRMS). This kind of analysis is restricted to bulk materials, and 10 to 50 μg of sulfur are needed, consequently, for water samples with low sulfur concentration, large sample volumes (> 5 L) are required.^{8,9} Furthermore, the determination of $\delta^{34}\text{S}$ for dissolved individual species *via* this method requires a tedious and time-consuming sample preparation. Isolation of each individual species can be achieved through complex and laborious steps that can lead to isotopic fractionation and contamination. Sulfate is generally recovered by precipitation with barium ($K_s(\text{BaSO}_4) = 1.08 \cdot 10^{-10}$), but if the sample also contains sulfite, the

sulfite will also coprecipitate ($K_s(\text{BaSO}_3) = 5.0 \cdot 10^{-10}$).¹⁰

In recent years, it has been demonstrated that precise (0.1-1‰) measurements of $\delta^{34}\text{S}$ can be achieved by multicollector inductively coupled plasma mass spectrometry (MC-ICPMS) with sulfur sample requirements at the μg level.¹¹⁻¹⁵ These methods have highlighted the feasibility of bulk analysis of liquid samples by direct measurement with MC-ICPMS. Recently, Zakon *et al.*¹⁶ combined ion chromatography with MC-ICPMS for the analysis of $\delta^{34}\text{S}$, $\delta^{81}\text{Br}$, and $\delta^{37}\text{Cl}$ in individual anionic species and illustrated the potential for anion-specific analysis of inorganic sulfur by analyzing a solution of sulfate and thiosulfate. In this study, the objective was to develop a method for the online determination of $\delta^{34}\text{S}$ in sulfite, sulfate and thiosulfate by coupling liquid chromatography (LC) to MC-ICPMS. Conventionally, mass bias is corrected by sample-standard bracketing, which can be done with the same ion (compound-specific bracketing, CSB) or different species (compound-unspecific bracketing, CUB)¹⁷ as the analyte. In this study, we proposed a new approach based on the direct addition of an internal standard (trimethylsulfoxide, TMSO) to the sample. In addition, isotope ratios were calculated by the linear regression slope (LRS), a strategy originally developed by Fietzke *et al.*¹⁸ for Sr isotope analysis by laser ablation MC-ICPMS and further applied to gas chromatography MC-ICPMS¹⁷ and LC-MC-ICPMS.¹⁹⁻²¹ LRS analysis is a suitable data treatment protocol for the determination of isotope ratios with transient signals which improves the accuracy and precision of isotopic ratios over those of peak area integration and point-by-point computation. LRS analysis is an advantageous method since no background subtraction is needed, which is of great importance in the case of sulfur, which is present in trace amounts in the mobile phases and ICP gases used. In this work, we used this new approach for sulfur isotopic ratios for the first time, and efforts were made to minimize uncertainties of the LRS calculations by optimizing the peak zones used for these calculations.

EXPERIMENTAL SECTION

Reagents, Standards and Solutions. Ultrapure water (18.2 M Ω cm) obtained from a Milli-Q system (Millipore Co., Bedford, MA, USA) was used to prepare all solutions and for sample dilution. The reference materials IAEA-S3 (Ag_2S) and IAEA-S4 (elemental S) were purchased from the International Atomic Energy Agency (IAEA, Austria). Sulfamic acid ($\text{H}_3\text{NO}_3\text{S}$), used as an in-

house reference material, was purchased from OEA labs (UK). Each reference material was acid digested in a microwave (Ethos Touch Control, Milestone, Italy) with high-purity 70% nitric acid (J.T. Baker, UK) and subsequently diluted with ultrapure water, resulting in a sulfate solution.

Analytical standards of sulfite, sulfate and thiosulfate were purchased from different manufacturers to assess their variability. From Sigma-Aldrich (Germany), we purchased ammonium sulfate (>99%), ammonium thiosulfate (>98%), sodium thiosulfate pentahydrate (ACS), sodium sulfite (analytical standard), sodium sulfite (BioUltra), and sodium sulfate (ACS). Sodium sulfate (>99%) was purchased from VWR Prolabo (France), while sodium thiosulfate pentahydrate (ACS) was also purchased from Fluka (Germany) and Probus (Spain). Additional standards of sodium sulfate and sodium sulfite (Reag. Ph Eur) were purchased from Merck (Germany).

Synthetic solutions were prepared with sulfite, sulfate and thiosulfate to optimize the method parameters and to compare the results with those obtained by EA-IRMS; the solution compositions are summarized in Table 1. A total of 1% of formaldehyde was added to the sulfite stock solutions to prevent oxidation.

Table 1. Composition of Synthetic Solutions. The concentration of each anion is 10 $\mu\text{g/g}$ of S.

| Name | Sulfite | Sulfate | Thiosulfate |
|------------|---|---|---|
| Solution 1 | Na_2SO_3 (An. std.) Sigma-Aldrich | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (>99%) Sigma-Aldrich | $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$ (>98%) Sigma-Aldrich |
| Solution 2 | Na_2SO_3 (BioUltra) Sigma-Aldrich | Na_2SO_4 (ACS) VWR Prolabo | $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (ACS) Sigma-Aldrich |
| Solution 3 | Na_2SO_3 (ACS) Sigma-Aldrich | IAEA-S4 (mineralized) IAEA | $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Fluka |
| Solution 4 | Na_2SO_3 (Reag. Ph Eur) Merck | Na_2SO_4 (Reag. Ph Eur) Merck | $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (ACS) Probus |

Finally, formaldehyde (ACS, 37%), ammonium hydroxide (30%), ammonium nitrate (>99.5%), trimethylsulfoxonium chloride (TMSO) and silicon standard solution (1000 $\mu\text{g/g}$, TraceCERT) were obtained from Sigma-Aldrich (Germany).

Natural spring and river water samples originating from the Sivas Basin, Turkey, and

described elsewhere²² were used for comparison and validation purposes.

Instrumentation. The multicollector inductively coupled plasma mass spectrometer used was a Neptune Plus from Thermo-Fisher Scientific (Bremen, Germany) operated at medium resolution ($\Delta m/m = 5000$) to resolve polyatomic interferences ($^{16}\text{O}_2^+$ and $^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+$ on ^{32}S and ^{34}S , respectively) as previously described¹⁵. The instrument was equipped with 9 Faraday cups. The sample introduction system was a Micromist nebulizer and a Scott double-pass spray chamber. The sample gas flow, torch position and ion lens settings were optimized on a daily basis to obtain maximum sensitivity. The cup configuration was set to include ^{29}Si and ^{30}Si for possible internal mass bias correction. The axial Faraday cup (C) was fixed at mass 31.065 (amu) for interference-free measurements of ^{29}Si (L4), ^{30}Si (L1), ^{32}S (H1), and ^{34}S (H4) isotopes as previously described by Martínez-Sierra *et al.*¹¹ Unfortunately, the internal mass bias correction procedure using silicon failed and hence is not described in this paper. Although the measure of ^{33}S is possible it has not been attempted. The measurement of ^{36}S is not possible due to unresolved interferences of ^{36}Ar . Liquid chromatography separations were performed with a Surveyor LC Pump Plus (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany) using an anion exchange column Dionex IonPac AS15 (2 × 250 mm) and a guard column AG15 (2 × 50 mm) (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany). The stationary phase consisted of silica bonded with alkanol quaternary ammonium groups. The particle size was 7.5 μm . All separations were performed at room temperature with an eluent consisting of 40-100 mM ammonium nitrate (gradient elution) and 0.1% formaldehyde at pH 7 (adjusted with 30% NH_4OH). Samples and standards were diluted into the mobile phase before injection using a six-way rheodyne valve in the chromatographic system. The instrumental operating conditions and data acquisition parameters are listed in Table S-1 in the supporting information.

Calculation of Isotopic Ratios ($^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) and Delta Values ($\delta^{34}\text{S}$). Sulfur isotope ratios ($^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) were calculated by linear regression slope (LRS).^{17,18,21} The regression line is described by the following:

$$\text{Equation 1: } y = ax + b$$

where y and x represent the measured intensities (in V) of ^{34}S and ^{32}S , respectively; a is the slope of the linear regression and corresponds to the isotopic ratio $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ as shown by Frietzke *et al.*¹⁸; and b is the intercept of the line. The

measurement uncertainty of isotopic ratios corresponds to the standard deviation of the slope computed from at least 1000 data points (100% of the peak).^{17,18,21}

The delta value ($\delta^{34}\text{S}$) is always expressed against the VCDT scale in ‰ and was calculated against the standard as follows:

Equation 2:

$$\delta^{34}\text{S} = \left(\frac{\left(\frac{^{34}\text{S}}{^{32}\text{S}} \right)_{\text{Sample}}}{\left(\frac{^{34}\text{S}}{^{32}\text{S}} \right)_{\text{WS}}} \right) \times (\delta^{34}\text{S}_{\text{WS}} + 1) - 1$$

where WS is the working standard.

The combined uncertainty (u_c) of $\delta^{34}\text{S}$ is calculated following the Kragten spreadsheet method,²³ as recommended by Eurachem guideline²⁴. The Kragten spreadsheet method, based on the general error propagation formula, is a numerical method for calculating the combined uncertainty from measurement uncertainties. The contributors to u_c are the measurement uncertainty of sulfur isotope ratios ($^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) values obtained for both the working standard and the analyte. A coverage factor of $k = 2$ was used for an approximate level of confidence of 95%.

Four methods for the measurement of $\delta^{34}\text{S}$ were compared for accuracy and uncertainties: (1) Compound unspecific bracketing (CUB), where the standard is the average of two measurements of TMSO conducted before and after each sample; (2) internal standardization (IS), where the standard (TMSO) is added to the sample solution as an internal standard; (3) internal standardization combined with a correction by external calibration (ISEC), where $\delta^{34}\text{S}$ is first calculated with the IS method and standards of each anion are analyzed throughout the analytical procedure to build a calibration curve for each anion and then used to correct the $\delta^{34}\text{S}$ values. This method is an analogue of the data treatment usually performed when measuring $\delta^{34}\text{S}$ by EA-IRMS²⁵; and (4) Compound specific bracketing (CSB), where the standard is the same anion as the sample and consists of the average calculation of two measurements conducted before and after each sample.

RESULTS AND DISCUSSION

Chromatographic Operating Conditions. As reported by Lin & Jiang,²⁶ suitable separation of sulfite, sulfate and thiosulfate can be achieved using a mobile phase of ammonium nitrate (60 mM) and formaldehyde (0.1%). In this method, sulfite reacts with formaldehyde to form hydroxymethanesulfonate, a more stable species.²⁷ In this study, the previously developed method was modified using a gradient elution (40-100 mM NH_4NO_3) to include TMSO and obtain the maximum sensitivity for all ions while

maintaining baseline peak separation, as peak separation is better for measuring $\delta^{34}\text{S}$. A typical chromatogram is shown in Figure 1. Using the working parameters listed in Table S1, peak areas of 24, 26, 27 and 26 V.s per 1 μg of injected S were obtained for TMSO, sulfite, sulfate and thiosulfate, respectively. Since liquid chromatography enables separation of the four ions in 20 minutes, the isotope ratios of each ion can be measured, and TMSO can be used for internal standardization.

Mass Bias Correction. Different approaches to correct for mass bias and simultaneously measure the $\delta^{34}\text{S}$ values of sulfite, sulfate and thiosulfate in water samples were investigated. Three different solutions (1, 2 and 3) containing the three anions (10 $\mu\text{g/g}$ of S for each anion) from different manufacturers (Table 1) were analyzed to evaluate the $\delta^{34}\text{S}$ measurement uncertainties and accuracy of the four different approaches previously described in the experimental section. Internal correction based on the measurement of the $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ ratio in silicon added to the mobile phase (10 $\mu\text{g/g}$) was also evaluated. But this procedure resulted in very high errors ($>4\%$) in the measured $\delta^{34}\text{S}$ values due to the highly variable $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ ratio (see Figure S-1) and was therefore abandoned. As an alternative, we selected TMSO for addition to each solution for IS measurements.

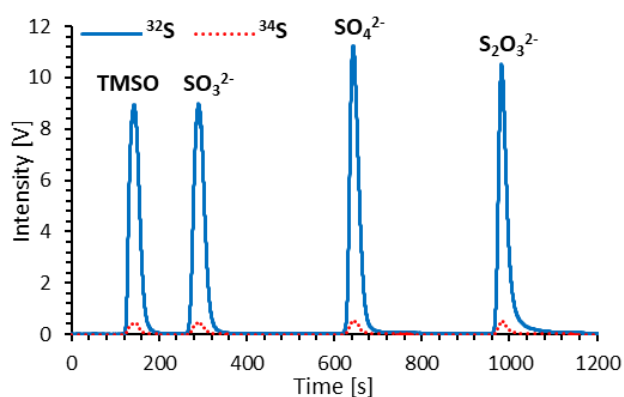


Figure 1. LC-MC-ICPMS analysis of a solution of Na_2SO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$ with TMSO as internal standard (10 $\mu\text{g/g}$ of S for each species).

Each compound was previously analyzed by EA-IRMS to determine its $\delta^{34}\text{S}$. Figure 2 shows $\delta^{34}\text{S}$ values measured by EA-IRMS for the different species in all analyzed solutions and by LC-MC-ICPMS with different measurement methods. A peak window of 100% was used for LRS calculations, as is common in other works.^{17,20} For the three anions, the results measured by IS and CUB were not significantly different (within 0.2‰) and the standard deviations of replicate analysis ($n=3$ for Solution 1, $n=2$ for Solutions 2 and 3) are not degraded between CUB and IS. This is in line with the work of Guéguen *et al.*²⁸ who

noted that mass bias correction with a single standard injection provides similar performance (0.05‰ to 0.28‰ for Samarium ratios) to that of a correction with two injected standards (0.04‰ to 0.61‰ for Neodymium ratios). The results obtained with IS and CUB are not significantly different from those obtained by EA-IRMS (within 0.6‰, 0.4‰ and 0.9‰ respectively for sulfite, sulfate and thiosulfate) except for sulfate and thiosulfate in Solution 3. However, in this work, we noticed a systematic positive bias for thiosulfate $\delta^{34}\text{S}$ (between 0.32 and 0.97‰) when measured with the IS and CUB methods. Some authors have noticed that isotopic fractionation can occur over the course of chromatographic separation, leading to a variation of isotopic ratio during peak elution.^{20,29,30} In this study, the chromatographic separation run took 20 minutes, and on-column isotopic fractionation could be a possible explanation for the observed bias on thiosulfate $\delta^{34}\text{S}$ value. Figure 3 shows the signal of ^{32}S and the $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ isotopic ratio in function of the elution time for TMSO, sulfite, sulfate and thiosulfate. No drift was observed on the $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ isotopic ratio for the TMSO. Conversely, a significant drift of the isotopic ratio was observed for the three anions. The $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ ratios decrease through elution, suggesting an isotopic fractionation with a faster elution of heavy isotopes. The amplitude of the drift is 0.4‰ for sulfite, 1.4‰ for sulfate and 2.0‰ for thiosulfate. Therefore, the amplitude of the drift increases with the retention time. The difference in retention time and thus in the drift amplitude between TMSO and thiosulfate could explain the observed bias on the thiosulfate $\delta^{34}\text{S}$ values. To investigate this phenomenon, we analyzed a solution of sulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) and thiosulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$) using four different elution gradients with the same batch of mobile phase to obtain different retention times for the same anions. If isotopic fractionation during elution does not take place, the retention time should not affect $\delta^{34}\text{S}$. The results for $\delta^{34}\text{S}$ measured by IS are reported in Table 2. For both sulfate and thiosulfate, the measured $\delta^{34}\text{S}$ increased with retention time, by up to 0.7‰ and 1‰, respectively. Therefore, the observed bias on the $\delta^{34}\text{S}$ value depends on retention time. This suggests that a correction with an anion eluted at the same retention time is required to avoid the bias on $\delta^{34}\text{S}$.

To correct the $\delta^{34}\text{S}$ bias induced by on-column isotopic fractionation, anion-specific calibration is required; thus, we coupled the IS method with an anion-specific external calibration method (ISEC). The first replicate of each synthetic solution was considered as the “standard”, and its

$\delta^{34}\text{S}$, measured previously by EA-IRMS, was used as a reference value to create a calibration curve for each species. The linear regression coefficients of the calibration curves were then used to correct the data. With this method, there is no systematic error. The results for the three anions are not significantly different from those obtained by EA-IRMS (within 0.2‰, 0.4‰ and 0.3‰ respectively for sulfite, sulfate and thiosulfate) (Figure 2).

CSB was also evaluated. As highlighted in Figure 2, standard deviations for sulfite and sulfate were larger with CSB (0.2-0.3‰ and 0.6-0.9‰, respectively) than with ISEC (0.01-0.2‰ and 0.3-0.6‰, respectively). Also, the Figure 2 shows that the accuracy is degraded with the CSB in comparison to the ISEC method. Furthermore, the $\delta^{34}\text{S}$ of sulfate in Solution 3 appears significantly different from the certified value. In this solution the sulfate comes from mineralized elemental sulfur (IAEA-S4), which has a very different matrix than the bracketing standards. The correction of mass bias by sample standard bracketing requires no difference in matrix between the standard and sample because the matrix can affect the mass bias inside the mass spectrometer.³¹ Consequently, we assume that such error on $\delta^{34}\text{S}$ is likely due to such matrix effects. In contrast, when using ISEC, mass bias and on-column isotopic fractionation are corrected with an internal standard added to the sample and anion-specific external calibration, respectively, which makes ISEC a robust method. Our results demonstrate that ISEC is the most accurate and robust method to simultaneously measure $\delta^{34}\text{S}$ in sulfite, sulfate and thiosulfate. Thus, this approach was chosen and applied for sample analyses.

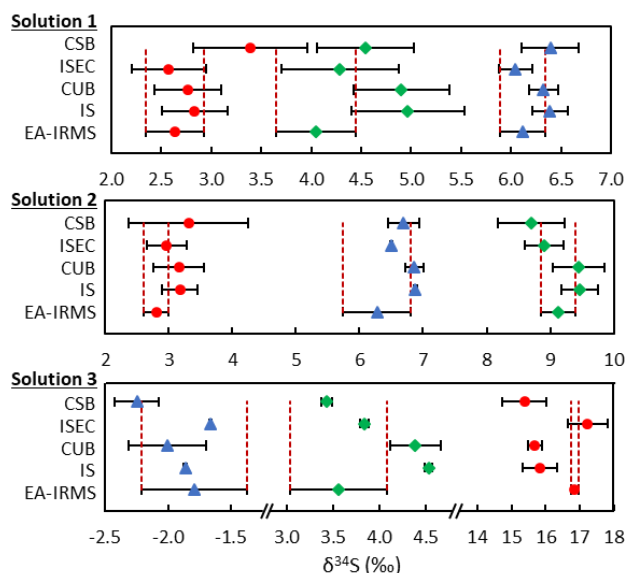


Figure 2. $\delta^{34}\text{S}$ of sulfite (\blacktriangle), sulfate (\bullet) and thiosulfate (\blacklozenge) in synthetic solutions 1, 2 and 3 measured by EA-IRMS (50 $\mu\text{g-S}$, $n \geq 2$) and LC-MC-ICPMS (1 $\mu\text{g-S}$, $n=3$ for Solution 1, $n=2$ for Solutions 2 & 3) with the measurement methods IS, CUB, ISEC and CSB. Note that in some cases the error bars are smaller than the symbol.

Table 2. $\delta^{34}\text{S}$ and retention time (t_R) for Ammonium Sulfate and Ammonium Thiosulfate with Different Gradient Elutions. The given uncertainty for $\delta^{34}\text{S}$ is the combined uncertainty (u_c).

| Sample | t_R [s] | $\delta^{34}\text{S}$ [‰] |
|--|-----------|---------------------------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Sigma-Aldrich | 395 | 1.93 ± 0.40 |
| | 583 | 2.46 ± 0.33 |
| | 607 | 2.53 ± 0.47 |
| | 625 | 2.98 ± 0.44 |
| $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$ Sigma-Aldrich | 831 | 4.71 ± 0.50 |
| | 941 | 5.05 ± 0.54 |
| | 959 | 5.24 ± 0.57 |
| | 971 | 5.43 ± 0.52 |

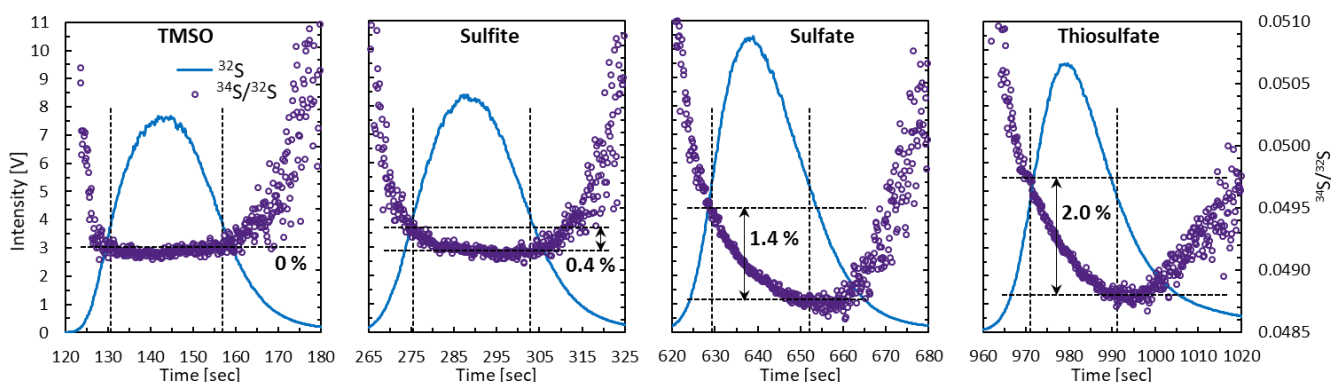


Figure 3. Measured ^{32}S signal (Solution 1, 10 $\mu\text{g/g}$ of S for each ion) by LC-MC-ICPMS and $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ isotopic ratio across elution of TMSO, sulfite, sulfate and thiosulfate. The approximate amplitude of the isotopic drift was estimated by the variation of the isotopic ratios between the two horizontal lines (at elution times corresponding to 50% of the signal maximum for ^{32}S).

Optimization of the Peak Zone for LRS Calculation. It has been demonstrated that better results are obtained when LRS is performed on the full peak zone (100%) rather than smaller zones and that the standard deviation of the measured isotopic ratio depends on the regression coefficient (R^2) of the linear function.¹⁷ In this study, we evaluated the possibility of calculating the isotopic ratio with larger peak zones, up to 300% of the peak (Figure 4C). Furthermore, we determined the peak zone between 100% and 300% of the peak providing the maximum R^2 of the linear function and the peak zone providing the minimum slope standard deviation by an iterative algorithm implemented as a Visual Basic code within Microsoft Excel (more details in SI). The different isotope ratio calculation methods were applied to the data obtained from previous analysis of the synthetic solutions to recalculate $\delta^{34}\text{S}$ values. To obtain a simple estimator of accuracy for each peak zone, the root-mean-square error (RMSE) expressed in ‰ was calculated as follows:

Equation 3:

$$RMSE = \sqrt{\sum (\delta^{34}S_{EA-IRMS} - \delta^{34}S_{LC-MC-ICPMS})^2 / n}$$

where $\delta^{34}S_{EA-IRMS}$ and $\delta^{34}S_{LC-MC-ICPMS}$ are the $\delta^{34}\text{S}$ values determined by EA-IRMS and LC-MC-ICPMS, respectively, and n is the number of samples. Here, $n = 7$ for each anion in each calculation. RMSE takes into account the differences ($\delta^{34}S_{EA-IRMS} - \delta^{34}S_{LC-MC-ICPMS}$) of a whole sample list, allowing a simple comparison of accuracy among different data treatments. For each peak zone, one RMSE per anion were calculated (see Figure 4A). For sulfite and thiosulfate, there was no significant change in RMSE whatever the peak zone tested; in contrast, for sulfate, RMSE decreased from 0.351‰ for a peak zone of 100% to 0.300‰ for a peak zone of 300% and 0.296‰ when the peak zone is selected to have the lowest slope standard deviation (zone for $u_{\text{slope min}}$). Considering the three anions, the slope standard deviation minimization provided the most accurate calculation of $\delta^{34}\text{S}$ values, as this condition led to the minimum RMSE.

The mean combined uncertainties (u_c) for each anion were calculated (Figure 4B). As expected, the combined uncertainty decreased with the expansion of the peak zone, the lowest values being obtained for a peak zone of 300% and for a peak zone selected by slope standard deviation minimization. Thus, u_c decreases from 0.12, 0.34 and 0.38‰ when 100% of the peak is taken to 0.09, 0.18 and 0.23‰, with peak zones of 300% or slope standard deviation minimization, respectively for sulfite, sulfate and thiosulfate.

These results are not surprising since the contributors to u_c are the slope standard deviations (corresponding to $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) of the internal standard and of the analyte (equation 1) and thus minimizing the slope standard deviation leads to a minimized u_c . These results suggest that expanding the peak zone for LRS calculation, including baseline points and selecting the peak zone in order to maximize the R^2 or minimize the slope standard deviation of the linear function, improves the accuracy of the measurements and leads to lower combined uncertainties. Minimization of slope standard deviation works best. The inclusion of baseline points in the LRS calculation leads to a better estimation of the b terms of equation 1 (b is correlated with the background signal) and consequently to a better estimation of the isotope ratio. Slope standard deviation minimization was selected to define the peak zones for LRS calculations since this approach improves accuracy and decreases significantly the combined uncertainty.

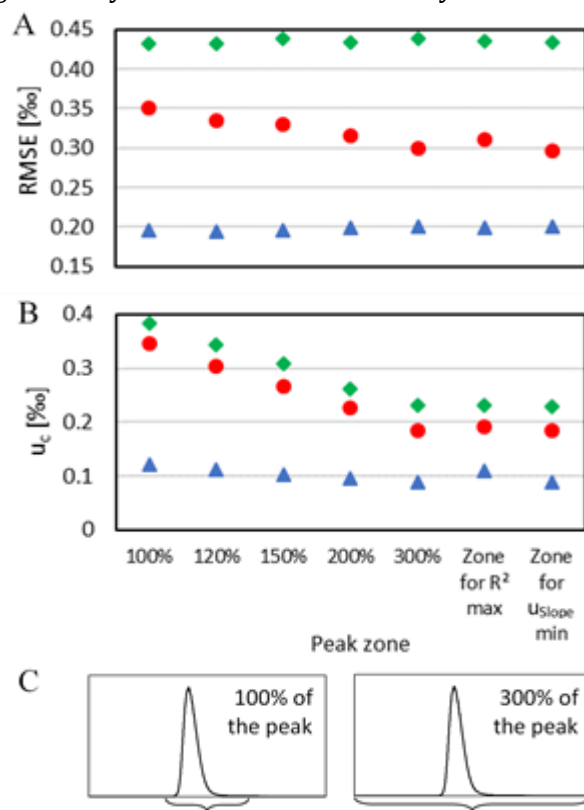


Figure 4. Determination of (A) RMSE and (B) mean combined uncertainty (u_c) of $\delta^{34}\text{S}$ obtained for sulfite (\blacktriangle), sulfate (\bullet) and thiosulfate (\blacklozenge) according to the peak zone selected for LRS calculation: values from 100 to 300% represent the peak zone selected as presented in figure C; “Zone for R^2 max” refers to the peak zone required to have the highest R^2 of the linear function and “Zone for $u_{\text{slope min}}$ ” refers to the peak zone required to have the lowest slope standard deviation of the linear function.

Here, we demonstrated that LRS taken together with ISEC leads to a combined uncertainty lower than 0.25‰ for anion-specific measurements of inorganic sulfur; this result is comparable to those obtained by Hanousek *et al.*¹², i.e., 0.3‰ for sulfate $\delta^{34}\text{S}$ measurement by MC-ICPMS. Standard deviations of replicate injections ($n=3$) of 0.20‰, 0.37‰ and 0.56‰ were obtained for sulfite, sulfate and thiosulfate, respectively, which are in the range of those previously obtained for $\delta^{34}\text{S}$ measurement by MC-ICPMS (0.1-0.5‰).¹¹⁻¹⁵

Analytical Validation by Analysis of Synthetic and Environmental Samples. The developed procedure for simultaneously measuring $\delta^{34}\text{S}$ in sulfite, sulfate and thiosulfate was applied to synthetic solutions (pure salts in water; mineralized certified reference materials IAEA-S3 and IAEA-S4 and mineralized in-house material $\text{H}_3\text{NO}_3\text{S}$) and environmental water samples described elsewhere.²²

All samples were diluted in the mobile phase to a final concentration of 10 $\mu\text{g/g}$ of S per anion and TMSO was added at the same concentration. The results were then compared to the reported $\delta^{34}\text{S}$ values. As shown in Figure 5, the measured values were in good agreement (within 0.5‰) with reported values for all samples and all anions except for some of the environmental water samples for which, the $\delta^{34}\text{S}$ values measured by LC-MC-ICPMS appeared higher than the reported ones (more details in Table S-2). Such differences could be blamed on the extremely high Na^+

content relative to SO_4^{2-} concentration in those samples, the $[\text{Na}^+]/[\text{SO}_4^{2-}]$ mass ratio being systematically greater than 10. Such matrix effect was also observed by Hanousek *et al.*, Lin *et al.* and Liu *et al.* for the direct measurement of sulfate in water by MC-ICPMS.^{12,32,33} Hanousek *et al.*¹² indicated that the addition of Na^+ caused a significant decrease in $\delta^{34}\text{S}$. In our case, we observed an increase in $\delta^{34}\text{S}$ due to the online anionic separation and internal standardization. Indeed, Na^+ eluted in the dead volume together with the TMSO (cation) used for $\delta^{34}\text{S}$ measurement, so this process likely causes the decrease in $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ of TMSO and consequently the $\delta^{34}\text{S}$ overestimation observed for sulfate. It is worth stressing, however, that it is rare to find $[\text{Na}^+]/[\text{SO}_4^{2-}]$ mass ratios greater than 10 in modern seawater, rivers and aquifers.³⁴⁻³⁷ Estimation of the effect of sulfur concentration on the combined uncertainty was attempted by diluting ammonium sulfate to 1 $\mu\text{g S/g}$ and by applying reanalysis. The obtained value of $\delta^{34}\text{S}$ was $2.74 \pm 0.37\text{‰}$, showing a slight increase relative to the u_c of 0.18‰ obtained for the same anion at 10 $\mu\text{g S/g}$. Reproducibility was estimated by analyzing Solution 1 in different analytical sessions ($n = 7$). The following results were obtained: $\delta^{34}\text{S}_{\text{Sulfite-1}} = 6.00 \pm 0.26\text{‰}$; $\delta^{34}\text{S}_{\text{Sulfate-1}} = 2.58 \pm 0.26\text{‰}$; and $\delta^{34}\text{S}_{\text{Thiosulfate-1}} = 4.33 \pm 0.50\text{‰}$. These results are in agreement with the reproducibility typically obtained (0.1-1‰) for $\delta^{34}\text{S}$ by MC-ICPMS.^{13-15,32,33}

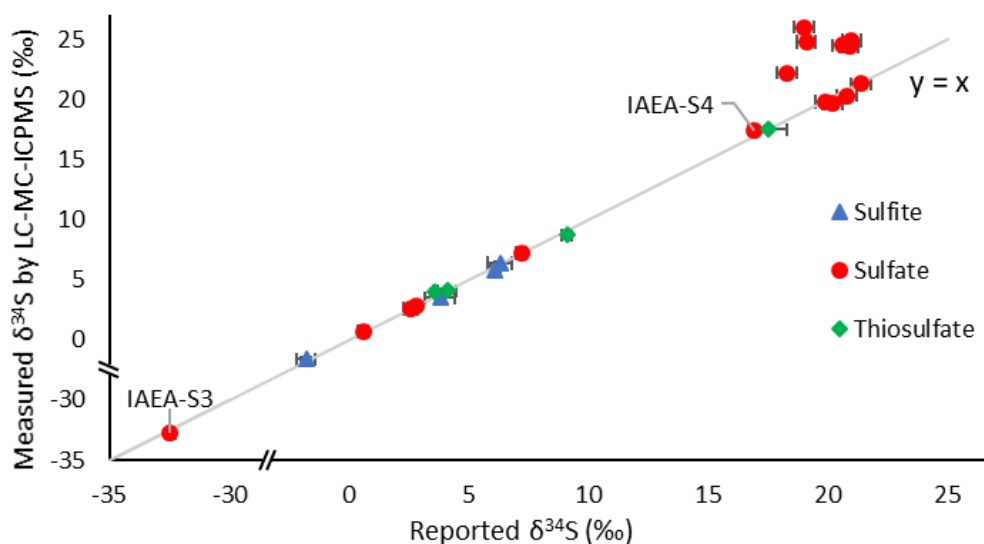


Figure 5. $\delta^{34}\text{S}$ for Measured Samples Obtained in this Work Compared with Reported Values. For LC-MC-ICPMS measurements, solutions and samples were diluted in the mobile phase to a final concentration of 10 $\mu\text{g/g}$ of S per anion and TMSO was added at the same concentration. The given uncertainty for LC-MC-ICPMS measurements represents the combined uncertainty (u_c) whereas for reported values it is the reported standard deviation. Reported delta values for synthetic solutions 1, 2, 3, 4 and the in-house material $\text{H}_3\text{NO}_3\text{S}$ were determined by EA-IRMS in this study. Reported delta values for IAEA-S3 and IAEA-S4 were determined by SF_6 -IRMS and MC-TIMS in ref³⁶ and by EA-IRMS in ref³⁷, respectively. Reported delta values for environmental waters where measured by EA-IRMS in ref²⁰. In some cases the uncertainty is smaller than the symbol. Complete numerical data is provided in Table S-2.

CONCLUSIONS

We have developed herein a simple, accurate and precise method for sulfur isotope composition ($\delta^{34}\text{S}$) analysis of sulfite, sulfate and thiosulfate in a single run using LC-MC-ICPMS. We demonstrated the applicability of linear regression slope for sulfur isotope ratio calculations in transient signals and the further improvement of the results by using an algorithm that minimizes the slope standard deviation of the linear function. We compared mass bias correction by internal standardization, compound unspecific bracketing, compound specific bracketing and internal standardization combined with a correction by external calibration. The latter is the more accurate and robust method for mass bias correction. In addition, avoiding sample-standard bracketing enhances sample throughput and may be useful for samples for which matrix matching remains difficult. The developed LC-MC-ICPMS method allows the analysis of $\delta^{34}\text{S}$ in sulfite, sulfate and thiosulfate in a single chromatographic run with a reproducibility better than 0.3‰ for sulfite and sulfate and better than 0.5‰ for thiosulfate for 1 μg of injected sulfur (per species); these reproducibilities are close to those obtained by EA-IRMS (0.1-0.5‰).^{22,25,40} This online method considerably simplifies the analysis of environmental water samples since sample preparation and purification steps are no longer required and the time of analysis is reduced. Notably, only 1 $\mu\text{g-S}$ is required, whereas the minimum amount for EA-IRMS is 33 $\mu\text{g-S}$.³⁸

The application of our innovative methodology to synthetic solutions and environmental water samples shows the high accuracy achievable and points out the limitation of the method. Indeed, sample with $[\text{Na}^+]/[\text{SO}_4^{2-}]$ greater than 10 causes a significant bias in the measured $\delta^{34}\text{S}$, but such large $[\text{Na}^+]/[\text{SO}_4^{2-}]$ is an extreme case. However, this limitation can be easily circumvented by selecting a different spiked standard, dithionate could be suitable as it will elutes after thiosulfate and will not coelute with cations²⁷. Another alternative would be cation removal, this could be done using a suppressor unit after the ionic separation or by sample purification prior to analysis through an anion or cation exchange resin.^{12,14,16} We believe our work has strong potential and could be a basis for many applications because this $\delta^{34}\text{S}$ measurement method can be applied to most environmental water samples. Also, this method could be a powerful tool for studying oxidation and reduction processes of sulfur where intermediate

valence sulfur anions such as sulfite and thiosulfate are formed.^{5,41,42}

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Instrumental parameters, Operating conditions and Data acquisition parameters, Silicon isotope ratio variability, Peak definition for LRS calculations, Delta values of water samples. SI_1.pdf

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: isabelle.lehecho@univ-pau.fr

Author Contributions

MM performed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript, JIG co-designed and supervised the experiments, CP supervised the experiments and the PhD work, JRE supervised the experiments, ILH supervised the PhD work, designed the study and corrected the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support of the Regional Council Nouvelle Aquitaine (Aquitrac project 20131206001-13010973) and ISIFOR. Guilhem Hoareau is thanked for providing environmental water samples.

REFERENCES

- (1) Kaplan, I. R.; Rittenberg, S. C. Microbiological Fractionation of Sulphur Isotopes. *J. Gen. Microbiol.* **1964**, *34*, 195–212.
- (2) Canfield, D. E. Isotope Fractionation by Natural Populations of Sulfate-Reducing Bacteria. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2001**, *65* (7), 1117–1124. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(00\)00584-6](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(00)00584-6).
- (3) Knöller, K.; Vogt, C.; Feisthauer, S.; Weise, S. M.; Weiss, H.; Richnow, H.-H. Sulfur Cycling and Biodegradation in Contaminated Aquifers: Insights from Stable Isotope Investigations. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42* (21), 7807–7812. <https://doi.org/10.1021/es800331p>.
- (4) Stefánsson, A.; Keller, N. S.; Robin, J. G.; Ono, S. Multiple Sulfur Isotope Systematics of Icelandic Geothermal Fluids and the Source and Reactions of Sulfur in Volcanic Geothermal Systems at Divergent Plate Boundaries. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2015**, *165*, 307–323. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2015.05.045>.
- (5) Leavitt, W. D.; Cummins, R.; Schmidt, M. L.; Sim, M. S.; Ono, S.; Bradley, A. S.; Johnston, D. T. Multiple Sulfur Isotope Signatures of Sulfite and Thiosulfate Reduction by the Model Dissimilatory Sulfate-Reducer, *Desulfovibrio Alaskensis* Str. G20. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00591>.
- (6) Gilhooly III, W. P.; Reinhard, C. T.; Lyons, T. W. A Comprehensive Sulfur and Oxygen Isotope Study of Sulfur Cycling in a Shallow, Hyper-Euxinic Meromictic Lake. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2016**, *189*, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2016.05.044>.
- (7) Fry, B.; Gest, H.; Hayes, J. M. Isotope Effects Associated with the Anaerobic Oxidation of Sulfite and Thiosulfate by the Photosynthetic Bacterium, *Chromatium Vinosum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1985**, *27* (2), 227–232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1985.tb00672.x>.
- (8) Mayer, B.; Krouse, H. R. Chapter 26 - Procedures for Sulfur Isotope Abundance Studies. In *Handbook of Stable Isotope Analytical Techniques*; de Groot, P. A.,

- Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2004; pp 538–596. <https://doi.org/10.1016/B978-044451114-0/50028-4>.
- (9) Mayer, B.; Feger, K. H.; Giesemann, A.; Jäger, H.-J. Interpretation of Sulfur Cycling in Two Catchments in the Black Forest (Germany) Using Stable Sulfur and Oxygen Isotope Data. *Biogeochemistry* **1995**, *30* (1), 31–58. <https://doi.org/10.1007/BF02181039>.
- (10) David R. Lide, (Editor-in-Chief, National Institute of Standards and Technology). Handbook of Chemistry and Physics, 87th Edition. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**. <https://doi.org/10.1021/ja069813z>.
- (11) Giner Martínez-Sierra, J.; Santamaria-Fernandez, R.; Hearn, R.; Marchante Gayón, J. M.; García Alonso, J. I. Development of a Direct Procedure for the Measurement of Sulfur Isotope Variability in Beers by MC-ICP-MS. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (7), 4043–4050. <https://doi.org/10.1021/jf9019213>.
- (12) Hanousek, O.; Berger, T. W.; Prohaska, T. MC ICP-MS δ ³⁴S VCDT Measurement of Dissolved Sulfate in Environmental Aqueous Samples after Matrix Separation by Means of an Anion Exchange Membrane. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408* (2), 399–407. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9053-z>.
- (13) Yu, T.-L.; Wang, B.-S.; Shen, C.-C.; Wang, P.-L.; Yang, T. F.; Burr, G. S.; Chen, Y.-G. Improved Analytical Techniques of Sulfur Isotopic Composition in Nanomole Quantities by MC-ICP-MS. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *988*, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.08.012>.
- (14) Paris, G.; Sessions, A. L.; Subhas, A. V.; Adkins, J. F. MC-ICP-MS Measurement of Δ ³⁴S and Δ ³³S in Small Amounts of Dissolved Sulfate. *Chem. Geol.* **2013**, *345*, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2013.02.022>.
- (15) Clough, R.; Evans, P.; Catterick, T.; Evans, E. H. Δ ³⁴S Measurements of Sulfur by Multicollector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (17), 6126–6132. <https://doi.org/10.1021/ac060875h>.
- (16) Zakon, Y.; Halicz, L.; Gelman, F. Isotope Analysis of Sulfur, Bromine, and Chlorine in Individual Anionic Species by Ion Chromatography/Multicollector-ICPMS. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (13), 6495–6500. <https://doi.org/10.1021/ac5010025>.
- (17) Epov, V. N.; Beraïl, S.; Jimenez-Moreno, M.; Perrot, V.; Pecheyran, C.; Amouroux, D.; Donard, O. F. X. Approach to Measure Isotopic Ratios in Species Using Multicollector-ICPMS Coupled with Chromatography. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (13), 5652–5662. <https://doi.org/10.1021/ac100648f>.
- (18) Fietzke, J.; Liebetrau, V.; Günther, D.; Gürs, K.; Hametner, K.; Zumholz, K.; Hansteen, T. H.; Eisenhauer, A. An Alternative Data Acquisition and Evaluation Strategy for Improved Isotope Ratio Precision Using LA-MC-ICP-MS Applied to Stable and Radiogenic Strontium Isotopes in Carbonates. *J. Anal. At. Spectrom.* **2008**, *23* (7), 955. <https://doi.org/10.1039/b717706b>.
- (19) Yang, L.; Zhou, L.; Hu, Z.; Gao, S. Direct Determination of Si Isotope Ratios in Natural Waters and Commercial Si Standards by Ion Exclusion Chromatography Multicollector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (18), 9301–9308. <https://doi.org/10.1021/ac5025396>.
- (20) Guéguen, F.; Isnard, H.; Nonell, A.; Vio, L.; Vercouter, T.; Chartier, F. Neodymium Isotope Ratio Measurements by LC-MC-ICPMS for Nuclear Applications: Investigation of Isotopic Fractionation and Mass Bias Correction. *J. Anal. Spectrom.* **2015**, *30*, 443–452. <https://doi.org/10.1039/C4JA00361F>.
- (21) Rodríguez-Castrillón, J. A.; García-Ruiz, S.; Moldovan, M.; García Alonso, J. I. Multiple Linear Regression and On-Line Ion Exchange Chromatography for Alternative Rb-Sr and Nd-Sm MC-ICP-MS Isotopic Measurements. *J. Anal. At. Spectrom.* **2012**, *27* (4), 611–618. <https://doi.org/10.1039/c2ja10274a>.
- (22) Pichat, A.; Hoareau, G.; Callot, J.-P.; Legeay, E.; Kavak, K. S.; Révillon, S.; Parat, C.; Ringenbach, J.-C. Evidence of Multiple Evaporite Recycling Processes in a Salt-Tectonic Context, Sivas Basin, Turkey. *Terra Nova* **2018**, *30* (1), 40–49. <https://doi.org/10.1111/ter.12306>.
- (23) Kragten, J. Tutorial Review. Calculating Standard Deviations and Confidence Intervals with a Universally Applicable Spreadsheet Technique. *Analyst* **1994**, *119* (10), 2161–2165. <https://doi.org/10.1039/AN9941902161>.
- (24) Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements, 3rd Edition. 2012.
- (25) Grassineau, N. V. High-Precision EA-IRMS Analysis of S and C Isotopes in Geological Materials. *Appl. Geochem.* **2006**, *21* (5), 756–765. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2006.02.015>.
- (26) Lin, L.-Y.; Jiang, S.-J. Determination of Sulfur Compounds in Water Samples by Ion Chromatography Dynamic Reaction Cell Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *J. Chin. Chem. Soc.* **2009**, *56* (5), 967–973. <https://doi.org/10.1002/jccs.200900141>.
- (27) O'Reilly, J. W.; Dicoski, G. W.; Shaw, M. J.; Haddad, P. R. Chromatographic and Electrophoretic Separation of Inorganic Sulfur and Sulfur-Oxygen Species. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *432* (2), 165–192. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)01389-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)01389-1).
- (28) Guéguen, F.; Nonell, A.; Isnard, H.; Vio, L.; Chartier, F. Multi-Elemental Gd, Eu, Sm, Nd Isotope Ratio Measurements by Liquid Chromatography Coupled to MC-ICPMS with Variable Faraday Cup Configurations during Elution. *Talanta* **2017**, *162*, 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.030>.
- (29) Karasinski, J.; Bulska, E.; Wojciechowski, M.; Krata, A. A.; Halicz, L. On-Line Separation of Strontium from a Matrix and Determination of the Sr/Sr Ratio by Ion Chromatography/Multicollector-ICPMS. *J. Anal. Spectrom.* **2016**, *31*, 1459–1463. <https://doi.org/10.1039/C6JA00109B>.
- (30) Gourgiotis, A.; Manhès, G.; Martelat, B.; Isnard, H. Deconvolution of the Isotopic Drift in LC-MC-ICPMS Coupling: A New Tool for Studying Isotope Fractionation Induced by Sample Introduction Techniques. *J. Anal. Spectrom.* **2017**. <https://doi.org/10.1039/C6JA00418K>.
- (31) Albarède, F.; Telouk, P.; Blichert-Toft, J.; Boyet, M.; Agranier, A.; Nelson, B. Precise and Accurate Isotopic Measurements Using Multiple-Collector ICPMS. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2004**, *68* (12), 2725–2744. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2003.11.024>.
- (32) Lin, A.-J.; Yang, T.; Jiang, S.-Y. A Rapid and High-Precision Method for Sulfur Isotope δ ³⁴S Determination with a Multiple-Collector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer: Matrix Effect Correction and Applications for Water Samples without Chemical Purification: Sulfur Isotope δ ³⁴S Determination by MC-ICP-MS. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2014**, *28* (7), 750–756. <https://doi.org/10.1002/rcm.6838>.
- (33) Liu, C.; Bian, X.-P.; Yang, T.; Lin, A.-J.; Jiang, S.-Y. Matrix Effects of Calcium on High-Precision Sulfur Isotope Measurement by Multiple-Collector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Talanta* **2016**, *151*, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.01.013>.
- (34) Riley, J. P.; Chester, R. *Introduction to Marine Chemistry*; Academic Press: London, New York, 1971.
- (35) Livingstone, D. A. *Chemical Composition of Rivers and Lakes*; Professional Paper; USGS Numbered Series 440-G; 1963.
- (36) André, L.; Franceschi, M.; Pouchan, P.; Atteia, O. Using Geochemical Data and Modelling to Enhance the Understanding of Groundwater Flow in a Regional

- Deep Aquifer, Aquitaine Basin, South-West of France. *J. Hydrol.* **2005**, *305* (1-4), 40-62. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2004.08.027>.
- (37) Roy, R. N.; Roy, L. N.; Vogel, K. M.; Porter-Moore, C.; Pearson, T.; Good, C. E.; Millero, F. J.; Campbell, D. M. The Dissociation Constants of Carbonic Acid in Seawater at Salinities 5 to 45 and Temperatures 0 to 45°C. *Mar. Chem.* **1993**, *44* (2-4), 249-267. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(93\)90207-5](https://doi.org/10.1016/0304-4203(93)90207-5).
- (38) Mann, J. L.; Vocke, R. D.; Kelly, W. R. Revised $\Delta^{34}\text{S}$ Reference Values for IAEA Sulfur Isotope Reference Materials S-2 and S-3. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23* (8), 1116-1124. <https://doi.org/10.1002/rcm.3977>.
- (39) Qi, H. P.; Coplen, T. B. Evaluation of the $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Ratio of Soufre de Lacq Elemental Sulfur Isotopic Reference Material by Continuous Flow Isotope-Ratio Mass Spectrometry. *Chem. Geol.* **2003**, *199* (1), 183-187. [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(03\)00075-5](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(03)00075-5).
- (40) Thomas, F.; Jamin, E.; Shimoo, K.; Nagao, J.; Osaki, Y.; Granier, C. The Use of Multi-Element Stable Isotope Analysis to Monitor the Origin of Chondroitin Sulfates: Monitoring the Origin of Chondroitin Sulfates. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25* (17), 2533-2537. <https://doi.org/10.1002/rcm.5159>.
- (41) Jørgensen. The Sulfur Cycle of Freshwater Sediments: Role of Thiosulfate. *Limnol. Oceanogr.* **1990**, *35* (6), 1329-1342. <https://doi.org/10.4319/lo.1990.35.6.1329>.
- (42) Zhang, J.-Z.; Millero, F. J. The Products from the Oxidation of H_2S in Seawater. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1993**, *57* (8), 1705-1718. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(93\)90108-9](https://doi.org/10.1016/0016-7037(93)90108-9).

Anion-specific sulfur isotope analysis by liquid chromatography coupled to multicollector ICPMS

Mathieu Martinez¹, Jose Ignacio Garcia-Alonso², Corinne Parat¹, Jorge Ruiz Encinar², Isabelle Le Hécho^{1*}

¹CNRS / Univ. Pau & Pays de l'Adour / E2S UPPA, Institut des Sciences Analytiques et de Physico-Chimie pour l'Environnement et les Matériaux, UMR 5254, 2 avenue Pierre Angot, Pau, 64000, France

²Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería 8, 33006, Oviedo, Spain

Corresponding Author

*E-mail: isabelle.lehecho@univ-pau.fr

Table of contents

1. Table S-1. LC-MC-ICPMS Working and Data Acquisition Parameters for the Measurement of Sulfur Isotope Ratios (p. S-2)
2. Si mass bias correction (p. S-3)
3. Figure S-1. LC-MC-ICPMS analysis of a solution of Na₂SO₃, Na₂SO₄ and Na₂S₂O₃ with TMSO as an internal standard (10 µg/g of S for each species). (p. S-3)
4. Peak definition and range of points for linear regression slope (LRS) calculations (p. S-3)
5. Table S-2. δ³⁴S for Measured Samples Obtained in this Work Compared to Reported Values. For LC-MC-ICPMS measurements, solutions and samples were diluted in the mobile phase to a final concentration of 10 µg/g of S per anion and TMSO was added at the same concentration. (p. S-4)
6. Reference of supporting information (p. S-4)

Table S-1. LC-MC-ICPMS Working and Data Acquisition Parameters for the Measurement of Sulfur Isotope Ratios

| Neptune Plus MC-ICPMS Operating Conditions | | | | | |
|--|---|------------------|--------|-----------------|-----------------|
| Rf power | 1350 W | | | | |
| Cool gas flow | 14.0 L/min Ar | | | | |
| Auxiliary gas flow | 0.7 L/min Ar | | | | |
| Sample gas flow | 0.9 - 1.0 L/min Ar | | | | |
| Sampler and skimmer cones | Ni | | | | |
| Extraction voltage | -2000 V | | | | |
| Focus lens | 15 V | | | | |
| Dispersion lens | -5 V | | | | |
| Resolution mode | Medium | | | | |
| Faraday cup configuration | L4 | L1 | C | H1 | H4 |
| | ²⁹ Si | ³⁰ Si | 31.065 | ³² S | ³⁴ S |
| Acquisition method | 1 block, 9160 cycles, 0.131 s integration | | | | |
| Liquid Chromatography Parameters | | | | | |
| Column | Dionex IonPac AS15, 2 × 250 mm + AG15, 2 × 50 mm | | | | |
| Eluent | NH ₄ NO ₃ 100 mM, 0.1% HCOH, pH = 7 (eluent A); 0.1% HCOH, pH = 7 (eluent B) | | | | |
| Flow rate | 0.25 mL/min | | | | |
| Injection volume | 100 μL | | | | |
| Gradient 0 to 4 min | 40% to 60% A | | | | |
| Gradient 4 to 8 min | 60% to 100% A | | | | |

Suppressor unit and desolvator unit were not used in this work. All tubes and connections used are made of polyetheretherketone (PEEK). Liquid chromatography and MC-ICPMS are connected with a PEEK tubing from the column outlet to the nebulizer inlet.

Si mass bias correction:

The $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ isotope ratio is highly variable and not correlated with elution of the sulfur anions (Figure S-1). The correction of $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ isotope ratio by $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ isotope ratio leads to very high errors ($>4\%$) in delta values. We assume it is due to the addition of silicon directly into the mobile phase and possible interaction between silicon and the column stationary phase. A post-column addition would be more suitable.

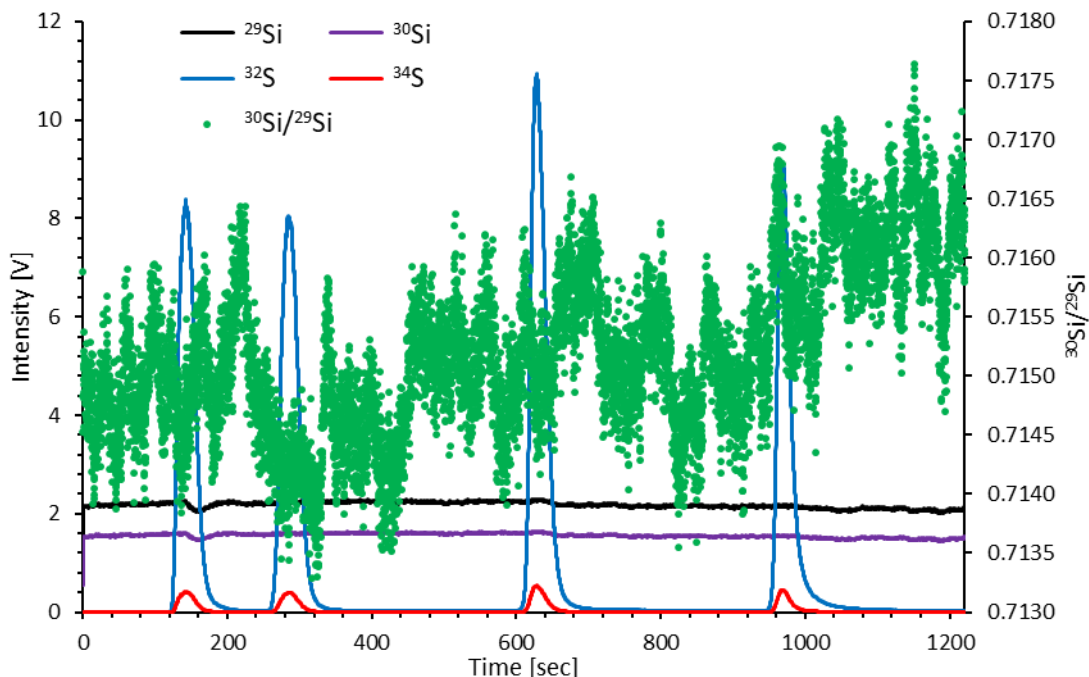


Figure S-1. LC-MC-ICPMS analysis of a solution of Na_2SO_3 , Na_2SO_4 and $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ with TMSO as an internal standard ($10 \mu\text{g/g}$ of S for each species).

Peak definition and range of points for linear regression slope (LRS) calculations:

The Visual Basic code used the m/z 32 data current to define chromatographic peaks, with starting and ending slopes of 0.5 mV/s and this peak definition was applied to the m/z 34 data current. This defines the range accounting for 100 % of the peak.

Then the LRS calculations are done on a fixed range of points between 100% and 300% of the peak width previously defined. Or the range of points can be optimized in order to maximize the R^2 of the linear slope or to minimize the standard deviation of the slope. This is done with two different algorithms implemented as a Visual Basic Code, described below. In all cases, the range of points is asymmetrically shortened if a neighboring peak is within the defined range.

Maximization of R^2 :

We have designed an algorithm (Visual Basic Code) that compares, by an iterative process, the R^2 of the linear regression line for ranges between 100% and 300% of the chromatographic peak width. The step is 1%. Then, the range corresponding to the largest R^2 is chosen to calculate the isotopic ratios by LRS.

Minimization of the standard deviation of the slope:

We have designed an algorithm (Visual Basic Code) that compares, by an iterative process, the standard deviation of the slope of the linear regression for ranges between 100% and 300% of the chromatographic peak width. The step is 1%. Then, the range corresponding to the minimum u_a is chosen to calculate the isotopic ratios by LRS.

Table S-2. $\delta^{34}\text{S}$ for Measured Samples Obtained in this Work Compared to Reported Values. For LC-MC-ICPMS measurements, solutions and samples were diluted in the mobile phase to a final concentration of 10 $\mu\text{g/g}$ of S per anion and TMSO was added at the same concentration.

| Sample Name | $\delta^{34}\text{S}$ Reported Value (‰) | | | $\delta^{34}\text{S}$ Measured Value (‰)* | | |
|----------------------------------|--|--------------------------|-------------------------|---|-------------|-------------|
| | Sulfite | Sulfate | Thiosulfate | Sulfite | Sulfate | Thiosulfate |
| Solution 1 | 6.1 ± 0.2 ^a | 2.6 ± 0.3 ^a | 4.1 ± 0.4 ^a | 5.8 ± 0.1 | 2.6 ± 0.2 | 4.1 ± 0.2 |
| Solution 2 | 6.3 ± 0.5 ^a | 2.8 ± 0.2 ^a | 9.1 ± 0.2 ^a | 6.4 ± 0.1 | 2.8 ± 0.2 | 8.7 ± 0.2 |
| Solution 3 | -1.8 ± 0.4 ^a | 16.9 ± 0.1 ^d | 3.6 ± 0.1 ^a | -1.6 ± 0.1 | 17.4 ± 0.2 | 4.0 ± 0.3 |
| Solution 4 | 3.8 ± 0.6 ^a | 7.2 ± 0.2 ^a | 17.5 ± 0.8 ^a | 3.5 ± 0.1 | 7.2 ± 0.2 | 17.5 ± 0.2 |
| IAEA-S3 | - | -32.5 ± 0.2 ^b | - | - | -32.8 ± 0.2 | - |
| H ₃ NO ₃ S | - | 0.6 ± 0.2 ^a | - | - | 0.7 ± 0.2 | - |
| Bingöl Tuz spring 1 | - | 20.9 ± 0.4 ^c | - | - | 24.4 ± 0.3 | - |
| Tuzlagözü spring 1 | - | 19.0 ± 0.4 ^c | - | - | 26.0 ± 0.2 | - |
| Hargün Tuz spring | - | 20.8 ± 0.4 ^c | - | - | 20.3 ± 0.2 | - |
| Bingöl Tuz spring 2 | - | 21.0 ± 0.4 ^c | - | - | 24.9 ± 0.2 | - |
| Emirhan spring | - | 21.4 ± 0.4 ^c | - | - | 21.3 ± 0.2 | - |
| Tuzhisar spring | - | 18.3 ± 0.4 ^c | - | - | 22.2 ± 0.2 | - |
| Tuzlagözü spring 2 | - | 19.1 ± 0.4 ^c | - | - | 24.8 ± 0.2 | - |
| Fadlun Tuz spring | - | 20.6 ± 0.4 ^c | - | - | 24.5 ± 0.2 | - |
| Hargün Tuz river | - | 19.9 ± 0.4 ^c | - | - | 19.8 ± 0.2 | - |
| Tuzlagözü well | - | 20.2 ± 0.4 ^c | - | - | 19.7 ± 0.4 | - |

*The given uncertainty represents the combined uncertainty (u_c). ^aThis study, results obtained by EA-IRMS, ^bref¹, ^cref², ^dref³.

REFERENCES OF SUPPORTING INFORMATION

- (1) Mann, J. L.; Vocke, R. D.; Kelly, W. R. Revised $\Delta^{34}\text{S}$ Reference Values for IAEA Sulfur Isotope Reference Materials S-2 and S-3. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009, 23 (8), 1116–1124. <https://doi.org/10.1002/rcm.3977>.
- (2) Pichat, A.; Hoareau, G.; Callot, J.-P.; Legeay, E.; Kavak, K. S.; Révillon, S.; Parat, C.; Ringenbach, J.-C. Evidence of Multiple Evaporite Recycling Processes in a Salt-Tectonic Context, Sivas Basin, Turkey. *Terra Nova* 2018, 30 (1), 40–49. <https://doi.org/10.1111/ter.12306>.
- (3) Qi, H. P.; Coplen, T. B. Evaluation of the $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ Ratio of Soufre de Lacq Elemental Sulfur Isotopic Reference Material by Continuous Flow Isotope-Ratio Mass Spectrometry. *Chem. Geol.* 2003, 199 (1), 183–187. [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(03\)00075-5](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(03)00075-5).

4. Conclusion du chapitre

La première étude de ce chapitre a présenté un développement de méthode pour la détermination des valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates et des thiosulfates, basée sur une séparation chromatographique par échange d'anions et la mesure en ligne des rapports isotopiques par MC-ICP-MS. Nous avons montré que la correction du biais de masse par la mesure du rapport $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ du silicium pouvait être réalisée par un ajout direct de silicium dans la phase mobile, évitant la dilution du flux et simplifiant ainsi le montage de la chaîne analytique par comparaison à un ajout post-colonne comme effectué dans une précédente étude (Santamaria-Fernandez et al., 2008). Le calcul des valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ a été réalisé pour la première fois par un étalonnage interne, permettant d'obtenir des valeurs non significativement différentes de celle obtenues par EA-IRMS avec un écart-type de 0,4 ‰ et une incertitude composée inférieure de 0,9 ‰ pour les sulfates, pour 0,5 μg de S injecté pour une solution synthétique et pour un échantillon réel. En revanche, les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ déterminées pour les thiosulfates étaient supérieures d'environ 3 ‰ à celles déterminées par EA-IRMS. Par ailleurs, il a été montré qu'un phénomène de dérive isotopique se produisait au cours de l'élution des pics chromatographiques et que celui-ci était amplifié lorsqu'un anion était retenu plus longtemps dans la colonne. En effet, la dérive isotopique était respectivement de 0,5 ; 1,1 et 2,6 ‰ pour l'étalon interne, les sulfates et les thiosulfates. Nous avons émis l'hypothèse que ce phénomène était à l'origine de l'erreur commise sur la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des thiosulfates éluant plus tardivement. Une correction supplémentaire semble être nécessaire afin d'obtenir des valeurs justes pour les thiosulfates. Un étalonnage externe pourrait permettre de corriger cette dérive et fournir une valeur de $\delta^{34}\text{S}$ juste.

Ces premiers travaux ont ainsi servi de base à la mise en place d'une méthodologie plus aboutie réalisée dans un deuxième temps. Cette deuxième étude a donc repris le développement précédent qui a été combiné à une méthode de séparation des sulfites, des sulfates et des thiosulfates, afin de mettre au point une méthode d'analyse isotopique en ligne pour ces trois anions. Nous avons montré qu'un étalonnage interne réalisé par ajout de TMSO dans les échantillons, combiné à une courbe d'étalonnage externe réalisée pour chaque espèce (ISEC) permettait de déterminer avec justesse (par rapport aux valeurs déterminées en EA-IRMS) les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ pour les trois anions en une seule injection, palliant ainsi le problème de dérive isotopique rencontré dans le premier développement. Cette nouvelle approche a été comparée au *sample-standard bracketing* par composé spécifique conventionnellement utilisé en MC-ICP-MS et elle était plus adaptée aux mesures de $\delta^{34}\text{S}$ par couplage LC-MC-ICP-MS. En effet, la méthode ISEC a conduit à des résultats plus proches de ceux mesurés par EA-IRMS que la méthode par *sample-standard bracketing* par composé spécifique. De plus, des écart-types plus faibles ont été obtenus avec la méthode ISEC (< 0,6 ‰) qu'avec la méthode par *sample-standard bracketing* par composé spécifique (< 0,9 ‰). D'autre part, un algorithme optimisant la zone du pic chromatographique utilisée pour le calcul des rapports isotopiques par LRS a été développé et a permis de minimiser l'incertitude de mesure (u_a) sur les rapports isotopiques calculés. Cette stratégie analytique

a permis d'obtenir des incertitudes composées (u_c) inférieures à 0,3 ‰ et des reproductibilités inférieures à 0,5 ‰ pour les trois anions (sulfites, sulfates et thiosulfates), pour 1 µg de S injecté par espèce. Ces incertitudes sont comparables avec celles rapportées (0,15 - 1 ‰) dans les autres études de couplage LC-MC-ICP-MS (Clough et al., 2006; Santamaria-Fernandez et al., 2008; Zakon et al., 2014; Ullrich et al., 2018). La méthodologie développée a été appliquée à des échantillons d'eaux de source et de rivière. Il a été montré que cette méthode est valide pour les échantillons dont le rapport en concentrations massiques $[\text{Na}^+]/[\text{SO}_4^{2-}]$ n'excède pas 10, ce cas étant le plus répandu dans les eaux naturelles. Cependant, pour des échantillons dont le rapport de concentration massique $[\text{Na}^+]/[\text{SO}_4^{2-}]$ excède 10, les ions Na^+ éluant dans le volume mort simultanément au TMSO provoquent un effet de matrice qui conduit à un biais sur la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ mesurée. Afin de résoudre ce problème plusieurs solutions sont possibles. L'une d'elle consiste à utiliser un étalon interne autre que le TMSO qui n'éluerait pas en même temps que les cations. Les dithionate pourrait par exemple être utilisé, cette espèce éluant après les thiosulfates en chromatographie ionique (O'Reilly et al., 2001). Une autre solution serait de réduire les effets de matrice causés par les cations en utilisant un suppresseur de conductivité placé en sortie de la colonne ionique, permettant l'échange des cations avec des H^+ (Zakon et al., 2014). Une troisième solution serait de réaliser, avant analyse, une purification des échantillons permettant l'élimination des cations grâce à une résine échangeuse d'anions (Hanousek et al., 2016a).

Conclusion et perspectives

Les espèces inorganiques du soufre jouent un rôle prépondérant dans le cycle du soufre aux interfaces eau-sédiments et milieux anoxiques-milieux oxiques. Les espèces de valence intermédiaire, telles que les sulfites et les thiosulfates, couplent les voies de réduction et les voies d'oxydation du cycle du soufre puisqu'elles peuvent être utilisées à la fois comme oxydant et réducteur (Jørgensen, 1990a). Pourtant, à ce jour, peu d'études se sont intéressées à l'isotopie de ces espèces, principalement à cause de leur faible concentration (de l'ordre du $\mu\text{mol/L}$) dans l'environnement (Zopfi et al., 2004) et aux difficultés analytiques qui en découlent.

Cette thèse de chimie analytique appliquée à des problématiques environnementales a été consacrée au développement de méthodes permettant de réaliser des analyses isotopiques par composés spécifiques (CSIA) du soufre inorganique présents dans des échantillons liquides.

Tout d'abord, une méthode de spéciation permettant de quantifier les sulfites, les sulfates et les thiosulfates par LC-HR-ICP-MS a été mise en place.

Ensuite, afin de déterminer les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfures, des sulfates et des thiosulfates présents simultanément dans un échantillon liquide, nous avons mis en œuvre et optimisé une méthodologie d'analyses isotopiques par composés spécifiques hors-ligne, qui a consisté en une précipitation séquentielle suivi d'analyses par EA-IRMS.

Enfin, une approche permettant des analyses isotopiques par composés spécifiques en ligne, mettant en jeu un couplage entre chromatographie liquide et MC-ICP-MS, a été développée et optimisée pour déterminer les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfites, des sulfates et des thiosulfates.

Analyses de spéciation

Les principales difficultés rencontrées lors de la mise au point d'une méthode de spéciation du soufre ont été, d'une part de stabiliser les sulfites qui sont rapidement oxydés en présence d'oxygène, et d'autre part, de séparer les sulfites (SO_3^{2-}) et les sulfates (SO_4^{2-}) dont les structures moléculaires sont très proches. La Figure C-1 synthétise la démarche mise en œuvre et les principaux résultats obtenus.

Les analytes étant anioniques à pH neutre, nous avons choisi d'utiliser une méthode de chromatographie par échange d'anions. Nous avons adapté et déployé la méthode publiée par Lin et Jiang (2009) sur une colonne anionique plus longue (250 mm) que dans l'étude précédente (150 mm), ce qui nous a permis d'améliorer significativement la séparation des espèces. Cette méthode de séparation a été couplée à une détection par ICP-MS haute résolution afin de s'affranchir des interférences spectrales du dioxygène ($^{16}\text{O}_2$) sur le soufre (^{32}S). La dérivation des ions sulfites par du formaldéhyde afin de former l'hydroxyméthanesulfonate (HMS) a permis de les séparer totalement des sulfates, mais également de les stabiliser. Nous avons observé pour une solution de HMS à 1 $\mu\text{g-S/g}$ dans la phase mobile que l'aire des pics était stable sur une durée de 24 h.

Après cette étape de séparation, pour traiter les données générées par ces analyses, nous avons développé un algorithme permettant de calculer l'aire des pics chromatographiques de façon automatisée et reproductible, puis de calculer les concentrations *via* un étalonnage externe.

In fine, les limites de détection obtenues étaient de 20, 23 et 18 ng-S/g respectivement pour les sulfites, les sulfates et les thiosulfates, ce qui est inférieur aux concentrations généralement rencontrées dans les eaux interstitielles de sédiments et les eaux souterraines (> 30 ng-S/g) (Zopfi et al., 2004; Einsiedl et al., 2015).

D'autre part, nous avons mis en évidence que les sulfures coéluent avec les sulfates dans ces conditions. Par conséquent, il a été nécessaire de réaliser les analyses de spéciation après précipitation des sulfures des échantillons afin de ne pas surestimer la concentration en sulfates.

La méthode de spéciation (LC-HR-ICP-MS) nous a permis de valider les étapes de préparation d'échantillons relatives aux analyses EA-IRMS. De plus, elle constitue la première étape du développement du couplage LC-MC-ICP-MS.

Cette méthode pourrait être améliorée en utilisant une colonne de diamètre interne plus faible, ce qui éviterait l'utilisation d'un *split* à l'entrée du spectromètre et permettrait ainsi d'abaisser les limites de détection.

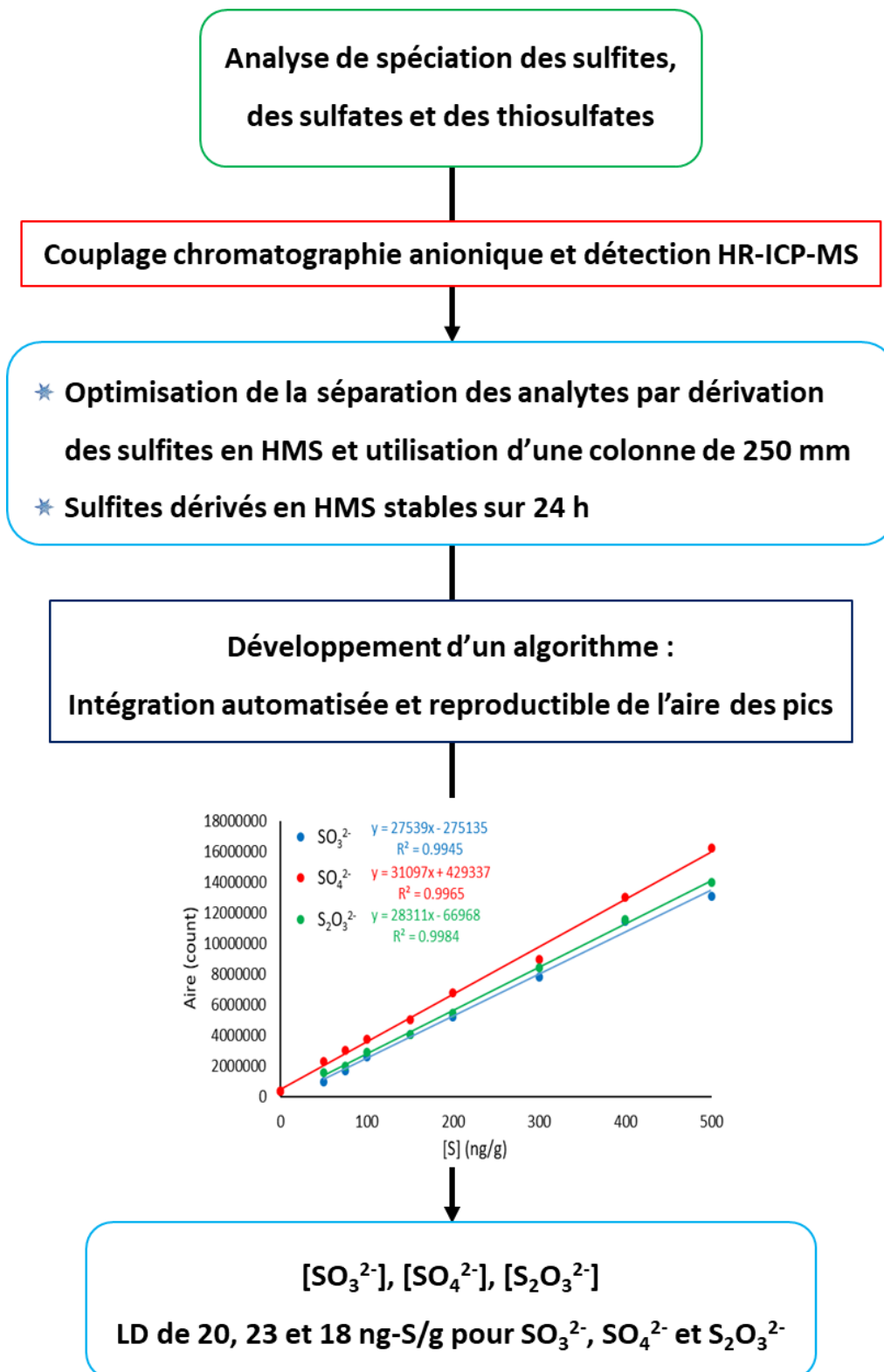


Figure C-1 : Schéma de synthèse de la démarche analytique et des résultats obtenus pour la quantification des sulfites, des sulfates et des thiosulfates.

Analyses isotopiques par composés spécifiques hors ligne

Pour l'analyse par EA-IRMS des sulfures, des sulfates et des thiosulfates dissous, le principal défi a été de mettre au point un protocole permettant de récupérer sous forme solide chacune des espèces sans provoquer de fractionnement isotopique. La démarche mise en œuvre a été de précipiter spécifiquement chaque espèce comme illustrée sur la Figure C-2. Nous avons tout d'abord optimisé la précipitation individuelle de chaque espèce, puis, nous avons optimisé la procédure de précipitation séquentielle des trois espèces.

Pour les sulfures, une précipitation par ajout d'acétate de Zn suivi d'un échange d'ions avec AgNO_3 a été réalisée ; l'analyse par EA-IRMS a montré que cette procédure permettait d'obtenir la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ sans entraîner de fractionnement isotopique. Les sulfates ont été précipités par ajout de BaCl_2 . L'analyse par LC-HR-ICP-MS nous a permis de montrer que la précipitation des sulfates était totale et l'analyse EA-IRMS nous a permis de valider cette méthode de précipitation pour la détermination de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates.

Les thiosulfates ne pouvant pas être précipités directement, une procédure conduisant à leur oxydation en sulfates est donc requise avant précipitation. Pour cela, nous avons développé une méthode d'oxydation électrochimique basée sur les travaux de Feng *et al.* (1995). Ceci nous a permis d'oxyder totalement les thiosulfates en 24 h et de suivre la cinétique de réaction grâce au suivi du courant d'oxydation. Les thiosulfates ont ensuite été précipités par ajout de BaCl_2 et l'analyse EA-IRMS a montré que cette procédure permettait de déterminer la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des thiosulfates. Des protocoles d'oxydation chimique avec H_2O_2 et ClO^- ont également été testés. Le rendement d'oxydation avec H_2O_2 n'a pas dépassé les 21 %, ce protocole d'oxydation n'a donc pas été retenu. En revanche, l'oxydation par les ions ClO^- a permis d'oxyder totalement les thiosulfates en 1 h de réaction et de déterminer la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des thiosulfates après précipitation sous forme de BaSO_4 . Cette dernière méthode a donc été retenue.

Nous avons ensuite testé ces protocoles en séquence : les sulfures ont été précipités, puis les sulfates, la procédure d'oxydation des thiosulfates par électrolyse a ensuite été appliquée (Figure C-2). La présence de baryum dans la solution s'est traduit par une passivation de l'électrode empêchant une oxydation complète des thiosulfates par électrochimie. Si cette approche, peu coûteuse en réactifs, reste utilisable dans le cas d'échantillons ne contenant pas de sulfates (ex : expérience de sulfato-réduction bactérienne des thiosulfates), elle s'est avérée incompatible avec une précipitation séquentielle sulfates-thiosulfates. L'oxydation par voie chimique avec les ions ClO^- a donc été choisie. Un test réalisé avec des étalons de sulfures, sulfates et thiosulfates dans un milieu de culture bactérien a montré que la méthode de précipitation séquentielle avec une oxydation des thiosulfates par les ions ClO^- permettait la détermination des valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ de ces trois espèces.

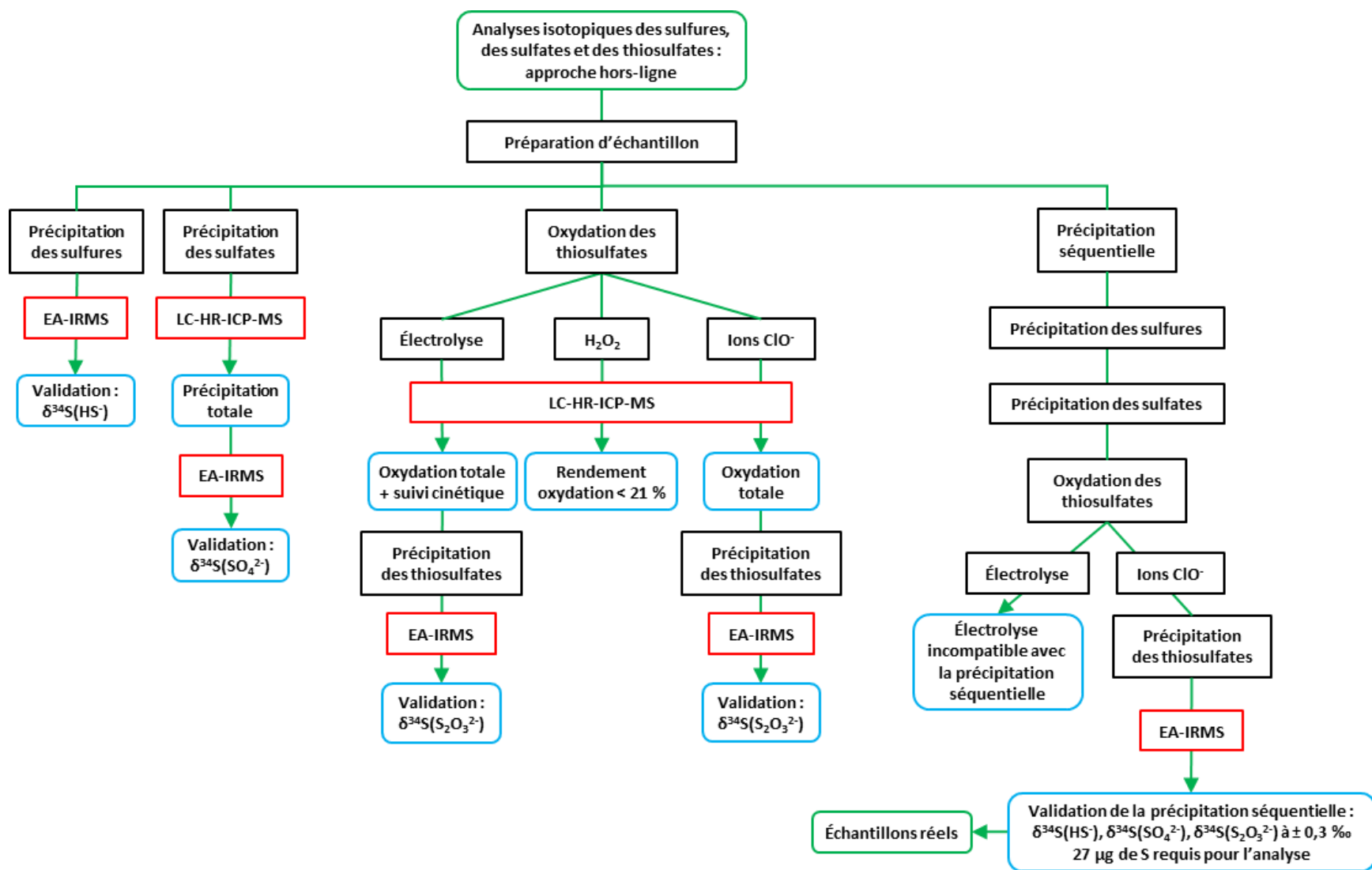


Figure C-2 : Schéma de synthèse de la démarche analytique et des résultats obtenus pour la mise au point de la précipitation des sulfures, des sulfates et des thiosulfates pour leur analyse isotopique par EA-IRMS.

La grande majorité des méthodes présentées dans la littérature se concentrent sur la mesure des rapports isotopiques des sulfures et des sulfates uniquement. Nous avons ici intégré les thiosulfates, qui est l'une des espèces de valence intermédiaire la plus susceptible de se retrouver en concentration mesurable dans l'environnement de par son rôle dans le cycle du soufre (Jørgensen, 1990a, 1990b; Zopfi et al., 2004).

Nous avons ensuite appliqué la méthodologie développée à des échantillons réels, à savoir des eaux de sources, des eaux souterraines et des cultures en laboratoire de bactéries sulfato-réductrices. Nous avons pu déterminer les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ pour les sulfates des échantillons d'eaux de sources et elles n'étaient pas significativement différentes de celles publiées par Pichat *et al.* (2018). Nous avons ensuite réalisé une première étude sur des eaux provenant d'un aquifère profond de stockage de gaz naturel. La méthodologie de précipitation séquentielle nous a permis de déterminer les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates et des sulfures de quelques-uns des échantillons d'eaux souterraines malgré les faibles concentrations (< 10 mg-S/L). Cela nous a permis de mettre en évidence des différences significatives entre les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des eaux situées en zone de stockage de gaz et des eaux périphériques. De plus, un fractionnement isotopique entre sulfates et sulfures correspondant à une activité de sulfato-réduction bactérienne a pu être observé dans un échantillon d'eau situé dans la zone de stockage de gaz.

Du point de vue analytique, ces deux études nous ont montré que la préparation d'échantillon par précipitation séquentielle des sulfures et des sulfates pour leur analyse isotopique pouvait être appliquée à des eaux naturelles. Nous avons aussi observé les limites de la méthode de préparation d'échantillon ; en effet, la quantité de BaSO_4 obtenue était généralement inférieure (d'environ 35 mg) à la quantité théorique calculée à partir des concentrations et des volumes d'échantillons, car il est difficile de récupérer l'intégralité du BaSO_4 retenu sur le filtre.

Les résultats obtenus pour les analyses isotopiques des eaux souterraines sont prometteurs. La méthodologie développée pour l'analyse isotopique par composés spécifiques va donc être appliquée aux eaux souterraines en augmentant les volumes d'échantillons et en pré-concentrant par évaporation. Il sera alors intéressant de coupler l'isotopie du soufre aux marqueurs de biodégradation tels que le fractionnement isotopique du carbone des BTEX pour mieux tracer la biodégradation de ces composés aromatiques.

La spéciation et l'isotopie du soufre ont été suivies au cours de la croissance de la souche *Desulfatamaculum profundi* avec des sulfates comme accepteurs d'électrons et du pyruvate comme donneurs d'électrons. La méthode de préparation mise au point pour les analyses EA-IRMS a permis de suivre la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates et des sulfures au cours de l'expérience. Le fractionnement isotopique entre les sulfures et les sulfates variait entre $-12,8 \pm 0,5$ ‰ en début de croissance à $-19,2 \pm 0,8$ ‰ en fin de croissance. Ces fractionnements isotopiques sont cohérents avec ceux mesurés entre $-27,8$ et $-5,5$ ‰ pour d'autres bactéries du genre *Desulfatamaculum* (McCready, 1975; Chambers et al.,

1976; Detmers et al., 2001; Davidson et al., 2009). Des thiosulfates ont également été détectés, mais leurs faibles concentrations ($< 0,25$ mmol-S/L) n'ont pas permis de déterminer leurs valeurs de $\delta^{34}\text{S}$. Ainsi nous avons pu mettre en évidence le fractionnement isotopique généré par cette bactérie grâce au protocole de précipitation séquentielle et aux analyses isotopiques par EA-IRMS mis au point dans ce travail. Par ailleurs, les bilans de masse n'étant pas équilibrés, nous supposons qu'une ré-oxydation partielle des sulfures dans les aliquotes prélevés pour la quantification des sulfates et des thiosulfates a eu lieu, mais cela ne concerne pas les prélèvements distincts réalisés pour les mesures de rapports isotopiques. Compte tenu des limitations expérimentales et des hypothèses émises concernant le biais de mesure des concentrations, il sera nécessaire de confirmer ces données par une nouvelle expérience dans les mêmes conditions de culture.

Quelques modifications du protocole de suivi du fractionnement isotopique du soufre d'une culture bactérienne permettraient de faciliter les analyses. Pour éviter une oxydation des sulfures avant les analyses de chromatographie ionique, les sulfures pourraient être précipités avec du chlorure de zinc à la place de l'acétate de zinc afin également de ne pas biaiser la concentration en acétate. Le prélèvement pour les analyses par chromatographie ionique pourrait alors être réalisé après filtration des sulfures. Prélever les échantillons dans une chambre anaérobie permettrait également de préserver les sulfures de l'oxydation par l'oxygène de l'atmosphère. Les mesures de rapports isotopiques des sulfures à $t = 0$ et des thiosulfates n'ont pu être réalisées car ils n'étaient pas présents en quantités suffisantes. Pour résoudre ce problème, des cultures de plus grands volumes pourraient être réalisées. Une autre solution serait de mesurer les rapports isotopiques du soufre des espèces peu abondantes par LC-MC-ICP-MS.

D'autre part, pour comprendre avec plus de précision le mécanisme de réduction de *D. profundus*, il serait intéressant de réaliser des études plus approfondies comme celles mises en place par Leavitt *et al.* (2014) pour l'étude de la souche *Desulfovibrio alaskensis* G20. L'utilisation de différentes sources de soufre (sulfates, sulfites, thiosulfates) a permis à ces auteurs de caractériser les différentes étapes de la SRB. De plus, pour mieux comprendre le fractionnement isotopique généré par cette bactérie dans son environnement naturel (aquifère profond), il sera nécessaire d'étudier comment les paramètres environnementaux (concentrations en soufre et en donneur d'électrons, nature de la source de soufre et de carbone, température...) influencent le fractionnement isotopique.

Récupérer une quantité suffisante de précipité a représenté un des principaux défis lors de la préparation des échantillons pour les analyses EA-IRMS. Pour le traitement des échantillons dont les concentrations en espèces soufrées sont faibles (< 10 mg-S/L), des méthodes de pré-concentration telles que l'évaporation (Brenot et al., 2007; Jenkins and Bao, 2006) ou la chromatographie préparative sur résine échangeuse d'anions (Carmody et al., 1998) permettrait d'éviter les pertes de matière due à la filtration de grands volumes. La centrifugation ou l'utilisation de filtres d'un diamètre plus petit ou encore de filtres de type « *ashless* » qui produisent une quantité infime de cendre lors de leur combustion

et peuvent donc être brûlés pour récupérer le précipité, permettrait également de réduire les pertes de précipité lors de la filtration.

On pourrait également envisager d'intégrer d'autres espèces telles que les sulfites et le soufre élémentaire au protocole de préparation hors-ligne. Pour cela des étapes supplémentaires de préparation devront être mise en place. Les sulfites pourraient être dérivés avec du formaldéhyde afin d'éviter leur co-précipitation avec les sulfates lors de l'ajout de baryum. Les sulfites pourraient ensuite être oxydés en sulfates et précipités à leur tour. Le soufre élémentaire pourrait être récupéré par extraction liquide-liquide avec un solvant (Zerkle et al., 2009; Gilhooly III et al., 2016) puis par réduction avec le dithiothréitol (Kurek et al., 2018).

Analyses isotopiques par composés spécifiques en ligne

La stratégie analytique mise en place, illustrée sur la Figure C-3, a été de coupler la précédente méthode de spéciation à un MC-ICP-MS qui permet de détecter simultanément les isotopes du soufre. Nous avons choisi de corriger le biais de masse par ajout aux échantillons d'un étalon interne (espèce soufrée), qui est utilisé pour calculer la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des analytes.

Dans un premier temps, la méthode de spéciation a été adaptée et couplée au MC-ICP-MS pour la détermination des valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates et des thiosulfates uniquement. L'étalon interne utilisé était l'acide sulfamique. Dans cette étude, la mesure du rapport $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ du silicium a permis de corriger efficacement le biais de masse sur le rapport $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$. Les rapports isotopiques ont été calculés par régression linéaire (LRS). Le calcul du $\delta^{34}\text{S}$ grâce à l'étalon interne a permis d'obtenir une valeur non significativement différente de celle déterminée par EA-IRMS pour les sulfates dans une solution étalon et dans un échantillon réel avec un écart-type de 0,4 ‰, pour 0,5 µg de soufre injecté. Cependant, la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ déterminée pour les thiosulfates dans la solution étalon était supérieure d'environ 3 ‰ à la valeur déterminée par EA-IRMS. Ce biais a été imputé à un phénomène de dérive isotopique (séparation chromatographique des isotopes) qui a lieu au cours de l'élution et dont l'ampleur augmente avec le temps de rétention.

Dans un deuxième temps, la méthode a été étendue à l'analyse des sulfites. L'acide sulfamique utilisé comme étalon interne coéluant avec les sulfites, il a été remplacé par le TMSO, et un gradient d'élution a été employé pour optimiser la séparation des différentes espèces. Pour résoudre le problème de biais systématique sur les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des thiosulfates, une correction par étalonnage externe a été réalisée pour chaque anion. Ceci a permis d'améliorer significativement la justesse (< 0,5 ‰) des mesures pour les trois anions.

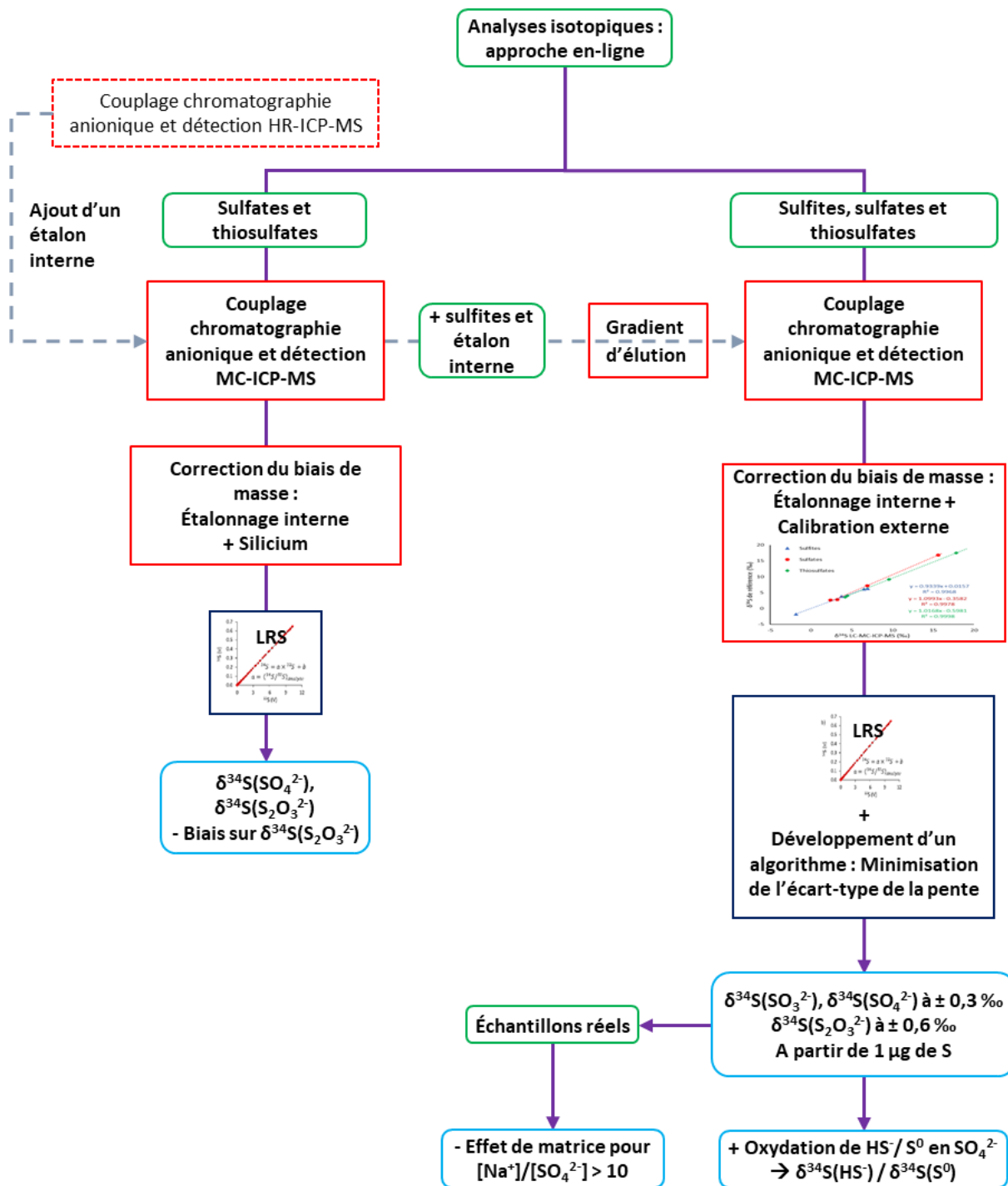


Figure C-3 : Schéma de synthèse de la démarche analytique et des résultats obtenus pour la mise au point de la méthode d'analyse isotopique en ligne des sulfites, des sulfates et des thiosulfates par LC-MC-ICP-MS.

D'autre part, le nombre de points des pics chromatographiques à utiliser pour le calcul des rapports isotopiques par régression linéaire a été optimisé afin de minimiser l'incertitude sur le rapport $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$. Pour cela, nous avons développé un algorithme permettant de sélectionner la zone chromatographique permettant d'obtenir le plus petit écart-type sur la pente de régression linéaire. Cet algorithme a permis de minimiser l'incertitude sur les rapports isotopiques mais également d'améliorer la justesse des valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ calculées.

La méthode LC-MC-ICP-MS a été évaluée sur une série de solutions étalons et d'échantillons réels dilués à 10 $\mu\text{g-S/g}$, soit 1 μg de soufre injecté par espèce. Les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ étaient en accord avec les valeurs reportées (à moins de 0,5 ‰), excepté pour 6 eaux naturelles dont le rapport massique $[\text{Na}^+]/[\text{SO}_4^{2-}]$ était supérieur à 10. Le sodium coéluait avec le TMSO et a provoqué un effet de matrice. Il doit être mentionné que ce type d'eaux est relativement rare dans l'environnement et représente donc un cas particulier.

De plus, nous avons montré qu'il était possible d'analyser les sulfures et le soufre élémentaire par cette méthode après leur oxydation en sulfates sous champs micro-onde.

Le développement de la méthode LC-MC-ICP-MS a fourni des résultats très encourageants, toutefois quelques améliorations peuvent être apportées. Au cours de cette étude nous avons montré que la LC-MC-ICP-MS permettait de mesurer les rapports isotopiques de plusieurs espèces du soufre en une analyse. Cependant, des effets de matrices ont été observés pour des échantillons dont la concentration massique en sodium excédait 10 fois celle en sulfates. L'utilisation d'un suppresseur de conductivité placé en sortie de la colonne ionique (Zakon et al., 2014) permettrait de limiter les effets de matrice dus aux cations coéluants avec l'étalon interne. Une autre possibilité serait d'utiliser un autre étalon interne ne coéluant pas avec les cations, comme par exemple les dithionates. Yu *et al.* (2017) et Paris *et al.* (2013) ont montré que l'utilisation d'une unité de désolvation permettait d'obtenir un gain en sensibilité. L'usage de ce type de dispositif pourrait alors permettre de diminuer les limites de détection.

D'autre part, le traitement de données mis au point pourrait être perfectionné en utilisant un traitement mathématique synchronisant les signaux des isotopes au cours de l'élution du pic chromatographique, ce qui permettrait de corriger la dérive des rapports isotopiques (Gourgiotis et al., 2017).

La méthode mise au point a été validée pour une concentration de 10 $\mu\text{g-S/g}$ et un test a montré qu'il était également possible de réaliser une analyse à une concentration de 1 $\mu\text{g-S/g}$. Par conséquent, elle permet de déterminer la valeur de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfates dans la plupart des eaux environnementales. Pour les rivières et les eaux souterraines les moins concentrées, une étape de pré-concentration est requise. Des concentrations jusqu'à 160 $\mu\text{g-S/g}$ et 6 $\mu\text{g-S/g}$ ont été mesurées respectivement pour les thiosulfates et les sulfites dans les eaux interstitielles de sédiments (Zopfi et al., 2004). La détermination des valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des thiosulfates peut donc être réalisée par le couplage LC-MC-ICP-MS développé. Les valeurs de $\delta^{34}\text{S}$ des sulfites peuvent être déterminées pour les eaux les plus concentrées.

D'autre part, cette stratégie d'analyse isotopique est particulièrement adaptée et pourra être appliquée à l'étude du mécanisme de sulfato-réduction bactérienne ou à l'étude des mécanismes d'oxydation et de dismutation bactérienne des sulfites et des thiosulfates.

Comparaison des approches EA-IRMS et LC-MC-ICP-MS pour l'analyse d'espèces inorganiques du soufre en solution

Pour l'analyse isotopique des sulfures dans des échantillons liquides, il est impératif de les précipiter afin d'éviter leur oxydation ou volatilisation, par conséquent, leur analyse par EA-IRMS semble plus appropriée. En effet, pour les analyser par la méthode LC-MC-ICP-MS développée dans ce travail, il est nécessaire de réaliser une étape supplémentaire d'oxydation pour les convertir en sulfates (Figure C-3).

Pour l'analyse des espèces inorganiques du soufre par EA-IRMS, des étapes de préparation fastidieuses sont nécessaires pour récupérer ces espèces sous forme solide comme illustré sur la Figure C-2. La méthode LC-MC-ICP-MS réduit considérablement les étapes de préparation d'échantillon pour l'analyse de des sulfites, des sulfates et des thiosulfates puisqu'il n'y a qu'une étape de dilution ou pré-concentration éventuelle et l'ajout d'un étalon interne. De plus, contrairement à l'EA-IRMS, elle permet de déterminer $\delta^{34}\text{S}$ des sulfites, des sulfates et des thiosulfates en une seule analyse, mais avec un traitement de données plus long et complexe. D'autre part, la méthode EA-IRMS nécessite l'injection d'au moins 27 μg de soufre. Alors que pour les analyses LC-MC-ICP-MS, 1 μg de soufre est requis. Ceci permet de réduire les quantités d'échantillon nécessaires et rend possible l'analyse d'échantillons faiblement concentrés. En effet, pour les eaux souterraines que nous avons analysées, la plus faible concentration en sulfates était de 0,22 mg-S/L soit 22 fois plus élevée que la concentration de 10 μg -S/L utilisée pour les analyses LC-MC-ICP-MS. Ainsi, toutes les eaux souterraines prélevées auraient pu être analysées par LC-MC-ICP-MS, il en va de même pour les thiosulfates dans les cultures bactériennes (> 1,9 mg-S/L). Les écart-types obtenus pour des répliques d'analyse pour les différentes espèces de soufre inorganique présentés dans le Tableau C-1, sont identiques pour les deux méthodes (à 0,1 ‰ près) à l'exception des thiosulfates où l'écart-type par LC-MC-ICP-MS est de 0,6 ‰ alors qu'il est de 0,3 ‰ par EA-IRMS. Globalement, les deux méthodes permettent d'atteindre les mêmes écart-types.

Tableau C- 1 : Comparaison des approches EA-IRMS et LC-MC-ICP-MS pour l'analyse d'espèces inorganiques du soufre. Les écart-types pour IAEA-S3 et S4 obtenus par EA-IRMS correspondent à ceux du Tableau 2-4, ceux en LC-MC-ICP-MS correspondent aux analyses sous forme de sulfates après-minéralisation sous champ micro-ondes. Pour les analyses de sulfates et thiosulfates par EA-IRMS, les données correspondent aux expériences de précipitation du composé pur en solution (paragraphe 3.2.2 du Chapitre 2) et de précipitation séquentielle dans un milieu de culture bactérien (Tableau 2-11). L'analyse des sulfites en EA-IRMS a été réalisée par précipitation avec BaCl₂ du composé pur en solution. Les sulfites, les sulfates et les thiosulfates ont été analysés simultanément par LC-MC-ICP-MS.

| Technique | Masse de S | Préparation d'échantillon | Traitement des données | Écart-type (%) | | | | |
|--------------|------------|---------------------------|------------------------|------------------|--|--|--|----------------------------|
| | | | | Sulfures IAEA-S3 | Sulfates (NH ₄) ₂ SO ₄ | Thiosulfates (NH ₄) ₂ S ₂ O ₃ | Sulfites Na ₂ SO ₃ | Soufre élémentaire IAEA-S4 |
| EA-IRMS | 27 µg | +++ | - | 0,1 (n = 3) | 0,3 (n = 3-4) | 0,3 (n = 4) | 0,2 (n = 2) | 0,3 (n = 3) |
| LC-MC-ICP-MS | 1 µg | - | +++ | 0,1 (n = 2) | 0,4 (n = 3) | 0,6 (n = 3) | 0,2 (n = 3) | 0,3 (n = 3) |

En conclusion, les développements analytiques de cette thèse ont permis d'ajouter une dimension de spéciation aux analyses isotopiques du soufre et vont ainsi pouvoir apporter de nouvelles informations nécessaires à une meilleure compréhension du cycle biogéochimique du soufre.

Bibliographie

- Aharon, P., Fu, B., 2000. Microbial sulfate reduction rates and sulfur and oxygen isotope fractionations at oil and gas seeps in deepwater Gulf of Mexico. *Geochim. Cosmochim. Acta* 64, 233–246. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(99\)00292-6](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(99)00292-6)
- Alam, M., Pyne, P., Mazumdar, A., Peketi, A., Ghosh, W., 2013. Kinetic Enrichment of ^{34}S during Proteobacterial Thiosulfate Oxidation and the Conserved Role of SoxB in S-S Bond Breaking. *Appl Env. Microbiol* 79, 4455–4464. <https://doi.org/10.1128/AEM.00956-13>
- Albalat, E., Telouk, P., Balter, V., Fujii, T., Bondanese, V.P., Plissonnier, M.-L., Vlaeminck-Guillem, V., Baccheta, J., Thiam, N., Miossec, P., Zoulim, F., Puisieux, A., Albarède, F., 2016. Sulfur isotope analysis by MC-ICP-MS and application to small medical samples. *J Anal Spectrom* 31, 1002–1011. <https://doi.org/10.1039/C5JA00489F>
- Albarède, F., Albalat, E., Télouk, P., 2015. Instrumental isotope fractionation in multiple-collector icp-ms. *J. Anal. At. Spectrom.* 30, 1736–1742. <https://doi.org/10.1039/C5JA00188A>
- Albarède, F., Telouk, P., Blichert-Toft, J., Boyet, M., Agranier, A., Nelson, B., 2004. Precise and accurate isotopic measurements using multiple-collector ICPMS. *Geochim. Cosmochim. Acta* 68, 2725–2744. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2003.11.024>
- Alexander, M., 1974. Microbial formation of environmental pollutants. *Adv. Appl. Microbiol.* 18, 1–73.
- Amrani, A., Deev, A., Sessions, A.L., Tang, Y., Adkins, J.F., Hill, R.J., Moldowan, J., Wei, Z., 2012. The sulfur-isotopic compositions of benzothiophenes and dibenzothiophenes as a proxy for thermochemical sulfate reduction. *Geochim. Cosmochim. Acta* 84, 152–164. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2012.01.023>
- Amrani, A., Said-Ahmad, W., Shaked, Y., Kiene, R.P., 2013. Sulfur isotope homogeneity of oceanic DMSP and DMS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 18413–18418. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312956110>
- Amrani, A., Sessions, A.L., Adkins, J.F., 2009. Compound-specific $\delta^{34}\text{S}$ analysis of volatile organics by coupled GC/multicollector-ICPMS. *Anal. Chem.* 81, 9027–9034. <https://doi.org/10.1021/ac9016538>
- Analyseur élémentaire Flash 2000 HTTM [WWW Document], 2018. URL <https://www.thermofisher.com/> (accessed 4.13.19).
- André, L., Franceschi, M., Pouchan, P., Atteia, O., 2005. Using geochemical data and modelling to enhance the understanding of groundwater flow in a regional deep aquifer, Aquitaine Basin, south-west of France. *J. Hydrol.* 305, 40–62. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2004.08.027>
- André, L., Franceschi, M., Pouchan, P., Atteia, O., 2002. Origine et évolution du soufre au sein de l'aquifère des Sables infra-molassiques du Bassin aquitain. *Comptes Rendus Geosci.* 334, 749–756. [https://doi.org/10.1016/S1631-0713\(02\)01814-X](https://doi.org/10.1016/S1631-0713(02)01814-X)
- Andreae, M.O., 1990. Ocean-atmosphere interactions in the global biogeochemical sulfur cycle. *Mar. Chem.* 30, 1–29. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(90\)90059-L](https://doi.org/10.1016/0304-4203(90)90059-L)
- Assonov, S.S., Brenninkmeijer, C. a. M., 2005. Reporting small $\Delta^{17}\text{O}$ values: existing definitions and concepts. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 627–636. <https://doi.org/10.1002/rcm.1833>
- Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum, L.J., Woese, C.R., Wolfe, R.S., 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.* 43, 260–296.
- Balci, N., Brunner, B., Turchyn, A.V., 2017. Tetrathionate and Elemental Sulfur Shape the Isotope Composition of Sulfate in Acid Mine Drainage. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01564>
- Balci, N., Mayer, B., Shanks, W.C., Mandernack, K.W., 2012. Oxygen and sulfur isotope systematics of sulfate produced during abiotic and bacterial oxidation of sphalerite and elemental sulfur. *Geochim. Cosmochim. Acta* 77, 335–351. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2011.10.022>

- Barton, L.L., Fauque, G.D., 2009. Chapter 2 Biochemistry, Physiology and Biotechnology of Sulfate-Reducing Bacteria, in: *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, pp. 41–98. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(09\)01202-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(09)01202-7)
- Baublys, K.A., Golding, S.D., Young, E., Kamber, B.S., 2004. Simultaneous determination of ^{33}S -CDT and ^{34}S -CDT using masses 48, 49 and 50 on a continuous flow isotope ratio mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 2765–2769. <https://doi.org/10.1002/rcm.1681>
- Bean, S.L., 2000. Thiosulfates, in: John Wiley & Sons, Inc. (Ed.), *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. <https://doi.org/10.1002/0471238961.2008091502050114.a01>
- Beaudoin, G., Taylor, B.E., Rumble, D., Thiemens, M., 1994. Variations in the sulfur isotope composition of troilite from the Cañon Diablo iron meteorite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 58, 4253–4255. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(94\)90277-1](https://doi.org/10.1016/0016-7037(94)90277-1)
- Belobaba, A.G., Sukhorukov, D.V., Masliy, A.I., 2008. Oxidation of sulfite and thiosulfate anions on a porous carbon fiber anode. *IEEE*, pp. 620–622. <https://doi.org/10.1109/IFOST.2008.4602952>
- Bendall, C., Lahaye, Y., Fiebig, J., Weyer, S., Brey, G.P., 2006. In situ sulfur isotope analysis by laser ablation MC-ICPMS. *Appl. Geochem.* 21, 782–787. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2006.02.012>
- Berlendis, S., Lascourreges, J.-F., Schraauwers, B., Sivadon, P., Magot, M., 2010. Anaerobic Biodegradation of BTEX by Original Bacterial Communities from an Underground Gas Storage Aquifer. *Environ. Sci. Technol.* 44, 3621–3628. <https://doi.org/10.1021/es100123b>
- Berlendis, S., Ranchou-Peyruse, M., Fardeau, M.-L., Lascourrèges, J.-F., Joseph, M., Ollivier, B., Aüillo, T., Dequidt, D., Magot, M., Ranchou-Peyruse, A., 2016. *Desulfotomaculum aquiferis* sp. Nov. and *Desulfotomaculum profundum* sp. Nov., isolated from a deep natural gas storage aquifer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 4329–4338. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001352>
- Bern, C.R., Chadwick, O.A., Kendall, C., Pribil, M.J., 2015. Steep spatial gradients of volcanic and marine sulfur in Hawaiian rainfall and ecosystems. *Sci. Total Environ.* 514, 250–260. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.001>
- Bian, X.-P., Yang, T., Lin, A.-J., Jiang, S.-Y., 2015. Rapid and high-precision measurement of sulfur isotope and sulfur concentration in sediment pore water by multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* 132, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.08.053>
- Bigeleisen, J., Mayer, M.G., 1947. Calculation of Equilibrium Constants for Isotopic Exchange Reactions. *J. Chem. Phys.* 15, 261–267. <https://doi.org/10.1063/1.1746492>
- Bolliger, C., Schroth, M.H., Bernasconi, S.M., Kleikemper, J., Zeyer, J., 2001. Sulfur isotope fractionation during microbial sulfate reduction by toluene-degrading bacteria. *Geochim. Cosmochim. Acta* 65, 3289–3298. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(01\)00671-8](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(01)00671-8)
- Böttcher, M.E., Smock, A.M., Cypionka, H., 1998. Sulfur isotope fractionation during experimental precipitation of iron(II) and manganese(II) sulfide at room temperature. *Chem. Geol.* 146, 127–134. [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(98\)00004-7](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(98)00004-7)
- Böttcher, M.E., Thamdrup, B., 2001. Oxygen and sulfur isotope fractionation during anaerobic bacterial disproportionation of elemental sulfur. *Geochim. Cosmochim. Acta* 65, 1601–1609. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(00\)00628-1](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(00)00628-1)
- Böttcher, M.E., Thamdrup, B., Gehre, M., Theune, A., 2005. $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ fractionation during sulfur disproportionation by *Desulfobulbus propionicus*. *Geomicrobiol. J.* 22, 219–226. <https://doi.org/10.1080/01490450590947751>
- Böttcher, M.E., Thamdrup, B., Vennemann, T.W., 2001. Anaerobic sulfide oxidation and stable isotope fractionation associated with bacterial sulfur disproportionation in the presence of MnO_2 . *Geochim. Cosmochim. Acta* 65, 1573–1581. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(00\)00622-0](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(00)00622-0)
- Bottrell, S.H., Newton, R.J., 2006. Reconstruction of changes in global sulfur cycling from marine sulfate isotopes. *Earth-Sci. Rev.*, *ISOTOPES IN PALAEOENVIRONMENTAL RECONSTRUCTION (ISOPAL)* 75, 59–83. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2005.10.004>
- Bouillon, R.-C., Lee, P.A., de Mora, S.J., Levasseur, M., Lovejoy, C., 2002. Vernal distribution of dimethylsulphide, dimethylsulphoniopropionate, and dimethylsulphoxide in the North Water in 1998. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.*, *The International North Water Polynya Study* 49, 5171–5189. [https://doi.org/10.1016/S0967-0645\(02\)00184-4](https://doi.org/10.1016/S0967-0645(02)00184-4)

- Bradley, A.S., Leavitt, W.D., Johnston, D.T., 2011. Revisiting the dissimilatory sulfate reduction pathway: Revisiting the dissimilatory sulfate reduction pathway. *Geobiology* 9, 446–457. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2011.00292.x>
- Bradley, A.S., Leavitt, W.D., Schmidt, M., Knoll, A.H., Girguis, P.R., Johnston, D.T., 2016. Patterns of sulfur isotope fractionation during microbial sulfate reduction. *Geobiology* 14, 91–101. <https://doi.org/10.1111/gbi.12149>
- Brenot, A., Carignan, J., France-Lanord, C., Benoît, M., 2007. Geological and land use control on $\delta^{34}\text{S}$ and $\delta^{18}\text{O}$ of river dissolved sulfate: The Moselle river basin, France. *Chem. Geol.* 244, 25–41. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2007.06.003>
- Brenot, A., Négrel, P., Petelet-Giraud, E., Millot, R., Malcuit, E., 2015. Insights from the salinity origins and interconnections of aquifers in a regional scale sedimentary aquifer system (Adour-Garonne district, SW France): Contributions of $\delta^{34}\text{S}$ and $\delta^{18}\text{O}$ from dissolved sulfates and the $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratio. *Appl. Geochem.* 53, 27–41. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2014.12.002>
- Brüchert, V., Currie, B., Peard, K.R., 2009. Hydrogen sulphide and methane emissions on the central Namibian shelf. *Prog. Oceanogr.* 83, 169–179. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2009.07.017>
- Brunner, B., Bernasconi, S.M., 2005. A revised isotope fractionation model for dissimilatory sulfate reduction in sulfate reducing bacteria. *Geochim. Cosmochim. Acta* 69, 4759–4771. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2005.04.015>
- Bühn, B., Santos, R.V., Dardenne, M.A., de Oliveira, C.G., 2012. Mass-dependent and mass-independent sulfur isotope fractionation ($\delta^{34}\text{S}$ and $\delta^{33}\text{S}$) from Brazilian Archean and Proterozoic sulfide deposits by laser ablation multi-collector ICP-MS. *Chem. Geol.* 312–313, 163–176. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2012.04.003>
- Burke, A., Present, T.M., Paris, G., Rae, E.C.M., Sandilands, B.H., Gaillardet, J., Peucker-Ehrenbrink, B., Fischer, W.W., McClelland, J.W., Spencer, R.G.M., Voss, B.M., Adkins, J.F., 2018. Sulfur isotopes in rivers: Insights into global weathering budgets, pyrite oxidation, and the modern sulfur cycle. *Earth Planet. Sci. Lett.* 496, 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2018.05.022>
- Butler, I.B., Böttcher, M.E., Rickard, D., Oldroyd, A., 2004. Sulfur isotope partitioning during experimental formation of pyrite via the polysulfide and hydrogen sulfide pathways: Implications for the interpretation of sedimentary and hydrothermal pyrite isotope records. *Earth Planet. Sci. Lett.* 228, 495–509. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2004.10.005>
- Cai, C., Amrani, A., Worden, R.H., Xiao, Q., Wang, T., Gvirtzman, Z., Li, H., Said-Ahmad, W., Jia, L., 2016. Sulfur isotopic compositions of individual organosulfur compounds and their genetic links in the Lower Paleozoic petroleum pools of the Tarim Basin, NW China. *Geochim. Cosmochim. Acta* 182, 88–108. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2016.02.036>
- Cai, C., Zhang, C., Worden, R.H., Wang, T., Li, H., Jiang, L., Huang, S., Zhang, B., 2015. Application of sulfur and carbon isotopes to oil–source rock correlation: A case study from the Tazhong area, Tarim Basin, China. *Org. Geochem.* 83–84, 140–152. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2015.03.012>
- Canavan, R.W., Slomp, C.P., Jourabchi, P., Van Cappellen, P., Laverman, A.M., van den Berg, G.A., 2006. Organic matter mineralization in sediment of a coastal freshwater lake and response to salinization. *Geochim. Cosmochim. Acta* 70, 2836–2855. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2006.03.012>
- Canfield, 2001. Biogeochemistry of Sulfur Isotopes. *Rev. Mineral. Geochem.* 43, 607–636. <https://doi.org/10.2138/gsrmg.43.1.607>
- Canfield, D.E., 2001. Isotope fractionation by natural populations of sulfate-reducing bacteria. *Geochim. Cosmochim. Acta* 65, 1117–1124. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(00\)00584-6](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(00)00584-6)
- Canfield, D.E., Farquhar, J., Zerkle, A.L., 2010. High isotope fractionations during sulfate reduction in a low-sulfate euxinic ocean analog. *Geology* 38, 415–418. <https://doi.org/10.1130/G30723.1>
- Canfield, D.E., Habicht, K.S., Thamdrup, B., 2000. The Archean sulfur cycle and the early history of atmospheric oxygen. *Science* 288, 658–661. <https://doi.org/10.1126/science.288.5466.658>
- Canfield, D.E., Olesen, C.A., Cox, R.P., 2006. Temperature and its control of isotope fractionation by a sulfate-reducing bacterium. *Geochim. Cosmochim. Acta* 70, 548–561. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2005.10.028>

- Canfield, D.E., Raiswell, R., Westrich, J.T., Reaves, C.M., Berner, R.A., 1986. The use of chromium reduction in the analysis of reduced inorganic sulfur in sediments and shales. *Chem. Geol.* 54, 149–155. [https://doi.org/10.1016/0009-2541\(86\)90078-1](https://doi.org/10.1016/0009-2541(86)90078-1)
- Canfield, D.E., Thamdrup, B., 1994. The production of ^{34}S -depleted sulfide during bacterial disproportionation of elemental sulfur. *Science* 266, 1973–1975.
- Canfield, D.E., Thamdrup, B., Fleischer, S., 1998. Isotope fractionation and sulfur metabolism by pure and enrichment cultures of elemental sulfur-disproportionating bacteria. *Limnol. Oceanogr.* 43, 253–264. <https://doi.org/10.4319/lo.1998.43.2.0253>
- Carmody, R.W., Plummer, N., Busenberg, E., Coplen, T.B., 1998. Methods for collection of dissolved sulfate and sulfide and analysis of their sulfur isotopic composition (No. 97–234). U.S. Geological Survey; Branch of Information Services [distributor], <https://doi.org/10.3133/ofr97234>
- Catalani, S., Fostinelli, J., Gilberti, M.E., Apostoli, P., 2015. Application of a metal free high performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP-MS) for the determination of chromium species in drinking and tap water. *Int. J. Mass Spectrom.* 387, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2015.06.015>
- Caumette, G., Patriarche, D., Chiquet, P., Dequidt, D., Le-Hécho, I., Carrier, H., Ranchou-Peyruse, A., 2017. Natural bioattenuation of BTEX compounds in underground gas storage. Presented at the International Gas Research Conference Proceedings, pp. 518–524.
- Chambers, L.A., Trudinger, P.A., 1979. Microbiological fractionation of stable sulfur isotopes: A review and critique. *Geomicrobiol. J.* 1, 249–293. <https://doi.org/10.1080/01490457909377735>
- Chambers, L.A., Trudinger, P.A., Smith, J.W., Burns, M.S., 1976. A possible boundary condition in bacterial sulfur isotope fractionation. *Geochim. Cosmochim. Acta* 40, 1191–1194. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(76\)90154-X](https://doi.org/10.1016/0016-7037(76)90154-X)
- Charlson, R.J., Warren, S.G., Lovelock, J.E., Andreae, M.O., 1987. Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo and climate. *Nature* 326, 655–661. <https://doi.org/10.1038/326655a0>
- Chen, K.Y., Morris, J.C., 1972. Kinetics of Oxidation of Aqueous Sulfide by O_2 . *Environ. Sci. Technol.* 6, 529–537. <https://doi.org/10.1021/es60065a008>
- Chen, L., Chen, K., Bao, Z., Liang, P., Sun, T., Yuan, H., 2017. Preparation of standards for in situ sulfur isotope measurement in sulfides using femtosecond laser ablation MC-ICP-MS. *J Anal Spectrom* 32, 107–116. <https://doi.org/10.1039/C6JA00270F>
- Christensen, L.E., Brunner, B., Truong, K.N., Mielke, R.E., Webster, C.R., Coleman, M., 2007. Measurement of Sulfur Isotope Compositions by Tunable Laser Spectroscopy of SO_2 . *Anal. Chem.* 79, 9261–9268. <https://doi.org/10.1021/ac071040p>
- Cline, J.D., 1969. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* 14, 454–458. <https://doi.org/10.4319/lo.1969.14.3.0454>
- Clough, R., Evans, P., Catterick, T., Evans, E.H., 2006. $\delta^{34}\text{S}$ Measurements of Sulfur by Multicollector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 78, 6126–6132. <https://doi.org/10.1021/ac060875h>
- Coplen, T.B., Hopple, J.A., Boehike, J.K., Peiser, H.S., Rieder, S.E., 2002. Compilation of minimum and maximum isotope ratios of selected elements in naturally occurring terrestrial materials and reagents.
- Coplen, T.B., Krouse, H.R., 1998. Sulphur isotope data consistency improved. *Nature* 392, 32–32. <https://doi.org/10.1038/32080>
- Craddock, P.R., Bach, W., 2010. Insights to magmatic–hydrothermal processes in the Manus back-arc basin as recorded by anhydrite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 74, 5514–5536. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2010.07.004>
- Craddock, P.R., Rouxel, O.J., Ball, L.A., Bach, W., 2008. Sulfur isotope measurement of sulfate and sulfide by high-resolution MC-ICP-MS. *Chem. Geol.* 253, 102–113. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2008.04.017>
- Crowe, S.A., Paris, G., Katsev, S., Jones, C., Kim, S.-T., Zerkle, A.L., Nomosatryo, S., Fowle, D.A., Adkins, J.F., Sessions, A.L., Farquhar, J., Canfield, D.E., 2014. Sulfate was a trace constituent of Archean seawater. *Science* 346, 735–739. <https://doi.org/10.1126/science.1258966>

- Cui, H., Kaufman, A.J., Xiao, S., Zhu, M., Zhou, C., Liu, X.-M., 2015. Redox architecture of an Ediacaran ocean margin. Integrated chemostratigraphic ($\delta^{13}\text{C}$ – $\delta^{34}\text{S}$ – $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ – Ce/Ce) correlation of the Doushantuo Formation, South China. *Chem. Geol.* 48–62.
- Cypionka, H., 1995. Solute Transport and Cell Energetics, in: Barton, L.L. (Ed.), *Sulfate-Reducing Bacteria*, Biotechnology Handbooks. Springer US, Boston, MA, pp. 151–184. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1582-5_6
- Cypionka, H., Smock, A.M., Böttcher, M.E., 1998. A combined pathway of sulfur compound disproportionation in *Desulfovibrio desulfuricans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 166, 181–186. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13888.x>
- Das, A., Chung, C.-H., You, C.-F., 2012a. Disproportionately high rates of sulfide oxidation from mountainous river basins of Taiwan orogeny: Sulfur isotope evidence. *Geophys. Res. Lett.* 39. <https://doi.org/10.1029/2012GL051549>
- Das, A., Chung, C.-H., You, C.-F., Shen, M.-L., 2012b. Application of an improved ion exchange technique for the measurement of $\delta^{34}\text{S}$ values from microgram quantities of sulfur by MC-ICPMS. *J. Anal. At. Spectrom.* 27, 2088. <https://doi.org/10.1039/c2ja30189j>
- David R. Lide, (Editor-in-Chief, National Institute of Standards and Technology), 2007. *Handbook of Chemistry and Physics*, 87th edition. *J. Am. Chem. Soc.* <https://doi.org/10.1021/ja069813z>
- Davidson, M.M., Bisher, M.E., Pratt, L.M., Fong, J., Southam, G., Pfiffner, S.M., Reches, Z., Onstott, T.C., 2009. Sulfur Isotope Enrichment during Maintenance Metabolism in the Thermophilic Sulfate-Reducing Bacterium *Desulfotomaculum putei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5621–5630. <https://doi.org/10.1128/AEM.02948-08>
- de Laeter, J.R., Böhlke, J.K., De Bièvre, P., Hidaka, H., Peiser, H.S., Rosman, K.J.R., Taylor, P.D.P., 2003. Atomic weights of the elements. Review 2000 (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 75, 683–800.
- del Valle, D.A., Kieber, D.J., Kiene, R.P., 2007. Depth-dependent fate of biologically-consumed dimethylsulfide in the Sargasso Sea. *Mar. Chem.* 103, 197–208.
- Detmers, J., Brüchert, V., Habicht, K.S., Kuever, J., 2001. Diversity of sulfur isotope fractionations by sulfate-reducing prokaryotes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 888–894. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.888-894.2001>
- Divjak, B., Goessler, W., 1999. Ion chromatographic separation of sulfur-containing inorganic anions with an ICP–MS as element-specific detector. *J. Chromatogr. A* 844, 161–169. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00409-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00409-4)
- Dogramaci, S., Herczeg, A., Schiff, S., Bone, Y., 2001. Controls on $\delta^{34}\text{S}$ and $\delta^{18}\text{O}$ of dissolved sulfate in aquifers of the Murray Basin, Australia and their use as indicators of flow processes. *Appl. Geochem.* 16, 475–488. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(00\)00052-4](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(00)00052-4)
- Dunn, P.J.H., Carter, J.F., 2018. Good practice guide for isotope ratio mass spectrometry, 2nd ed. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1562-0>
- Einsiedl, F., Piloni, G., Ruth-Anneser, B., Lueders, T., Griebler, C., 2015. Spatial distributions of sulphur species and sulphate-reducing bacteria provide insights into sulphur redox cycling and biodegradation hot-spots in a hydrocarbon-contaminated aquifer. *Geochim. Cosmochim. Acta* 156, 207–221. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2015.01.014>
- Eldridge, D.L., Farquhar, J., 2018. Rates and multiple sulfur isotope fractionations associated with the oxidation of sulfide by oxygen in aqueous solution. *Geochim. Cosmochim. Acta* 237, 240–260. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2018.06.030>
- Epov, V.N., Berail, S., Jimenez-Moreno, M., Perrot, V., Pecheyran, C., Amouroux, D., Donard, O.F.X., 2010. Approach to Measure Isotopic Ratios in Species Using Multicollector-ICPMS Coupled with Chromatography. *Anal. Chem.* 82, 5652–5662. <https://doi.org/10.1021/ac100648f>
- Epov, V.N., Rodriguez-Gonzalez, P., Sonke, J.E., Tessier, E., Amouroux, D., Bourgoin, L.M., Donard, O.F.X., 2008. Simultaneous determination of species-specific isotopic composition of Hg by gas chromatography coupled to multicollector ICPMS. *Anal. Chem.* 80, 3530–3538. <https://doi.org/10.1021/ac800384b>
- EURACHEM, 2000. Guide EURACHEM/CITAC – Quantifier l’incertitude dans les mesures analytiques, deuxième édition.
- Farquhar, J., Bao, H., Thiemens, M., 2000. Atmospheric Influence of Earth’s Earliest Sulfur Cycle. *Science* 289, 756–758. <https://doi.org/10.1126/science.289.5480.756>

- Farquhar, J., Savarino, J., Airieau, S., Thiemens, M.H., 2001. Observation of wavelength-sensitive mass-independent sulfur isotope effects during SO₂ photolysis: Implications for the early atmosphere. *J. Geophys. Res. Planets* 106, 32829–32839. <https://doi.org/10.1029/2000JE001437>
- Farquhar, J., Wing, B.A., 2003. Multiple sulfur isotopes and the evolution of the atmosphere. *Earth Planet. Sci. Lett.* 213, 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0012-821X\(03\)00296-6](https://doi.org/10.1016/S0012-821X(03)00296-6)
- Feisthauer, S., Seidel, M., Bombach, P., Traube, S., Knöller, K., Wange, M., Fachmann, S., Richnow, H.H., 2012. Characterization of the relationship between microbial degradation processes at a hydrocarbon contaminated site using isotopic methods. *J. Contam. Hydrol.* 133, 17–29. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2012.03.001>
- Feng, J., Johnson, D.C., Lowery, S.N., 1995. Oxidation of Thiosulfate to Sulfate at Glassy Carbon Electrodes. *J. Electrochem. Soc.* 142, 2618. <https://doi.org/10.1149/1.2050063>
- Fietzke, J., Liebetrau, V., Günther, D., Gürs, K., Hametner, K., Zumholz, K., Hansteen, T.H., Eisenhauer, A., 2008. An alternative data acquisition and evaluation strategy for improved isotope ratio precision using LA-MC-ICP-MS applied to stable and radiogenic strontium isotopes in carbonates. *J. Anal. At. Spectrom.* 23, 955. <https://doi.org/10.1039/b717706b>
- Fike, D.A., Bradley, A.S., Leavitt, W.D., 2015. Geomicrobiology of sulfur, in: Ehrlich's Geomicrobiology, Sixth Edition. pp. 479–516. <https://doi.org/10.1201/b19121>
- Findley, J.E., Akagi, J.M., 1969. Evidence for thiosulfate formation during sulfite reduction by *Desulfovibrio vulgaris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36, 266–271. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(69\)90324-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(69)90324-6)
- Finster, K., 2008. Microbiological disproportionation of inorganic sulfur compounds. *J. Sulfur Chem.* 29, 281–292. <https://doi.org/10.1080/17415990802105770>
- Fischer, H., Schulz-Ekloff, G., Wöhrle, D., 1997. Oxidation of aqueous sulfide solutions by dioxygen Part I: Autoxidation reaction. *Chem. Eng. Technol.* 20, 462–468. <https://doi.org/10.1002/ceat.270200705>
- Fitz, R.M., Cypionka, H., 1990. Formation of thiosulfate and trithionate during sulfite reduction by washed cells of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Arch. Microbiol.* 154, 400–406. <https://doi.org/10.1007/BF00276538>
- Fontes, J.-C., Fritz, P., Louvat, D., Michelot, J.-L., 1989. Aqueous sulphates from the Stripa groundwater system. *Geochim. Cosmochim. Acta* 53, 1783–1789. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(89\)90299-8](https://doi.org/10.1016/0016-7037(89)90299-8)
- Fourel, F., Martineau, F., Seris, M., Lécuyer, C., 2015. Measurement of ³⁴S/³²S Ratios of NBS 120c and BCR 32 Phosphorites Using Purge and Trap EA-IRMS Technology. *Geostand. Geoanalytical Res.* 39, 47–53. <https://doi.org/10.1111/j.1751-908X.2014.00297.x>
- Friend, J.P., 1973. The Global Sulfur Cycle, in: Rasool, S.I. (Ed.), Chemistry of the Lower Atmosphere. Springer US, Boston, MA, pp. 177–201. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-1986-3_4
- Fritz, P., Drimmie, R.J., Nowicki, V.K., 1974. Preparation of sulfur dioxide for mass spectrometer analyses by combustion of sulfides with copper oxide. *Anal. Chem.* 46, 164–166. <https://doi.org/10.1021/ac60337a044>
- Froelich, P.N., Klinkhammer, G.P., Bender, M.L., Luedtke, N.A., Heath, G.R., Cullen, D., Dauphin, P., Hammond, D., Hartman, B., Maynard, V., 1979. Early oxidation of organic matter in pelagic sediments of the eastern equatorial Atlantic: suboxic diagenesis. *Geochim. Cosmochim. Acta* 43, 1075–1090. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(79\)90095-4](https://doi.org/10.1016/0016-7037(79)90095-4)
- Fry, B., Cox, J., Gest, H., Hayes, J.M., 1986. Discrimination between ³⁴S and ³²S during bacterial metabolism of inorganic sulfur compounds. *J. Bacteriol.* 165, 328–330. <https://doi.org/10.1128/jb.165.1.328-330.1986>
- Fry, B., Gest, H., Hayes, J.M., 1988a. ³⁴S/³²S fractionation in sulfur cycles catalyzed by anaerobic bacteria. *Appl Env. Microbiol.* 54, 250–256.
- Fry, B., Gest, H., Hayes, J.M., 1985. Isotope effects associated with the anaerobic oxidation of sulfite and thiosulfate by the photosynthetic bacterium, *Chromatium vinosum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 27, 227–232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1985.tb00672.x>
- Fry, B., Hayes, G., Hayes, J.M., 1984. Isotope effects associated with the anaerobic oxidation of sulfide by the purple photosynthetic bacterium, *Chromatium vinosum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 22, 283–287.

- Fry, B., Ruf, W., Gest, H., Hayes, J.M., 1988b. Sulfur isotope effects associated with oxidation of sulfide by O₂ in aqueous solution. *Chem. Geol. Isot. Geosci. Sect.* 73, 205–210. [https://doi.org/10.1016/0168-9622\(88\)90001-2](https://doi.org/10.1016/0168-9622(88)90001-2)
- Fry, B., Silva, S., Kendall, C., Anderson, R., 2002. Oxygen isotope corrections for online $\delta^{34}\text{S}$ analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 854–858. <https://doi.org/10.1002/rcm.651>
- Fu, J., Hu, Z., Li, J., Yang, L., Zhang, W., Liu, Y., Li, Q., Zong, K., Hu, S., 2017. Accurate determination of sulfur isotopes ($\delta^{33}\text{S}$ and $\delta^{34}\text{S}$) in sulfides and elemental sulfur by femtosecond laser ablation MC-ICP-MS with non-matrix matched calibration. *J. Anal. At. Spectrom.* 32, 2341–2351. <https://doi.org/10.1039/c7ja00282c>
- Fu, J., Hu, Z., Zhang, W., Yang, L., Liu, Y., Li, M., Zong, K., Gao, S., Hu, S., 2016. In situ sulfur isotopes ($\delta^{34}\text{S}$ and $\delta^{33}\text{S}$) analyses in sulfides and elemental sulfur using high sensitivity cones combined with the addition of nitrogen by laser ablation MC-ICP-MS. *Anal. Chim. Acta* 911, 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.01.026>
- Gage, D.A., Rhodes, D., Nolte, K.D., Hicks, W.A., Leustek, T., Cooper, A.J., Hanson, A.D., 1997. A new route for synthesis of dimethylsulphoniopropionate in marine algae. *Nature* 387, 891–894. <https://doi.org/10.1038/43160>
- Giesemann, A., Jaeger, H.-J., Norman, A.L., Krouse, H.R., Brand, W.A., 1994. Online Sulfur-Isotope Determination Using an Elemental Analyzer Coupled to a Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* 66, 2816–2819. <https://doi.org/10.1021/ac00090a005>
- Gilhooly III, W.P., Reinhard, C.T., Lyons, T.W., 2016. A comprehensive sulfur and oxygen isotope study of sulfur cycling in a shallow, hyper-euxinic meromictic lake. *Geochim. Cosmochim. Acta* 189, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2016.05.044>
- Giner Martínez-Sierra, J., Santamaria-Fernandez, R., Hearn, R., Marchante Gayón, J.M., García Alonso, J.I., 2010. Development of a Direct Procedure for the Measurement of Sulfur Isotope Variability in Beers by MC-ICP-MS. *J. Agric. Food Chem.* 58, 4043–4050. <https://doi.org/10.1021/jf9019213>
- Goldhaber, M.B., Kaplan, I.R., 1980. Mechanisms of sulfur incorporation and isotope fractionation during early diagenesis in sediments of the gulf of California. *Mar. Chem.* 9, 95–143. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(80\)90063-8](https://doi.org/10.1016/0304-4203(80)90063-8)
- Gomide, C.S., Brod, J.A., Junqueira-Brod, T.C., Buhn, B.M., Santos, R.V., Barbosa, E.S.R., Cordeiro, P.F.O., Palmieri, M., Grasso, C.B., Torres, M.G., 2013. Sulfur isotopes from Brazilian alkaline carbonatite complexes. *Chem. Geol.* 341, 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2013.01.006>
- Gonfiantini, R., Strichler, W., Rozanski, K., 1993. Standards and intercomparison materials distributed by the International Atomic Energy Agency for stable isotope measurements. Presented at the Reference and intercomparison materials for stable isotope of light elements. Proceedings of a consultants meeting held in Vienna, 1–3 December 1993., IAEA, Vienna, pp. 13–30.
- Goodridge, B.M., Valentine, D.L., 2016. Microscale Measurement and Visualization of Sulfide $\Delta^{34}\text{S}$ Using Photographic Film Sulfide Capture Coupled with Laser Ablation Multicollector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 88, 10126–10133. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02601>
- Gourgiotis, A., Manhès, G., Martelat, B., Isnard, H., 2017. Deconvolution of the isotopic drift in LC-MC-ICPMS coupling: a new tool for studding isotope fractionation induced by sample introduction techniques. *J Anal Spectrom.* <https://doi.org/10.1039/C6JA00418K>
- Grassineau, N.V., 2006. High-precision EA-IRMS analysis of S and C isotopes in geological materials. *Appl. Geochem.* 21, 756–765. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2006.02.015>
- Grassineau, N.V., Matthey, D.P., Lowry, D., 2001. Sulfur Isotope Analysis of Sulfide and Sulfate Minerals by Continuous Flow-Isotope Ratio Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 73, 220–225. <https://doi.org/10.1021/ac000550f>
- Greenwood, P.F., Amrani, A., Sessions, A., Raven, M.R., Holman, A., Dror, G., Grice, K., McCulloch, M.T., Adkins, J.F., 2014. CHAPTER 10. Development and Initial Biogeochemical Applications of Compound-Specific Sulfur Isotope Analysis, in: Grice, K. (Ed.), *RSC Detection Science*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 285–312.
- Guéguen, F., Isnard, H., Nonell, A., Vio, L., Vercouter, T., Chartier, F., 2015. Neodymium isotope ratio measurements by LC-MC-ICPMS for nuclear applications: investigation of isotopic

- fractionation and mass bias correction. *J Anal Spectrom* 30, 443–452. <https://doi.org/10.1039/C4JA00361F>
- Guéguen, F., Nonell, A., Isnard, H., Vio, L., Chartier, F., 2017. Multi-elemental Gd, Eu, Sm, Nd isotope ratio measurements by liquid chromatography coupled to MC-ICPMS with variable Faraday cup configurations during elution. *Talanta* 162, 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.030>
- Gvirtzman, Z., Said-Ahmad, W., Ellis, G.S., Hill, R.J., Moldowan, J.M., Wei, Z., Amrani, A., 2015. Compound-specific sulfur isotope analysis of thiadimondoids of oils from the Smackover Formation, USA. *Geochim. Cosmochim. Acta* 167, 144–161. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2015.07.008>
- Habicht, K.S., 2002. Calibration of Sulfate Levels in the Archean Ocean. *Science* 298, 2372–2374. <https://doi.org/10.1126/science.1078265>
- Habicht, K.S., Canfield, D.E., 1997. Sulfur isotope fractionation during bacterial sulfate reduction in organic-rich sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 61, 5351–5361.
- Habicht, K.S., Canfield, D.E., Rethmeier, J., 1998. Sulfur isotope fractionation during bacterial reduction and disproportionation of thiosulfate and sulfite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 62, 2585–2595. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(98\)00167-7](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(98)00167-7)
- Halliday, A.N., Lee, D.-C., Christensen, J.N., Walder, A.J., Freedman, P.A., Jones, C.E., Hall, C.M., Yi, W., Teagle, D., 1995. Recent developments in inductively coupled plasma magnetic sector multiple collector mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* 146–147, 21–33. [https://doi.org/10.1016/0168-1176\(95\)04200-5](https://doi.org/10.1016/0168-1176(95)04200-5)
- Han, S.-H., Varga, Z., Krajcók, J., Wallenius, M., Song, K., Mayer, K., 2013. Measurement of the sulphur isotope ratio ($^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$) in uranium ore concentrates (yellow cakes) for origin assessment. *J. Anal. At. Spectrom.* 28, 1919–1925. <https://doi.org/10.1039/c3ja50231g>
- Hanousek, O., Berger, T.W., Prohaska, T., 2016a. MC ICP-MS $\delta^{34}\text{S}$ VCDT measurement of dissolved sulfate in environmental aqueous samples after matrix separation by means of an anion exchange membrane. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 399–407. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9053-z>
- Hanousek, O., Brunner, M., Pröfrock, D., Irrgeher, J., Prohaska, T., 2016b. The performance of single and multi-collector ICP-MS instruments for fast and reliable $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ isotope ratio measurements. *Anal Methods* 8, 7661–7672. <https://doi.org/10.1039/C6AY02177H>
- Hanousek, O., Santner, J., Mason, S., Berger, T.W., Wenzel, W.W., Prohaska, T., 2016c. Diffusive gradients in thin films measurement of sulfur stable isotope variations in labile soil sulfate. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 8333–8341. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9949-2>
- Harrison, A.G., Thode, H.G., 1958. Mechanism of the bacterial reduction of sulphate from isotope fractionation studies. *Trans. Faraday Soc.* 54, 84–92. <https://doi.org/10.1039/tf9585400084>
- Harrison, A.G., Thode, H.G., 1957. The kinetic isotope effect in the chemical reduction of sulphate. *Trans. Faraday Soc.* 53, 1648–1651. <https://doi.org/10.1039/tf9575301648>
- Hassan, S.M., 1994. Sulfur speciation: Methodology and application to sulfide oxidation studies at the sediment-water interface. *Chemosphere* 29, 2555–2569. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(94\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0045-6535(94)90057-4)
- Havlin, J.L., Tisdale, S.L., Nelson, W.L., Beaton, J.D., 1999. *Soil Fertility and Fertilizers*. Pearson, Upper Saddle River, N.J.
- Hoefs, J., 2015. *Stable Isotope Geochemistry*. Springer International Publishing, Cham.
- Hoek, J., Reysenbach, A.-L., Habicht, K.S., Canfield, D.E., 2006. Effect of hydrogen limitation and temperature on the fractionation of sulfur isotopes by a deep-sea hydrothermal vent sulfate-reducing bacterium. *Geochim. Cosmochim. Acta* 70, 5831–5841. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2006.07.031>
- Holmer, M., Storkholm, P., 2001. Sulphate reduction and sulphur cycling in lake sediments: A review. *Freshw. Biol.* 46, 431–451. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2001.00687.x>
- Holser, W.T., Kaplan, I.R., 1966. Isotope geochemistry of sedimentary sulfates. *Chem. Geol.* 1, 93–135. [https://doi.org/10.1016/0009-2541\(66\)90011-8](https://doi.org/10.1016/0009-2541(66)90011-8)
- Howard, B.H., Hungate, R.E., 1976. *Desulfovibrio* of the sheep rumen. *Appl Env. Microbiol* 32, 598–602.

- Hu, G., Rumble, D., Wang, P., 2003. An ultraviolet laser microprobe for the in situ analysis of multisulfur isotopes and its use in measuring Archean sulfur isotope mass-independent anomalies. *Geochim. Cosmochim. Acta* 67, 3101–3118. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(02\)00929-8](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(02)00929-8)
- Hubert, C., Voordouw, G., Mayer, B., 2009. Elucidating microbial processes in nitrate- and sulfate-reducing systems using sulfur and oxygen isotope ratios: The example of oil reservoir souring control. *Geochim. Cosmochim. Acta* 73, 3864–3879. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2009.03.025>
- Ingle, C.P., Sharp, B.L., Horstwood, M.S.A., Parrish, R.R., Lewis, D.J., 2003. Instrument response functions, mass bias and matrix effects in isotope ratio measurements and semi-quantitative analysis by single and multi-collector ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 18, 219–229. <https://doi.org/10.1039/B211527A>
- Ishida, T., Tayasu, I., Takenaka, C., 2015. Characterization of sulfur deposition over the period of industrialization in Japan using sulfur isotope ratio in Japanese cedar tree rings taken from stumps. *Environ. Monit. Assess.* 187. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4678-0>
- JCGM group, 2012. *Vocabulaire international de métrologie – Concepts fondamentaux et généraux et termes associés (VIM)*.
- Jenkins, K.A., Bao, H., 2006. Multiple oxygen and sulfur isotope compositions of atmospheric sulfate in Baton Rouge, LA, USA. *Atmos. Environ.* 40, 4528–4537. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2006.04.010>
- Jeyakumar, S., Rastogi, R.K., Chaudhuri, N.K., Ramakumar, K.L., 2002. Determination of Sulphur Species in the Presence of Common Anions with Indirect Measurement of Sulphide by Ion Chromatography (ic). *Anal. Lett.* 35, 383–395. <https://doi.org/10.1081/AL-120002537>
- Johnston, D.T., Farquhar, J., Wing, B.A., Kaufman, A.J., Canfield, D.E., Habicht, K.S., 2005. Multiple sulfur isotope fractionations in biological systems: a case study with sulfate reducers and sulfur disproportionators. *Am. J. Sci.* 305, 645–660.
- Jones, G.E., Starkey, R.L., 1957. Fractionation of Stable Isotopes of Sulfur by Microorganisms and Their Role in Deposition of Native Sulfur. *Appl. Microbiol.* 5, 111–118.
- Jørgensen, 1990a. A thiosulfate shunt in the sulfur cycle of marine sediments. *Science* 249, 152–154. <https://doi.org/10.1126/science.249.4965.152>
- Jørgensen, 1990b. The sulfur cycle of freshwater sediments: Role of thiosulfate. *Limnol. Oceanogr.* 35, 1329–1342. <https://doi.org/10.4319/lo.1990.35.6.1329>
- Jørgensen, B.B., 1982. Mineralization of organic matter in the sea bed—the role of sulphate reduction. *Nature* 296, 643–645. <https://doi.org/10.1038/296643a0>
- Jørgensen, B.B., 1979. A theoretical model of the stable sulfur isotope distribution in marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 43, 363–374. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(79\)90201-1](https://doi.org/10.1016/0016-7037(79)90201-1)
- Jørgensen, B.B., Böttcher, M.E., Lüschen, H., Neretin, L.N., Volkov, I.I., 2004. Anaerobic methane oxidation and a deep H₂S sink generate isotopically heavy sulfides in Black Sea sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 68, 2095–2118. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2003.07.017>
- Jørgensen, B.B., Kasten, S., 2006. Sulfur Cycling and Methane Oxidation, in: Schulz, H.D., Zabel, M. (Eds.), *Marine Geochemistry*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 271–309. https://doi.org/10.1007/3-540-32144-6_8
- Jørgensen, B.B., Nelson, D.C., 2004. Sulfide oxidation in marine sediments: Geochemistry meets microbiology. *Spec. Pap. Geol. Soc. Am.* 379, 63–81. <https://doi.org/10.1130/0-8137-2379-5.63>
- Kamyshny, A., Druschel, G., Mansaray, Z.F., Farquhar, J., 2014. Multiple sulfur isotopes fractionations associated with abiotic sulfur transformations in Yellowstone National Park geothermal springs. *Geochem. Trans.* 15, 7. <https://doi.org/10.1186/1467-4866-15-7>
- Kamyshny, A., Zerkle, A.L., Mansaray, Z.F., Ciglenc̆ki, I., Bura-Nakić, E., Farquhar, J., Ferdelman, T.G., 2011. Biogeochemical sulfur cycling in the water column of a shallow stratified sea-water lake: Speciation and quadruple sulfur isotope composition. *Mar. Chem.* 127, 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2011.09.001>
- Kaplan, I.R., Rafter, T.A., 1958. Fractionation of Stable Isotopes of Sulfur by Thiobacilli. *Science* 127, 517–518. <https://doi.org/10.1126/science.127.3297.517>
- Kaplan, I.R., Rittenberg, S.C., 1964. Microbiological fractionation of sulphur isotopes. *J. Gen. Microbiol.* 34, 195–212.

- Kaplan, I.R., Rittenberg, S.C., 1962. Fractionation of Isotopes in Relation to the Problem of Elemental Sulphur Transport by Micro-organisms. *Nature* 194, 1098. <https://doi.org/10.1038/1941098a0>
- Kaufman, A.J., Johnston, D.T., Farquhar, J., Masterson, A.L., Lyons, T.W., Bates, S., Anbar, A.D., Arnold, G.L., Garvin, J., Buick, R., 2007. Late Archean biospheric oxygenation and atmospheric evolution. *Science* 317, 1900–1903.
- Kellogg, W.W., Cadle, R.D., Allen, E.R., Lazrus, A.L., Martell, E.A., 1972. The Sulfur Cycle. *Science* 175, 587–596. <https://doi.org/10.1126/science.175.4022.587>
- Kelly, D.P., 2008. Stable sulfur isotope fractionation and discrimination between the sulfur atoms of thiosulfate during oxidation by *Halothiobacillus neapolitanus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 282, 299–306. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01146.x>
- Kemp, A.L.W., Thode, H.G., 1968. The mechanism of the bacterial reduction of sulphate and of sulphite from isotope fractionation studies. *Geochim. Cosmochim. Acta* 32, 71–91. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(68\)90088-4](https://doi.org/10.1016/0016-7037(68)90088-4)
- Kendall, C., Doctor, D.H., Young, M.B., 2014. 7.9 - Environmental Isotope Applications in Hydrologic Studies, in: Holland, H.D., Turekian, K.K. (Eds.), *Treatise on Geochemistry (Second Edition)*. Elsevier, Oxford, pp. 273–327. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-095975-7.00510-6>
- Kerker, M., 1951. The Acid Decomposition of Sodium Thiosulfate. *J. Chem. Phys.* 19, 1324–1325. <https://doi.org/10.1063/1.1748044>
- Kiene, R.P., Linn, L.J., Bruton, J.A., 2000. New and important roles for DMSP in marine microbial communities. *J. Sea Res.* 43, 209–224. [https://doi.org/10.1016/S1385-1101\(00\)00023-X](https://doi.org/10.1016/S1385-1101(00)00023-X)
- Killingsworth, B.A., Bao, H., 2015. Significant Human Impact on the Flux and $\delta^{34}\text{S}$ of Sulfate from the Largest River in North America. *Environ. Sci. Technol.* 49, 4851–4860. <https://doi.org/10.1021/es504498s>
- Kleikemper, J., Schroth, M.H., Bernasconi, S.M., Brunner, B., Zeyer, J., 2004. Sulfur isotope fractionation during growth of sulfate-reducing bacteria on various carbon sources. *Geochim. Cosmochim. Acta* 68, 4891–4904. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2004.05.034>
- Knöller, K., Vogt, C., Feisthauer, S., Weise, S.M., Weiss, H., Richnow, H.-H., 2008. Sulfur Cycling and Biodegradation in Contaminated Aquifers: Insights from Stable Isotope Investigations. *Environ. Sci. Technol.* 42, 7807–7812. <https://doi.org/10.1021/es800331p>
- Knöller, K., Vogt, C., Richnow, H.-H., Weise, S.M., 2006. Sulfur and Oxygen Isotope Fractionation during Benzene, Toluene, Ethyl Benzene, and Xylene Degradation by Sulfate-Reducing Bacteria. *Environ. Sci. Technol.* 40, 3879–3885. <https://doi.org/10.1021/es052325r>
- Kobayashi, K., Tachibana, S., Ishimoto, M., 1969. Intermediary formation of trithionate in sulfite reduction by a sulfate-reducing bacterium. *J. Biochem. (Tokyo)* 65, 155–157.
- Kobayashi, K., Takahashi, E., Ishimoto, M., 1972. Biochemical studies on sulfate-reducing bacteria: XI. purification and some properties of sulfite reductase, desulfovirdin. *J. Biochem. (Tokyo)* 72, 879–887. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a129982>
- Kragten, J., 1994. Tutorial review. Calculating standard deviations and confidence intervals with a universally applicable spreadsheet technique. *Analyst* 119, 2161–2165. <https://doi.org/10.1039/AN9941902161>
- Krajcók, J., Varga, Z., Wallenius, M., Mayer, K., Konings, R., 2016. Investigation of sulphur isotope variation due to different processes applied during uranium ore concentrate production. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 309, 1113–1121. <https://doi.org/10.1007/s10967-016-4733-5>
- Krouse, H.R., Mayer, B., 2000. Sulphur and Oxygen Isotopes in Sulphate, in: Cook, P.G., Herczeg, A.L. (Eds.), *Environmental Tracers in Subsurface Hydrology*. Springer US, Boston, MA, pp. 195–231. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4557-6_7
- Krupp, E.M., Péchéyan, C., Meffan-Main, S., Donard, O.F.X., 2004. Precise isotope-ratio determination by CGC hyphenated to ICP-MCMS for speciation of trace amounts of gaseous sulfur, with SF₆ as example compound. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 250–255. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2328-9>
- Kurek, M.R., Gilhooly, W.P., III, Druschel, G.K., O’Beirne, M.D., Werne, J.P., 2018. The use of dithiothreitol for the quantitative analysis of elemental sulfur concentrations and isotopes in environmental samples. *Chem. Geol.* 481, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2018.01.014>

- Lana, A., Simó, R., Vallina, S.M., Dachs, J., 2012. Re-examination of global emerging patterns of ocean DMS concentration. *Biogeochemistry* 110, 173–182.
- Leavitt, W.D., 2014. On the mechanisms of sulfur isotope fractionation during microbial sulfate reduction.
- Leavitt, W.D., Bradley, A.S., Santos, A.A., Pereira, I.A., Johnston, D.T., 2015. Sulfur isotope effects of dissimilatory sulfite reductase. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01392>
- Leavitt, W.D., Cummins, R., Schmidt, M.L., Sim, M.S., Ono, S., Bradley, A.S., Johnston, D.T., 2014. Multiple sulfur isotope signatures of sulfite and thiosulfate reduction by the model dissimilatory sulfate-reducer, *Desulfovibrio alaskensis* str. G20. *Front. Microbiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00591>
- Leavitt, W.D., Halevy, I., Bradley, A.S., Johnston, D.T., 2013. Influence of sulfate reduction rates on the Phanerozoic sulfur isotope record. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 11244–11249. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218874110>
- Li, S., Amrani, A., Pang, X., Yang, H., Said-Ahmad, W., Zhang, B., Pang, Q., 2015. Origin and quantitative source assessment of deep oils in the Tazhong Uplift, Tarim Basin. *Org. Geochem.* 78, 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2014.10.004>
- Lin, A.-J., Yang, T., Jiang, S.-Y., 2014. A rapid and high-precision method for sulfur isotope $\delta^{34}\text{S}$ determination with a multiple-collector inductively coupled plasma mass spectrometer: matrix effect correction and applications for water samples without chemical purification: Sulfur isotope $\delta^{34}\text{S}$ determination by MC-ICP-MS. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 28, 750–756. <https://doi.org/10.1002/rcm.6838>
- Lin, L.-Y., Jiang, S.-J., 2009. Determination of Sulfur Compounds in Water Samples by Ion Chromatography Dynamic Reaction Cell Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *J. Chin. Chem. Soc.* 56, 967–973. <https://doi.org/10.1002/jccs.200900141>
- Liu, C., Bian, X.-P., Yang, T., Lin, A.-J., Jiang, S.-Y., 2016. Matrix effects of calcium on high-precision sulfur isotope measurement by multiple-collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* 151, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.01.013>
- Livingstone, D.A., 1963. Chemical composition of rivers and lakes (USGS Numbered Series No. 440–G), Professional Paper.
- Loka Bharathi, P.A., 2008. Sulfur Cycle, in: Jørgensen, S.E., Fath, B.D. (Eds.), *Encyclopedia of Ecology*. Academic Press, Oxford, pp. 3424–3431. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00761-8>
- Luther, G.W., Findlay, A.J., Macdonald, D.J., Owings, S.M., Hanson, T.E., Beinart, R.A., Girguis, P.R., 2011. Thermodynamics and kinetics of sulfide oxidation by oxygen: a look at inorganically controlled reactions and biologically mediated processes in the environment. *Front. Microbiol.* 2, 62. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00062>
- Macnamara, J., Thode, H.G., 1950. Comparison of the Isotopic Constitution of Terrestrial and Meteoritic Sulfur. *Phys. Rev.* 78, 307–308. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.78.307>
- Maier, R.M., 2015. Chapter 16 - Biogeochemical Cycling, in: Pepper, I.L., Gerba, C.P., Gentry, T.J. (Eds.), *Environmental Microbiology (Third Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 339–373. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00016-8>
- Mangalo, M., Meckenstock, R.U., Stichler, W., Einsiedl, F., 2007. Stable isotope fractionation during bacterial sulfate reduction is controlled by reoxidation of intermediates. *Geochim. Cosmochim. Acta* 71, 4161–4171. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2007.06.058>
- Mann, J.L., Kelly, W.R., 2005. Measurement of sulfur isotope composition ($\delta^{34}\text{S}$) by multiple-collector thermal ionization mass spectrometry using a ^{33}S - ^{36}S double spike. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 3429–3441. <https://doi.org/10.1002/rcm.2213>
- Mann, J.L., Vocke, R.D., Kelly, W.R., 2009. Revised $\delta^{34}\text{S}$ reference values for IAEA sulfur isotope reference materials S-2 and S-3. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23, 1116–1124. <https://doi.org/10.1002/rcm.3977>
- Mariotti, A., Germon, J., Hubert, P., Kaiser, P., Letolle, R., Tardieux, A., Tardieux, P., 1981. Experimental-Determination of Nitrogen Kinetic Isotope Fractionation - Some Principles - Illustration for the Denitrification and Nitrification Processes. *Plant Soil* 62, 413–430. <https://doi.org/10.1007/BF02374138>

- Martelat, B., Vio, L., Isnard, H., Simonnet, J., Cornet, T., Nonell, A., Chartier, F., 2017. Neodymium isotope ratio measurements by CE-MC-ICPMS: investigation of isotopic fractionation and evaluation of analytical performances. *J. Anal. At. Spectrom.* 32, 2271–2280. <https://doi.org/10.1039/C7JA00250E>
- Mason, P.R.D., Košler, J., de Hoog, J.C.M., Sylvester, P.J., Meffan-Main, S., 2006. In situ determination of sulfur isotopes in sulfur-rich materials by laser ablation multiple-collector inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-MC-ICP-MS). *J Anal Spectrom* 21, 177–186. <https://doi.org/10.1039/B510883G>
- Matsu'ura, F., Sunamura, M., Ueno, Y., Urabe, T., 2016. Influence of cell's growth phase on the sulfur isotopic fractionation during in vitro microbial sulfate reduction. *Chem. Geol.* 431, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2016.03.017>
- Mayer, B., Feger, K.H., Giesemann, A., Jäger, H.-J., 1995. Interpretation of sulfur cycling in two catchments in the Black Forest (Germany) using stable sulfur and oxygen isotope data. *Biogeochemistry* 30, 31–58. <https://doi.org/10.1007/BF02181039>
- Mayer, B., Krouse, H.R., 2004. Chapter 26 - Procedures for Sulfur Isotope Abundance Studies, in: de Groot, P.A. (Ed.), *Handbook of Stable Isotope Analytical Techniques*. Elsevier, Amsterdam, pp. 538–596. <https://doi.org/10.1016/B978-044451114-0/50028-4>
- McConnell, J.R., Burke, A., Dunbar, N.W., Köhler, P., Thomas, J.L., Arienzo, M.M., Chellman, N.J., Maselli, O.J., Sigl, M., Adkins, J.F., Baggenstos, D., Burkhart, J.F., Brook, E.J., Buizert, C., Cole-Dai, J., Fudge, T.J., Knorr, G., Graf, H.-F., Grieman, M.M., Iverson, N., McGwire, K.C., Mulvaney, R., Paris, G., Rhodes, R.H., Saltzman, E.S., Severinghaus, J.P., Steffensen, J.P., Taylor, K.C., Winckler, G., 2017. Synchronous volcanic eruptions and abrupt climate change ~17.7 ka plausibly linked by stratospheric ozone depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 10035–10040. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705595114>
- McCready, R.G.L., 1975. Sulphur isotope fractionation by *Desulfovibrio* and *Desulfotomaculum* species. *Geochim. Cosmochim. Acta* 39, 1395–1401. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(75\)90118-0](https://doi.org/10.1016/0016-7037(75)90118-0)
- McCready, R.G.L., Krouse, H.R., 1982. Sulfur isotope fractionation during the oxidation of elemental sulfur by thiobacilli in a solonchic soil. *Can. J. Soil Sci.* 62, 105–110. <https://doi.org/10.4141/cjss82-012>
- Meshoulam, A., Ellis, G.S., Said Ahmad, W., Deev, A., Sessions, A.L., Tang, Y., Adkins, J.F., Liu, J., Gilhooly III, W.P., Aizenshtat, Z., Amrani, A., 2016. Study of thermochemical sulfate reduction mechanism using compound specific sulfur isotope analysis. *Geochim. Cosmochim. Acta* 188, 73–92. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2016.05.026>
- Michalik, A., Migaszewski, Z.M., 2012. Stable sulfur and oxygen isotope ratios of the Świętokrzyski National Park spring waters generated by natural and anthropogenic factors (south-central Poland). *Appl. Geochem.* 27, 1123–1132. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2012.02.025>
- Michigami, Y., Ueda, K., 1994. Sulphite stabilizer in ion chromatography. *J. Chromatogr. A* 663, 255–258. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)85252-9](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)85252-9)
- Mitchell, K., Heyer, A., Canfield, D.E., Hoek, J., Habicht, K.S., 2009. Temperature effect on the sulfur isotope fractionation during sulfate reduction by two strains of the hyperthermophilic *Archaeoglobus fulgidus*. *Environ. Microbiol.* 11, 2998–3006. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02002.x>
- Moncaster, S.J., Bottrell, S.H., 1991. Extraction of low-level sulphide from groundwaters for sulphur isotope analysis. *Chem. Geol.* 94, 79–82. [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(10\)80019-1](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(10)80019-1)
- Moncaster, S.J., Bottrell, S.H., Tellam, J.H., Lloyd, J.W., Konhauser, K.O., 2000. Migration and attenuation of agrochemical pollutants: insights from isotopic analysis of groundwater sulphate. *J. Contam. Hydrol.* 43, 147–163. [https://doi.org/10.1016/S0169-7722\(99\)00104-7](https://doi.org/10.1016/S0169-7722(99)00104-7)
- Moses, C.O., Herman, J.S., 1991. Pyrite oxidation at circumneutral pH. *Geochim. Cosmochim. Acta* 55, 471–482. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(91\)90005-P](https://doi.org/10.1016/0016-7037(91)90005-P)
- Motellier, S., Descostes, M., 2001. Sulfur speciation and tetrathionate sulfitolysis monitoring by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 907, 329–335. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)01046-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01046-3)

- Moussa, N., Rouxel, O., Grassineau, N.V., Ponzevera, E., Nonnotte, P., Fouquet, Y., Le Gall, B., 2017. Sulfur and strontium isotopic study of epithermal mineralization: A case study from the SE Afar Rift, Djibouti. *Ore Geol. Rev.* 81, 358–368. <https://doi.org/10.1016/j.oregeorev.2016.10.028>
- Okrusch, M., Lorenz, J.A., Weyer, S., 2007. The genesis of sulfide assemblages in the former Wilhelmine mine, Spessart, Bavaria, Germany. *Can. Mineral.* 45, 723–750. <https://doi.org/10.2113/gscanmin.45.4.723>
- Oliveira, T.F., Vornhein, C., Matias, P.M., Venceslau, S.S., Pereira, I.A.C., Archer, M., 2008. The crystal structure of Desulfovibrio vulgaris dissimilatory sulfite reductase bound to DsrC provides novel insights into the mechanism of sulfate respiration. *J. Biol. Chem.* 283, 34141–34149. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805643200>
- Ono, S., Wing, B., Rumble, D., Farquhar, J., 2006. High precision analysis of all four stable isotopes of sulfur (^{32}S , ^{33}S , ^{34}S and ^{36}S) at nanomole levels using a laser fluorination isotope-ratio-monitoring gas chromatography–mass spectrometry. *Chem. Geol.* 225, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2005.08.005>
- O'Reilly, J.W., Dicoski, G.W., Shaw, M.J., Haddad, P.R., 2001. Chromatographic and electrophoretic separation of inorganic sulfur and sulfur–oxygen species. *Anal. Chim. Acta* 432, 165–192. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)01389-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)01389-1)
- Parey, K., Warkentin, E., Kroneck, P.M.H., Ermler, U., 2010. Reaction cycle of the dissimilatory sulfite reductase from *archaeoglobus fulgidus*. *Biochemistry (Mosc.)* 49, 8912–8921. <https://doi.org/10.1021/bi100781f>
- Paris, G., Adkins, J.F., Sessions, A.L., Webb, S.M., Fischer, W.W., 2014a. Neoproterozoic carbonate-associated sulfate records positive $\delta^{33}\text{S}$ anomalies. *Science* 346, 739–741. <https://doi.org/10.1126/science.1258211>
- Paris, G., Fehrenbacher, J.S., Sessions, A.L., Spero, H.J., Adkins, J.F., 2014b. Experimental determination of carbonate-associated sulfate $\delta^{34}\text{S}$ in planktonic foraminifera shells. *Geochem. Geophys. Geosystems* 15, 1452–1461. <https://doi.org/10.1002/2014GC005295>
- Paris, G., Sessions, A.L., Subhas, A.V., Adkins, J.F., 2013. MC-ICP-MS measurement of $\delta^{34}\text{S}$ and $\Delta^{33}\text{S}$ in small amounts of dissolved sulfate. *Chem. Geol.* 345, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2013.02.022>
- Paytan, Kastner, Campbell, Thieme, 1998. Sulfur isotopic composition of Cenozoic seawater sulfate. *Science* 282, 1459–1462.
- Pichat, A., Hoareau, G., Callot, J.-P., Legeay, E., Kavak, K.S., Révillon, S., Parat, C., Ringenbach, J.-C., 2018. Evidence of multiple evaporite recycling processes in a salt-tectonic context, Sivas Basin, Turkey. *Terra Nova* 30, 40–49. <https://doi.org/10.1111/ter.12306>
- Poser, A., Vogt, C., Knöller, K., Ahlheim, J., Weiss, H., Kleinstüber, S., Richnow, H.-H., 2014. Stable Sulfur and Oxygen Isotope Fractionation of Anoxic Sulfide Oxidation by Two Different Enzymatic Pathways. *Environ. Sci. Technol.* 48, 9094–9102. <https://doi.org/10.1021/es404808r>
- Present, T.M., Paris, G., Burke, A., Fischer, W.W., Adkins, J.F., 2015. Large Carbonate Associated Sulfate isotopic variability between brachiopods, micrite, and other sedimentary components in Late Ordovician strata. *Earth Planet. Sci. Lett.* 432, 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2015.10.005>
- Pribil, M.J., Ridley, W.I., Emsbo, P., 2015. Sulfate and sulfide sulfur isotopes ($\delta^{34}\text{S}$ and $\delta^{33}\text{S}$) measured by solution and laser ablation MC-ICP-MS: An enhanced approach using external correction. *Chem. Geol.* 412, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2015.07.014>
- Puchelt, H., Sabels, B.R., Hoering, T.C., 1971. Preparation of sulfur hexafluoride for isotope geochemical analysis. *Geochim. Cosmochim. Acta* 35, 625–628. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(71\)90093-7](https://doi.org/10.1016/0016-7037(71)90093-7)
- Quinn, P.K., Bates, T.S., 2011. The case against climate regulation via oceanic phytoplankton sulphur emissions. *Nature* 480, 51–56. <https://doi.org/10.1038/nature10580>
- Raab, M., Spiro, B., 1991. Sulfur isotopic variations during seawater evaporation with fractional crystallization. *Chem. Geol. Isot. Geosci. Sect.* 86, 323–333. [https://doi.org/10.1016/0168-9622\(91\)90014-N](https://doi.org/10.1016/0168-9622(91)90014-N)
- Raven, M.R., Adkins, J.F., Werne, J.P., Lyons, T.W., Sessions, A.L., 2015. Sulfur isotopic composition of individual organic compounds from Cariaco Basin sediments. *Org. Geochem.* 80, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2015.01.002>

- Raven, M.R., Sessions, A.L., Adkins, J.F., Thunell, R.C., 2016. Rapid organic matter sulfurization in sinking particles from the Cariaco Basin water column. *Geochim. Cosmochim. Acta* 190, 175–190. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2016.06.030>
- Rees, C.E., 1978. Sulphur isotope measurements using SO₂ and SF₆. *Geochim. Cosmochim. Acta* 42, 383–389. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(78\)90269-7](https://doi.org/10.1016/0016-7037(78)90269-7)
- Rees, C.E., 1973. A steady-state model for sulphur isotope fractionation in bacterial reduction processes. *Geochim. Cosmochim. Acta* 37, 1141–1162. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(73\)90052-5](https://doi.org/10.1016/0016-7037(73)90052-5)
- Rennie, V.C.F., Paris, G., Sessions, A.L., Abramovich, S., Turchyn, A.V., Adkins, J.F., 2018. Cenozoic record of $\delta^{34}\text{S}$ in foraminiferal calcite implies an early Eocene shift to deep-ocean sulfide burial. *Nat. Geosci.* 11, 761–765. <https://doi.org/10.1038/s41561-018-0200-y>
- Révész, K.M., Coplen, T.B., Haiping, Q., 2012. Determination of the $\delta^{34}\text{S}$ of total sulfur in solids: RSIL Lab Code 1800. US Department of the Interior, US Geological Survey.
- Richards, S.R., Rudd, J.W.M., Kelly, C.A., 1994. Organic volatile sulfur in lakes ranging in sulfate and dissolved salt concentration over five orders of magnitude. *Limnol. Oceanogr.* 39, 562–572. <https://doi.org/10.4319/lo.1994.39.3.0562>
- Rickard, D., 2012. Chapter 11 - Sedimentary Sulfur Isotope Biogeochemistry, in: Rickard, D. (Ed.), *Developments in Sedimentology, Sulfidic Sediments and Sedimentary Rocks*. Elsevier, pp. 419–473. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52989-3.00011-8>
- Riley, J.P., Chester, R., 1971. *Introduction to Marine Chemistry*. Academic Press, London, New York.
- Rivier, C., Lalere, B., 2003. *Guide méthodologique pour l'estimation des incertitudes en analyse chimique*. LNE, Laboratoire National d'Essais.
- Robinson, B.W., Kusakabe, M., 1975. Quantitative preparation of sulfur dioxide, for sulfur-34/sulfur-32 analyses, from sulfides by combustion with cuprous oxide. *Anal. Chem.* 47, 1179–1181. <https://doi.org/10.1021/ac60357a026>
- Rodríguez-Castrillón, J.A., García-Ruiz, S., Moldovan, M., García Alonso, J.I., 2012. Multiple linear regression and on-line ion exchange chromatography for alternative Rb-Sr and Nd-Sm MC-ICP-MS isotopic measurements. *J. Anal. At. Spectrom.* 27, 611–618. <https://doi.org/10.1039/c2ja10274a>
- Rodríguez-González, P., Epov, V.N., Pecheyran, C., Amouroux, D., Donard, O.F.X., 2012. Species-specific stable isotope analysis by the hyphenation of chromatographic techniques with MC-ICPMS. *Mass Spectrom. Rev.* 31, 504–521. <https://doi.org/10.1002/mas.20352>
- Roy, A.B., Trudinger, P.A., 1970. *The biochemistry of inorganic compounds of sulphur*. University Press, Cambridge [England].
- Rye, R.O., Back, W., Hanshaw, B.B., Rightmire, C.T., Pearson, F.J., 1981. The origin and isotopic composition of dissolved sulfide in groundwater from carbonate aquifers in Florida and Texas. *Geochim. Cosmochim. Acta* 45, 1941–1950. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(81\)90024-7](https://doi.org/10.1016/0016-7037(81)90024-7)
- Said-Ahmad, W., Amrani, A., 2013. A sensitive method for the sulfur isotope analysis of dimethyl sulfide and dimethylsulfoniopropionate in seawater. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27, 2789–2796. <https://doi.org/10.1002/rcm.6751>
- Santamaria-Fernandez, R., Giner, M.-S., Marchante-Gayón, J.M., García-Alonso, J.I., Hearn, R., 2009a. Measurement of longitudinal sulfur isotopic variations by laser ablation MC-ICP-MS in single human hair strands. *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 225–233. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2615-1>
- Santamaria-Fernandez, R., Hearn, R., 2008. Systematic comparison of $\delta^{34}\text{S}$ measurements by multicollector inductively coupled plasma mass spectrometry and evaluation of full uncertainty budget using two different metrological approaches. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 401–408. <https://doi.org/10.1002/rcm.3376>
- Santamaria-Fernandez, R., Hearn, R., Wolff, J.-C., 2009b. Detection of counterfeit antiviral drug HeptodinTM and classification of counterfeits using isotope amount ratio measurements by multicollector inductively coupled plasma mass spectrometry (MC-ICPMS) and isotope ratio mass spectrometry (IRMS). *Sci. Justice* 49, 102–106. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2008.12.003>
- Santamaria-Fernandez, R., Hearn, R., Wolff, J.-C., 2008. Detection of counterfeit tablets of an antiviral drug using $\delta^{34}\text{S}$ measurements by MC-ICP-MS and confirmation by LA-MC-ICP-MS and HPLC-MC-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 23, 1294. <https://doi.org/10.1039/b802890g>

- Sato, K., Furuya, S., Takenaka, N., Bandow, H., Maeda, Y., Furukawa, Y., 2003. Oxidative Reaction of Thiosulfate with Hydrogen Peroxide by Freezing. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 76, 1139–1144. <https://doi.org/10.1246/bcsj.76.1139>
- Schauder, R., Eikmanns, B., Thauer, R.K., Widdel, F., Fuchs, G., 1986. Acetate oxidation to CO₂ in anaerobic bacteria via a novel pathway not involving reactions of the citric acid cycle. *Arch. Microbiol.* 145, 162–172. <https://doi.org/10.1007/BF00446775>
- Schippers, A., Jorgensen, B.B., 2001. Oxidation of pyrite and iron sulfide by manganese dioxide in marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 65, 915–922. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(00\)00589-5](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(00)00589-5)
- Schoonen, M.A., 2018. Sulfur cycle. *Encycl. Earth Sci. Ser.* 1399–1401.
- Schroth, M.H., Kleikemper, J., Bolliger, C., Bernasconi, S.M., Zeyer, J., 2001. In situ assessment of microbial sulfate reduction in a petroleum-contaminated aquifer using push–pull tests and stable sulfur isotope analyses. *J. Contam. Hydrol.* 51, 179–195. [https://doi.org/10.1016/S0169-7722\(01\)00128-0](https://doi.org/10.1016/S0169-7722(01)00128-0)
- Seal, R.R., 2006. Sulfur Isotope Geochemistry of Sulfide Minerals. *Rev. Mineral. Geochem.* 61, 633–677. <https://doi.org/10.2138/rmg.2006.61.12>
- Sieper, H.-P., Kupka, H.-J., Williams, T., Rossmann, A., Rummel, S., Tanz, N., Schmidt, H.-L., 2006. A measuring system for the fast simultaneous isotope ratio and elemental analysis of carbon, hydrogen, nitrogen and sulfur in food commodities and other biological material. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 2521–2527. <https://doi.org/10.1002/rcm.2619>
- Sillén, L.G., Martell, A.E., Bjerrum, . Stability constants of metal-ion complexes, Jannik, Britain), C.S., 1964. *Stability constants of metal-ion complexes*, 2d ed. ed. London : Chemical Society.
- Sim, M.S., Bosak, T., Ono, S., 2011. Large sulfur isotope fractionation does not require disproportionation. *Science* 333, 74–77. <https://doi.org/10.1126/science.1205103>
- Sim, M.S., Ogata, H., Lubitz, W., Adkins, J.F., Sessions, A.L., Orphan, V.J., McGlynn, S.E., 2019a. Role of APS reductase in biogeochemical sulfur isotope fractionation. *Nat. Commun.* 10, 44. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07878-4>
- Sim, M.S., Ono, S., Donovan, K., Templer, S.P., Bosak, T., 2011. Effect of electron donors on the fractionation of sulfur isotopes by a marine *Desulfovibrio* sp. *Geochim. Cosmochim. Acta* 75, 4244–4259. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2011.05.021>
- Sim, M.S., Paris, G., Adkins, J.F., Orphan, V.J., Sessions, A.L., 2017. Quantification and isotopic analysis of intracellular sulfur metabolites in the dissimilatory sulfate reduction pathway. *Geochim. Cosmochim. Acta* 206, 57–72. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2017.02.024>
- Sim, M.S., Sessions, A.L., Orphan, V.J., Adkins, J.F., 2019b. Precise determination of equilibrium sulfur isotope effects during volatilization and deprotonation of dissolved H₂S. *Geochim. Cosmochim. Acta* 248, 242–251. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2019.01.016>
- Smock, A.M., Böttcher, M.E., Cypionka, H., 1998. Fractionation of sulfur isotopes during thiosulfate reduction by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Arch. Microbiol.* 169, 460–463. <https://doi.org/10.1007/s002030050597>
- Spormann, A.M., Widdel, F., 2000. Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* 11, 85–105. <https://doi.org/10.1023/A:1011122631799>
- Stam, M.C., Mason, P.R.D., Pallud, C., Van Cappellen, P., 2010. Sulfate reducing activity and sulfur isotope fractionation by natural microbial communities in sediments of a hypersaline soda lake (Mono Lake, California). *Chem. Geol.* 278, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2010.08.006>
- Stefánsson, A., Keller, N.S., Robin, J.G., Ono, S., 2015. Multiple sulfur isotope systematics of Icelandic geothermal fluids and the source and reactions of sulfur in volcanic geothermal systems at divergent plate boundaries. *Geochim. Cosmochim. Acta* 165, 307–323. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2015.05.045>
- Strong, F.C., 1961. Faraday's laws in one equation. *J. Chem. Educ.* 38, 98. <https://doi.org/10.1021/ed038p98>
- Sun, S., Li, J., Zhang, L., Yin, L., Zhang, J., 2018. Simultaneous measurement of Re–Os and S isotopic compositions of sulfur-bearing minerals using a Carius tube digestion-based N-TIMS and MC-ICP-MS approach. *J. Anal. At. Spectrom.* 33, 1057–1067. <https://doi.org/10.1039/C8JA00014J>

- Surkov, A.V., Böttcher, M.E., Kuever, J., 2012. Sulphur isotope fractionation during the reduction of elemental sulphur and thiosulphate by *Dethiosulfovibrio* spp. *Isotopes Environ. Health Stud.* 48, 65–75. <https://doi.org/10.1080/10256016.2011.626525>
- Szaran, J., 1996. Experimental investigation of sulphur isotopic fractionation between dissolved and gaseous H₂S. *Chem. Geol.* 127, 223–228. [https://doi.org/10.1016/0009-2541\(95\)00096-8](https://doi.org/10.1016/0009-2541(95)00096-8)
- Szynkiewicz, A., Johnson, A.P., Pratt, L.M., 2012. Sulfur species and biosignatures in Sulphur Springs, Valles Caldera, New Mexico—Implications for Mars astrobiology. *Earth Planet. Sci. Lett.* 321–322, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2011.12.015>
- Thamdrup, B., Finster, K., Fossing, H., Hansen, J.W., Jørgensen, B.B., 1994. Thiosulfate and sulfite distributions in porewater of marine sediments related to manganese, iron, and sulfur geochemistry. *Geochim. Cosmochim. Acta* 58, 67–73. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(94\)90446-4](https://doi.org/10.1016/0016-7037(94)90446-4)
- Thamdrup, B., Finster, K., Hansen, J.W., Bak, F., 1993. Bacterial disproportionation of elemental sulfur coupled to chemical reduction of iron or manganese. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 101–108.
- Thode, H., Rees, C., 1971. Measurement of sulphur concentrations and the isotope ratios ³³S/³²S, ³⁴S/³²S and ³⁶S/³²S in Apollo 12 samples. *Earth Planet. Sci. Lett.* 12, 434–438. [https://doi.org/10.1016/0012-821X\(71\)90029-X](https://doi.org/10.1016/0012-821X(71)90029-X)
- Thode, H.G., Monster, J., Dunford, H.B., 1961. Sulphur isotope geochemistry. *Geochim. Cosmochim. Acta* 25, 159–174. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(61\)90074-6](https://doi.org/10.1016/0016-7037(61)90074-6)
- Thomas, F., Jamin, E., Shimoo, K., Nagao, J., Osaki, Y., Granier, C., 2011. The use of multi-element stable isotope analysis to monitor the origin of chondroitin sulfates: Monitoring the origin of chondroitin sulfates. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25, 2533–2537. <https://doi.org/10.1002/rcm.5159>
- Thomsen, U., Thamdrup, B., Stahl, D.A., Canfield, D.E., 2004. Pathways of organic carbon oxidation in a deep lacustrine sediment, Lake Michigan. *Limnol. Oceanogr.* 49, 2046–2057. <https://doi.org/10.4319/lo.2004.49.6.2046>
- Torres, M.A., Paris, G., Adkins, J.F., Fischer, W.W., 2018. Riverine evidence for isotopic mass balance in the Earth's early sulfur cycle. *Nat. Geosci.* 11, 661–664. <https://doi.org/10.1038/s41561-018-0184-7>
- Torres, M.A., West, A.J., Clark, K.E., Paris, G., Bouchez, J., Ponton, C., Feakins, S.J., Galy, V., Adkins, J.F., 2016. The acid and alkalinity budgets of weathering in the Andes–Amazon system: Insights into the erosional control of global biogeochemical cycles. *Earth Planet. Sci. Lett.* 450, 381–391. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2016.06.012>
- Tostevin, R., Craw, D., Van Hale, R., Vaughan, M., 2016. Sources of environmental sulfur in the groundwater system, southern New Zealand. *Appl. Geochem.* 70, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2016.05.005>
- Ueno, Y., Aoyama, S., Endo, Y., Matsu'ura, F., Foriel, J., 2015. Rapid quadruple sulfur isotope analysis at the sub-micromole level by a flash heating with CoF₃. *Chem. Geol.* 419, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2015.10.032>
- Ullrich, M.K., Gelman, F., Zakon, Y., Halicz, L., Knöller, K., Planer-Friedrich, B., 2018. Sulfur isotope analysis by IC-MC-ICP-MS provides insight into fractionation of thioarsenates during abiotic oxidation. *Chem. Geol.* 477, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2017.12.008>
- Valiente, N., Carrey, R., Otero, N., Gutiérrez-Villanueva, M.A., Soler, A., Sanz, D., Castaño, S., Gómez-Alday, J.J., 2017. Tracing sulfate recycling in the hypersaline Pétrola Lake (SE Spain): A combined isotopic and microbiological approach. *Chem. Geol.* 473, 74–89. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2017.10.024>
- Van Everdingen, R.O., Shakur, M.A., Krouse, H.R., 1982. Isotope geochemistry of dissolved, precipitated, airborne, and fallout sulfur species associated with springs near Paige Mountain, Norman Range, N.W.T. *Can. J. Earth Sci.* 19, 1395–1407.
- Van Stempvoort, D.R., Reardon, E.J., Fritz, P., 1990. Fractionation of sulfur and oxygen isotopes in sulfate by soil sorption. *Geochim. Cosmochim. Acta* 54, 2817–2826. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(90\)90016-E](https://doi.org/10.1016/0016-7037(90)90016-E)
- Wagner, T., Okrusch, M., Weyer, S., Lorenz, J., Lahaye, Y., Taubald, H., Schmitt, R.T., 2010. The role of the Kupferschiefer in the formation of hydrothermal base metal mineralization in the Spessart

- ore district, Germany: insight from detailed sulfur isotope studies. *Miner. Deposita* 45, 217–239. <https://doi.org/10.1007/s00126-009-0270-2>
- Weber, P.K., Hutcheon, I.D., McKeegan, K.D., Ingram, B.L., 2002. Otolith sulfur isotope method to reconstruct salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) life history. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 587–591. <https://doi.org/10.1139/f02-038>
- Weiss, J., 2016. Theory of Chromatography, in: *Handbook of Ion Chromatography*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 15–28. <https://doi.org/10.1002/9783527651610.ch2>
- Werne, J.P., Hollander, D.J., Lyons, T.W., Sinninghe Damsté, J.S., 2004. Organic sulfur biogeochemistry: Recent advances and future research directions. *Spec. Pap. Geol. Soc. Am.* 379, 135–150. <https://doi.org/10.1130/0-8137-2379-5.135>
- Werne, J.P., Lyons, T.W., Hollander, D.J., Schouten, S., Hopmans, E.C., Sinninghe Damsté, J.S., 2008. Investigating pathways of diagenetic organic matter sulfurization using compound-specific sulfur isotope analysis. *Geochim. Cosmochim. Acta* 72, 3489–3502. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2008.04.033>
- Weyer, S., Schwieters, J.B., 2003. High precision Fe isotope measurements with high mass resolution MC-ICPMS. *Int. J. Mass Spectrom.* 226, 355–368. [https://doi.org/10.1016/S1387-3806\(03\)00078-2](https://doi.org/10.1016/S1387-3806(03)00078-2)
- Widdel, F., Pfennig, N., 1981. Sporulation and further nutritional characteristics of *Desulfotomaculum acetoxidans*. *Arch. Microbiol.* 129, 401–402. <https://doi.org/10.1007/BF00406471>
- Wilkin, R.T., Barnes, H.L., 1996. Pyrite formation by reactions of iron monosulfides with dissolved inorganic and organic sulfur species. *Geochim. Cosmochim. Acta* 60, 4167–4179. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(97\)81466-4](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(97)81466-4)
- Wortmann, U.G., Bernasconi, S.M., Böttcher, M.E., 2001. Hypersulfidic deep biosphere indicates extreme sulfur isotope fractionation during single-step microbial sulfate reduction. *Geology* 29, 647–650. [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(2001\)029<0647:HDBIES>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(2001)029<0647:HDBIES>2.0.CO;2)
- Wu, D., Pichler, T., 2014. Simultaneous speciation analysis of As, Sb and Se redox couples by SF-ICP-MS coupled to HPLC. *Anal. Methods* 6, 5112–5119. <https://doi.org/10.1039/c4ay01013b>
- Yanagisawa, F., Sakai, H., 1983. Thermal decomposition of barium sulfate-vanadium pentoxide-silica glass mixtures for preparation of sulfur dioxide in sulfur isotope ratio measurements. *Anal. Chem.* 55, 985–987.
- Yang, L., Zhou, L., Hu, Z., Gao, S., 2014. Direct Determination of Si Isotope Ratios in Natural Waters and Commercial Si Standards by Ion Exclusion Chromatography Multicollector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 86, 9301–9308. <https://doi.org/10.1021/ac5025396>
- Yao, W., Millero, F.J., 1996. Oxidation of hydrogen sulfide by hydrous Fe(III) oxides in seawater. *Mar. Chem.* 52, 1–16. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(95\)00072-0](https://doi.org/10.1016/0304-4203(95)00072-0)
- Yao, W., Millero, F.J., 1993. The rate of sulfide oxidation by δMnO_2 in seawater. *Geochim. Cosmochim. Acta* 57, 3359–3365. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(93\)90544-7](https://doi.org/10.1016/0016-7037(93)90544-7)
- Yoch, D.C., 2002. Dimethylsulfoniopropionate: Its Sources, Role in the Marine Food Web, and Biological Degradation to Dimethylsulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5804–5815. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.5804-5815.2002>
- Yokosuka, F., Kurai, T., Okuwaki, A., Okabe, T., 1975. Oxidation of Sodium Thiosulfate with Hydrogen Peroxide and Sodium Hypochlorite. *NIPPON KAGAKU KAISHI* 1975, 1901–1909. <https://doi.org/10.1246/nikkashi.1975.1901>
- Young, E.D., Galy, A., Nagahara, H., 2002. Kinetic and equilibrium mass-dependent isotope fractionation laws in nature and their geochemical and cosmochemical significance. *Geochim. Cosmochim. Acta* 66, 1095–1104. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(01\)00832-8](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(01)00832-8)
- Yu, T.-L., Wang, B.-S., Shen, C.-C., Wang, P.-L., Yang, T.F., Burr, G.S., Chen, Y.-G., 2017. Improved analytical techniques of sulfur isotopic composition in nanomole quantities by MC-ICP-MS. *Anal. Chim. Acta* 988, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.08.012>
- Yun, M., Mayer, B., Taylor, S.W., 2005. $\delta^{34}\text{S}$ measurements on organic materials by continuous flow isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 1429–1436. <https://doi.org/10.1002/rcm.1939>

- Zakon, Y., Halicz, L., Gelman, F., 2014. Isotope Analysis of Sulfur, Bromine, and Chlorine in Individual Anionic Species by Ion Chromatography/Multicollector-ICPMS. *Anal. Chem.* 86, 6495–6500. <https://doi.org/10.1021/ac5010025>
- Zehnder, A.J.B., Zinder, S.H., 1980. The Sulfur Cycle, in: Hutzinger, O. (Ed.), *The Natural Environment and the Biogeochemical Cycles*, *The Handbook of Environmental Chemistry*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 105–145. https://doi.org/10.1007/978-3-662-24940-6_6
- Zerkle, A.L., Farquhar, J., Johnston, D.T., Cox, R.P., Canfield, D.E., 2009. Fractionation of multiple sulfur isotopes during phototrophic oxidation of sulfide and elemental sulfur by a green sulfur bacterium. *Geochim. Cosmochim. Acta* 73, 291–306. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2008.10.027>
- Zerkle, A.L., Jones, D.S., Farquhar, J., Macalady, J.L., 2016. Sulfur isotope values in the sulfidic Frasassi cave system, central Italy: A case study of a chemolithotrophic S-based ecosystem. *Geochim. Cosmochim. Acta* 173, 373–386. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2015.10.028>
- Zhang, J., Lin, Y., Yang, W., Shen, W., Hao, J., Hu, S., Cao, M., 2014. Improved precision and spatial resolution of sulfur isotope analysis using NanoSIMS. *J Anal Spectrom* 29, 1934–1943. <https://doi.org/10.1039/C4JA00140K>
- Zhang, J.-Z., Millero, F.J., 1993. The products from the oxidation of H₂S in seawater. *Geochim. Cosmochim. Acta* 57, 1705–1718. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(93\)90108-9](https://doi.org/10.1016/0016-7037(93)90108-9)
- Zopfi, J., Ferdelman, T.G., Fossing, H., 2004. Distribution and fate of sulfur intermediates—sulfite, tetrathionate, thiosulfate, and elemental sulfur—in marine sediments, in: *Special Paper 379: Sulfur Biogeochemistry - Past and Present*. Geological Society of America, pp. 97–116. <https://doi.org/10.1130/0-8137-2379-5.97>

Annexes

Annexe 1. Limite de détection du détecteur TCD et de l'EA-IRMS

Le détecteur TCD de l'analyseur élémentaire permet de déterminer le pourcentage massique en soufre des échantillons, sa limite de détection a été estimée en calculant l'écart-type du signal mesuré pour trois blancs (capsule d'étain vide) entre 410 et 590 s (zone d'éluion des pics de SO₂). Cet écart-type a été multiplié par 3 et la masse de soufre correspondante a été calculée grâce à une droite d'étalonnage, présentée sur la Figure A1, réalisée entre l'intensité du signal TCD et la masse de soufre analysée (entre 20 et 320 µg) pour les matériaux de référence acide sulfamique et sulfanilamide. La limite de détection est de 4,2 µg de soufre. La limite de quantification a été calculée comme étant égale à 10 fois l'écart-type du blanc, elle est de 5,3 µg de soufre. Ce test permet également de montrer que l'intensité du signal du TCD est linéaire de 20 µg jusqu'à 320 µg de soufre (Figure A1).

La limite de détection a été calculée de même pour l'IRMS, l'écart-type du signal mesuré pour un blanc (capsule vide) entre 568 et 668 s (zone d'éluion du pic de SO₂ de l'échantillon) a été multiplié par 3 et la masse de soufre correspondante a été calculée par une droite d'étalonnage, présentée sur la Figure A2, réalisée entre l'intensité du soufre à m/z = 64 (l'étalonnage avec m/z = 66 conduit au même résultat) et la masse de soufre analysée. L'étalonnage a été réalisé entre 20 et 147 µg car les masses supérieures à 147 µg ont été diluées *via* le Conflo IV. La limite de détection de l'IRMS est de 10,4 µg de soufre.

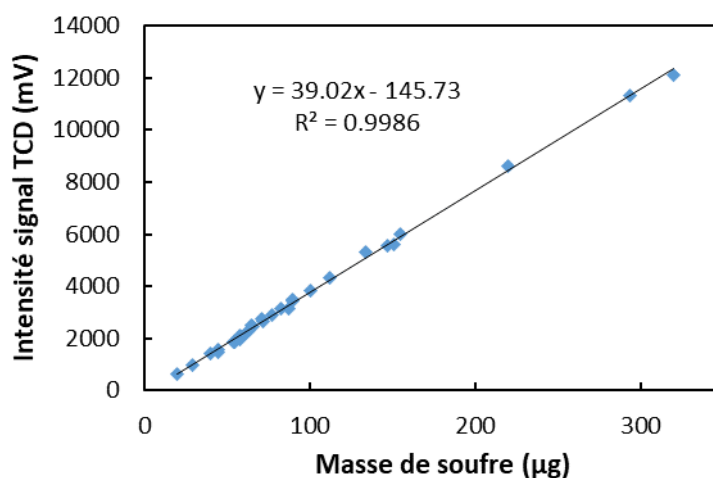


Figure A1 : Droite d'étalonnage entre l'intensité du signal TCD et la masse de soufre analysée.

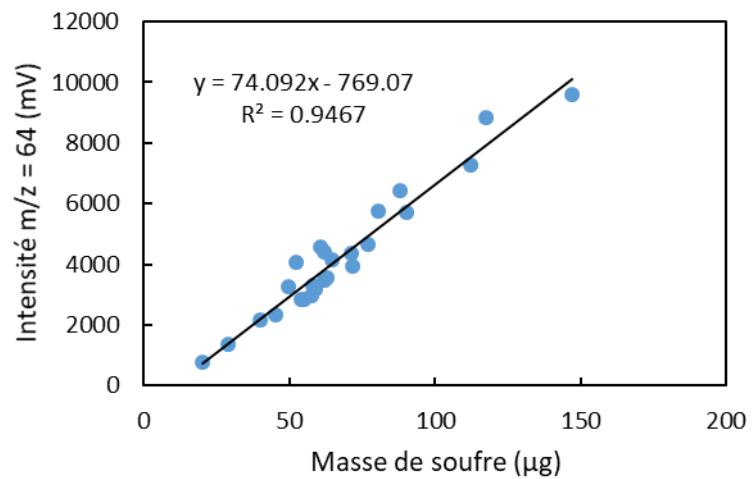


Figure A2 : Droite d'étalonnage entre l'intensité à $m/z = 64$ détectée en IRMS et la masse de soufre analysée.

Annexe 2. Analyse d'un sel de sodium en EA-IRMS

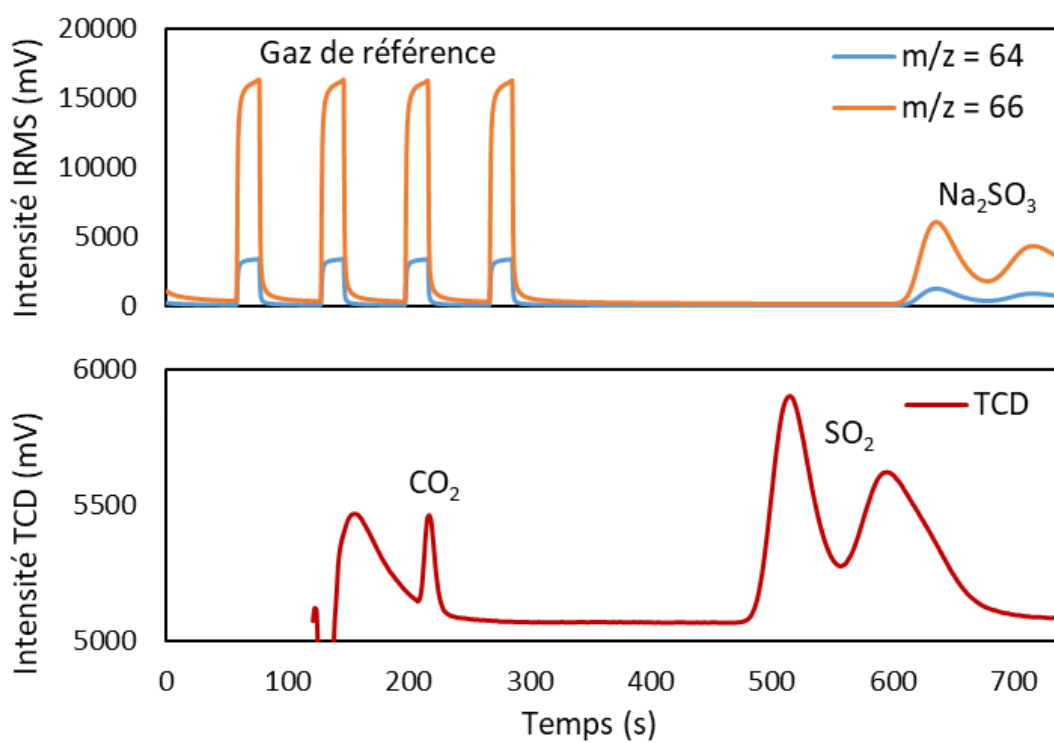


Figure A3 : Analyse EA-IRMS de 232 μg de Na_2SO_3 . Dédoublage du pic de SO_2 dû à la présence de sodium.

Annexe 3. Composition des solutions d'oligoéléments et de vitamines utilisée pour la préparation de milieu de culture bactérien.

| Composé | Concentration (g/L) |
|---|---------------------|
| H ₃ BO ₃ | 0,300 |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 1,1 |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 0,190 |
| MnCl ₂ .4H ₂ O | 0,050 |
| ZnCl ₂ | 0,042 |
| NiCl ₂ .6H ₂ O | 0,024 |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0,018 |
| CuCl ₂ .2H ₂ O | 0,002 |

Tableau A1 : Composition de la solution d'oligoéléments utilisée pour la préparation de milieu de culture bactérien.

| Composé | Concentration (mg/L) |
|---------------------------|----------------------|
| Acide folique | 2 |
| Pyridoxine HCl | 10 |
| Riboflavine | 5 |
| Biotine | 2 |
| Thiamine | 5 |
| Acide nicotinique | 5 |
| Acide pantothénique | 5 |
| Vitamine B12 | 0,1 |
| Acide para-aminobenzoïque | 5 |
| Acide thioctique | 5 |

Tableau A2 : Composition de la solution de vitamines utilisée pour la préparation de milieu de culture bactérien.

Annexe 4. Analyses électrochimiques de blancs

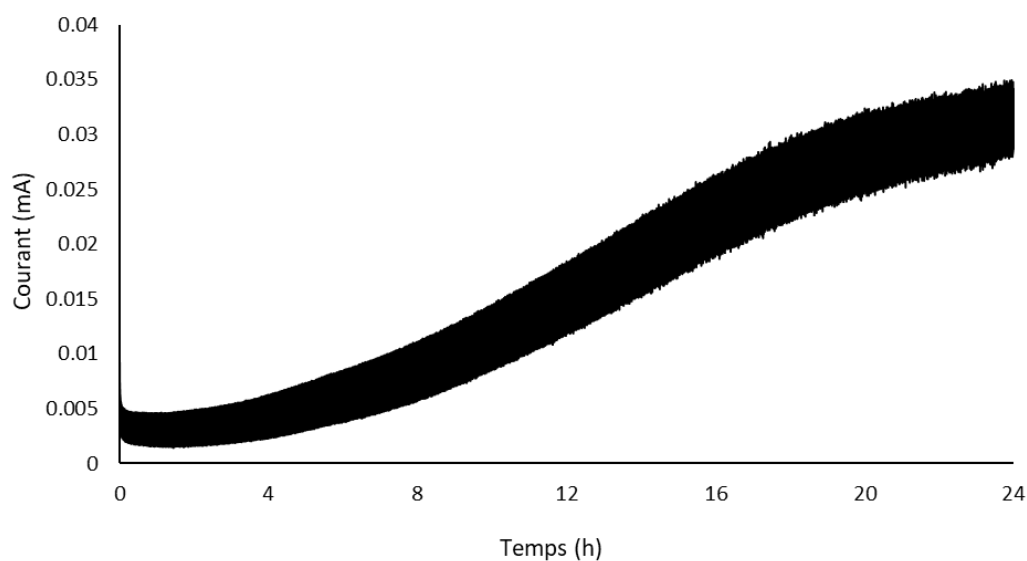


Figure A4 : Chronoampérométrie d'une solution de tampon acétate à 1 M (pH 5) (sous agitation) à 1,2 V, correspond à un blanc analytique pour la procédure d'oxydation électrochimique des thiosulfates.

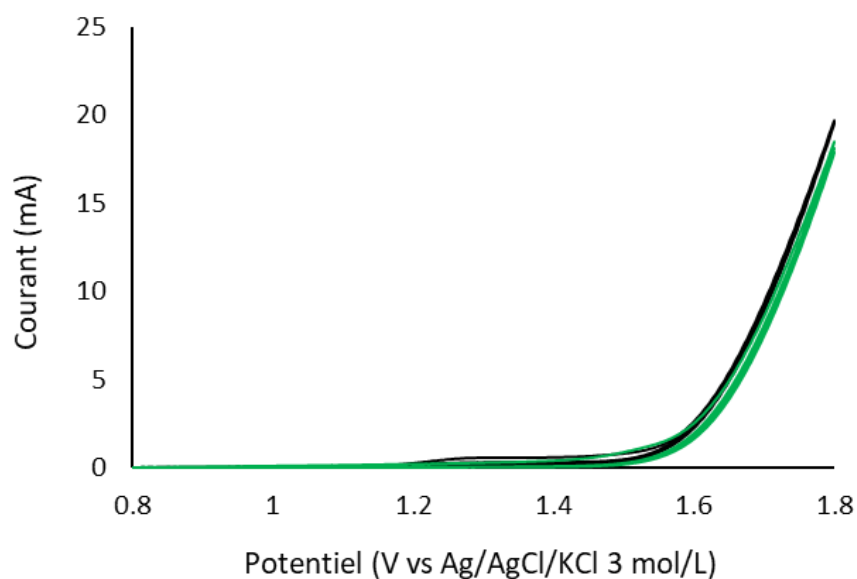


Figure A5 : Voltampérométrie cyclique (sans agitation) : — solution de 20 mmol-S/L de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$ dans un tampon acétate à 1 mol/L (pH 5) après 24 h d'électrolyse à 1,2 V ; — solution de tampon acétate à 1 mol/L (pH 5).

Annexe 5. Analyses électrochimiques en présence de BaCl₂

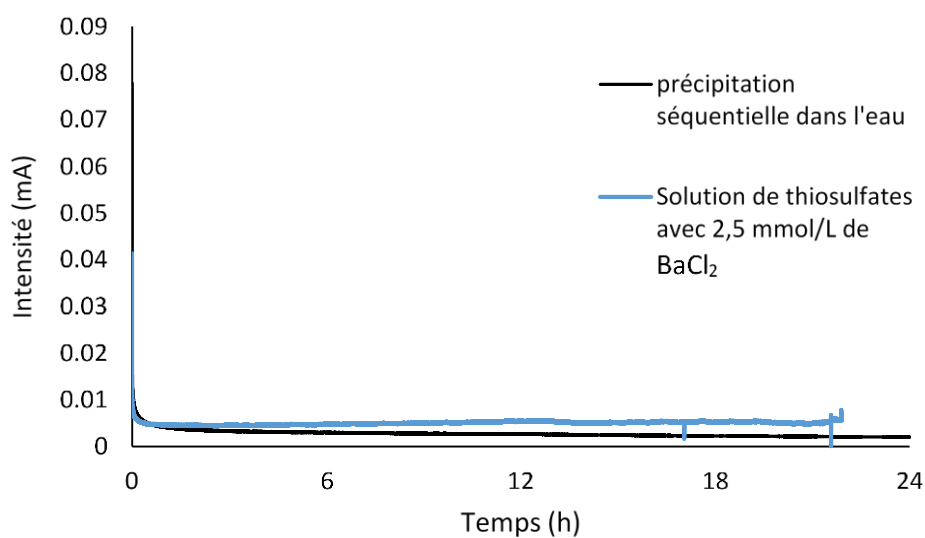


Figure A6 : Chronoampérométrie (sous agitation) à 1,2 V pendant 24 h de la solution du test de précipitation séquentielle contenant 20 mmol-S/L de thiosulfates et d'une solution à 20 mmol-S/L de thiosulfates et 2,5 mmol/L de BaCl₂. Les deux solutions ont été tamponnée dans de l'acétate à pH 5.

Annexe 6. Analyse EA-IRMS des sulfates d'eaux de source

Tableau A3: Analyse EA-IRMS d'échantillons d'eaux de source du Bassin de Sivas, Turquie. ^a référence (Pichat et al., 2018), ^b Communication personnelle, Dr. G. Hoareau, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau, France.

| Échantillon | $\delta^{34}\text{S}$ Valeur reportée (‰) | $\delta^{34}\text{S}$ déterminée dans cette étude (‰) |
|---------------------|---|---|
| Bingöl Tuz spring 1 | $20,9 \pm 0,4^a$ | $20,9 \pm 0,8$ (n = 4) |
| Emirhan spring | $21,4 \pm 0,4^a$ | $21,4 \pm 0,3$ (n = 2) |
| Fadlun Tuz spring | $20,6 \pm 0,4^a$ | $21,0 \pm 0,2$ (n = 2) |
| Hargün Tuz spring | $20,8 \pm 0,4^a$ | $21,1 \pm 0,3$ (n = 3) |
| Source 3 saline | $20,0 \pm 0,4^b$ | $20,0 \pm 0,1$ (n = 3) |
| Tuzhisar spring | $18,3 \pm 0,4^a$ | $18,8 \pm 0,1$ (n = 2) |
| Tuzlagözü spring 1 | $19,0 \pm 0,4^a$ | $19,4 \pm 0,1$ (n = 3) |
| Tuzlagözü spring 2 | $19,1 \pm 0,4^a$ | $19,4 \pm 0,5$ (n = 3) |