



**HAL**  
open science

# Étude des déterminants environnementaux et de l'anoxie dans la formation des microbialites

Jeanne Caumartin

► **To cite this version:**

Jeanne Caumartin. Étude des déterminants environnementaux et de l'anoxie dans la formation des microbialites. Minéralogie. Sorbonne Université, 2024. Français. NNT : 2024SORUS238 . tel-04785238

**HAL Id: tel-04785238**

**<https://theses.hal.science/tel-04785238v1>**

Submitted on 15 Nov 2024

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

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



## Sorbonne Université

Ecole doctorale Géosciences, Ressources Naturelles et Environnement – ED 398

*Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie / Equipe BIOMIN*

*Institut Diversité, Ecologie et Evolution du Vivant / Equipe DEEM*

### **Etude des déterminants environnementaux et de l'anoxie dans la formation des microbialites**

Jeanne Caumartin

Thèse de doctorat de Biogéosciences

Dirigée par Karim Benzerara et Purificación López-García

Jury composé de :

Julie Cosmidis (Associate Professor, University of Oxford)	Rapportrice
Jean-Luc Rols (Professeur des Universités, Université Toulouse III-Paul Sabatier)	Rapporteur
Guillaume Paris (Chargé de recherche CNRS, CRPG Nancy)	Examineur
Johanna Marin-Carbonne (Professeure associée, Université de Lausanne)	Présidente du jury
Gaël Erauso (Professeur des Universités, Université Aix-Marseille)	Examineur
Christophe Thomazo (Professeur des Universités, Université Bourgogne Franche-Comté)	Invité



Except where otherwise noted, this work is licensed under <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>





# Remerciements

Je tiens à remercier tous ceux qui pendant trois ans, d'une manière ou d'une autre, ont participé à l'aboutissement de ce travail de thèse. Je me restreins ici au cadre professionnel.

Avant toute chose, je remercie infiniment Karim Benzerara et Purificación López-García pour leur encadrement inégalable. Je n'ai pas assez de mots pour vous exprimer ma reconnaissance, pour m'avoir proposé ce sujet de thèse qui m'a énormément apporté, pour m'avoir accueillie dans vos équipes, pour votre rigueur scientifique, pour ce que vous apportez à la science et la manière dont vous la partagez. Karim, merci de m'avoir encadrée pour mes deux stages et d'avoir accepté de continuer pour cette thèse, pour tes retours toujours extrêmement pertinents et complets, pour les opportunités de participer à différents projets de recherche, pour les questions inépuisables que tu ouvres à chaque résultat apporté. Puri, merci pour ta disponibilité sans faille alors que je venais moins souvent à Saclay, pour la patience avec laquelle tu m'as si bien réexpliqué les bases, pour m'avoir fait découvrir le monde de la diversité microbienne et guidée tout au long de la thèse en partageant tes connaissances. Merci pour tout cela, et pour bien d'autres choses encore, mais également pour votre patience et votre bienveillance à tous les deux.

J'exprime un immense merci à Fériel Skouri-Panet. Merci pour ta gentillesse inlassable, merci de rendre le quotidien dans l'équipe toujours plus facile et agréable à vivre, pour l'enthousiasme avec lequel tu pratiques la science, pour ton travail acharné dans ce laboratoire qui a une chance considérable de te compter parmi ses membres, pour être toujours là quand on a besoin et pour ton amitié. Merci également à Cynthia Travert pour ton support technique de tous les jours, les conversations pleines de bonne humeur et pour ton pragmatisme, particulièrement utile sur le terrain. My warmest thanks to Neha Mehta, for all your time spent helping me, both scientifically and technically, especially in geochemistry, for being such an inspiring person, but also for your friendship and your ever-wise advices.

Je remercie les membres du jury, Julie Cosmidis, Jean-Luc Rols, Guillaume Paris, Johanna Marin-Carbonne, Gaël Erauso et Christophe Thomazo, qui ont accepté de relire le manuscrit et d'évaluer mon travail. Je remercie aussi les membres de mes comités de thèse, à savoir German Montes-Hernandez, Olivier Beyssac, Olivier Braissant et Elodie Duprat.

De nombreuses autres personnes ont également collaboré dans les différents chantiers scientifiques de cette thèse, que je tiens à remercier pour toute leur aide précieuse et pour leur gentillesse. Merci à Maria Ciobanu et Paola Bertolino pour les manip en laboratoire ; Maria notamment pour m'avoir montré l'utilisation de la boîte à gants et fait le séquençage par Nanopore avec Agathe Struillou, Pao pour avoir fait avec moi une partie des extractions d'ADN, le clonage et fait certaines purifications avant séquençage. Elodie Duprat, merci beaucoup pour les scripts R, tes explications pointues et patientes, et ta rigueur dans les analyses statistiques. Ana Gutiérrez-Preciado, thank you so much for all the last-

minute processing you did on the raw data from the Nanopore sequencing. Thank you for your hard work, your responsiveness to my questions and your great kindness. Miguel Iniesto, merci beaucoup d'avoir été présent dans les manip au laboratoire dès le début de ma thèse, et pour les analyses statistiques que tu as pris le temps de faire sur certaines des données de diversité microbienne.

Je remercie le personnel des plateformes de l'IMPMC, comprenant la plateforme GEMME, MEB-FIB, DRX, spectroscopie et de MET. Merci à Stéphanie Delbrel, Imène Estève et Béatrice Doisneau pour votre support au MEB. Merci Béatrice en particulier pour les longues heures passées à refaire des lames FIB et pour les séances de MET. Merci Ludovic Delbes et Maxime Guillaumet pour votre aide en DRX et en FTIR, respectivement. Merci Nicolas Menguy pour la formation et les conseils au MET, ainsi qu'à Jean-Michel Guigner. Merci Laure Cordier pour l'acquisition de certaines données d'ICP. Merci également Luis Colucho-Hurtarte et Marine Cotte pour l'acquisition et le traitement des données de XANES à la ligne ID21 de l'ESRF.

Je remercie les collaborateurs du Mexique, Rosaluz Tavera et Vladimir Betancourt, ainsi que toutes les autres personnes qui ont fait partie de la mission de terrain à Alchichica, Atexcac et La Preciosa en 2022 et l'ont organisée ; à savoir Karim, Cynthia, Christopher Lefèvre, Didier Jézéquel, Robin Havas, Emmanuelle Vennin, Pierre Boussagol, les conducteurs et les plongeurs. Un grand merci également à Christophe Thomazo pour toutes ces discussions enrichissantes à propos des articles. Plus généralement, merci à François Guyot, Electra Kotopoulou, David Moreira, Stéphanie Finet et Guillaume Morin pour certaines discussions scientifiques que nous avons pu avoir plus ponctuellement. Merci à Nina Zeyen ; même si nous nous sommes vues assez peu au final, je crois que je connais maintenant par cœur tous tes articles qui ont précédé ma thèse ;) Merci également à Elodie Muller pour ton aide et ton encadrement durant mon stage.

Un très grand merci à toutes les personnes en thèse et en post-doc que j'ai pu croiser au cours de ces trois ans et sans qui cette expérience n'aurait pas été la même. Merci en particulier à Juliette, pour avoir débarqué dans le bureau du fond avec toutes ces plantes et toute ta bonne humeur qui rendent la vie plus légère, merci d'avoir réussi à faire de ton temps de rédaction une période très agréable, merci d'avoir partagé ton recul sur les choses et merci avant tout pour ton amitié très précieuse. Arnaud, merci d'avoir été un super co-bureau pendant la rédaction, pour ta gentillesse, ton aide spontanée sur n'importe quel sujet, la précision de tes explications et ton humilité. Robin, merci d'avoir partagé avec moi l'enthousiasme de découvrir et d'étudier ces lacs mexicains. De manière générale, un grand merci à tous les doctorants/post-docs/ingénieurs que j'ai pu rencontrer pendant cette thèse : Juliette, Divine, Andreas, Geoffroy, Laurane, Apolline, Laura, Dania, Raphaël, Romain, Luca. Merci aussi à Thuy, Claudine, Elisabeth, Antonella et Aïcha qui ont participé d'un peu plus loin à ces trois ans.

Enfin, merci à mes proches.

# Résumé

Les microbialites sont des structures organo-sédimentaires formées par les interactions entre des communautés microbiennes benthiques et des phases minérales. Certaines se développent actuellement alors que les plus anciennes, sous forme fossile, sont datées jusqu'à ~3,43 Ga et comptent parmi les plus anciennes traces de vie non-ambigües connues sur Terre. Par conséquent, les microbialites fournissent des informations précieuses sur la paléobiologie et les paléoenvironnements. Pourtant, malgré l'importance géobiologique de ces objets, leurs conditions et processus de formation sont encore peu compris. En particulier, des microbialites anciennes se sont vraisemblablement formées dans des conditions anoxiques, ce qui peut avoir des conséquences majeures sur la disponibilité des espèces chimiques en solution. Or, la plupart des microbialites actuelles, utilisées comme analogues des microbialites anciennes, se forment dans des environnements oxiques. Ceci confronte nos interprétations des paléobiologies et des paléoenvironnements à un manque de données sur la formation des microbialites en anoxie, et sur l'acclimatation/l'adaptation de leurs communautés microbiennes au cours du temps dans ces conditions. Ici, nous nous sommes intéressés à des microbialites actuelles découvertes dans des zones profondes saisonnièrement anoxiques de deux lacs alcalins : Alchichica et Atexcac (Mexique), en couplant des études de la minéralogie, de la diversité des microorganismes, de la géochimie des solutions et de la spéciation des éléments chimiques. Dans un premier temps de cette thèse, nous proposons, après avoir mis en place une base de données des microbialites actuelles connues, que les eaux où se forment les microbialites doivent être saturées vis-à-vis de phases carbonatées précurseurs et solubles comme les carbonates de calcium amorphes (ACC) et la monohydrocalcite, et que ce critère géochimique explique la présence ou non de microbialites dans des environnements actuels. Nous montrons ensuite un enregistrement des états redox de la colonne d'eau non seulement par la minéralogie des microbialites profondes via des signatures dans la spéciation du soufre déterminées par des analyses en spectroscopie d'absorption X synchrotron, mais aussi par les communautés microbiennes via des fluctuations d'abondances taxonomiques relatives identifiées par metabarcoding. Enfin, nous démontrons que les microbialites actuelles du lac Alchichica sont soumises à de la diagenèse précoce, conduisant à la formation de phases minérales rares comme la huntite, et ce notamment de manière différente en profondeur dans la colonne d'eau.

# Abstract

Microbialites are organo-sedimentary structures formed by interactions between benthic microbial communities and mineral phases. Some are currently developing, while the oldest, in fossil form, have been dated back to ~3.43 Ga and are among the oldest traces of non-ambiguous life known on Earth. Consequently, microbialites provide valuable information on paleobiology and paleoenvironments. However, despite the geobiological importance of these objects, their formation conditions and processes are still poorly understood. In particular, ancient microbialites are likely to have formed under anoxic conditions, which can have major consequences for the availability of chemical species in solution. However, most modern microbialites, used as analogues of ancient microbialites, form in oxic environments. This confronts our interpretations of paleobiologies and paleoenvironments with a lack of data on the formation of microbialites in anoxia, and on the acclimation/adaptation of their microbial communities over time in these conditions. Here, we have focused on modern microbialites discovered in seasonally anoxic deep zones of two alkaline lakes: Alchichica and Atexcac (Mexico) by combining studies of mineralogy, microorganism diversity, solution geochemistry and chemical element speciation. In the first part of this thesis, after setting up a database of known modern microbialites, we propose that the waters where microbialites form must be saturated with precursor and soluble carbonate phases such as amorphous calcium carbonates (ACC) and monohydrocalcite, and that this geochemical criterion explains the presence or absence of microbialites in modern environments. We then show a record of water column redox states not only by the mineralogy of deep microbialites via signatures in sulfur speciation determined by synchrotron X-ray absorption spectroscopy analyses, but also by microbial communities via fluctuations in relative taxonomic abundances identified by metabarcoding. Finally, we demonstrate that the modern microbialites of Lake Alchichica undergo early diagenesis, leading to the formation of rare mineral phases such as huntite, and in particular differentially at depth in the water column.



# Table des matières

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>1. LES INTERACTIONS MINERAL-VIVANT .....</b>	<b>2</b>
1.1. MODALITES D'INTERACTIONS ENTRE LE MINERAL ET LE VIVANT .....	2
1.2. CO-EVOLUTIONS DU MINERAL ET DU VIVANT .....	6
<b>2. LES MICROBIALITES .....</b>	<b>11</b>
2.1. DEFINITION.....	11
2.2. ACTEURS PRINCIPAUX IMPLIQUES DANS LA FORMATION DES MICROBIALITES .....	12
2.2.1. <i>Les phases minérales</i> .....	13
2.2.2. <i>La solution de formation</i> .....	14
2.2.3. <i>Les microorganismes</i> .....	15
2.3. EVOLUTION DES MICROBIALITES AU COURS DES TEMPS GEOLOGIQUES.....	22
<b>3. VARIATIONS DES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES AU COURS DES TEMPS GEOLOGIQUES .....</b>	<b>25</b>
3.1. CYCLE GEOCHIMIQUE DU DIOXYGENE .....	25
3.2. CYCLES GEOCHIMIQUES DU FER, DU SOUFRE ET DU MANGANESE.....	28
<b>4. ENVIRONNEMENTS STRATIFIES .....</b>	<b>34</b>
<b>5. PROBLEMATIQUES ET OBJECTIFS DE LA THESE.....</b>	<b>37</b>
CONTRIBUTIONS AUX TRAVAUX PRESENTES.....	39
<b>Matériel d'étude et méthodes .....</b>	<b>41</b>
<b>1. LES LACS MEXICAINS ALCHICHICA ET ATEXCAC .....</b>	<b>42</b>
1.1. PARAMETRES GEOLOGIQUES, LIMNOLOGIQUES, CLIMATIQUES GENERAUX DES LACS ALCHICHICA ..... ET ATEXCAC	42
1.2. GEOCHIMIE GENERALE ET COMMUNAUTES MICROBIENNES PRINCIPALES DES COLONNES D'EAU ..... DES LACS ALCHICHICA ET ATEXCAC	48
1.2.1. <i>Concentrations ioniques majeures des colonnes d'eau</i> .....	48
1.2.2. <i>Paramètres physico-chimiques majeurs des colonnes d'eau</i> .....	50
1.2.3. <i>Concentrations en éléments traces des colonnes d'eau</i> .....	52
1.2.4. <i>Concentrations en nutriments des colonnes d'eau</i> .....	52
1.2.5. <i>Saturation des colonnes d'eau d'Alchichica et Atexcac vis-à-vis des carbonates et des silicates</i> .....	53
1.2.6. <i>Communautés microbiennes majeures des colonnes d'eau</i> .....	56
1.3. MINERALOGIE ET ECOLOGIE MICROBIENNE GENERALES DES MICROBIALITES DES LACS ALCHICHICA ET ATEXCAC	58
1.3.1. <i>Phases minérales retrouvées dans les microbialites d'Alchichica et Atexcac</i> .....	58
1.3.2. <i>Composition des communautés microbiennes des microbialites d'Alchichica et Atexcac</i> .....	60
1.4. ECHANTILLONNAGE DE MICROBIALITES DE LA ZONE PROFONDE DANS LES LACS ALCHICHICA ET ATEXCAC .....	61
1.5. EVALUATION DE LA CROISSANCE DES MICROBIALITES DES LACS ALCHICHICA ET ATEXCAC.....	62
<b>2. METHODES.....</b>	<b>64</b>
2.1. ECHANTILLONNAGE DES MICROBIALITES ET DES SOLUTIONS IN SITU.....	64
2.1.1. <i>Microbialites</i> .....	64
2.1.2. <i>Solutions</i> .....	65
Récupération des solutions dans la colonne d'eau .....	65
Données de sondes in situ sur les colonnes d'eau .....	65
Préparation des échantillons sur le terrain.....	65
2.2. ANALYSES MINERALOGIQUES .....	66
2.2.1. <i>Analyses en bulk</i> .....	66

Analyses chimiques au SARM .....	66
Préparation des lames minces .....	67
Préparation de sections polies pour le MEB .....	67
Préparation des échantillons de microbialites avec séchage au point critique.....	67
Métallisation des échantillons destinés aux observations MEB .....	68
FTIR .....	69
DRX.....	70
2.2.2. Analyses en microscopie.....	70
Optique .....	70
XRF .....	70
MEB .....	71
FIB.....	72
MET.....	73
CLSM .....	73
Raman.....	73
XANES et SR-XRF .....	74
2.3. ANALYSES CHIMIQUES.....	75
2.3.1. Fraction dissoute.....	75
2.3.2. Fraction particulière.....	76
2.4. ANALYSES DE LA DIVERSITE MICROBIENNE .....	77
Mésocosmes.....	77
Enrichissements .....	78
Extraction de l'ADN.....	79
Clonage.....	81
Amplification de l'ADN par PCR.....	82
Purification .....	83
Séquençage Sanger .....	84
Séquençage Nanopore.....	84
Traitement des données brutes.....	85
Blast et arbres phylogénétiques.....	87
Analyses statistiques multivariées .....	88

## **Chapitre I. Conditions géochimiques de formation des microbialites actuelles .....90**

<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>91</b>
<b>2. MANUSCRIT DE L'ARTICLE (TEXTE PRINCIPAL) .....</b>	<b>94</b>
The chemical conditions necessary for the formation of microbialites .....	94
Abstract .....	94
Introduction .....	94
Results.....	95
Physico-chemical parameters of microbialite-hosting environments.....	95
Assessment of the saturation index of waters in which modern microbialites form .....	96
Comparison of the chemistry of modern microbialite-hosting aqueous solutions with two global freshwater data bases .....	98
Discussion .....	100
Saturation with vaterite/ACC/MHC as a necessary condition for the formation of microbialites .....	100
Acknowledgements .....	102
<b>3. DONNÉES SUPPLÉMENTAIRES .....</b>	<b>103</b>
3.1. MATERIALS AND METHODS .....	103
Setup of a new modern microbialite-hosting environment database and description of the database .....	103
Environmental Data Initiative (EDI) and Global Lake Ecological Observatory Network (GLEON) datasets .....	103
Speciation calculations .....	104
Statistical analyses .....	104
Principal component analyses (PCA).....	105
3.2. CONTENU DE LA BASE DE DONNEES DES MICROBIALITES ACTUELLES ET PERSPECTIVES D'AMELIORATIONS .....	106
Informations présentes dans la base de données .....	106
Répartition des microbialites actuelles dans le monde.....	107

Potentiels environnements de formation de microbialites actuelles sélectionnés sur la base de leur indice de saturation .....	108
Cas particuliers des environnements très sursaturés vis-à-vis des ACC .....	109
3.3. EVALUATION PLUS ETENDUE DE LA CHIMIE GENERALE PROPRE AUX ENVIRONNEMENTS DE FORMATION DES MICROBIALITES ACTUELLES.....	110
Quelques sources d'incertitudes sur les analyses statistiques qui ont été faites .....	110
Particularités physico-chimiques des environnements abritant des microbialites actuelles .....	112
Existence de microbialites dans des solutions sous-saturées vis-à-vis des ACC/MHC.....	117
3.4. PERSPECTIVES D'INTERPRETATIONS GEOCHIMIQUES DES ENVIRONNEMENTS PASSES .....	120
Modèle d'un déclin des microbialites Protérozoïque-Phanérozoïque lié à des variations hydrochimiques .....	120
<b>4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>122</b>

## **Chapitre II. Enregistrements de l'euxinie de la colonne d'eau dans les microbialites profondes du lac Alchichica.....127**

<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>128</b>
<b>2. PAPER DRAFT, IN PREPARATION .....</b>	<b>132</b>

Varying sulfur speciation in modern carbonate microbialites forming under oxic and euxinic conditions ....	132
Abstract .....	132
Introduction.....	134
Materials and methods.....	136
Alchichica lake geochemical settings .....	136
Microbialite and water samples .....	136
Microbialites samples .....	136
Water samples.....	137
Methods.....	137
Chemical analyses of water solutions .....	137
Bulk chemical analyses of microbialites.....	138
Preparation of thin and thick sections .....	138
Scanning electron microscopy and energy-dispersive X-ray spectrometry (SEM-EDXS) .....	138
Laboratory X-ray fluorescence spectroscopy (XRF) .....	139
Micro-X-ray fluorescence mapping and X-ray absorption near-edge structure (XANES) spectroscopy at the sulfur K-edge .....	139
XANES and SR-XRF data processing .....	139
Results.....	141
Water column .....	141
Bulk chemical and mineralogical analyses .....	144
Laboratory-based XRF analyses of microbialite thin sections.....	145
Sulfur distribution assessed by SR-XRF and SEM-EDXS analyses.....	147
Sulfur speciation measurements by SR-XANES spectromicroscopy .....	153
Discussion .....	159
1. Sulfur detected in Alchichica microbialites is preferentially associated with aragonite, possibly and partly in the form of carbonate associated sulfate (CAS) and/or organic sulfates .....	159
2. Origins of sulfur in the water column and microbialites of Lake Alchichica .....	161
3. Euxinic conditions are recorded by reduced sulfur in microbialites .....	162
Conclusion.....	164

<b>3. DONNEES SUPPLEMENTAIRES .....</b>	<b>165</b>
3.1. DONNEES SUPPLEMENTAIRES RELATIVES AU MANUSCRIT.....	165
Approche par combinaisons linéaires pour l'interprétation des spectres XANES .....	165
Recherche de signatures des CAS dans les échantillons en FTIR.....	168
3.2. ENREGISTREMENTS POTENTIELS DE L'EUXINIE PAR LE SOUFRE DANS LA COLONNE D'EAU ET LES MICROBIALITES DU LAC ATEXCAC.....	169
3.3. SPECIATIONS DU FER ET DU MANGANESE DANS LES COLONNES D'EAU ET LES MICROBIALITES DES LACS ALCHICHICA ET ATEXCAC.....	172
3.4. EVALUATIONS EN BULK DES CONCENTRATIONS EN TERRES RARES DANS LA COLONNE D'EAU ET LES MICROBIALITES DES LACS ALCHICHICA ET ATEXCAC.....	176
<b>4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>179</b>

SOUFRE .....	179
FER/MANGANESE/TERRES RARES .....	180

## **Chapitre III. Acclimatation/Adaptation des communautés microbiennes des microbialites à l'anoxie saisonnière .....184**

### **1. INTRODUCTION..... 185**

### **2. PAPER DRAFT, IN PREPARATION ..... 189**

Acclimation of microbial communities from modern microbialites to anoxic conditions .....	189
Abstract .....	189
Introduction .....	190
Materials and methods.....	193
Plankton and microbialite sampling.....	193
Mesocosm incubation and microbial enrichments under continuous anoxia .....	194
DNA purification and 16S rRNA gene amplicon sequencing.....	195
Sequence analysis .....	196
Statistical analysis.....	196
Results .....	197
1. Microbialite and plankton prokaryotic communities across the water columns of lakes Alchichica and Atexcac .....	197
2. Acclimation/adaptation of the prokaryotic communities under continuous anoxia in the laboratory	201
Microbial community composition of microbialites and plankton over time under continuous anoxia .....	201
Conservation of a core microbial community in microbialites samples .....	205
Cultivation of prokaryotes from Alchichica microbialites under anoxic conditions .....	207
Discussion .....	209
Global conservation of a core prokaryotic phylogenetic diversity in redox-stratified Alchichica and Atexcac lakes.....	209
Variations in the Alchichica and Atexcac microbial community compositions reflect adaptation to anoxia and sulfidic conditions .....	210
Changes of natural Alchichica and Atexcac microbialite communities as a function of lake sampling period and depth .....	210
Adaptation of microbial communities in Alchichica and Atexcac microbialites to anoxia.....	212
Implications of anoxia-adapted organisms in the carbonatogenesis of deep microbialites from Alchichica and Atexcac .....	215
Conclusion.....	217

### **3. DONNEES SUPPLEMENTAIRES ..... 218**

3.1. FIGURES ET TABLEAUX SUPPLEMENTAIRES DU TEXTE PRINCIPAL .....	218
Quatre organismes enrichis en anoxie appartenant à l'ordre des Acinetobacter .....	218
Perspectives d'enrichissement d'une espèce de Pleurocapsales facultativement anaérobie.....	219
3.2. PERSPECTIVES SUR D'AUTRES MILIEUX NATURELS .....	221
3.3. PERSPECTIVES SUR DES SUIVIS BIOGEOCHIMIQUES EN LABORATOIRE .....	223

### **4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES ..... 224**

## **Chapitre IV. Modifications diagénétiques des microbialites d'Alchichica et d'Atexcac .....230**

### **1. INTRODUCTION..... 231**

### **2. MANUSCRIT DE L'ARTICLE, TEXTE PRINCIPAL ..... 234**

Huntite [CaMg <sub>3</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> ], a rare carbonate phase formed during early diagenesis in modern microbialites ....	234
Abstract .....	234
Keywords .....	235
Introduction .....	235
Material and methods .....	238
Description of the lake and geological context.....	238
Rocks and water samples.....	238
Collection of microbialites samples ranging from 0 to 40 meters in depth.....	238

Water samples.....	239
Methods.....	239
Chemical bulk analyses of microbialites.....	239
X-ray diffraction (XRD).....	240
Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy analyses.....	240
Preparation of thin sections and polished thick sections of microbialites.....	240
X-ray fluorescence (XRF) analyses.....	241
Scanning electron microscopy (SEM).....	241
Focused ion beam (FIB) milling.....	241
Transmission electron microscopy (TEM).....	242
Confocal laser scanning microscopy (CLSM).....	242
Raman microspectroscopy.....	242
Chemical analyses of water solutions and speciation modelling.....	242
Isotopic measurements.....	244
Results.....	245
Aqueous geochemistry of Lake Alchichica.....	245
Detection of huntite in deep ( $\geq 20$ m) Alchichica microbialites.....	248
Bulk chemical analyses.....	248
FTIR analyses.....	249
XRD analyses.....	250
Raman microspectroscopy and electron microscopy analyses.....	251
Decrease of autofluorescence in deep microbialites.....	253
Microscopy analyses of mineral textures/distribution.....	255
Carbon and oxygen stable isotope signatures of huntite-bearing microbialites.....	261
Discussion.....	263
1. Evidence of huntite, a rare carbonate phase, in Lake Alchichica deep microbialites.....	263
2. Formation mechanisms and conditions of huntite formation in Lake Alchichica deep microbialites.....	265
2.1 Primary formation of aragonite and hydromagnesite in Lake Alchichica microbialites is likely kinetically controlled.....	265
2.2 Huntite forms secondarily through aragonite and hydromagnesite destabilization.....	266
2.3 Conditions favoring the formation of huntite in deep microbialites.....	267
3. Implications for the preservation of primary carbonate signatures in Lake Alchichica deep microbialites.....	269
Conclusion.....	271
Acknowledgments.....	273

### **3. DONNEES SUPPLEMENTAIRES : COMPARAISON AVEC LES MICROBIALITES D'ATEXCAC**..... 274

3.1 BIOGEOCHIMIE DE LA COLONNE D'EAU.....	274
3.2 ALTERATIONS/MODIFICATIONS DES PHASES MINERALES DANS LES MICROBIALITES D'ATEXCAC.....	275
<i>Fracturation</i> .....	275
<i>Silicification</i> .....	276
<i>Cimentations/précipitations aragonitiques</i> .....	278
3.3. CONSERVATION DES SIGNATURES BIO/MINERALOGIQUES APRES/AU COURS DE LA DIAGENESE.....	279
3.4. HYPOTHESES SUR LES ETAPES DE DIAGENESE.....	280

### **4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**..... 285

## **Conclusions, perspectives**..... 290

### **CONCLUSIONS PRINCIPALES**..... 291

CONDITIONS GEOCHIMIQUES DE FORMATION DES MICROBIALITES ACTUELLES.....	292
ENREGISTREMENTS DE L'EUXINIE DANS LES MICROBIALITES DU LAC ALCHICHICA.....	293
ACCLIMATATION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DES MICROBIALITES D'ALCHICHICA ET ATEXCAC A L'ANOXIE.....	294
MODIFICATIONS DIAGENETIQUES DES MICROBIALITES D'ALCHICHICA.....	295

### **PERSPECTIVES GENERALES**..... 296

1. ETUDE INTEGRATIVE DES SYSTEMES CONTENANT DES MICROBIALITES ACTUELLES.....	296
Les systèmes naturels d'Alchichica et d'Atexcac.....	296

Modélisation des systèmes de formation des microbialites en laboratoire.....	297
2. ETUDE A PLUS FINE ECHELLE DES MICROBIALITES ACTUELLES .....	299
3. ETUDE A PLUS LARGE ECHELLE DES MICROBIALITES ACTUELLES .....	301
4. CHOIX DES ANALOGUES AUX MICROBIALITES ANCIENNES .....	302
<b>Références.....</b>	<b>304</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>341</b>
<b>ANNEXES MATERIEL D'ETUDE ET METHODES.....</b>	<b>342</b>
<b>ANNEXES CHAPITRE I.....</b>	<b>344</b>
LIEN A1.1.....	344
TABLEAUX A1.1 ET A1.2.....	344
<b>ANNEXES CHAPITRE II .....</b>	<b>347</b>
TABLEAUX A2.1 ET A2.2.....	347
FIGURES A2.1 A A2.10 .....	347
<b>ANNEXES CHAPITRE III.....</b>	<b>360</b>
TABLEAUX A3.1 ET A3.2.....	360
FIGURES A3.1 A A3.8 .....	360
<b>ANNEXES CHAPITRE IV .....</b>	<b>371</b>
TABLEAUX A4.1 A A4.5 .....	371
FIGURES A4.1 A A4.4 .....	371
<b>ARTICLES EN CO-AUTRICE .....</b>	<b>378</b>
Annexe A, article de <b>Muller et al., (2023)</b> : Diagenetic formation of stevensite by replacement of diatom frustules in the sediments of the alkaline Lake Alchichica (Mexico).....	379
Annexe B, article de <b>Havas et al. (2023a)</b> : The hidden role of dissolved organic carbon in the biogeochemical cycle of carbon in modern redox-stratified lakes .....	405
.....	405
Annexe C, article de <b>Havas et al. (2023b)</b> : Biogeochemical processes captured by carbon isotopes in redox-stratified water columns: a comparative study of four modern stratified lakes along an alkalinity gradient.....	425
.....	425
.....	445
Annexe D, article de <b>Stigliano et al. (2023)</b> : Chapter 6 - Micro- and nanoscale techniques for studying biofilm-mineral interactions.....	446
.....	487



# **Introduction**

## 1. Les interactions minéral-vivant

Les microorganismes interagissent avec les minéraux par le biais d'échanges de matière et de flux d'énergie (Dong et al., 2022). Ces interactions sont diversifiées et répandues sur la surface terrestre, à toutes les échelles. Elles ont lieu entre autres dans des environnements aqueux, dans le sol, en profondeur dans les roches de subsurface, sur et en-dessous des fonds marins, mais aussi dans des environnements considérés extrêmes pour l'humain (Cuadros, 2017 ; Huang, 2004 ; Ahmed et Holmström, 2015 ; Edwards et al., 2005 ; White et al., 2020). Ces interactions sont capables de modifier les propriétés de leurs matrices. Notamment, de nombreux microorganismes colonisent les porosités des roches et les processus de dissolution/précipitation dont ils sont à l'origine augmentent/diminuent des caractéristiques géochimiques et hydrologiques telles que la perméabilité (Escudero et al., 2020 ; Banfield et al., 1999). Les propriétés de ces matrices peuvent aussi, en retour, influencer la distribution de la biodiversité microbienne (Escudero et al., 2020 ; Ehrlich, 2001). Actuellement, on considère qu'environ 34 % des espèces minérales sont formées au moins en partie sous l'influence plus ou moins directe de mécanismes biologiques (Hazen et Morrison, 2022). Par conséquent, les précipitations, altérations, évolutions de nombreuses phases minérales ne peuvent pas être comprises sans intégrer les implications multiples du vivant et notamment des microorganismes.

### *1.1. Modalités d'interactions entre le minéral et le vivant*

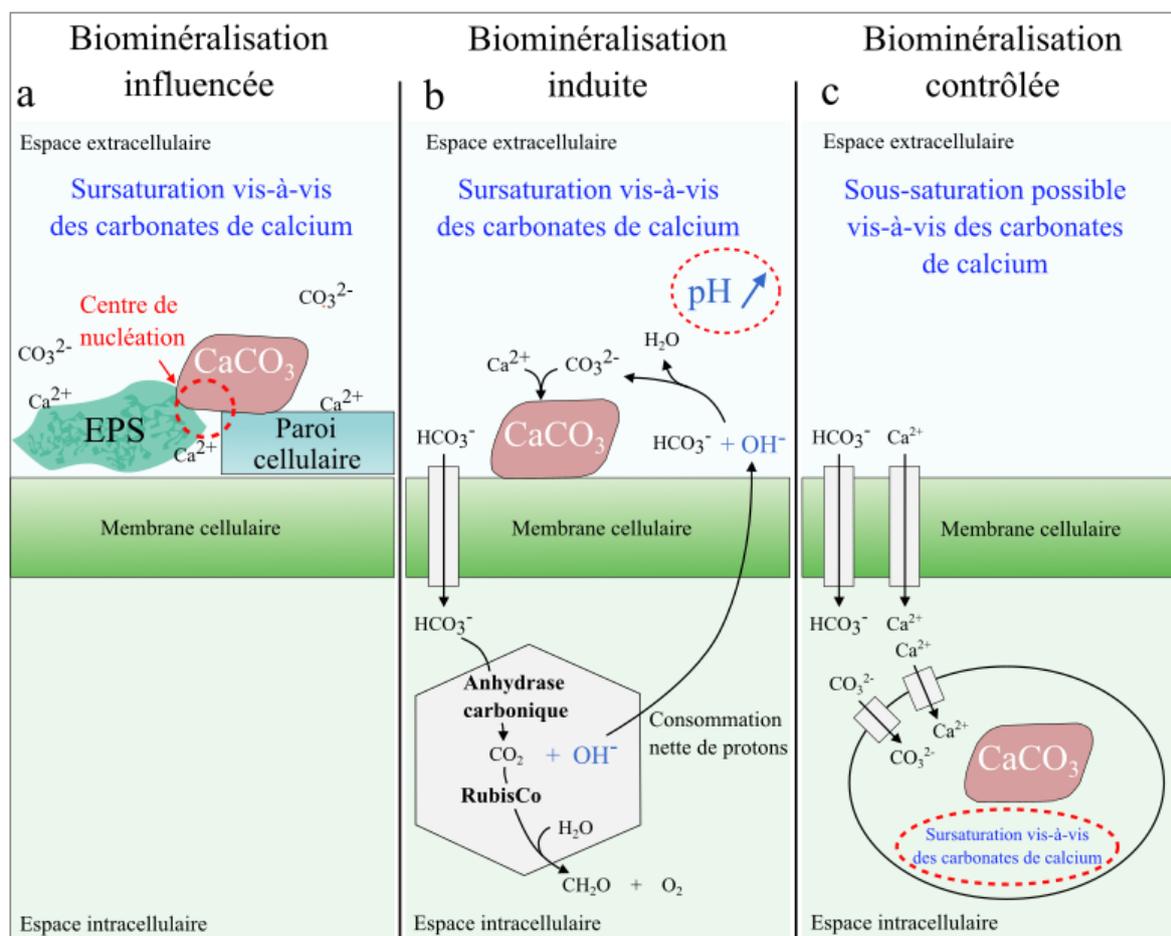
De manière générale, il existe plusieurs modalités d'interaction entre les microorganismes et les phases minérales. En étant en contact direct avec le substratum géologique, les microorganismes peuvent entraîner leur dissolution et/ou leur précipitation et/ou leur transformation (lors de la diagenèse par exemple) (Cuadros, 2017 ; Ng et al., 2016). Une hypothèse formulée par certains auteurs sur la fonction de ces interactions est que les roches fourniraient aux organismes leurs nutriments inorganiques et leurs habitats (Cuadros, 2017 ; Dong et Lu, 2012). De plus, les phases minérales peuvent catalyser des réactions conduisant à la formation de molécules organiques, et certaines peuvent être prébiotiques (Brack, 2013, Li et al., 2019). Par exemple, les argiles sont des minéraux fortement réactifs en raison de leur capacité d'absorption permettant de concentrer les composants organiques. De ce fait, il a été suggéré qu'elles avaient joué un rôle dans l'origine de la vie sur Terre et la conservation de ses traces primitives (Bernal, 1949 ; Hazen et al., 2009). Les biofilms, en regroupant des microorganismes sessiles (procaryotes et/ou eucaryotes) qui adhèrent entre eux

via la matrice extracellulaire qu'ils produisent, sont des structures dynamiques qui privilégient les interactions minéral-vivant (Stigliano et al., 2023 ; Costerton et al., 1995). Leur mise en place nécessite plusieurs étapes-clés allant de leur attachement, leur croissance, à leur maturation puis, éventuellement, leur détachement (Lappin-Scott et Bass, 2001 ; Battin et al., 2003). Ils constituent également des microenvironnements qui protègent les microorganismes et les minéraux de certains stress environnementaux via la production de substances polymériques extracellulaires (EPS) (Ahmed et Holmström, 2015). A ce titre, ils offrent un cas d'étude particulièrement intéressant des voies conduisant les microorganismes à défavoriser ou favoriser la précipitation minérale.

D'une part, les interactions minéral-vivant conduisant à la dissolution des phases minérales peuvent intervenir dès l'attachement des biofilms (Buss, 2006). Durant ces processus d'altération, les bactéries peuvent catalyser des réactions d'oxydo-réduction à la surface des minéraux (Banfield et al., 1999 ; Ahmed et Holmström, 2015 ; Mueller, 2015). Il a été supposé que ces derniers leur servent de sources d'électrons et de micro/macronutriments, ce qui est le cas pour la pyrite vis-à-vis de certaines bactéries oxydantes du soufre (Mansour et al., 2019 ; Ng et al., 2016 ; Ehrlich, 2001). Les activités microbiennes permettent également la libération d'éléments à partir des phases minérales via la production d'acides organiques et inorganiques (par exemple dans les EPS) qui abaissent le pH localement et peuvent conduire à la dissolution de carbonates (Dong et al., 2022). Des voies métaboliques présentes chez de nombreux microorganismes hétérotrophes comme la fermentation ou la dénitrification sont également connues pour promouvoir la dissolution des phases minérales (White et al., 2020). Concernant l'identification de ces interactions après un temps donné, il est probable que certaines phases minérales conservent des signatures microtopographiques des altérations produites à leur surface par les microorganismes du fait de la capacité de ces derniers à modifier localement les taux de dissolution minérale (Stigliano et al., thèse).

D'autre part, les activités microbiennes peuvent favoriser la précipitation minérale par des processus de biominéralisation (Knoll, 2003). Dans l'ensemble, il existe trois modalités différentes de la précipitation minérale par les microorganismes dans les milieux aqueux (Fig. 1 modifiée de Görgen et al., 2020) : (i) la précipitation minérale est biologiquement influencée. Dans ce cas, la minéralisation extracellulaire ne peut avoir lieu que si la solution de formation est déjà sursaturée vis-à-vis de la phase minérale. Les EPS jouent un rôle important dans ce mode de précipitation puisque les polysaccharides, acides nucléiques, glycoprotéines qu'ils contiennent entre autres présentent des groupes fonctionnels chargés négativement susceptibles

d'adsorber des cations impliqués dans la formation des carbonates comme le  $\text{Ca}^{2+}$  ou le  $\text{Mg}^{2+}$  (Warren et Ferris, 1998 ; Dupraz et al., 2004 ; Huang, 2004 ; Bourillot et al., 2020). D'après Giuffrè et al. (2013), certains polysaccharides sont capables de diminuer la tension superficielle entre la solution, le biofilm et le cristal en cours de formation comme la calcite, et fournissent ainsi des sites de nucléation hétérogènes aux carbonates dans le biofilm. (ii) La précipitation minérale peut être biologiquement induite. Cette fois, l'activité métabolique des microorganismes change les conditions thermodynamiques en rendant le pH et les activités des espèces chimiques en jeu favorables à la précipitation des carbonates. Autrement dit, ce sont des mécanismes cellulaires qui sursaturent localement le compartiment extracellulaire vis-à-vis des phases minérales et rendent thermodynamiquement possible la précipitation ou bien en accélèrent la cinétique (Van der Weijden et al., 2014 ; Frankel et Bazylinski, 2003). Par exemple chez les procaryotes, des métabolismes microbiens comme la photosynthèse augmentent localement le pH autour du biofilm par des mécanismes de stockage des ions bicarbonates puis leur conversion intracellulaire en  $\text{CO}_2$  (Dupraz et al., 2009). (iii) La troisième voie par laquelle les microorganismes agissent sur la précipitation des minéraux est la minéralisation biologiquement contrôlée. Dans ce cas, la minéralisation ne nécessite pas de sursaturation préalable vis-à-vis des carbonates dans la solution environnante (Görge et al., 2020). C'est le cas de nombreux squelettes/coquilles retrouvées chez les eucaryotes (frustule siliceuse des diatomées, squelettes carbonatés de coraux, coccolithophoridés) mais c'est aussi un phénomène largement répandu chez les cyanobactéries comme *Gloeomargarita* (Moreira et al., 2017), *Mycrocystis* (Gaëtan et al., 2022), chez la gammaprotéobactérie *Achromatium* (Benzerara et al., 2022) ou encore chez des alphaprotéobactéries magnétotactiques (Monteil et al., 2021). De manière intéressante, un contrôle génétique de la biominéralisation de carbonates a été mis en évidence dans une large gamme de cyanobactéries impliquant notamment le gène *ccyA* et la famille de protéines nommée calcyanine qui sont marqueurs de ce type de biominéralisation (Benzerara et al., 2022). De plus, ces différences dans les modalités de biominéralisation impliquent une diversité dans les morphologies et les compositions chimiques des biominéraux qui en résultent (Görge et al., 2020).



**Figure 1.**

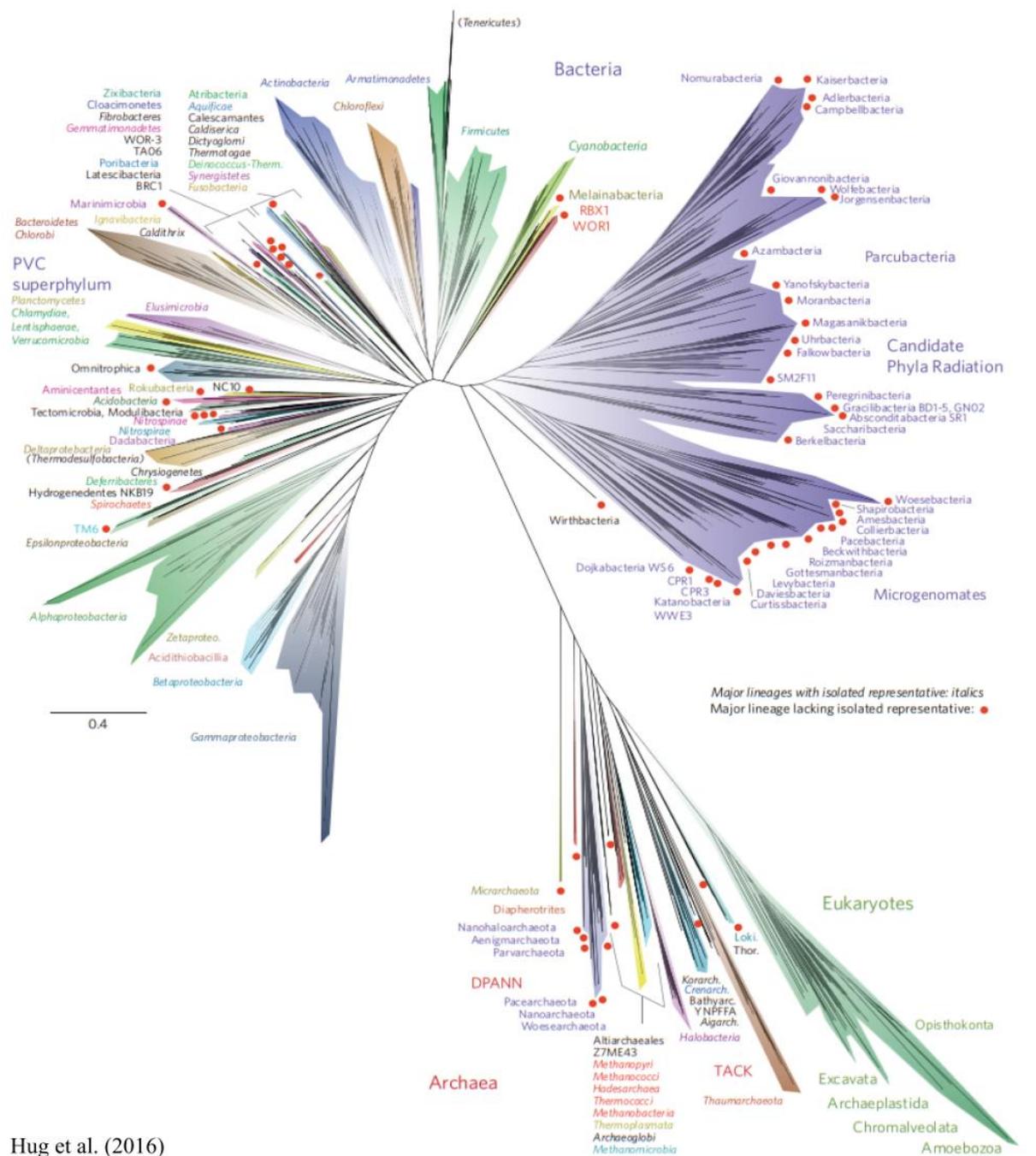
**Trois types de processus de biominéralisation avec l'exemple des carbonates de calcium.** Les lieux/processus permettant la formation locale des carbonates sont entourés en pointillés rouges. (a) Biominéralisation influencée ; (b) Biominéralisation induite avec l'exemple de la photosynthèse oxygénique ; (c) Biominéralisation contrôlée, modifiée de Görger et al. (2020)

Globalement, les fonctions, ainsi que les avantages et désavantages pour la fitness des organismes de tous ces mécanismes impliqués dans les interactions minéral-vivant sont encore largement discutés. D'un côté, l'encroûtement minéral des cellules limite a priori l'accès et le transport des nutriments, des déchets et des différentes sources d'énergie jusqu'aux cellules, ce qui peut avoir des conséquences néfastes pour les bactéries notamment (Miot et al., 2015). D'un autre côté, des hypothèses ont été avancées sur des avantages, directs ou indirects, de la biominéralisation pour les organismes tels que des fonctions de stockage des nutriments, immobilisation des toxines, protection contre le dessèchement, participation à l'intégrité d'un biofilm, installation d'une force motrice au voisinage de cellules vivant à une interface redox, tampon du pH intracellulaire ou encore action sur la flottabilité des cellules dans le cas des inclusions intracellulaires (Phoenix et Konhauser, 2008 ; Cosmidis et Benzerara, 2022 ; Mansor et Xu, 2020 ; Benzerara et al., 2022). Par exemple, il a été proposé que la présence de  $S_0$

biogénique dans des bactéries autotrophes ou chimiotrophes comme *Thiotrix* ou *Thiomicrospira* permet un stockage d'énergie pouvant être réutilisé par la suite dans des relations mutualistes (Boden et al., 2007 ; Maki, 2013). De plus, malgré une identification de gènes impliqués dans la biominéralisation chez les cyanobactéries par exemple, on n'identifie toujours pas précisément les fonctions qui y sont associées (Benzerara et al., 2022). En conséquence, il reste de nombreuses pistes à explorer pour comprendre ce qui a permis à ce trait fournissant des capacités de biominéralisation, fondamental dans les interactions minéral-vivant, d'être conservé et diversifié lors de l'évolution microbienne, à plus forte raison si la biominéralisation est un processus persistant depuis des millions d'années.

### 1.2. Co-évolutions du minéral et du vivant

Les interactions entre les microorganismes et les minéraux ont vraisemblablement commencé à l'Archéen au moins, dès l'apparition de la vie sur Terre (Schopf, 2006). Ainsi, les traces de vie non-ambigües les plus anciennes et communément admises par la communauté scientifique ont été datées à 3,46 Ga environ dans des stromatolites de la formation Strelley Pool du groupe Warrawoona en Australie (Allwood et al., 2006 ; Van Kanendonk, 2007 ; Knoll et Nowak, 2017). Il est possible que ces premières formes de vie correspondent à des bactéries et des archées qui constituent toujours les formes majoritaires de la vie sur Terre (leur diversité métabolique et leur ubiquité notamment leur permettent d'être présentes dans une large gamme de conditions géochimiques, Sutter et al., 2021 ; Bar-On et Milo, 2019 ; Granato et al., 2019). Plus globalement, depuis une réévaluation de l'arbre du vivant à partir de 1990 par C.R. Woese et al., on répartit les êtres vivants en trois domaines (Woese et al., 1990) : Bacteria (les bactéries), Archaea (les archées) et Eucarya (les eucaryotes) (Fig. 2, López-García et Moreira, 2008 ; Hug et al., 2016). Malgré les progrès qui ont eu lieu dans l'évaluation de la diversité microbienne et malgré l'accumulation d'un nombre impressionnant de séquences dans les bases de données génomiques, le nombre de lignées, leurs voies d'évolution, les métabolismes utilisés et même les critères permettant la définition d'une espèce sont encore difficiles à cerner (López-García et Moreira, 2008).



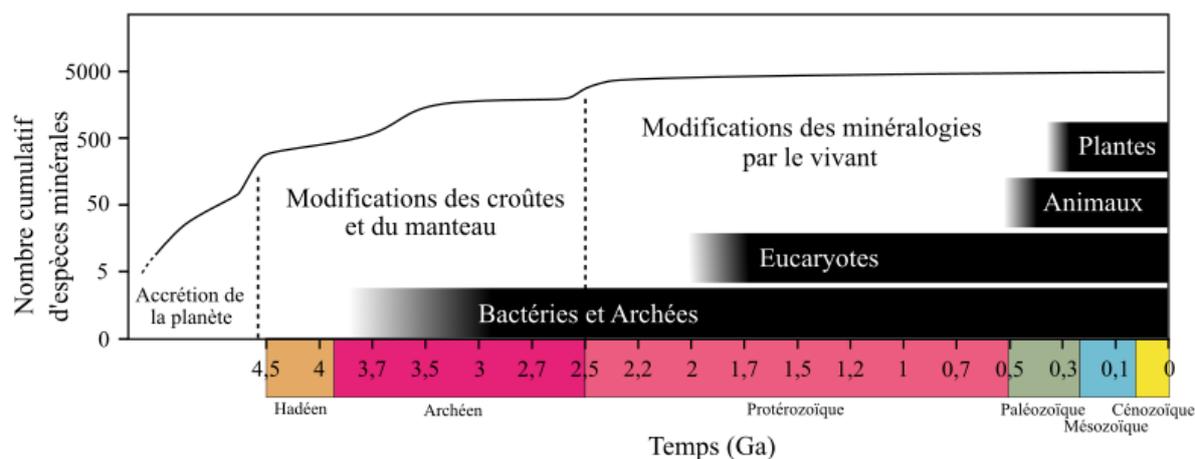
Hug et al. (2016)

## Figure 2.

**Représentation de l'arbre schématique du vivant illustrant les trois domaines du vivant.** Les points rouges représentent les lignées de hauts rangs taxonomiques sans espèces cultivées/décrites. Aujourd'hui on connaît beaucoup plus de phylums sans représentants cultivés (ex. Hug et al. 2016). La figure provient de Hug et al. (2016).

Les avancées dans l'utilisation des outils moléculaires (en particulier en bioinformatique) facilitées par le séquençage massif des gènes d'ARN ribosomique d'écosystèmes naturels (utilisés comme marqueurs d'identité phylogénétique des organismes) et la métagénomique (séquençage de l'ensemble des génomes d'une communauté, donnant accès aussi aux gènes du métabolisme) ouvrent un champ de recherche très large sur ce

domaine, notamment dans la compréhension de l'évolution microbienne au cours du temps. Ainsi, même si les connaissances sur les processus géologiques et biologiques primitifs sont encore floues, plusieurs épisodes majeurs de l'évolution microbienne ont été identifiés, notamment en inférant des propriétés métaboliques à des lignées phylogénétiques spécifiques, et des caractéristiques environnementales associées à ces propriétés métaboliques (Sleep, 2018 ; Knoll et Nowak, 2017). L'intégration des données géochronologiques aux données biologiques montre entre autres que les épisodes d'émergence, de diversification et d'extinction du vivant sont corrélés à des changements géochimiques comme l'oxygénation des milieux de la surface de la Terre. Brièvement, les plus anciens procaryotes se sont développés en anoxie, potentiellement pour certains sous forme de tapis microbiens phototrophes, puis ont continué à se diversifier après ~2,4 Ga en parallèle de l'émergence des eucaryotes, puis des organismes multicellulaires à partir de l'ère Néoprotérozoïque (Fig. 3, Knoll et Nowak, 2017 ; Knoll et al., 2016 ; López-García et al., 2017). En parallèle, les conditions géochimiques ont évolué depuis l'accrétion terrestre jusqu'à l'actuel. Différents processus géologiques tels que le volcanisme, le métamorphisme, l'hydrothermalisme ou l'oxygénation globale de l'atmosphère et des océans ont conduit à des interactions fluide-roches au sein de la Terre, qui elles-mêmes ont permis l'évolution des phases minérales pouvant se former (Fig. 3, Hazen et al., 2008). Il y a donc eu une co-évolution entre les microorganismes et les minéraux au cours des temps géologiques, qui a modifié significativement les cycles biogéochimiques globaux (Fomina et Skorochood, 2020 ; Mueller, 2015). Notamment, une conséquence de l'augmentation des diversités vivantes et minérales a été l'accroissement de leurs diversités respectives (une sorte de feed-back positif) et donc du champ de leurs interactions potentielles (Hazen et al., 2008 ; Hazen et Morrison, 2022).



**Figure 3.**

**Evolution schématique au cours des temps géologiques du nombre d'espèces minérales et du vivant.** Les phases dans la diversification des espèces minérales ainsi que l'approximation de leur nombre proviennent de Hazen et Ferry (2006). Les périodes d'apparition/diversification du vivant proviennent de Knoll et Nowak (2017). Figure modifiée de Knoll et Nowak (2017) et Hazen et Ferry (2006)

Actuellement, de nombreux outils permettent d'étudier les interactions minéral-vivant et soulignent les difficultés qui existent parfois à distinguer la limite entre les deux entités. Le tableau 1 donne une idée générale des techniques d'observation directe en microscopie/techniques afférentes à micro/nano-échelle, et des avantages/inconvénients qui leur sont associés dans l'étude des interactions minéral-vivant (Stigliano et al., 2023). Par exemple, ces outils peuvent aider à l'identification de minéraux biomarqueurs et l'évaluation de leur biogénicité dans le cadre de l'exploration spatiale et d'une potentielle vie ailleurs (Huang, 2004 ; Cockell, 2010). A travers différents mécanismes conduisant à l'altération et/ou à la précipitation minérale, les interactions minéral-vivant constituent donc des facteurs majeurs à prendre en compte dans l'étude des paléoclimats, des cycles géochimiques, dans l'exploration des environnements extra-terrestres et de manière générale pour comprendre la transformation de la géosphère par la biosphère (et inversement) au cours des temps géologiques (Li et al., 2019). Pour autant, toutes ces interactions entre les minéraux et le vivant ne sont pas connues de manière exhaustive et laissent ouvertes de nombreuses questions (Cuadros, 2017 ; Huang, 2004). Il est donc nécessaire de caractériser les différents acteurs impliqués et leurs hétérogénéités, et d'évaluer leurs variations au cours du temps. Dans ce cadre, les microbialites constituent des objets emblématiques particulièrement adaptés.

Technique	Lateral resolution	Sample depth-penetration	Field of view	Main information provided on mineral-living interactions	Advantages	Limitations
CLSM	250 nm down to tens of nm	200 $\mu\text{m}$	$\text{mm}^2$ up to $\text{cm}^2$ with stitching	Cellular compartments/specific molecules imaging via staining. Specific mineral-taxa relations detection. Chemical gradients	High lateral resolution, several channels visualization, versatile, 3D-reconstruction, time-lapse imaging	Low penetration depth, long-time acquisitions, phototoxicity, staining
Multi-photon LSM	0.7 $\mu\text{m}$	1 mm	<1 $\text{mm}^2$	Molecular relationships between mineral and microorganisms	Deep samples imaging, less photobleaching than CLSM	Limited access to the machine; complex operation
OCT	few $\mu\text{m}$	few mm	few $\text{mm}^2$	3D biofilm structure reconstruction, bulk-biofilm interactions imaging over time	Large area imaging, fast, no-staining, real-time, non-destructive, long-time experiment	Effects of shades, low spatial resolution
AFM	30 nm	10 $\mu\text{m}$	100 $\mu\text{m}^2$	Biofilm-minerals topography imaging, mechanical properties assessment of biofilm-mineral assemblages	Ultra-high-resolution, <i>in-situ</i> imaging of biofilm-minerals assemblages under wet conditions	Low vertical scanning range, tip could be invasive for biofilm integrity
VSI	360 nm	1 mm	$\text{mm}^2$ up to $\text{cm}^2$ with stitching	Biofilm-minerals topography imaging, dissolution/precipitation rates of minerals, biofilm coverage assessment	High-resolution, large field of view, non-invasive for biofilm integrity	Limited lateral resolution, optical artefacts, in-situ imaging of biofilm-minerals assemblages under wet conditions only possible with ad-hoc design of an optical compensating filter
SEM	1 nm at best, depends on detected signal	few hundreds of nm	100 $\mu\text{m}^2$ up to $\text{cm}^2$ with stitching	Surface biofilm morphological information; qualitative and semi-quantitative elemental composition of biofilm-mineral assemblages	Imaging with high-resolution	Drying and coating of samples, limited penetration-depth, high-vacuum required
HIM	0.24 nm	few nm	100 $\mu\text{m}^2$	Same as SEM except for chemical analyses	Ultra-high spatial resolution, high surface sensitivity, non-conductive samples imaging	No elemental quantification
TEM	atomic scale	<200 nm	few $\mu\text{m}^2$	Ultrastructural view of cells at the nanoscale; crystallographic orientations imaging; nanoscale chemical biofilm heterogeneities visualization	Ultra-high lateral 2D resolution imaging, elemental speciation	Sample preparation, thin samples required, trade-off needed between low dose/cryo- and high dose
FIB	1 nm	Tens of $\mu\text{m}$	100 $\mu\text{m}^2$	Biofilm/mineral in 3D; sample prep for TEM.	High-resolution cross-sectional analyses, 3D sample visualization	Ion beam damages such as amorphization of mineral, sample preparation
Nano-XRF, nano-XAS	~10 nm	10-100 $\mu\text{m}$ , Depending on the excitation beam and mass	10 $\mu\text{m}^2$ up to $\text{mm}^2$	Spatial distribution of chemical elements in biofilms mapping; element speciation analysis; three-dimensional tomography analysis	Elemental detection and speciation, limited sample preparation, environmental mapping condition	Beam damages, limited access to the technique; limited speed

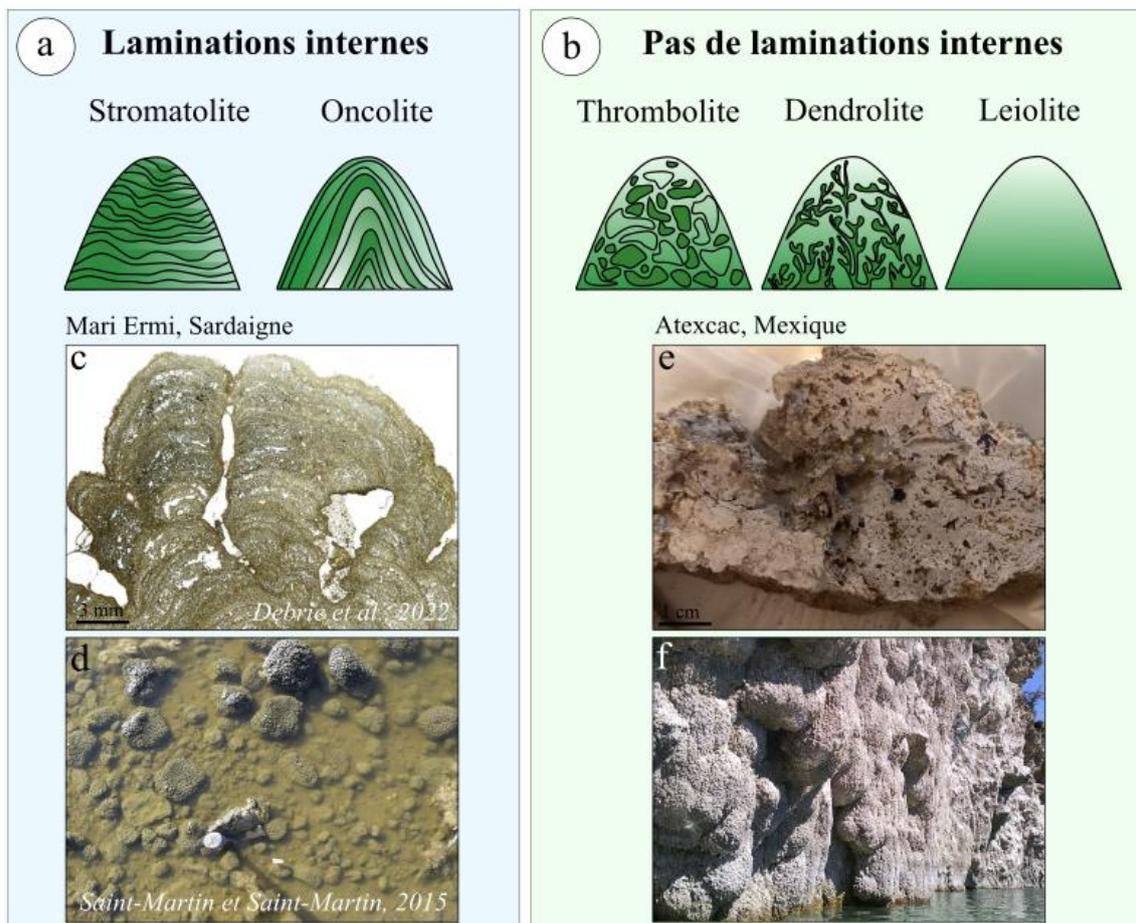
Tableau 1.

**Résumé des avantages, inconvénients et caractéristiques des techniques d'analyses observationnelles à micro/nano-échelle microscopiques et associées, utilisées dans l'étude des interactions minéral-vivant.** Les méthodes moléculaires, ou de sondes fluorescentes comme pour le FISH ne sont pas présentées ici. La figure provient de Stigliano et al. (2023).

## 2. Les microbialites

### 2.1. Définition

Les microbialites sont des dépôts organo-sédimentaires formés par les interactions entre des communautés microbiennes benthiques et des phases minérales (Burne et Moore, 1987). Le plus souvent, ces phases minérales sont carbonatées ; elles sont soit authigènes, soit formées par piégeage de particules détritiques, soit les deux (Burne et Moore, 1987 ; Riding, 1991). Les microbialites sont donc des structures clés pour comprendre les interactions entre le minéral et le vivant dans le registre fossile comme dans le registre actuel. Actuellement, il est possible d'en retrouver sur tout le globe dans une diversité de milieux présentant une large gamme de conditions environnementales (en termes de climat, salinité, pH, température, alcalinité, etc). A cette diversité d'environnements correspond également une diversité de morphologies des microbialites. Une classification générale basée sur l'identification de nombreux critères texturaux a permis d'ordonner ces différentes morphologies dans plusieurs groupes généraux représentés dans la figure 4.



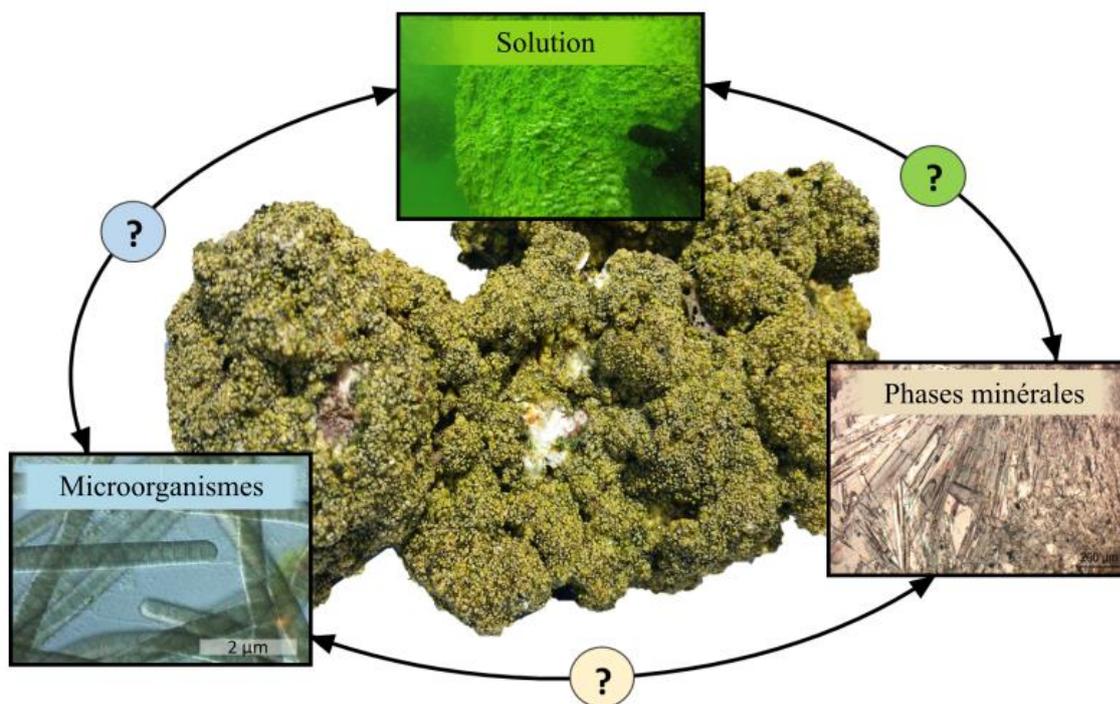
**Figure 4.**

**Classification non détaillée des microbialites en fonction de leur morphologie.** (a) Stromatolites et oncolites correspondant à des structures laminées ; (b) Thrombolites, dendrolites et leiolite correspondant à des structures non-laminées ; (c) Exemple d'une stromatolite actuelle se formant dans la lagune de Mari Ermi, en Sardaigne (Debie et al., 2022) ; (d) Vue d'ensemble des stromatolites de l'image c (Saint-Martin et Saint-Martin, 2015) ; (e) Exemple de thrombolite actuelle du lac Atexcac, au Mexique ; (f) Vue d'ensemble des thrombolites de l'image e. Figure modifiée de White (2020).

De manière générale, les microbialites peuvent ou non présenter des laminations, dont les origines ne sont pas encore connues de manière exhaustive. Dans l'ensemble, ce critère permet de distinguer deux grands groupes de microbialites : (i) lorsqu'elles présentent des laminations internes, elles sont appelées des stromatolites et (ii) lorsque les microbialites ne présentent pas de laminations elles sont regroupées sous le terme de thrombolite (ou dendrolite dans le cas d'une structure ramifiée) (White et al., 2020). Au premier ordre, cette diversité d'environnements de formation et de morphologies illustre bien la complexité de ces structures géobiologiques et des conditions qui interviennent dans leur formation. Par conséquent, si on veut comprendre le fonctionnement de ces écosystèmes qui enregistrent des informations à propos de leur environnement à un moment donné, il est nécessaire de caractériser les différents acteurs qui sont impliqués dans leur formation.

## *2.2. Acteurs principaux impliqués dans la formation des microbialites*

De très nombreux paramètres interviennent dans la formation des microbialites (Dupraz et al., 2011 ; Chagas et al., 2016, Zeyen et al., 2021). S'il n'est pas possible actuellement de quantifier et de généraliser à tous les environnements le rôle de chacun de ces paramètres, ces derniers peuvent néanmoins être associés à trois éléments clés composant les microbialites et/ou intervenant dans leur formation : (i) les phases minérales constitutives, (ii) la solution de formation et (iii) les microorganismes les peuplant (Fig. 5). Ces trois acteurs principaux forment une unité où la notion d'interactions est importante car chaque modification de l'un entraîne des modifications des deux autres. Parmi eux, certains ont des rôles prépondérants à un endroit mais sont moindres à un autre endroit ; leur influence est liée aux variations spatiales des microbialites.



**Figure 5.**  
Trois composantes principales reliées entre elles intervenant dans la formation des microbialites.

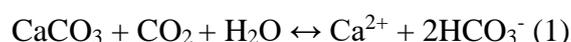
### 2.2.1. Les phases minérales

La formation des phases minérales cristallines ou amorphes se fait à travers différentes étapes (Benning et Waychunas, 2008). La première étape est la nucléation et a lieu lorsque la solution est sursaturée vis-à-vis de la phase en question. La physico-chimie locale de la solution intervient donc très tôt dans le processus de précipitation minérale dans les microbialites. La seconde étape est la croissance des minéraux. Au cours du temps, les phases minérales primaires des microbialites peuvent être soit préservées soit remaniées (diagenèse) en lien avec des variations de pression/température/biologie qui affectent la stabilité thermodynamique des minéraux. Actuellement, une grande diversité de phases minérales a été décrite dans différents types de microbialites, actuelles ou fossiles, même si les plus répandues sont des carbonates tels que la calcite, l'aragonite ou l'hydromagnésite (Dupraz et al., 2011 ; White et al., 2020). On retrouve ces phases par exemple dans les microbialites du lac Salda en Turquie (Gunes et al., 2023) ou du lac Alchichica au Mexique (Kaźmierczak et al., 2011). Plusieurs microbialites sont également composées de silicates hydratés d'origine primaire, tels que la kérolite, par exemple dans le lac Atexcac, au Mexique (Zeyen et al., 2015). Les phosphates, sulfates, sulfures, oxalates, oxydes et hydroxydes sont également des phases minérales retrouvées de manière relativement courante au sein de matrices carbonatées dans les microbialites actuelles et passées (Dupraz et al., 2011). Globalement, cette diversité de compositions chimiques des

phases minérales implique non seulement une diversité de conditions physico-chimiques de formation pour les microbialites, comme souligné précédemment, mais aussi entraîne une diversité dans leurs fabriques. De plus, lors de leur précipitation, les phases minérales influencent aussi la localisation/spécificité des communautés microbiennes des microbialites. Même si le rôle du substratum géologique sur la composition des communautés microbiennes est moins documenté que l'inverse, il a par exemple été proposé à l'aide d'incubations microbiennes sur différents substrats en laboratoire que certaines phases minérales comme la pyrite pouvaient influencer les structures et les compositions microbiennes et constituer des habitats microbiens spécifiques (minéralosphère, Uroz et al., 2015 ; Mitchell et al., 2013). En parallèle, la précipitation ou la dissolution d'une phase minérale extrait/relargue respectivement des ions en solution, donc il existe une dynamique constante entre les phases minérales, les microorganismes et la solution au sein des microbialites.

### 2.2.2. La solution de formation

La composition chimique de la solution dans laquelle se forment les microbialites est un autre acteur majeur de leur formation. Une solution est sursaturée vis-à-vis d'une phase minérale lorsque « le potentiel chimique du soluté est plus élevé que le potentiel chimique correspondant à ce soluté en équilibre avec la forme cristalline la plus thermodynamiquement stable » (Taylor et Zang, 2016). Lorsque la solution est sursaturée vis-à-vis d'une phase minérale, donc déviée de son état d'équilibre, l'énergie libre totale du système est réduite et la différence de potentiel chimique entre la phase minérale en question et la solution devient négative, ce qui favorise la nucléation puis la croissance de la phase minérale (Benning et Waychunas, 2008). Dans le cas inverse, les phases minérales déjà présentes sont soumises à la dissolution et libèrent des ions en solution. La composition chimique de la solution de départ définit ainsi un état de saturation global dans les systèmes qui nous intéressent, et la précipitation ou non des phases minérales est non seulement contrôlée par les paramètres thermodynamiques décrits au-dessus, mais aussi par des phénomènes cinétiques, particulièrement importants à basses températures. Dans le cas de la plupart des microbialites, la relation suivante d'équilibre des carbonates (en exemple les carbonates de calcium) est impliquée :



A chaque équilibre chimique tel que celui montré ci-dessus correspond une constante d'équilibre  $K_s$  nommée aussi le produit de solubilité, qui est dépendante de la température. Il est possible à partir des concentrations mesurées au sein des solutions qui abritent les microbialites de déduire des modèles de spéciations des espèces chimiques et de prédire leurs activités. Notamment, le produit d'activité ionique (ion activity product, IAP) correspond au rapport entre le produit des activités des produits sur le produit des activités des réactifs, donc par exemple dans le cas du carbonate de calcium de la relation (1),  $IAP = a(\text{HCO}_3^-)^2 \cdot a(\text{Ca}^{2+}) / a(\text{CO}_2)$ . La précipitation est thermodynamiquement possible lorsque le produit de l'activité ionique IAP est supérieur à la valeur de la constante de solubilité  $K_s$ , ce qui permet de définir la saturation du système. Souvent, on utilise ainsi l'indice de saturation (SI) pour évaluer la prédisposition de la solution à favoriser ou non la précipitation d'une phase minérale, ici des carbonates, défini comme suit :

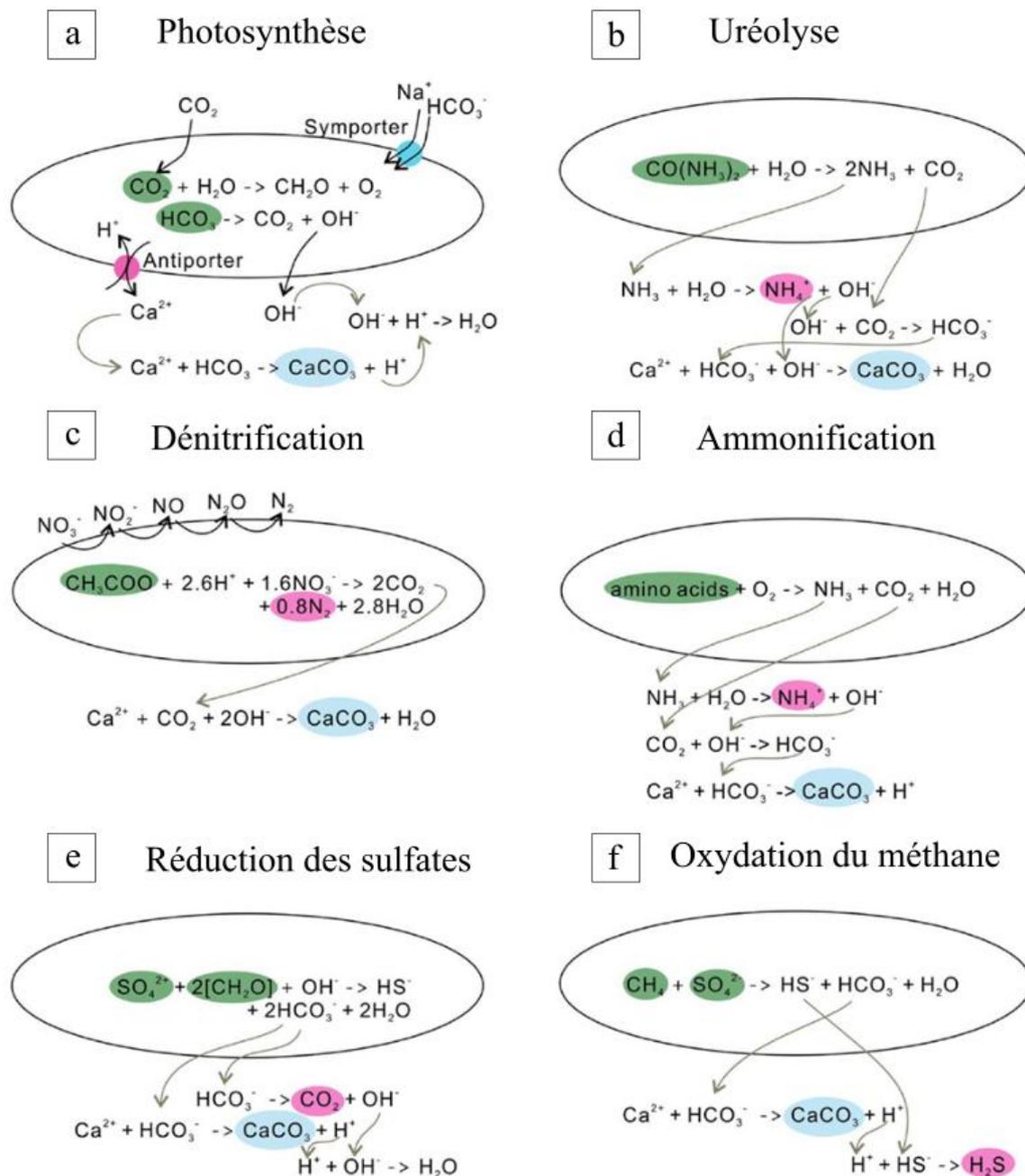
$$SI = \log(IAP/K_s)$$

Si  $SI = 0$ , la solution est à l'équilibre avec la phase minérale. Lorsque  $SI > 0$ , la solution est sursaturée vis-à-vis de la phase minérale, donc celle-ci peut précipiter, et lorsque  $SI < 0$ , la solution est sous-saturée vis-à-vis de la phase minérale et cette dernière a tendance à se dissoudre. La capacité de la solution à favoriser la précipitation ou la dissolution d'un minéral est donc indiquée par la valeur du SI. Pourtant, certaines réactions thermodynamiquement favorisées peuvent ne pas se produire à cause de phénomènes cinétiques. Mais l'augmentation du SI étant susceptible d'accélérer la cinétique, il est aussi possible que la présence de paramètres dans le milieu augmentant le SI puissent indirectement favoriser une réaction qui aurait été très lente sinon. Par conséquent, d'après ces considérations thermodynamiques et cinétiques, il est clair que si les conditions locales extracellulaires des tapis microbiens changent, les états de saturation de la solution changent, donc les mécanismes de biominéralisation (influencée et/ou induite) sont plus ou moins favorisés. Notamment, la chimie de la solution définit l'activité des ions carbonates et bicarbonates, soit le moteur d'alcalinité décrit par Gørgen et al. (2020), impliqué au même titre que les EPS dans la précipitation des phases minérales dans les tapis microbiens des microbialites.

### 2.2.3. Les microorganismes

Les microorganismes sont la troisième composante majeure des microbialites, où leurs interactions avec les minéraux sont essentielles. Néanmoins, il existe une diversité de voies

métaboliques impliquées dans ces interactions et certaines d'entre elles influencent directement le moteur d'alcalinité (Couradeau, 2012 ; Dupraz et al., 2009 ; Zhu et Dittrich, 2016). Etant donnée leur participation à la construction des microbialites, c'est sur ces voies induisant la carbonatation des biofilms que nous nous sommes focalisés dans cette partie (Fig. 6). De plus, les surfaces des cellules contenues dans les biofilms des microbialites peuvent stabiliser les premiers nucléi via une diminution de la tension de surface ; dans ce cas elles fournissent par exemple des supports à la nucléation de phases minérales (Dupraz et Visscher, 2005 ; Zhu et Dittrich, 2016).



Zhu et Dittrich (2016)

Figure 6.

**Diversité de métabolismes favorisant la précipitation des carbonates.** Ces métabolismes comprennent (a) la photosynthèse, (b) l'uréolyse, (c) la dénitrification, (d) l'ammonification, (e) la réduction des sulfates et (f) l'oxydation du méthane. Figure modifiée de Zhu et Dittrich (2016).

Au premier ordre, les organismes autotrophes sont fortement impliqués dans la biominéralisation induite des microbialites en utilisant des sources de carbone inorganiques en conditions oxiques ou anoxiques (Dupraz et Visscher, 2005 ; Riding, 2000). Notamment, les cyanobactéries en sont des représentantes majeures et on considère actuellement ces organismes photosynthétiques responsables de précipitations carbonatées depuis au moins 2,6 Ga (Altermann et al., 2006). Plus généralement, les photosynthèses oxygénique et anoxygénique sont des métabolismes majeurs qui interviennent dans la formation des microbialites et peuvent correspondre respectivement aux réactions (1) et (2) suivantes :



Dans l'ensemble, la photosynthèse permet une augmentation du pH dans le microenvironnement extracellulaire des biofilms (Fig. 6a ; Zhu et Dittrich, 2016 ; Görgen et al., 2020 ; Bundeleva et al., 2012). Les ions  $\text{HCO}_3^-$  de la solution extracellulaire sont activement accumulés dans les cellules puis convertis en  $\text{CO}_2$  et  $\text{OH}^-$  via l'activité d'une anhydrase carbonique, ce qui conduit à un import de protons par les cellules compensant le pH intracellulaire. Le  $\text{CO}_2$  est ensuite fixé par la RuBisCO. Au total, ce processus de fixation du  $\text{CO}_2$  conduit à une augmentation du pH extracellulaire localement. Ce phénomène peut être décrit par la relation suivante pour la photosynthèse oxygénique par exemple (Baumgartner et al., 2006) :



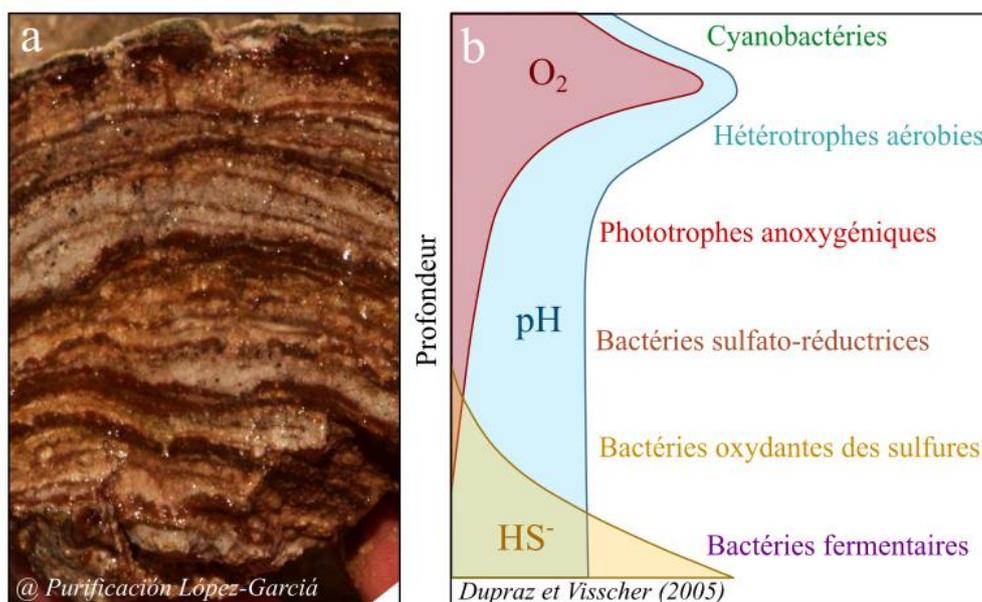
Par ailleurs, certaines cyanobactéries possèdent des échangeurs  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ , avec un export des ions  $\text{Ca}^{2+}$  vers l'extérieur de la cellule et un import des protons, ce qui augmente d'autant plus la saturation extracellulaire vis-à-vis des carbonates de calcium (Görgen et al., 2020 ; Waditee et al., 2004).

D'autre part, certaines voies métaboliques hétérotrophes peuvent également favoriser la précipitation des carbonates. En utilisant différentes sources de carbone organique, ces voies métaboliques produisent au final notamment du  $\text{CO}_2$  qui s'hydrate en acide carbonique puis se dissocie jusqu'à l'anion bicarbonate dans les milieux au pH compris entre ~7 et ~9. En présence

de cations métalliques comme  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  et de sites de nucléations, l'acide carbonique permet la calcification des biofilms dans les microbialites. Par exemple, comme pour les photosynthèses, les métabolismes qui conduisent à l'oxydation du méthane peuvent avoir lieu en oxie ou en anoxie. Les organismes méthanotrophes peuvent respectivement utiliser le dioxygène ou le sulfate en tant qu'accepteurs d'électrons (Fig. 6f, Zhu et Dittrich, 2016). La méthanotrophie anaérobie a notamment été étudiée chez des archées du groupe ANME ayant un rôle dans la précipitation de carbonates authigènes dans des tapis microbiens de milieux euxiniques en mer Noire (Stadnitskaia et al., 2005). Il a également été suggéré via des analyses isotopiques du  $^{13}\text{C}$  que l'oxydation microbienne anaérobie du méthane dépendante de la présence de sulfates (nitrates dans d'autres cas) puisse constituer une source de carbone inorganique et un puits de méthane dans une zone de l'île d'Elbe et dans des dômes de sel du golfe du Mexique (Meister et al., 2018 ; Caesar et al., 2019). Ensuite, d'autres cycles majeurs comme celui du soufre peuvent être impliqués dans les voies métaboliques induisant la carbonatation dans les microbialites. Par exemple, il a été proposé que les organismes sulfato-réducteurs permettent dans certains cas la biominéralisation de carbonates et de sulfures de fer via la réduction des sulfates en sulfures (Fig. 6e, Duverger et al., 2020 ; Rassmann, 2017 ; Görden et al., 2020 ; Zhu et Dittrich, 2016). De fait, l'activité des ions bicarbonates dans le milieu extracellulaire augmente. L'hétérotrophie de ces organismes est également susceptible de dégrader les EPS des tapis microbiens des microbialites, conduisant à la libération extracellulaire de cations comme le  $\text{Ca}^{2+}$  (Plée et al., 2010), même si ceci est fait le plus souvent par d'autres hétérotrophes tels que les Bacteroidetes et/ou Planctomycetes. De plus, outre l'implication du cycle du soufre dans la précipitation microbienne des carbonates de calcium, d'autres voies métaboliques induisant la carbonatation des biofilms et impliquant le cycle de l'azote sont également connues. C'est le cas des voies d'ammonification ou de dénitrification. Comme le montre la figure 6d, l'ammonification favorise l'augmentation de l'activité des ions carbonates en solution. Notamment, Krause et al. (2018) ont montré que les processus combinés de l'ammonification due à la dégradation de la matière organique dans les biofilms et du rôle extracellulaire de l'anhydrase carbonique peuvent augmenter l'alcalinité de la solution et induisent une précipitation ultérieure de carbonate. Certains organismes hétérotrophes, souvent des anaérobies facultatifs, sont également capables de réduire le nitrate en présence de matière organique (Fig. 6c, Jain et al., 2021). Ce processus de dénitrification génère de l'alcalinité et du dioxyde de carbone qui s'équilibre avec l'eau et forme des ions bicarbonates. En exemple, *Pseudomonas denitrificans*, *Denitrobacillus* ou *Thiobacillus* sont des microorganismes dénitrifiants (Jain et al., 2021). Enfin, parmi les différentes voies métaboliques hétérotrophes

ayant un rôle sur le moteur d'alcalinité dans l'environnement des microbialites, l'hydrolyse microbienne de l'urée forme notamment de l'ammoniac (une base forte) et de l'acide carbonique en produits finaux (Fig. 6b). Dans ce processus, c'est une enzyme, l'uréase, qui permet l'hydrolyse de l'urée et c'est la formation en produits intermédiaires des ions ammonium et hydroxyle qui induit l'augmentation de l'alcalinité ambiante de la solution. D'après Jain et al. (2021), de nombreuses espèces microbiennes interviennent dans les cycles de l'uréolyse comme *B. subtilis*, *Sporosarcina pasteurii* ou *Sporolactobacillus*, ce qui peut conduire à de forts taux de précipitations carbonatées.

Dans l'ensemble, toutes ces voies métaboliques susceptibles d'induire une précipitation des carbonates sont conditionnées aux disponibilités des différentes espèces chimiques du milieu qui leur fournissent des sources d'énergie, de carbone, azote et soufre, et des donneurs/accepteurs d'électrons. Par conséquent, les conditions environnementales, incluant la chimie de la solution et la nature des phases minérales, influencent et/ou déterminent les métabolismes qui peuvent être utilisés par les communautés microbiennes, et donc vraisemblablement la répartition des organismes dans un milieu. Par exemple, à l'échelle des tapis microbiens des microbialites, plusieurs travaux ont suggéré un étagement des microorganismes entre la surface et les zones plus profondes où les conditions chimiques diffèrent (Fig. 7, Pace et al., 2016 ; Dupraz et Visscher, 2005).



**Figure 7.**

**Variations théoriques des communautés microbiennes et des conditions physico-chimiques dans un tapis microbien en fonction de la profondeur à partir de la surface.** (a) Coupe d'une microbialite laminée vivante présentant différentes couches associées à des tapis microbiens, et provenant de Salada del Peine (Salar de Atacama). Photographie prise en 2012 par P. López-García ; (b) Communautés microbiennes théoriques associées aux différentes couches présentes dans le tapis microbiens (Dupraz

et Visscher, 2005) ; (c) Profils théoriques du dioxygène, du pH et des sulfures dans un tapis microbien en fonction de la profondeur (Dupraz et Visscher, 2005). Figure modifiée de Dupraz et Visscher (2005).

A une échelle plus large comme un lac, la composition (phylogénétique et fonctionnelle) des communautés microbiennes est aussi soumise aux variations du milieu, et inversement. Cela rend difficile l'évaluation de cette diversité et de l'abondance relative de lignées microbiennes, à plus forte raison lorsque les milieux sont dynamiques et subissent par exemple des changements géochimiques saisonniers. Néanmoins, l'étendue de cette diversité est de mieux en mieux comprise, par exemple chez les procaryotes, avec un nombre de plus en plus important de séquences nucléotidiques/protéiques fournies dans les bases de données classiques comme NCBI (National Center for Biotechnology Information), et provenant entre autres d'échantillons environnementaux (Schoch et al., 2020 ; López-García et Moreira, 2008 ; Brock et al., 2003). Au cours des deux dernières décennies, les approches moléculaires en microbiologie environnementale ont permis de réévaluer plus précisément la diversité et l'abondance relative des lignées microbiennes en utilisant des analyses moléculaires massives basées sur l'amplification et le séquençage des gènes de l'ARN ribosomique de la petite sous-unité (ARNr SSU) comme marqueur universel des organismes (López-García et Moreira, 2008). A partir des séquences de ces amplicons, des unités taxonomiques opérationnelles (operational taxonomic units, OTUs) sont définies par taux de similarité entre les séquences. Dans la pratique, les OTUs sont utilisées pour l'assignation phylogénétique des organismes (et donc leur classification taxonomique) en utilisant des seuils convenus de similarité bien qu'il n'existe pas de concept d'espèce consensuel pour les microbes (Blaxter et al., 2005 ; López-García et Moreira, 2008 ; Spratt et al., 2006). Des séquences alignées de gènes d'ARN ribosomique de bonne qualité et excluant des chimères pour les bactéries, archées et eucaryotes sont regroupées dans certaines bases de données publiques, comme SILVA ; ces séquences servent de référence pour classer les séquences environnementales nouvelles par similarité et, plus précisément, par construction d'arbres phylogénétiques (Quast et al., 2013 ; Glöckner et al., 2017). Ainsi, notre compréhension des écosystèmes microbiens repose particulièrement sur le développement de techniques moléculaires comme le métabarcoding (séquençage d'amplicons d'ARNr SSU des échantillons environnementaux), la métagénomique et/ou la métatranscriptomique (Shelton et al., 2022 ; Bengtsson-Palme et al., 2018 ; Lamb et al., 2018 ; Guyomar and Lemaitre, 2022 ; Simon et Daniel, 2009 ; Pérez-Cobas et al., 2020). Enfin, dans l'ensemble, ces avancées dans les outils microbiologiques ont conduit à revoir les classifications du vivant sur des critères plus moléculaires et moins phénotypiques. Depuis sa mise en place en 2017, la base de données GTDB (Genome Taxonomy Database) a notamment

normalisé par rangs phylogénétiques de profondeur comparable la taxonomie de plus de 250 000 génomes bactériens (entre autres) provenant de la base de données classique NCBI correspondant à des génomes d'organismes cultivés ou bien assemblés à partir de métagénomes (metagenome-assembled genomes, MAGs) (Parks et al., 2022). Cela a fourni une taxonomie bactérienne et archéenne rationalisée qui accommode aussi les génomes des organismes des phylums nouveaux identifiés dans les écosystèmes. Cette taxonomie en cours d'imposition dans la communauté scientifique est organisée sur des critères quantitatifs de divergence évolutive relative entre identités nucléotidiques moyennes (average nucleotide identity, ANI) (Parks et al., 2022) ainsi que de phylogénie moléculaire. Cependant, l'utilisation des critères morphologiques reste indispensable pour décrire officiellement les espèces microbiennes et autres taxons (familles, ordres, phylums), et la question de la part non négligeable de séquences appartenant à des organismes qui ne sont pas cultivés dans les bases de données se pose dans l'étude des diversités environnementales procaryotes et eucaryotes (Cahill et al., 2017 ; Zimmermann et al., 2014). Pour cela, des nomenclatures comme le SeqCode permettent de s'affranchir en partie des règles de la nomenclature conventionnelle dépendantes de la cultivabilité des procaryotes et de les nommer de manière similaire et reproductible sur la base des séquences génomiques provenant d'isolats, de MAGs, etc (Hedlund et al., 2022).

Pour conclure, la composante microbienne est complexe, et intrinsèquement reliée aux paramètres chimiques et minéralogiques du milieu. Elle intervient largement dans la compréhension des écosystèmes et spécifiquement dans la formation des microbialites. Ces structures géobiologiques sont donc de réels objets d'intérêt qui mettent en avant les flux d'éléments constants existant entre microorganismes, minéralogie et solution.

### 2.3. Evolution des microbialites au cours des temps géologiques

Au cours des évolutions conjointes entre les minéraux et le vivant, l'abondance et l'hétérogénéité des microbialites ont varié. Ces dernières sont largement répandues dans le registre fossile et on en trouve à des temps aussi reculés que l'Archéen. Les microbialites sont ainsi considérées parmi les plus anciennes traces de vie connues sur Terre (Allwood et al., 2006 ; Awramik et al., 1983 ; Schopf, 2006). Ce sont des stromatolites appartenant au Strelley Pool Chert (Pilbara Craton), dans l'ouest de l'Australie, et localisées dans un vestige de plateforme carbonatée de plusieurs kilomètres, qui ont été datées à ~3,46 Ga (Fig. 8, Allwood et al., 2009 ; Duda et al., 2016).



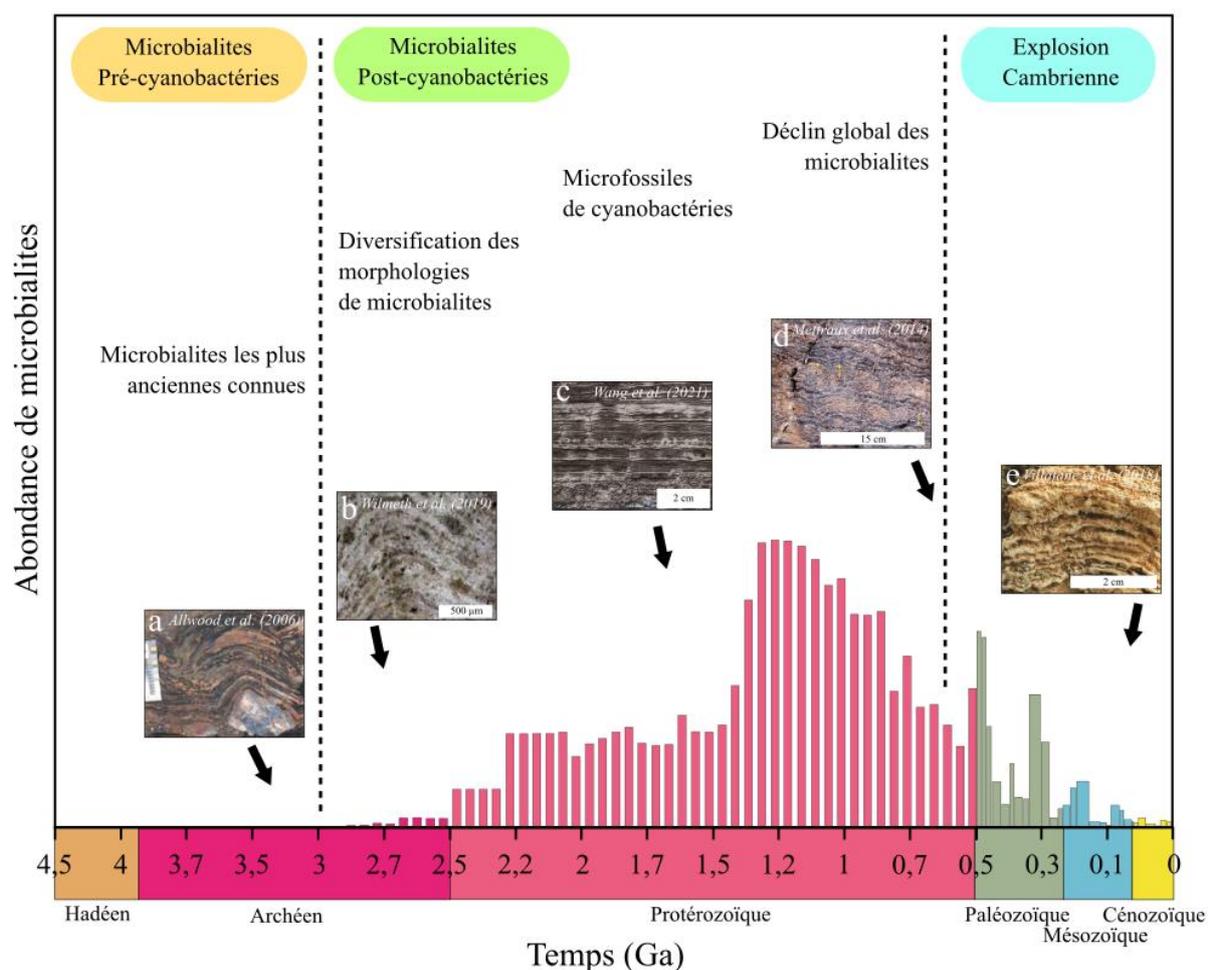
**Figure 8.**

**Stromatolites fossiles du Pilbara craton contenant les plus anciennes traces de vie non-ambigües connues sur Terre.** (a) stromatolites coniformes avec une lamine délimitée par des pointillés blancs (Allwood et al., 2009); (b) couches de stromatolites centimétriques intercalées dans des sédiments (Duda et al., 2016); (c) faciès de laminites en dômes avec une lamine soulignée par des pointillés blancs (Allwood et al., 2006); (d) cônes stromatolitiques dont la structure est montrée par des pointillés blancs (Allwood et al., 2006); (e) Carbonates laminés et stromatolitiques de la Strelley Pool Formation (Duda et al., 2016); (f) autre type de stromatolites côniformes de la Strelley Pool Chert Formation (Allwood et al., 2006). Figure modifiée de Allwood et al. (2006, 2009) et Duda et al. (2016).

La biogénicité de ces stromatolites a été établie grâce à des critères morphologiques ; en l'occurrence différents types de laminations et d'encroûtements en formes de dômes (Allwood et al., 2006 ; Sugitani et al., 2010). D'autres traces de vie plus anciennes pourraient être supposées d'après de tels critères morphologiques (*e.g.* stromatolites supposées d'Isua de ~3.7 Ga, Nutman et al., 2016) mais la biogénicité en général reste difficile à établir car il est possible que des formes produites par des accrétions sédimentaires abiotiques soient confondues avec

des formes produites biologiquement (Grotzinger et Rothmann, 1996 ; McMahon et Cosmidis, 2023 ; Brasier et al., 2005 ; Knoll et al., 2016). Malgré tout, la présence de ces traces de vie non-ambigües datées de l'Archéen dans des microbialites fossiles en font des objets emblématiques largement étudiés dans la compréhension et l'interprétation de la vie primitive.

De nombreuses occurrences de microbialites se sont succédées au cours des temps géologiques (dont l'identification et la quantification sont basées sur la présence de carbonates microbiens de récifs notamment), et leur diversité a varié (Fig. 9).



**Figure 9.**

**Evolution des microbialites au cours du temps approximée par leur diversité taxonomique (formes des espèces de stromatolites) et l'abondance relative des carbonates microbiens de récifs.** Sur la période du Précambrien, c'est la diversité des stromatolites (formes des espèces) qui a été évaluée sur des intervalles de 50 Ma par Awramik et Sprinkle (1999). Les abondances relatives des carbonates microbiens marins au Phanérozoïque ont été évaluées par Kiessling (2002), sur la base d'une compilation de sites récifaux. (a) Stromatolites de ~3.43 Ga, Australie (Allwood et al., 2006) ; (b) Stromatolites de ~2.7 Ga, Afrique du Sud (Wilmeth et al., 2019) ; (c) Stromatolites du Mésoprotérozoïque, Chine (Wang et al., 2021) ; (d) Stromatolites du Néoprotérozoïque, Oman (Mettraux et al., 2014) ; (e) Stromatolites du Messinien, Espagne (Villafañe et al., 2018). Figure basée sur Riding (2005, 2006), Kiessling (2002) et White (2020).

Ces variations d'abondance, de localisation, de diversité (en termes de morphologies et textures des stromatolites) ont été produites pas des événements au cours des temps géologiques (Riding, 2005). Comme mentionné précédemment, la diversité des microbialites se caractérise actuellement en termes d'environnements dans lesquels ils se forment (marin, eau douce, hypersalin, etc), de phases minérales les composant (surtout des carbonates, mais aussi silicates, phosphates, etc) et de communautés microbiennes (acclimatées à des conditions oxiques et/ou anoxiques par exemple). Bien qu'il soit complexe d'aborder directement ces questions de variations d'abondance et de diversité des microbialites au cours du temps, ces discussions mettent en avant le besoin de caractériser les points communs entre les environnements abritant des microbialites. Notamment, est-ce que certaines conditions géochimiques regroupent ces environnements actuellement ? Est-ce que ce sont les mêmes aujourd'hui que dans le passé ? Dans quelle mesure les communautés microbiennes impliquées dans la carbonatogenèse des microbialites ont varié ? Pour obtenir des éléments de réponse à ces questions, il est nécessaire de mieux interpréter les environnements et mécanismes de formation des microbialites fossiles puisque celles-ci, en théorie, ont enregistré les conditions géochimiques/biologiques caractérisant leur milieu au moment de leur formation.

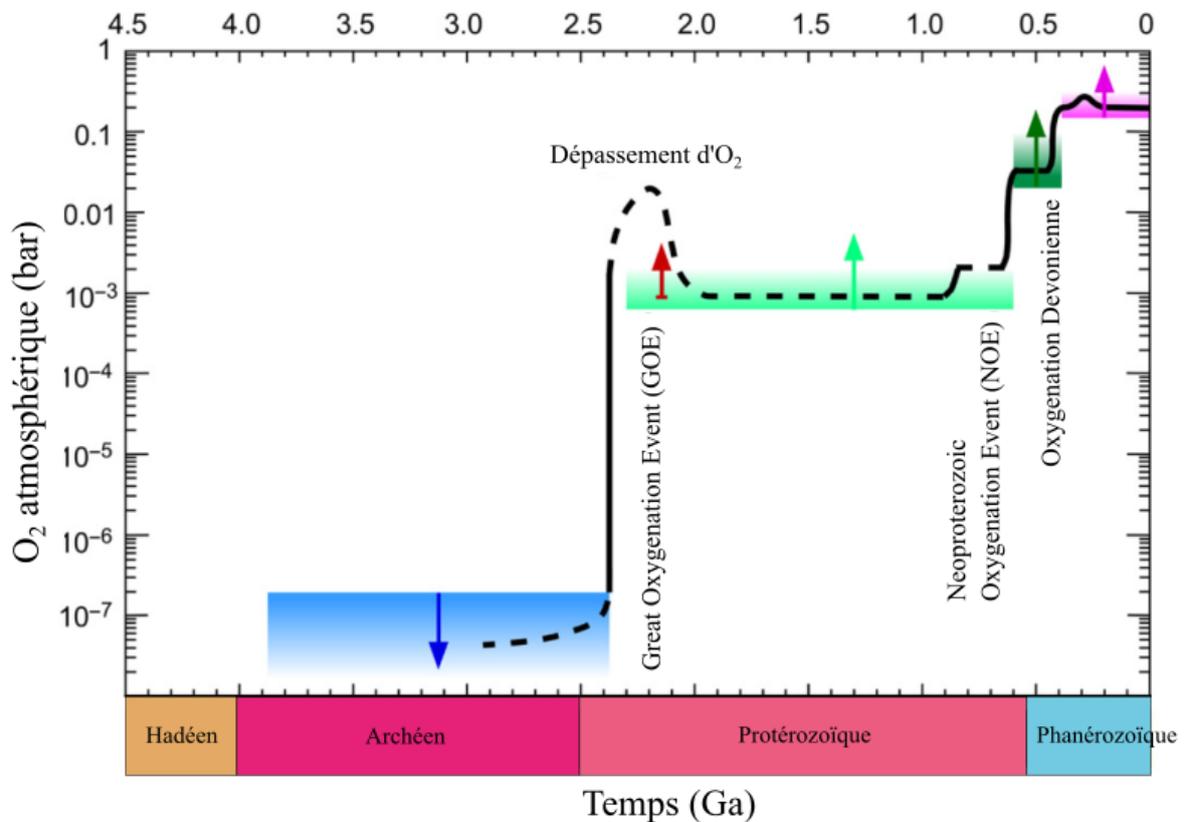
### 3. Variations des conditions environnementales au cours des temps géologiques

Les cycles géochimiques de nombreux éléments ont subi des variations au cours des temps géologiques, auxquelles les interactions minéral-vivant ont largement participé. Ces cycles géochimiques ont ainsi pu influencer l'évolution des microbialites. Certains éléments comme l'oxygène, l'azote ou le carbone ont eu des influences majeures sur l'installation et l'évolution des communautés microbiennes, ainsi que sur les phases minérales précipitées, et inversement. Les différentes compositions atmosphériques au cours des temps géologiques peuvent être estimées à partir de critères isotopiques (Zahnle et al., 2006), des proxies pétrologiques comme des inclusions de gaz piégées dans des roches et/ou des paléosols (Sheldon, 2006), etc. Les conditions de température, pression atmosphérique et luminosité peuvent aussi être évaluées pour chaque période géologique. Des études comme celles de Catling et Zahnle (2020) ou Farquhar et al. (2011) résument la diversité des traceurs qui permettent d'interpréter l'évolution des cycles de certaines espèces chimiques critiques dans l'évolution et la mise en place de la composition atmosphérique terrestre.

#### 3.1. Cycle géochimique du dioxygène

Entre autres, le cycle du dioxygène, étant un oxydant majeur, a eu un très fort impact sur l'évolution microbienne. Peu après l'accrétion de la Terre, l'atmosphère contenait surtout de l'eau, du CO<sub>2</sub> et du N<sub>2</sub>, et le dioxygène était absent de l'atmosphère et des océans (Catling et Zahnle, 2020 ; Zahnle et al., 2020). Des phases minérales sensibles au rédox comme les uraninites, sidérites et pyrites localisées dans des sédiments datés de l'Archéen attestent des teneurs négligeables en O<sub>2</sub> contenues dans l'atmosphère à ces périodes puisqu'elles s'altèrent rapidement dans des conditions oxydantes (Johnson et al., 2014). L'étude de proxies comme les anomalies en cérium (terre rare particulièrement sensible aux variations redox) permet également de suivre les changements dans la disponibilité en dioxygène des paléoenvironnements bien que les méthodes de préservation et d'extraction de ce traceur engendrent des biais dans son interprétation (Tostevin, 2021 ; Planavsky et al., 2010). De plus, un fractionnement indépendant de la masse des isotopes du soufre (MIF) global enregistré à l'Archéen permet aussi d'estimer une teneur en O<sub>2</sub> atmosphérique très faible pendant la majorité de cette ère géologique (Zahnle et al., 2006 ; Habicht et al., 2002 ; Catling et Zahnle, 2020). Ces différents indicateurs géochimiques présents dans le registre géologique permettent donc

de retracer la teneur atmosphérique en dioxygène au cours du temps. Grâce à leurs interprétations, il est estimé actuellement que deux périodes globales d'oxygénation de l'atmosphère et des océans ont eu lieu : une première phase vers 2,4 Ga (Great Oxygenation Event, GOE), suivie par une autre au Néoprotérozoïque entre 0,85 et 0,54 Ga (Neoproterozoic Oxygenation Event, NOE, Och et Shields-Zhou, 2012). Entre les deux, les concentrations en  $O_2$  dans l'atmosphère sont a priori restées relativement constantes (Lyons et al., 2014 ; Tostevin et al., 2020). La figure 10 résume les suggestions actuelles faites sur les différents stades d'oxygénation atmosphérique au cours du temps.



**Figure 10.** Evolution de l' $O_2$  atmosphérique au cours des temps géologiques, avec les principaux événements d'oxygénation. Figure modifiée de Catling et Zahnle (2020).

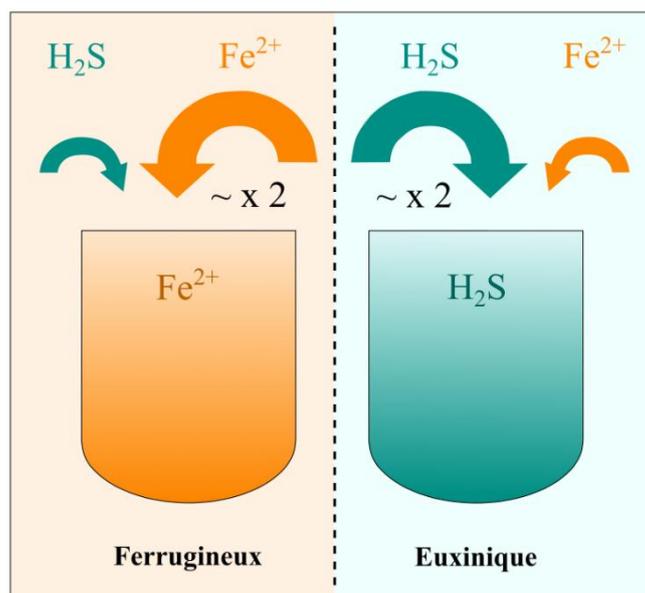
Bien qu'il existe des lacunes dans ces enregistrements, le GOE est interprété comme le résultat d'un équilibre dynamique entre des hausses et des baisses répétitives de teneurs en  $O_2$  dans l'atmosphère entre 2,5 et 2,3 Ga, jusqu'à ce que les sources surmontent les puits de manière permanente (Lyons et al., 2014). Ces équilibrages entre la production et la consommation d' $O_2$  dans l'atmosphère ont été reliés par exemple à l'efficacité du piégeage du carbone organique dans les sédiments et/ou à l'évolution des compositions de gaz rejetés par les volcans (Gaillard et al., 2011). Le GOE est ainsi considéré comme une première transition faisant partie d'un

processus global mais non-unidirectionnel d'oxygénation de l'atmosphère et des océans à l'échelle de la Terre (Frei et al., 2009). Cependant, certains dépôts de fer rubané (banded iron formations, BIFs) corrélés à une absence de fractionnement des isotopes du Cr indiquent localement des épisodes sans oxydation à cette période (par exemple vers 1,88 Ga), donc potentiellement des fluctuations locales de la concentration en O<sub>2</sub> disponible dans l'atmosphère et les océans (Frei et al., 2011 ; Frei et al., 2009). Dans l'ensemble, le GOE a été mis en relation avec la photosynthèse oxygénique apparue chez un certain groupe de bactéries, les cyanobactéries, même si les étapes de l'évolution de ces organismes restent difficiles à déterminer (Watanabe et al., 2023 ; Holland et al., 2006 ; Des Marais, 2000). Il est notamment suggéré que l'émergence de ce métabolisme chez les cyanobactéries, c'est-à-dire la possibilité d'utiliser la molécule H<sub>2</sub>O comme donneur d'électrons, ait pu former des oasis oxygénées qui, à terme, auraient contribué à l'augmentation notable de cette molécule dans l'atmosphère et dans certaines couches de surface des océans, tandis que les parties profondes restaient anoxiques (Holland et al., 2006 ; Tostevin et al., 2020 ; Havig et Hamilton, 2019 ; Olson et al., 2013). Bien que, a priori, le GOE constitue un point de départ pour l'émergence et la diversification des métabolismes utilisant le dioxygène comme accepteur d'électrons, l'évolution des réactions de photosynthèse synchrone avec celle des cyanobactéries est discutée (Sánchez-Baracaldo et Cardona, 2019). Notamment, des études sur les caractéristiques structurales et photochimiques de la photosynthèse, par exemple sur les évolutions parallèles des photosystèmes PSI et PSII, attestent d'une photosynthèse oxygénique présente au moins 100 Ma avant le GOE qui s'est complexifiée vers la fin de l'Archéen tandis que les cyanobactéries devenaient les producteurs primaires dominants (Fournier et al., 2021 ; Schirrmeister et al., 2015 ; Buick et al., 2008 ; Cardona et al., 2019). Pour autant, une grande partie des groupes des cyanobactéries connus actuellement sont apparus après le GOE (Sánchez-Baracaldo et Cardona, 2019). Par conséquent, il est probable qu'un décalage ait eu lieu entre l'apparition et l'émergence de la photosynthèse oxygénique chez les cyanobactéries et le GOE (Lyons et al., 2014 ; Ward et al., 2016 ; Fischer et al., 2016). Avant ces augmentations massives de la concentration en O<sub>2</sub> dans l'atmosphère dues à des changements d'équilibre entre sa production et sa consommation, et comme la photosynthèse de manière générale requiert à la fois une source de lumière et une source de pouvoir réducteur, les bactéries photosynthétiques utilisaient vraisemblablement H<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S et/ou Fe<sup>2+</sup> comme donneurs d'électrons dans la réduction du CO<sub>2</sub> en matière organique (Holland et al., 2006 ; Olson, 2006 ; Fischer et al., 2016). Certaines cyanobactéries peuvent toujours utiliser ces donneurs d'électrons. Par la suite, d'autres processus d'oxygénation ont commencé au Néoprotérozoïque (NOE) vers 800-600 Ma

et ont permis des augmentations au Paléozoïque des concentrations atmosphériques en  $O_2$  jusqu'à celles que l'on connaît actuellement (Tostevin et al., 2020 ; Strauss, 2006 ; Knoll et Lahr, 2016). Cette deuxième transition est concomitante avec l'apparition/diversification des animaux et surtout des eucaryotes photosynthétiques (qui produisent eux-aussi de l' $O_2$ ), dont certains groupes de phytoplancton marin (Brocks, 2018 ; Sánchez-Baracaldo et al., 2014 ; Butterfield, 2015). Les processus d'oxygénation de l'atmosphère et de la surface des océans ont donc largement été impliqués dans la co-évolution entre les microorganismes et les phases minérales, et ont contribué à leur diversification. Par exemple, le nombre d'espèces minérales a augmenté de ~1500 à ~4000 entre le début et la fin de du GOE, en lien avec la mise en place de conditions oxydantes, mais aussi potentiellement avec l'émergence des eucaryotes (Hazen et al., 2008). Plus globalement, la teneur atmosphérique en dioxygène a influencé la disponibilité de très nombreuses espèces et éléments chimiques au cours des temps géologiques, dont le carbone, le soufre, le fer ou le manganèse. Concernant le cycle du carbone, des approches isotopiques permettent de le relier à celui de l'oxygène puisqu'en théorie l'oxygénation de l'atmosphère a impliqué que des sources d' $O_2$  surpassent les puits, c'est-à-dire que la fixation du carbone lors de la photosynthèse oxygénique excède la dégradation de la matière organique par des processus comme la respiration microbienne aérobie (Hodgskiss et al., 2023).

### *3.2. Cycles géochimiques du fer, du soufre et du manganèse*

Les cycles du fer et du soufre ont non seulement été impactés par l'oxygénation de l'atmosphère mais sont aussi fortement associés. En théorie, dans un système anoxique avec un pH ~neutre où le flux de fer réactif excède le flux de sulfures avec un facteur ~2, le Fe(II) soluble s'accumule et cela conduit à un milieu ferrugineux (dans les milieux oxiques, le fer ferrique est insoluble et précipite). Dans le cas inverse où le flux de sulfures excède avec un facteur ~2 le flux de fer réactif, les sulfures s'accumulent et le milieu est euxinique (Fig. 11, Raiswell et Canfield, 2012). Le ratio Fe/S est donc déterminant pour comprendre l'équilibre entre les flux de sulfates et de fer dans des systèmes aqueux anoxiques. Dans un contexte où le flux de fer réactif est supérieur à celui des sulfates, ces derniers peuvent être retirés du système soit par précipitation de pyrite ( $FeS_2$ ) soit par précipitation de  $CaSO_4$  évaporitique (Raiswell et Canfield, 2012).

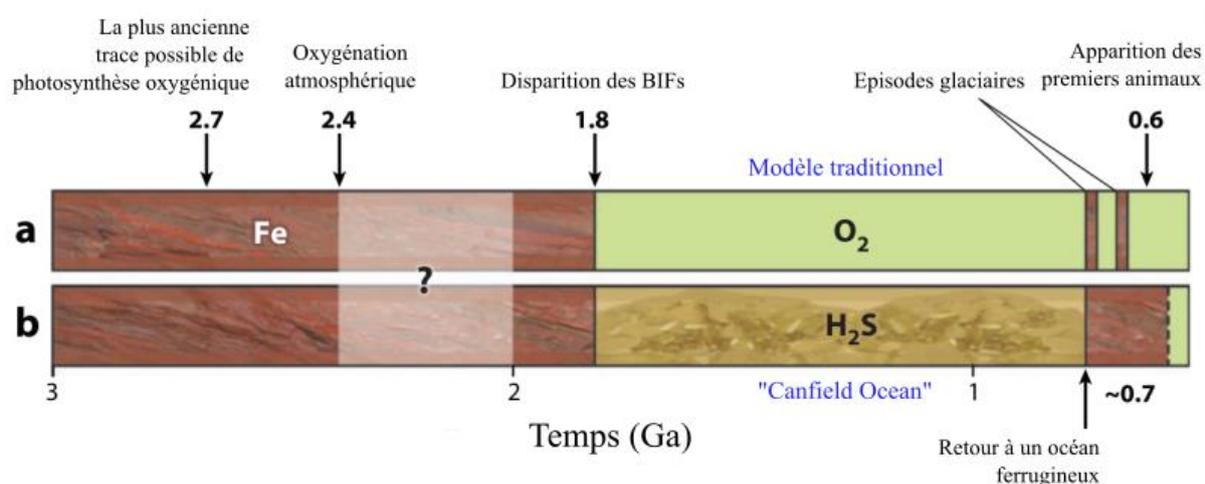


**Figure 11.** Représentation schématique de la nature ferrugineuse ou euxinique d'une solution anoxique en fonction de ses concentrations en fer et en soufre. Figure modifiée de Raiswell et Canfield (2012).

Globalement, les conditions ferrugineuses ont été considérées comme une caractéristique majeure des océans au cours des temps géologiques, avant leur oxygénation par le biais de circulations d'eaux froides riches en  $O_2$  dissous (Poulton et Canfield, 2011). Pourtant, il reste difficile de distinguer les paramètres qui ont contrôlé l'équilibre entre des conditions euxiniques et ferrugineuses, et d'interpréter en conséquence les marqueurs géologiques/biologiques/isotopiques contenus dans les archives sédimentaires. Néanmoins, il existe plusieurs indicateurs géochimiques plus ou moins directs qui suggèrent des périodes d'euxinie dans les sédiments, comme le ratio S/C, le degré de pyritisation et la taille des pyrites, la quantité de fer réactif, la composition en isotopes du soufre, les quantités d'éléments traces (*e.g.* Mo, U, V, Zn), le ratio C/P ou encore des biomarqueurs organiques (Meyer et Kump, 2008). Ainsi, dans des conditions où la plupart des océans étaient anoxiques, des étapes dominées par des concentrations élevées en Fe et/ou en S se sont succédées et ont abouti à des océans considérés soit comme ferrugineux soit comme euxiniques. Cela a influencé l'évolution et les diversifications des microbes et des phases minérales (Meyer et Kump, 2008). Plusieurs spéculations ont donc été faites sur les cycles du fer et du soufre au cours des temps géologiques bien que les flux géochimiques primaires soient complexes et que les interprétations des indicateurs des états redox étudiés actuellement soient discutées (Poulton et Canfield, 2011). Par exemple, avant l'apparition de la photosynthèse oxygénique, et de manière cohérente avec une évolution des photosystèmes PSI et PSII chez certaines bactéries des écosystèmes anoxiques, il est probable que les autotrophes anoxygéniques occupaient les environnements de

surface des océans (Raiswell et Canfield, 2012). D'après Raiswell et Canfield (2012), il est également probable que le Fe(II) était globalement en excès par rapport aux sulfures si l'on considère que le S provenait seulement du volcanisme et des sources hydrothermales avant l'oxygénation de l'atmosphère alors que le fer était fourni par l'altération des roches continentales et des sources hydrothermales également. En particulier, la présence des BIFs et de certaines argiles enrichies en Fe(II) à l'Archéen suggèrent un apport de Fe(II) dissous dans les océans à cette période, conduisant à des conditions ferrugineuses en moyenne (Poulton et Canfield, 2011 ; Scott et al., 2011 ; Thompson et al., 2019 ; Wang et al., 2023 ; Crowe et al., 2023). Par conséquent, en considérant que les métabolismes des autotrophes anoxygéniques et des hétérotrophes étaient les mêmes que ceux que l'on connaît actuellement, le fer était possiblement oxydé en (oxy)hydroxydes par les phototrophes anoxygéniques dans la zone photique et réduit par les bactéries réductrices du fer plus en profondeur (Wang et al., 2023 ; Crowe et al., 2023). Ce modèle basé sur un cycle actif d'oxydations et de réductions du fer suggère une influence sur le cycle du carbone déjà avant le GOE, même si celui-ci s'est accéléré a priori avec l'émergence des photoautotrophes oxygéniques (Raiswell et Canfield, 2012 ; Craddock et Dauphas, 2011). Pourtant, il existe actuellement peu d'indications quant au fait que ce scénario ait pu avoir lieu. Par exemple, les enregistrements du carbone organique et des isotopes datés de l'Archéen ne sont pas bien préservés (Des Marais, 2001), ce qui ne permet pas forcément de soutenir l'hypothèse que le cycle du carbone ait d'abord été dominé par des métabolismes liés au cycle du fer puis par la photosynthèse oxygénique. Malgré un consensus relatif sur des conditions ferrugineuses globales dans les océans archéens, des affleurements riches en pyrite et en matière organique attestent que des épisodes euxiniques ont eu lieu à la fin de cette ère (Kendall et al., 2011 ; Garvin et al., 2009 ; Kendall et al., 2010). Ces périodes sont parfois corrélées à des épisodes d'oxygénation pré-GOE qui auraient permis au moins localement une oxydation des sulfures continentaux en sulfates, donc une augmentation du flux de sulfates océaniques (Raiswell et Canfield (2012)). Dans l'ensemble, un marqueur commun du GOE dans les enregistrements géologiques reste la perte globale du signal de fractionnement indépendant de la masse des isotopes du soufre (MIFs) (Philippot et al., 2018 ; Lyons et Gill, 2010 ; Fakrae et al., 2018). Vers 1,8 Ga, une disparition générale des BIFs dans les enregistrements géologiques est observée (Klein, 2005 ; Song et al., 2017). Raiswell et Canfield (2012) ont spéculé qu'une disponibilité croissante des sulfates en solution (corrélée à une oxydation accrue des sulfures continentaux) ait pu stimuler leur réduction dans la partie profonde des océans, via par exemple une précipitation de pyrite, jusqu'à dépasser le flux de Fe(II), et donc permettre le passage vers des conditions euxiniques dans les zones côtières. Dans

les zones plus éloignées des côtes, l'absence de dépôt de BIFs au Protérozoïque suggère que, même si les eaux océaniques restaient ferrugineuses, elles l'étaient moins que pendant l'Archéen à cause d'une plus forte concentration en soufre constituant un puits pour le fer réactif (Planavsky et al., 2011 ; Raiswell et Canfield, 2012). Plusieurs scénarios ont toutefois été proposés quant à la géochimie des océans pendant le Protérozoïque, opposant basiquement ce modèle où la quantité d'oxygène générée par le GOE n'est pas suffisante pour oxygéner les océans profonds et où le flux de sulfures tamponne la quantité de fer réactif en profondeur (« Canfield Ocean », Canfield, 1998) et un modèle où la disparition des BIFs est expliquée surtout par une oxygénation globale lors du GOE (Fig. 12).



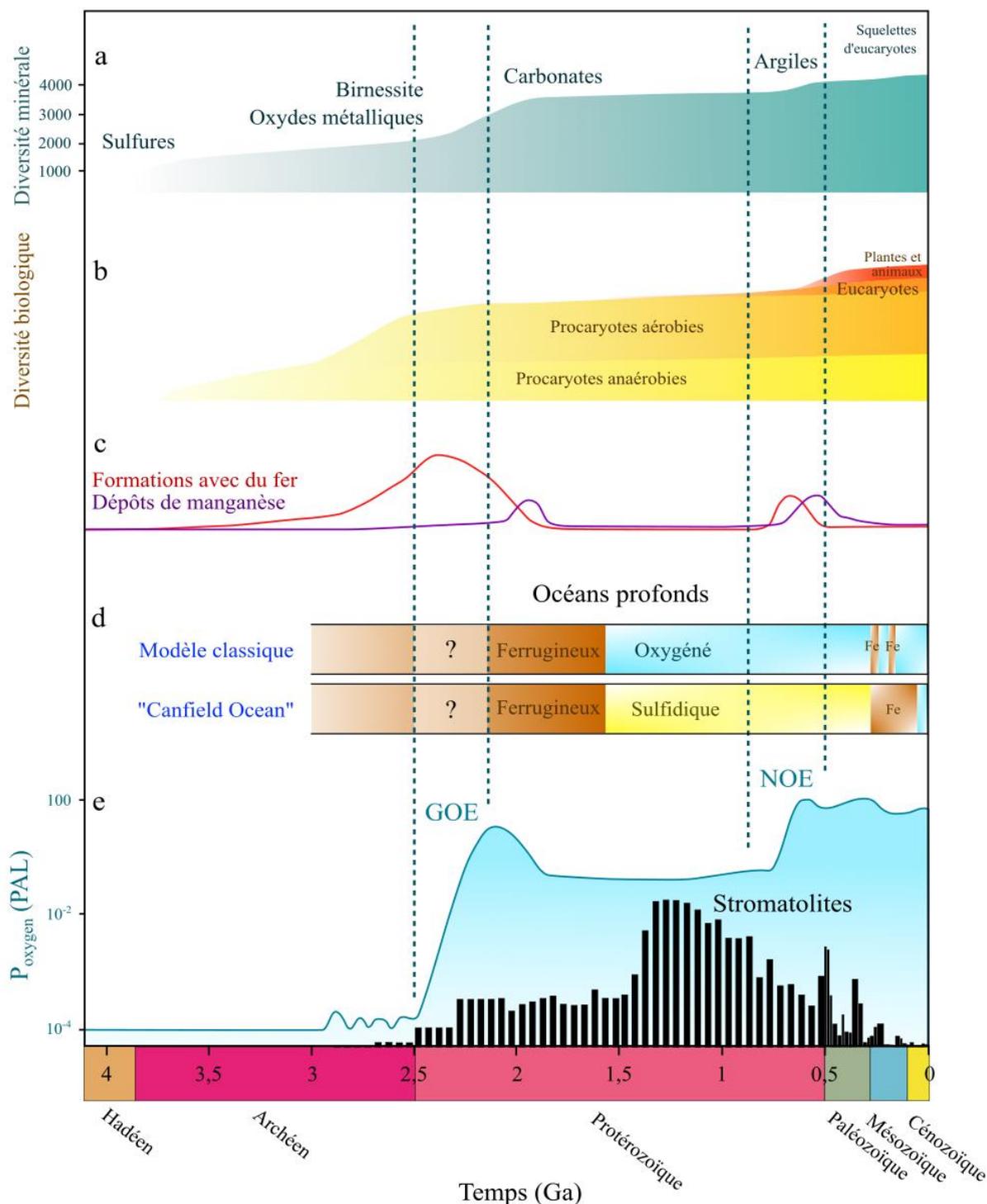
**Figure 12.**  
**Deux modèles alternatifs expliquant la géochimie des océans profonds pendant le Protérozoïque.**  
 Figure modifiée de Lyons et al. (2009).

Par la suite, au Néoprotérozoïque, les océans profonds sont interprétés comme globalement ferrugineux avec des phénomènes transitoires d'euxinie attestés par des plus forts degrés de pyritisation (Guilbaud et al., 2015 ; Canfield et al., 2008 ; Hood and Wallace, 2014 ; Lyons et al., 2009 ; Raiswell et Canfield, 2012). Durant le début du Phanérozoïque, les conditions d'anoxie restaient présentes dans les océans profonds, et plusieurs événements d'anoxie océanique (Oceanic Anoxia Events) ont eu lieu par la suite (Pohl et al., 2022 ; Meyer et Kump, 2008 ; Jenkyns, 2010). Notamment, des analyses des rapports C/S et des isotopes du soufre attestent d'épisodes d'euxinie étendue (Bernier and Raiswell, 1983 ; Gill et al., 2011 ; Raiswell et al., 2001). De plus, des intervalles euxiniques ont été détectés dans des argiles datées du Crétacé déposées pendant des événements d'anoxie océanique (Ozaki et al., 2011, Owens et al., 2013 ; Jenkyns, 2010 ; Tessin et al., 2019 ; Lyons et al., 2009). Ces intervalles apportant du H<sub>2</sub>S dans certains cas ont été interprétés comme une cause majeure potentielle de crises

biologiques au Phanérozoïque (Stockey et al., 2020 ; Sahoo et al., 2023 ; Meyer and Kump, 2008). De manière générale, il semble que, malgré des successions constantes entre des conditions ferrugineuses et sulfidiques, l'euxinie prévalait dans les océans durant les épisodes anoxiques du Phanérozoïque, jusqu'à une oxygénation plus globale des différentes couches des océans.

En plus de ce couplage entre les cycles du fer et du soufre, le cycle du manganèse a également, entre autres, été corrélé aux fluctuations en dioxygène au cours des temps géologiques à cause de sa sensibilité au redox, même s'il a fait l'objet de moins de travaux (Lyons et al., 2020 ; Lu et al., 2021). En général, les formes oxydées  $Mn^{3+}$  et  $Mn^{4+}$  sont insolubles et la forme  $Mn^{2+}$  est un peu plus soluble, ce qui permet en théorie de faire la distinction entre des environnements de dépôt oxiques et anoxiques (Calvert et Pedersen, 1996). Pour cela, cet élément a été utilisé en tant qu'indicateur de conditions réductrices par exemple dans des gisements Archéens où des carbonates et des oxydes de manganèse ont été trouvés (Holland, 2006). De nombreuses occurrences de dépôts de manganèse ont ensuite été répertoriées dans les archives sédimentaires datant de l'Archéen, du Protérozoïque et du Phanérozoïque, et l'absence de manganèse dans les sédiments datés entre 1,8 et 0,8 Ga soutient par exemple l'hypothèse d'une oxygénation moyenne après le GOE (Holland, 2006 ; Hummer et al., 2022). En particulier, il a été suggéré que la réduction du manganèse couplée à l'oxydation de la matière organique avait joué un rôle dans le cycle atmosphérique du  $CO_2$  par exemple (Roy et al., 1996). De plus, plusieurs études ont permis de relier l'évolution des teneurs sédimentaires en manganèse à l'évolution de la photosynthèse oxygénique et à l'augmentation de l' $O_2$  dans les océans et dans l'atmosphère (Lingappa et al., 2019 ; Johnson, 2019 ; Johnson et al., 2013 ; Robbins et al., 2023).

Pour conclure, les interactions entre les cycles de l'oxygène, du soufre, du fer et du manganèse abordées partiellement dans cette partie ont eu de très nombreuses implications sur la géochimie globale des océans et de l'atmosphère, mais sont aussi globalement en relation avec tous les autres cycles tels que ceux du carbone, du manganèse, de l'azote, de la silice, etc. La figure 13 modifiée de Dong et al. (2022) résume les liens présumés actuellement entre les évolutions de cycles géochimiques majeurs et les évolutions biologiques et minérales. Dans ces évolutions, les microbialites fossiles constituent à la fois des témoins et des acteurs des changements géochimiques, d'où l'importance de leur étude, autant fossiles qu'actuelles, pour comprendre les interactions minéral-vivant au cours de l'histoire de la Terre.



**Figure 13.**

**Evolutions biologiques, minérales et des principaux cycles géochimiques au cours du temps.** (a) Augmentation du nombre d'espèces minérales au cours du temps (Dong et al., 2022) ; (b) Evolution de la diversité biologique au cours du temps (Dong et al., 2022) ; (c) Evolution de l'abondance roches contenant des marqueurs redox, en l'occurrence le fer (en rouge) et le manganèse (en violet) (Dong et al., 2022) ; (d) Chimie globale des océans profonds selon (i) le modèle classique avec une oxygénation pendant le Protérozoïque et (ii) le modèle de l'océan profond euxinique d'après Canfield pendant le Protérozoïque (Lyons et al., 2009) ; (e) Evolutions du de l'O<sub>2</sub> atmosphérique (courbe bleue, d'après Dong et al., 2022) couplée à l'évolution de l'abondance des stromatolites (histogramme noir, d'après Riding, 2005). Figure modifiée de Dong et al. (2022), Lyons et al. (2009) et Riding (2005).

## 4. Environnements stratifiés

Les environnements stratifiés peuvent constituer des analogues aux systèmes biogéochimiques anciens puisque, comme vu dans la partie précédente, les océans ont été stratifiés à de nombreuses périodes de l'histoire de la Terre, avec des chimies plus ou moins riches en fer et/ou en soufre en fonction de la profondeur (Satkoski et al., 2015 ; Knoll et al., 2016 ; Gutiérrez-Preciado et al., 2018). Ces géochimies distinctes en fonction de la profondeur et au cours du temps impliquent des différences entre les métabolismes microbiens s'y développant (Brand et al., 2016 ; Edwardson et Hollibaugh, 2018). D'après Canfield et al. (2005), « l'importance de la photosynthèse anoxygénique dans les systèmes stratifiés dépend de l'efficacité avec laquelle le carbone organique est exporté de la couche de surface vers l'eau anoxique, et de l'efficacité avec laquelle les espèces redox actives (S ou Fe) sont recyclées sous leur forme réduite sous la zone photique ». Par conséquent, comme les phénomènes de stratification des couches d'eau influencent les géochimies et les flux de biomasse des milieux aqueux, il est nécessaire de les caractériser pour évaluer le fonctionnement global des systèmes passés mais aussi actuels abritant entre autres des microbialites. Actuellement, la stratification des eaux est un phénomène que l'on retrouve souvent dans des lacs en partie parce que la taille de leur bassin conditionne la formation locale de gradients redox (Boehrer et Schultze, 2008). Elle résulte de nombreux facteurs comme l'oxygénation du milieu, donc la formation de gradients redox, la densité des masses d'eau, la forme du bassin permettant ou non la mise en place de courants ou l'influence des microorganismes sur la disponibilité des espèces chimiques (Brand et al., 2016). Plusieurs modes de mélanges définissent le fonctionnement des lacs stratifiés et le maintien/la suppression des gradients physico-chimiques. La stratification peut être permanente (*e.g.* méromictique), saisonnière (*e.g.* monomictique), avoir des occurrences plusieurs fois par an (*e.g.* dimictique), ou moins, etc, avec des apports externes et/ou des infiltrations d'eaux souterraines (Boehrer et Schultze, 2008). Ce sont les sources et les puits de dioxygène qui influencent la dynamique des lacs présentant un gradient redox ; globalement la photosynthèse oxygénique constitue une source et les respirations microbiennes sont des puits majeurs. Les différentes réactions de respiration microbienne utilisent en théorie jusqu'à épuisement les accepteurs d'électrons leur fournissant la plus grande énergie libre par mole de carbone oxydée (Canfield et Thamdrup, 2009). Il existe donc des équilibres entre la disponibilité des accepteurs d'électrons et la nature des communautés microbiennes, conduisant à une répartition schématique de ces derniers selon une échelle verticale, que ce soit dans la colonne d'eau, les tapis microbiens ou les sédiments. Dans certains cas, l'oxygène disponible

dans le milieu est totalement consommé dans la partie la plus profonde des lacs (hypolimnion) en parallèle de la présence de sulfures d'hydrogène en solution, ce qui conduit à former un environnement euxinique en profondeur.

Comme les modifications des conditions environnementales au cours du temps sont au moins partiellement enregistrées par les dépôts sédimentaires, notre compréhension du passé réside dans l'étude et l'interprétation des traces qui ont été conservées dans le registre géologique fossile. L'étude des lacs stratifiés peut donc donner des éléments de réponse sur le fonctionnement des systèmes anciens et des cycles biogéochimiques au cours du temps. De même, en considérant que les conditions passées peuvent être inférées à la lumière de l'actuel, de nombreux cas de microbialites actuelles sont étudiés avec l'objectif d'interpréter les paléobiologies et les paléoenvironnements. Par exemple, certains signaux isotopiques actuels peuvent renseigner sur les sources de carbone de l'ancien (Fairchild, 1991). Ou alors, entre autres nombreux exemples, des carbonates formés par des processus microbiens dans des tapis microbiens calcifiants actuels ont pu aussi être étudiés en tant que support à la compréhension des anciens (Vasconcelos et al., 2006). Pourtant, la majorité des exemples de microbialites actuelles se forment dans des environnements oxiques. Or les microbialites fossiles, et spécifiquement les stromatolites contenant les plus anciennes traces de vie non-ambigües sur Terre, se sont formées dans des environnements anoxiques. Cela questionne sur la représentativité des microbialites actuelles de milieux oxiques en tant qu'analogues des microbialites fossiles de milieux anoxiques. Suivant cette problématique, il a été suggéré que certaines bactéries, via la photosynthèse anoxygénique et/ou des métabolismes liés à l'arsenic, avaient pu jouer un rôle dans la formation des stromatolites de l'Archéen (Bosak et al., 2007 ; Visscher et al., 2020). Pour autant, le rôle de la photosynthèse oxygénique des cyanobactéries dans la formation des microbialites actuelles est reconnu comme majeur et nous ne savons pas dans quelle mesure ces observations restent vraies dans des microbialites d'environnements anoxiques. De plus, l'influence sur les phases minérales de communautés microbiennes associées à des microbialites de milieu anoxique est peu documentée en plus du fait que, actuellement, il a très peu été fait mention de la présence de microbialites actuelles dans les parties anoxiques d'environnements stratifiés.

De manière intéressante, les lacs Alchichica et Atexcac, au Mexique, présentent des caractéristiques géochimiques, minéralogiques et biologiques complexes. En particulier, ils se stratifient tous les ans entre avril et octobre, ce qui conduit à la mise en place de conditions anoxiques et sulfidiques dans la colonne d'eau profonde. En parallèle, ils contiennent des

microbialites actuelles non seulement dans la colonne d'eau de surface mais aussi en profondeur, sous l'oxycline lors de la période de stratification. Des microbialites de profondeur de ces deux lacs redox-stratifiés ont pu être collectées en 2019 et en 2022. Par conséquent, cette découverte de microbialites actuelles plongées dans des conditions d'anoxie saisonnières offre des outils clé pour comprendre le fonctionnement des microbialites en anoxie. De plus, ces échantillons de microbialites provenant de zones qui subissent l'anoxie une fois par an apparaissent comme des candidats pour être des analogues à celles de milieux anoxiques/euxiniques anciens. Bien que le terme d'analogue soit assez vague et englobe une large gamme de paramètres qu'on ne connaît pas forcément en détail, les microbialites de 40 m de profondeur et de 27 m de profondeur prélevées en 2019 et en 2022 dans les lacs redox-stratifiés d'Alchichica et d'Atexcac présentent des caractéristiques qui n'ont pas encore été documentées à notre connaissance et qui peuvent d'une certaine façon ressembler à certaines microbialites anciennes.

## 5. Problématiques et objectifs de la thèse

Dans cette thèse, l'objectif principal est de caractériser les trois composantes (hydrochimique, minéralogique, microbiologique) des microbialites se développant en conditions anoxiques pendant une grande période de l'année (6-8 mois), et déterminer l'acclimatation et/ou l'adaptation des communautés microbiennes de la colonne d'eau et des microbialites à des conditions anoxiques au cours du temps. Les objets d'étude choisis sont les microbialites actuelles formées dans les lacs Alchichica et Atexcac, au Mexique. Les microbialites de ces lacs ont été préalablement étudiées, mais seulement dans les conditions oxiques de la surface. Ici, la nouveauté est que des microbialites profondes ont été découvertes dans ces mêmes lacs en conditions saisonnièrement anoxiques. Pour atteindre ces objectifs généraux, nous avons défini plusieurs axes de travail : (i) en amont de ce travail spécifique sur les microbialites du Mexique, il est nécessaire de mieux caractériser la diversité des environnements dans lesquels on retrouve les microbialites actuelles, et en particulier de mieux comprendre les paramètres géochimiques qui sont nécessaires et/ou suffisants à leur formation. (ii) Puis, comme les microbialites anciennes ne se sont pas formées dans les mêmes environnements que la plupart des actuelles, notamment en termes d'oxygénation du milieu, nous avons besoin de caractériser la minéralogie et les communautés microbiennes des microbialites actuelles découvertes dans des conditions saisonnières d'anoxie à Alchichica et Atexcac. (iii) Enfin, il est important de comprendre dans quelle mesure les signatures primaires contenues dans des microbialites de milieux anoxiques sont affectées par la diagenèse.

(i) La première partie de cette thèse a donc porté sur une évaluation globale des conditions environnementales dans lesquelles les microbialites se forment actuellement. Les questions qui l'ont motivée étaient : quels sont les facteurs qui déterminent le plus les variabilités environnementales, minéralogiques, biologiques observées sur les microbialites actuelles ? Existe-t-il des paramètres géochimiques globaux qui contrôlent universellement la formation des microbialites actuelles dans le monde malgré leur diversité apparente ? Cette partie a consisté à compiler par une synthèse bibliographique approfondie des données géochimiques existantes sur une diversité de microbialites actuelles dans le monde, puis de les analyser de manière systématique à l'aide d'outils statistiques pour trouver les paramètres décrivant au mieux la variabilité/les similarités de leurs milieux de formation. Ceci a permis de trouver des déterminants environnementaux de la formation des microbialites actuelles. Enfin, les conditions géochimiques des milieux connus pour contenir des microbialites actuelles ont

été comparées aux conditions géochimiques d'une large gamme de milieux aqueux dans le monde afin de discuter si d'autres sites pourraient abriter des microbialites sans que cela ne soit encore connu.

(ii) Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés à l'influence de l'anoxie sur des microbialites actuelles, et particulièrement les microbialites des lacs Alchichica et Atexcac. Ces microbialites et ces lacs ont déjà été très largement documentés précédemment (Alcocer et al., 2022 ; Saghāï et al., 2015 ; Kaźmierczak et al., 2011 ; Gérard et al., 2013 ; Couradeau et al., 2011, 2012 ; Iniesto et al., 2021, 2022 ; Zeyen et al., 2015, 2017, 2019, 2022). L'abondance de ces travaux et la diversité des approches utilisées ont montré entre autres la nécessité d'associer les études de la géochimie, de la minéralogie et des compositions microbiennes pour comprendre comment se forment les microbialites. Un but ici était donc d'analyser et d'intégrer ces trois composantes dans l'étude de l'influence de l'anoxie sur les microbialites d'Alchichica et d'Atexcac. Ces deux lacs ont été régulièrement échantillonnés depuis au moins 2007 mais, de manière intéressante, des microbialites ont été découvertes et récoltées à de grandes profondeurs (40 et 27 m respectivement à Alchichica et Atexcac) lors des campagnes de terrain de 2019 et de 2022 (effectuée pendant la deuxième année de cette thèse). Or les lacs Alchichica et Atexcac sont anoxiques en profondeur pendant l'été et l'automne, ce qui implique que les microbialites profondes subissent cette anoxie. Donc, dans quelle mesure l'anoxie impacte-t-elle la minéralogie, la biologie et la chimie des microbialites et de la colonne d'eau ? Pour trouver des éléments de réponse à cette question, des approches géochimiques, minéralogiques et biologiques sur les échantillons naturels et sur des expérimentations en laboratoire ont été utilisées.

D'abord, la minéralogie, et spécifiquement la composition en fer, manganèse, soufre ainsi que la spéciation du soufre des microbialites profondes d'Alchichica et d'Atexcac, ont été analysées dans le but de répondre à ces questions : comment les cycles des éléments sensibles au redox tels que le fer, le manganèse ou le soufre sont-ils influencés par l'anoxie saisonnière ? Si les microbialites profondes sont en croissance, enregistrent-elles les périodes d'anoxie ? Si oui, sous quelles formes ? Et dans ce cas peut-on trouver des signatures de l'anoxie dans les microbialites actuelles ?

Ensuite, par des approches sur des incubations de microbialites en laboratoire, nous avons voulu comprendre dans quelle mesure les communautés microbiennes des microbialites profondes s'acclimatent ou s'adaptent aux variations saisonnières d'oxygénation. Un des

objectifs était de déterminer quels sont les microorganismes qui induisent/facilitent la précipitation des carbonates dans ce milieu et sont donc impliqués dans la formation des microbialites. Notamment, est-ce que les assemblages microbiens qui induisent la formation des microbialites sont les mêmes en surface où les conditions sont oxiques en permanence et en profondeur où les conditions sont saisonnièrement anoxiques ? Comment ces assemblages évoluent-ils si on les soumet à l'anoxie continue ? Est-ce qu'on retrouve dans les microorganismes qui sont impliqués dans la carbonatogenèse des microbialites de profondeur certaines cyanobactéries capables de basculer entre la photosynthèse oxygénique et la photosynthèse anoxygénique ?

(iii) Enfin, dans une dernière partie de la thèse, une des questions qui restaient ouvertes était de savoir dans quelle mesure les signatures environnementales chimiques et biologiques (dont notamment les enregistrements potentiels de l'anoxie) sont préservées dans les microbialites lors des premières étapes de la diagenèse. En d'autres termes, quel est l'impact de la diagenèse précoce sur la minéralogie des microbialites profondes et dans quelle mesure modifie-t-elle les signatures chimiques et biologiques présentes dans leur minéralogie ? Pour cela, la minéralogie des microbialites profondes du lac Alchichica a été comparée à la minéralogie des microbialites peu profondes.

#### *Contributions aux travaux présentés*

Dans le chapitre 1, j'ai récolté les données dans la littérature, fait les modélisations chimiques, en partie les analyses statistiques et écrit en partie l'article, corrigé par les coauteurs.

Dans le chapitre 2, j'ai participé à l'acquisition des données de synchrotron et à la récolte des échantillons lors de la mission de terrain, acquis/analysé les données d'ICP, DIC, MEB-EDXS, FTIR, DRX, XANES, et écrit le manuscrit de l'article.

Dans le chapitre 3, j'ai prélevé les échantillons, fait les repiquages, séquençages Sanger, participé à certaines étapes du séquençage Nanopore, fait les arbres phylogénétiques des isolats, l'analyse des histogrammes de diversité et écrit un manuscrit d'article.

Dans le chapitre 4, j'ai acquis/analysé les données de MEB-EDXS, FTIR, DRX, CLSM, ICP, DIC, fait les modélisations chimiques, participé à l'acquisition des données de MET et écrit en partie le manuscrit de l'article, corrigé par les coauteurs.

Pour les quatre articles dont je suis co-auteurice (dernière partie des Annexes), j'ai participé à l'acquisition d'une partie des échantillons et/ou des données, et à la discussion. J'ai écrit la partie sur le CLSM et l'OCT du chapitre méthodologique de Stigliano et al. (2023).



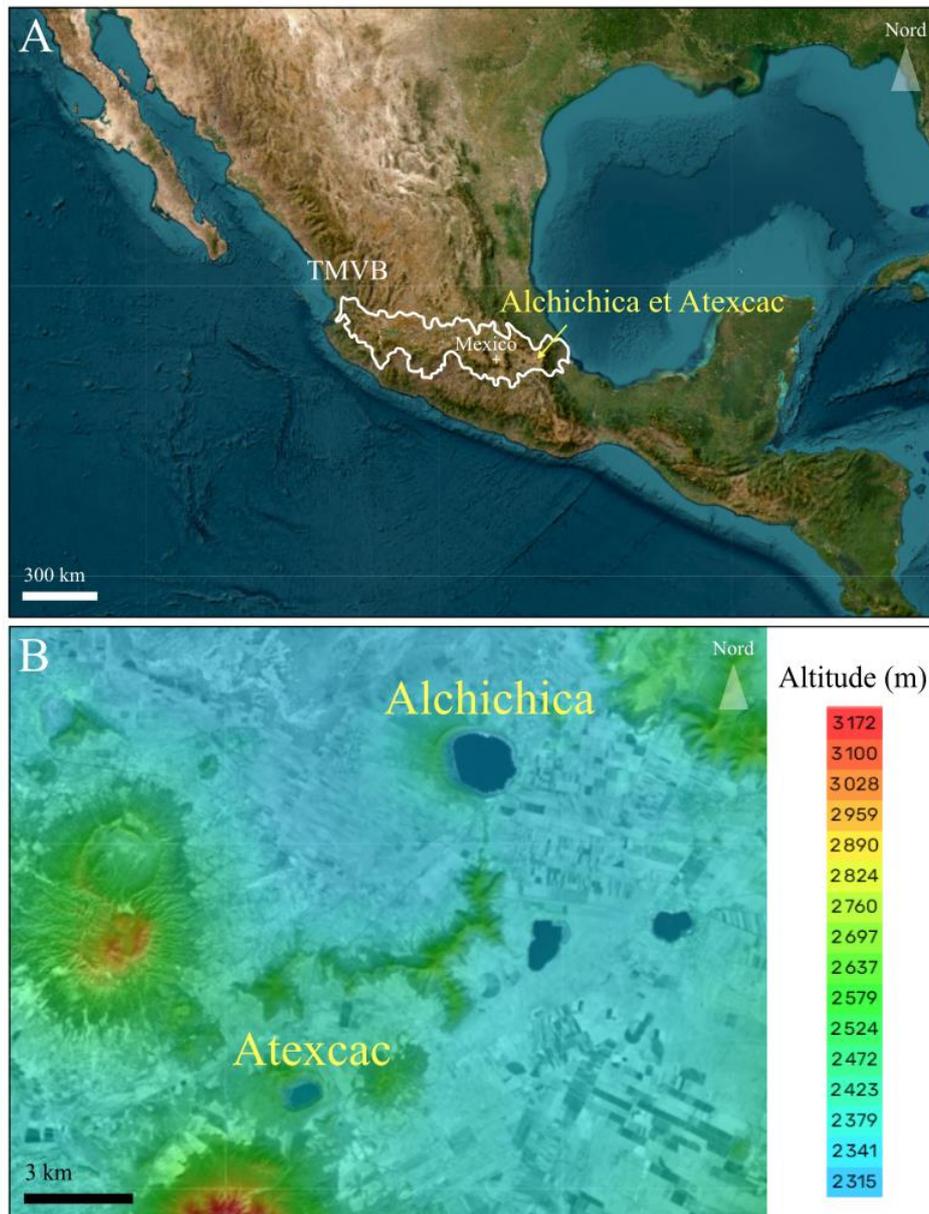
# **Matériel d'étude et méthodes**

## 1. Les lacs mexicains Alchichica et Atexcac

Une synthèse de ce que l'on sait sur les lacs d'Alchichica et d'Atexcac, leur contexte géologique, leur hydrochimie et les communautés microbiennes qui les habitent est proposée dans la partie qui suit. Un certain nombre de données acquises au cours des missions d'échantillonnage réalisées juste avant et pendant la thèse sont également introduites ici, ce qui permettra de mieux expliquer ensuite les différents chantiers scientifiques auxquels je me suis plus particulièrement intéressée.

### *1.1. Paramètres géologiques, limnologiques, climatiques généraux des lacs Alchichica et Atexcac*

Les lacs Alchichica (19° 24' N; 97° 24''W) et Atexcac (19° 20' N; 97° 27') sont deux lacs de cratère mexicains localisés dans la région de Los Llanos de San Juan, à l'est de la ceinture volcanique trans-Mexicaine (TMVB, Alcocer et al., 2022 ; Muller et al., 2023, Fig. 14). Ils sont étudiés depuis plus de 20 ans notamment parce qu'ils abritent tous les deux des microbialites actuelles (visibles sur les rives des lacs). Plus globalement, ils appartiennent à une lignée de lacs de cratères situés dans la même ceinture volcanique, comprenant entre autres La Preciosa, La Alberca de Los Espinos, Alberca de Guadalupe, Quechulac, Patzcuaro, Aljojuca et Tecuitlapa. Des microbialites vivantes ont également été observées dans ces lacs de la série évolutive, mais ce sont celles d'Alchichica et dans une moindre mesure d'Atexcac auxquelles nous nous sommes intéressés ici. La géologie générale de la zone dans laquelle ils se trouvent influence le fonctionnement de ces deux lacs et a été étudiée par d'autres auteurs à large échelle à l'aide d'analyses de paramètres géophysiques, géologiques et géochimiques (Ferrari et al., 2012 ; Chako-Tchamabé et al., 2020).

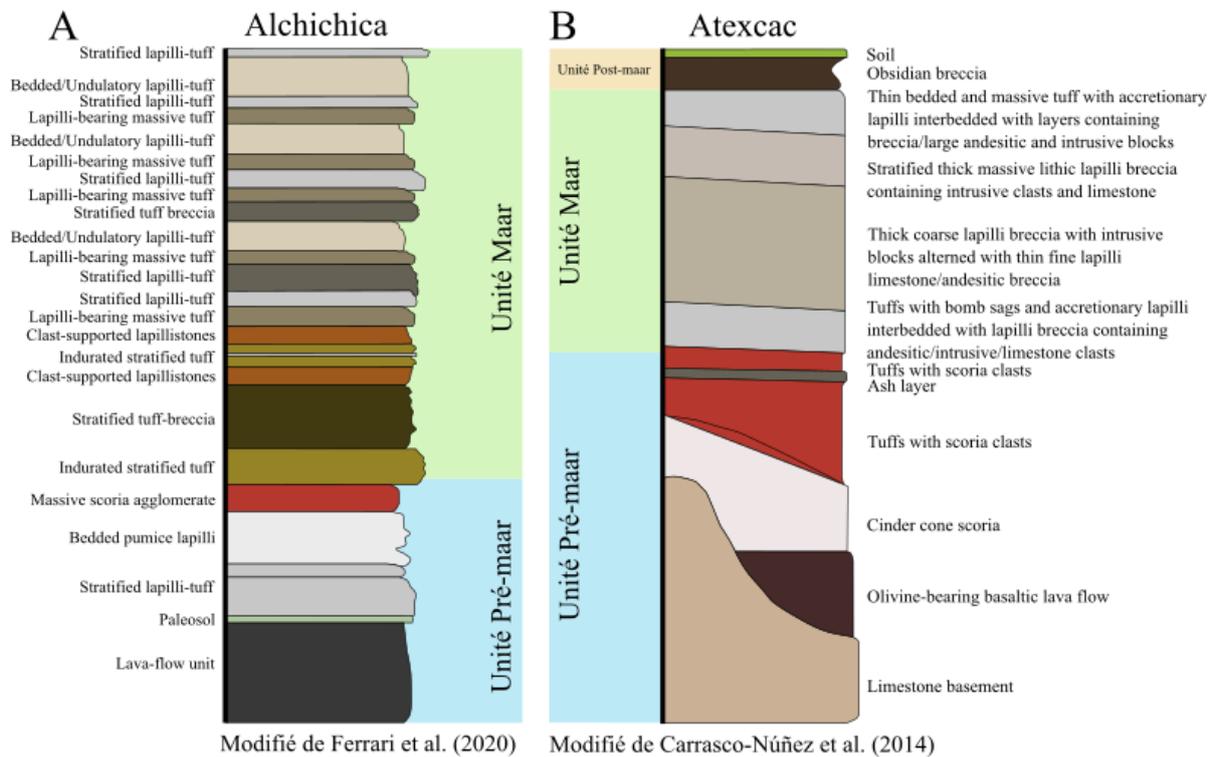


**Figure 14.**

**Cartes représentant les localisations des lacs Alchichica et Atexcac au Mexique.** Les fonds de cartes proviennent de Topographic-map.com (A) Carte satellite du Mexique montrant la délimitation de la TMVB (Ferrari et al., 2012) avec les localisations de Mexico et des deux lacs. (B) Zoom sur un fond de carte topographique de la zone de la TMVB où se trouvent les lacs Alchichica et Atexcac.

Globalement, la TMVB est un arc volcanique Néogène intra-continentale au centre du Mexique qui s'étend sur plus de 1000 km de long et au maximum 100 km de large, résultant de la subduction des plaques Rivera et Cocos sous la plaque Nord-Américaine (Ferrari et al., 2012). L'extrémité ouest de l'arc volcanique se trouve à proximité du rift Nord-Ouest/Sud-Est du golfe de Californie et l'extrémité est s'étend jusqu'au bassin océanique du golfe du Mexique. Les analyses pétrologiques ont mis en évidence principalement des roches calco-alcaline cohérentes avec un contexte de subduction et comprenant notamment des basaltes (Gómez-

Tuena et al., 2003 ; Zeyen et al., 2021). Ferrari et al. (2012) ont proposé un modèle pour la mise en place de la TMVB au cours du temps, dont les étapes principales pourraient être résumées par (i) une formation initiale par subduction d'un arc andésitique intra-continentale entre ~20 et 10 Ma conduisant en théorie à l'amincissement de la partie subductée, suivie par (ii) un épisode de volcanisme mafique migrant d'ouest en est entre ~11 et 7 Ma, relié à la propagation latérale d'une déchirure entre les plaques Cocos et Rivera. (iii) Puis un volcanisme plus siliceux permettant la formation de basaltes et de failles d'extension marque la période entre 7,5 et 3 Ma jusqu'à (iv) la mise en place de l'arc volcanique actuel (Ferrari et al., 2012). Dans cet arc volcanique, les lacs Alchichica et Atexcac reposent sur une croûte Précambrienne à Paléozoïque dont l'épaisseur varie entre 50 et 55 km (Ferrari et al., 2012). Ce contexte volcanique a permis la formation de nombreux strato-volcans monogéniques accompagnée d'une activité phréato-magmatique conduisant parfois à la mise en place de cratères, dans lesquels se trouvent par exemple les lacs Alchichica et Atexcac. Plus précisément, les cratères qui contiennent les lacs Alchichica et Atexcac sont des maars, c'est-à-dire qu'ils ont été formés suite à des explosions causées par des interactions entre un magma ascendant et une source d'eau externe provenant d'un lac ou d'un aquifère, d'après Carrasco-Núñez et Chako-Tchamabé, 2022. En raison des processus multiples liés au volcanisme, à la tectonique et à la géomorphologie qui peuvent se combiner dans ces structures, il est difficile d'identifier une chronologie précise dans les événements qui interviennent lors de leur formation (Carrasco-Núñez et Chako-Tchamabé, 2022). Dans le cas d'Alchichica (qui appartient à un groupe de volcans monogéniques datés du Pléistocène supérieur à l'Holocène), différents critères de volcanostratigraphie et de géochimie indiquent que le lac est issu d'une série d'épisodes de volcanisme phréato-magmatique pré-maar et syn-maar, alimentés par différents types de magmas (Chako-Tchamabé et al., 2020). Par conséquent, les dépôts sédimentaires qui forment le substratum géologique du lac sont principalement composés de matériaux pyroclastiques, de scories, de coulées de laves et de paléosols (Fig. 15).



**Figure 15.**

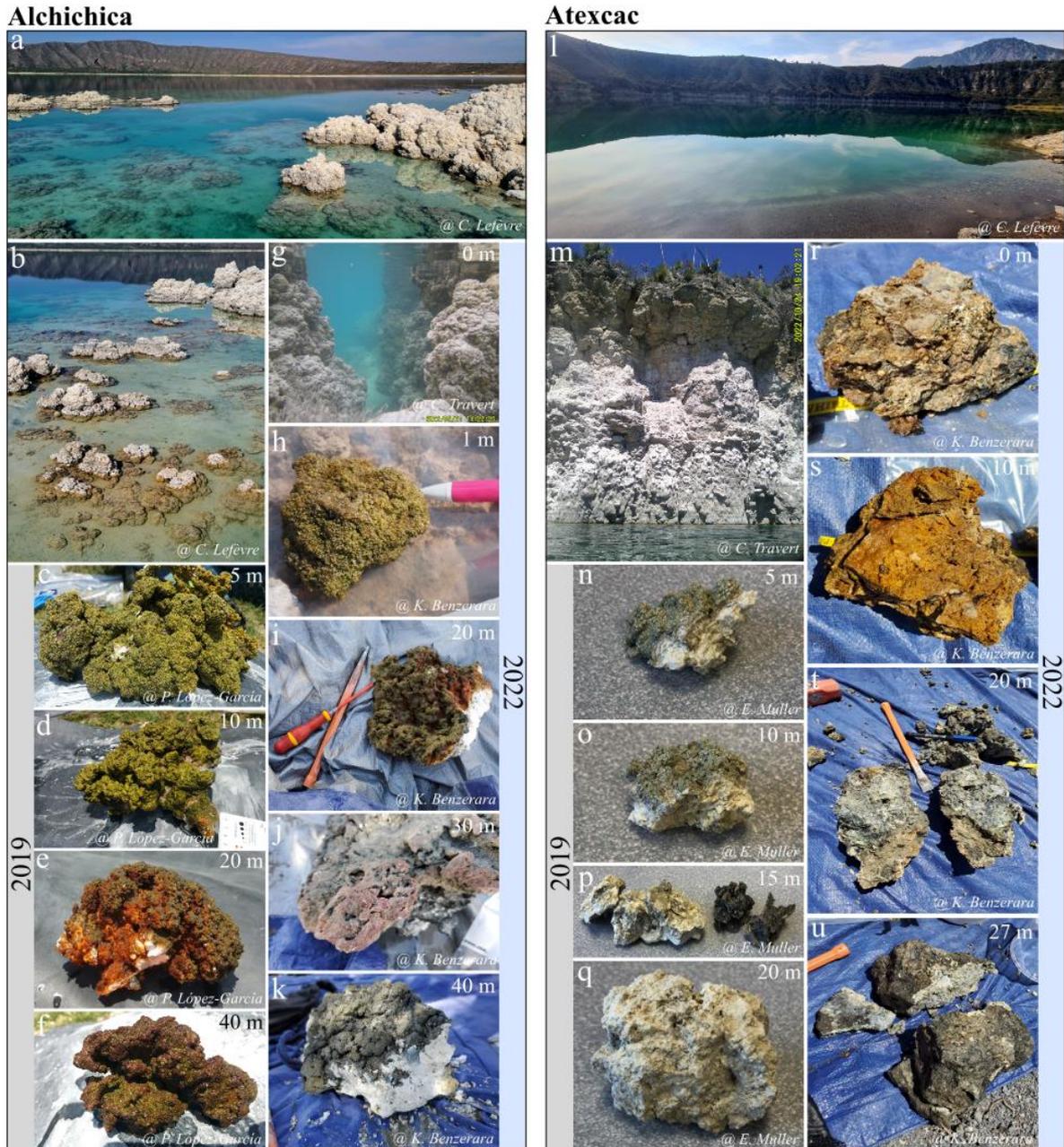
**Log stratigraphiques généraux du substratum géologique à Alchichica (A) et Atexcac (B).** Pour chacun des cratères, les unités déposées avant et pendant la formation du maar sont respectivement représentées en bleu et en vert. Ces logs sont respectivement modifiés de Ferrari et al. (2020) et de Carrasco-Núñez et al. (2014).

En particulier, les relevés stratigraphiques faits autour du lac ont été distingués entre une série « pré-maar » comprenant des roches volcaniques avec des coulées de lave, des tuffs stratifiés, des rhyolites et un cône de scories, et une série « maar » constituée d'une alternance de couches formées par des flux pyroclastiques (Chako-Tchamabé et al., 2020 ; Carrasco-Núñez et al., 2014 ; Carrasco-Núñez et Chako-Tchamabé., 2022). Pour Atexcac, les flans du cratère sont principalement formés par des coulées de lave andésitique/sédiments volcaniques et des blocs calcaires provenant eux aussi d'épisodes pré-, syn- et post-maars (Carrasco-Núñez et al., 2007).

Dans un contexte plus local, les lacs Alchichica et Atexcac se situent à des altitudes respectives de ~2326 m et ~2510 m au-dessus du niveau marin et s'étendent sur des surfaces relativement petites (1,81 km<sup>2</sup> pour Alchichica et 0,29 km<sup>2</sup> pour Atexcac ; Lugo et al., 1998). Ce sont des lacs profonds en comparaison de la moyenne des lacs mexicains, avec une profondeur maximum de ~39 m pour Atexcac et de ~64 m, pour Alchichica (Lugo et al., 1998). Ces deux lacs sont situés dans un bassin endoréique (Serdán-Oriental basin ou SOB), c'est-à-dire un bassin clos où les solutions ne se déversent pas dans une mer/un océan. Ces lacs ne sont

alimentés que par les arrivées d'eaux météoriques ainsi que par des entrées d'eaux souterraines provenant d'aquifères, et l'eau ne s'échappe du système que par des processus d'évaporation (Silva-Aguilera et al., 2022). Par ailleurs, l'évaporation est un phénomène qui s'observe au moins à Alchichica, notamment avec une augmentation de la salinité de la solution au cours du temps, et une baisse du niveau d'eau visible sur les berges (Alcocer et al., 2022). Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces observations. Par exemple, les activités agricoles alentours pompent l'eau des aquifères qui alimentent le lac. De plus, les lacs Alchichica et à Atexcac sont situés dans une zone tempérée semi-aride à cause du relief et de la position perpendiculaire du bassin par rapport aux vents dominants, avec par exemple à Alchichica une température atmosphérique maximum moyenne sur l'année de 21,75 °C (Silva-Aguilera et al., 2022 ; Filonov et al., 2022). Le climat du bassin est saisonnier, c'est-à-dire que lors de la mousson mexicaine entre mai et octobre la plupart des pluies tombent pendant que la surface des lacs est réchauffée, alors qu'en hiver les pluies surviennent surtout lors d'événements de tempête, et sinon la saison est sèche (Silva-Aguilera et al., 2022). Cette variation de climat en deux saisons a une influence sur la température des masses d'eau des lacs Alchichica et Atexcac. En hiver, l'eau de surface est refroidie et entraîne par densité un mélange de la colonne d'eau, alors qu'en été et en automne, l'eau de surface est réchauffée et il n'y a pas de mélange de la colonne d'eau. Comme nous le verrons, ces variations saisonnières de températures sont couplées à des variations saisonnières du redox de la solution, et influencent par conséquent la disponibilité en dioxygène dissous dans la colonne d'eau.

Les lacs Alchichica et Atexcac sont étudiés depuis plusieurs années, d'abord parce qu'ils contiennent des microbialites, mais aussi pour leur hydrogéologie, hydrochimie et leurs diversités d'organismes particulières. Notamment, des campagnes de terrains ont été effectuées au moins à partir de 2007, puis en 2012, 2014, 2016, 2018, 2019 et 2022 à l'IMPMC et l'ESE. Dans cette thèse, nous avons en particulier regardé les données acquises pendant les deux dernières campagnes de terrain en mai 2019 et en octobre 2022 (Fig. 16).



**Figure 16.**

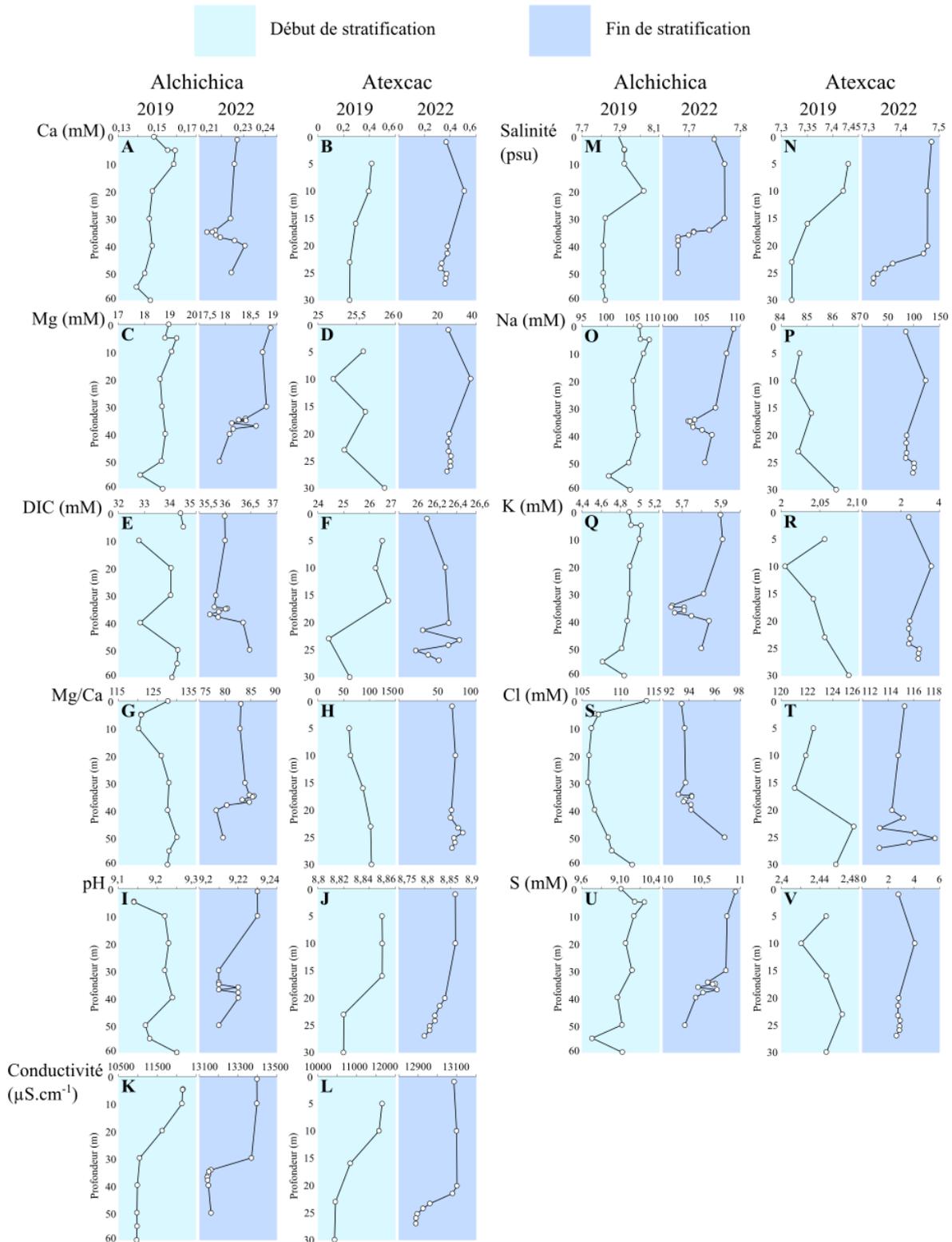
**Photographies des lacs Alchichica et Atexcac et des échantillons de microbialites prélevés en mai 2019 et en octobre 2022.** (a) Vue d'ensemble du lac Alchichica ; (b) Microbialites de surface du lac Alchichica, sur lesquelles des marques du niveau d'eau avant évaporation sont visibles ; (c, d, e, f) De haut en bas, échantillons prélevés respectivement à 5, 10, 20 et 40 m de profondeur en mai 2019 à Alchichica ; (g, h, i, j, k) De haut en bas, échantillons prélevés respectivement en surface, à 1, 20, 30 et 40 m de profondeur en octobre 2022 à Alchichica ; (l) Vue d'ensemble du lac Atexcac ; (m) Microbialites émergées le long d'une paroi verticale du lac Atexcac ; (n, o, p, q) De haut en bas, échantillons prélevés respectivement à 5, 10, 15 et 20 m de profondeur en mai 2019 à Atexcac ; (r, s, t, u) De haut en bas, échantillons prélevés respectivement en surface, à 10, 20 et 27 m de profondeur en octobre 2022 à Atexcac.

## 1.2. Géochimie générale et communautés microbiennes principales des colonnes d'eau des lacs Alchichica et Atexcac

Pour donner un aperçu de la chimie globale des colonnes d'eau des lacs Alchichica et Atexcac, les profils en fonction de la profondeur de différents paramètres géochimiques qui les caractérisent sont donnés dans cette partie introductive. Les profils géochimiques des colonnes d'eau des lacs Alchichica et Atexcac ont été mesurés à différentes périodes de l'année. Ils représentent des dynamiques de la colonne d'eau qui varient en fonction de la saison (*i.e.* périodes de mélange, périodes de début de stratification, périodes de fin de stratification du lac). Dans le cas du lac Alchichica, les données géochimiques en fonction du temps et de la profondeur ont déjà été détaillées précisément dans le livre d'Alcocer et al. (2022). Par ailleurs, dans tout ce manuscrit, la fraction « dissoute » se réfère à la fraction de diamètre inférieur à 0,2  $\mu\text{m}$ .

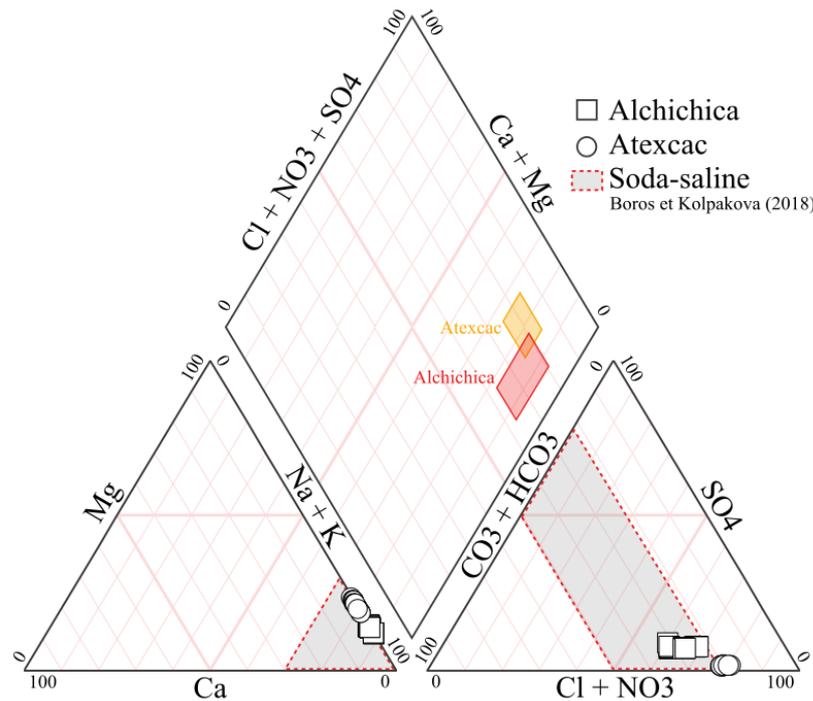
### 1.2.1. Concentrations ioniques majeures des colonnes d'eau

Les concentrations en espèces chimiques majeures et le pH ( $\sim 9,2$  en moyenne pour Alchichica et  $\sim 8,8$  en moyenne pour Atexcac) ont peu varié entre 2012 et 2022 dans les colonnes d'eau d'Alchichica et d'Atexcac. Néanmoins, de légères augmentations de la salinité et de l'alcalinité ont été notées au cours du temps, en partie reliées à des phénomènes d'évaporation et de pompage de l'eau du lac (Fig. 17). Les lacs Alchichica et Atexcac ont de fortes concentrations en DIC et en magnésium (respectivement  $\sim 34,9$  mM et  $\sim 18,6$  mM pour Alchichica, et  $\sim 26,1$  mM et  $\sim 26,7$  mM pour Atexcac), et il a notamment été suggéré que cet important réservoir de DIC tamponne l'expression des métabolismes dépendants du redox avec l'augmentation de l'alcalinité de ces lacs, qui présentent aussi une salinité élevée (Havas et al., 2023a, b, Annexes B et C). De plus, Havas et al. (2023a, b) ont montré des concentrations et des compositions isotopiques du carbone organique dissous (DOC) élevées et variables dans les colonnes d'eau des deux lacs. A Atexcac, les pics de DOC proviennent plutôt du relargage dans la colonne d'eau d'un excès de carbone organique fixé par les photosynthèses oxy- et anoxygéniques chez les producteurs primaires alors qu'à Alchichica les variations du DOC ont plutôt été interprétées comme les résultats de la dégradation de la matière organique puis accumulation du DOC dans la partie plus profonde anoxique de la colonne d'eau. Comme montré par la distribution de leurs concentrations ioniques dans un diagramme ternaire de Piper, ce sont des lacs salins-alcalins (soda-alkaline lakes) dans la classification décrite par Boros et Kolpakova (2018) (Fig. 18).



**Figure 17.**

**Variations en fonction de la profondeur de plusieurs paramètres physico-chimiques dans les lacs Alchichica et Atexcac en mai 2019 (début de stratification) et en octobre 2022 (fin de stratification).** Les précisions sont estimées à 5 % pour les mesures des concentrations. (A à L) De haut en bas, profils en fonction de la profondeur respectivement du Ca (mM), Mg (mM), DIC (mM), Mg/Ca, pH et de la conductivité ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ); (M à V) De haut en bas, profils en fonction de la profondeur respectivement de la salinité (psu), du Na (mM), K (mM), Cl (mM) et S (mM).

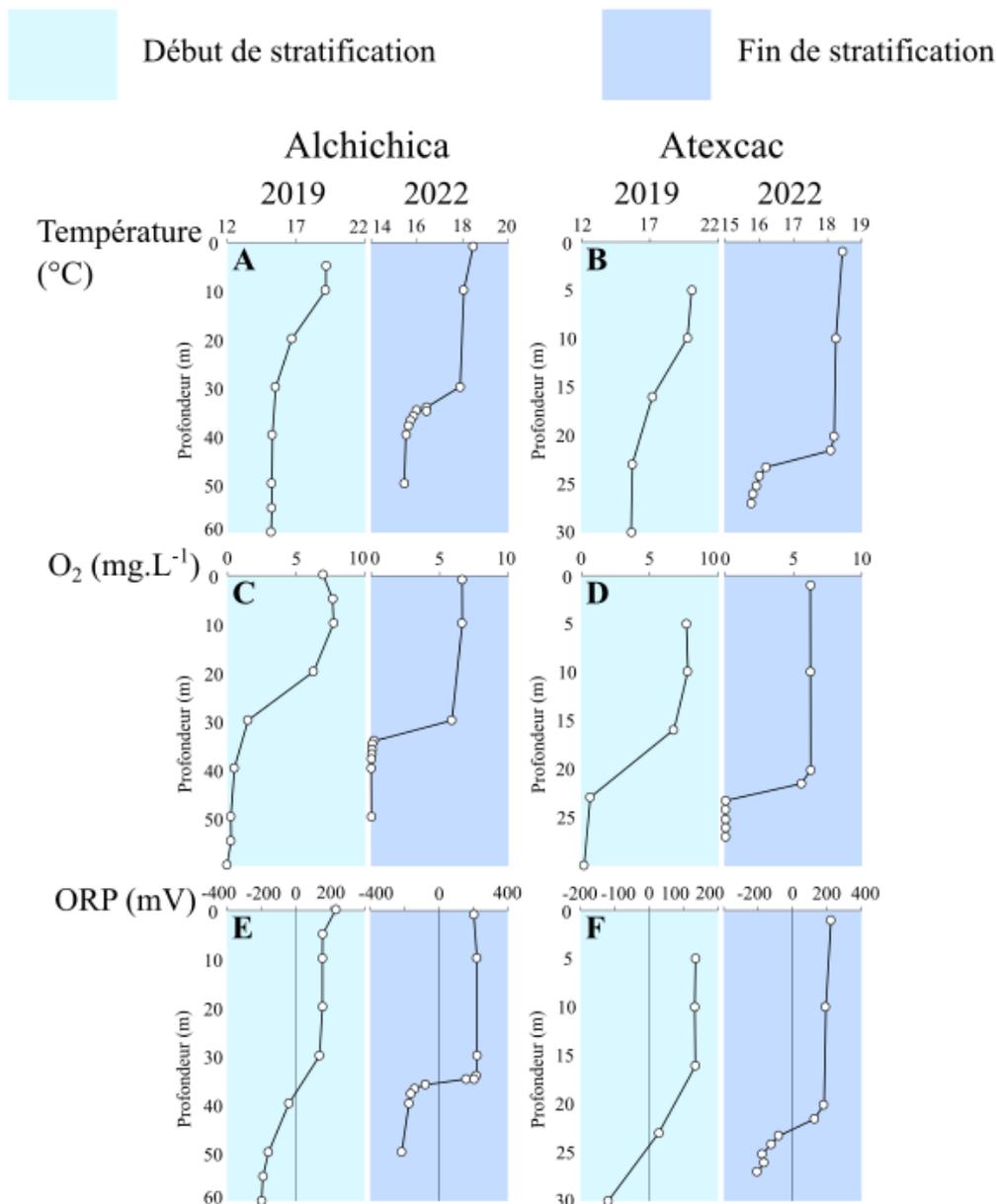


**Figure 18.** Solutions des colonnes d'eau des lacs Alchichica et Atexcac représentées dans un diagramme de Piper. Les solutions ont été prélevées en 2014, 2016, 2019 et 2022 (sauf pour Atexcac dans le diagramme ternaire  $\text{CO}_3+\text{HCO}_3-\text{SO}_4-\text{Cl}+\text{NO}_3$  où les données ne sont disponibles que pour 2019 et 2022).

### 1.2.2. Paramètres physico-chimiques majeurs des colonnes d'eau

Les lacs Alchichica et Atexcac sont monomictiques (ils se stratifient une fois par an), ce qui se traduit par des variations saisonnières de la température, de la concentration en dioxygène dissous et d'autres paramètres comme le PAR (Photosynthetic Active Radiation) définissant la profondeur jusqu'à laquelle les longueurs d'onde utilisables par la photosynthèse pénètrent dans la colonne d'eau. Les stratifications à Alchichica et Atexcac influencent de nombreux autres paramètres ; notamment ce sont les variations de profondeur de PAR qui définissent la profondeur de la zone du système où la colonne d'eau reçoit encore assez de lumière pour la photosynthèse (zone euphotique, dont la profondeur est en général limitée à celle où la colonne d'eau reçoit 0,1 à 1 % du PAR de surface). Par exemple, dans le cas du lac Alchichica qui est assez transparent (profondeur du disque Secchi entre 3,6 et 10,4 m, Alcocer et al., 2022), la zone euphotique varie entre 25 m en période de mélange et 40 m en période de stratification (avec un maximum aux mois d'octobre et novembre). La stratification thermique de la colonne d'eau conduit à un décalage d'environ 2 °C entre le haut et le bas de la colonne d'eau pour une moyenne annuelle de 15,8 °C (Alcocer et al., 2022). Pendant les périodes de stratification de 2019 et 2022, la concentration en dioxygène dissous a diminué de ~7,18 à 0 mg.L<sup>-1</sup> à Alchichica

et de  $\sim 6,3$  à  $0 \text{ mg.L}^{-1}$  à Atexcac entre la surface et la profondeur. Ainsi, les courbes de la  $p\text{O}_2$  permettent de définir plusieurs zones dans les lacs en fonction de la saison. Par exemple, l'oxycline est déterminée ici par la profondeur du point d'inflexion de la courbe de concentration du dioxygène dissous, ce qui permet de définir l'épilimnion comme la couche d'eau de surface, le métalimnion comme la couche d'eau au niveau de l'oxycline et l'hypolimnion comme la couche d'eau de profondeur. Les profils en fonction de la profondeur de ces différents paramètres dans la colonne d'eau ont été représentés dans la figure 19.



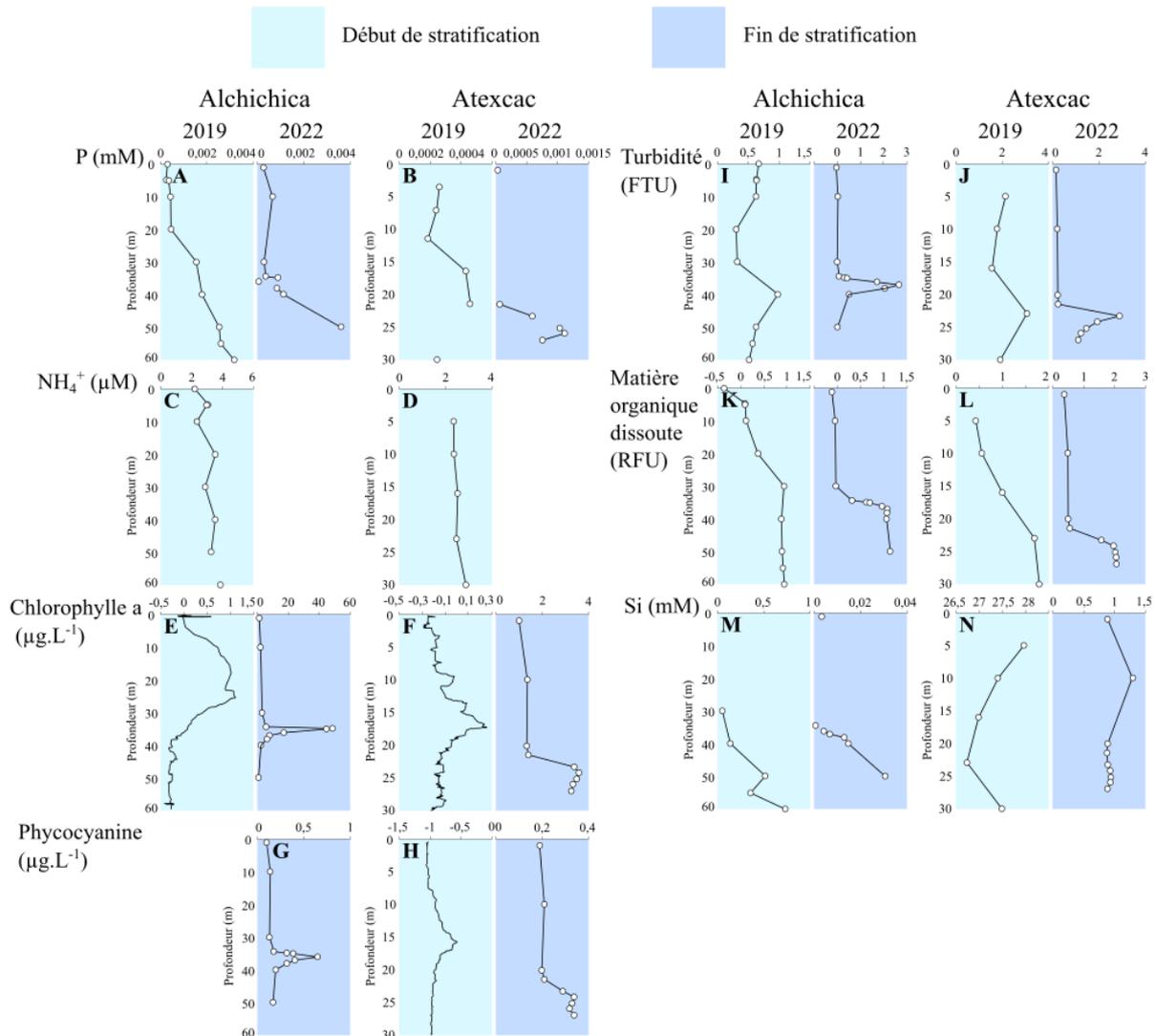
**Figure 19.** Variations en fonction de la profondeur de la température ( $^{\circ}\text{C}$ ), l' $\text{O}_2$  dissous ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) et l'ORP (mV) dans la colonne d'eau des lacs Alchichica et Atexcac en mai 2019 (début de stratification) et en octobre 2022 (fin de stratification). Les précisions sont respectivement estimées à  $\pm 0.01 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\pm 0.1 \text{ mg.L}^{-1}$  et  $1 \text{ mV}$ .

### 1.2.3. Concentrations en éléments traces des colonnes d'eau

Les éléments traces peuvent participer à de nombreux cycles géochimiques et biologiques dans la colonne d'eau. Les valeurs des concentrations de ces éléments mesurées en mai 2019 dans les lacs Alchichica et Atexcac ont été reportées dans la figure A1.

### 1.2.4. Concentrations en nutriments des colonnes d'eau

Les lacs Alchichica et Atexcac sont respectivement oligo-mésotrophiques et oligotrophiques, c'est-à-dire qu'ils contiennent peu d'éléments nutritifs dans l'ensemble (Fig. 20). Les activités agricoles autour du lac Alchichica sont néanmoins susceptibles d'affecter les cycles de l'azote et du phosphore au cours des années, mais, globalement, les valeurs moyennes de concentration en ion ammonium, en phosphore total et chlorophylle a dans la colonne d'eau sont respectivement de  $\sim 3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $\sim 0,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$  et moins de  $5 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Ramirez-Zierold et al., 2022 ; données de l'IMPMC). Des augmentations de la concentration en phosphore dans la colonne d'eau profonde et dans une certaine mesure de la concentration en ammonium sont notables à Alchichica, possiblement liées à une reminéralisation de la matière organique en profondeur (*cf* Havas et al., 2023). A Atexcac, ces concentrations atteignent  $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $0,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$  et  $\sim 0,7 \mu\text{g.L}^{-1}$  (pour respectivement l'ammonium, le phosphore total et la chlorophylle a). Un caractère de la colonne d'eau qui distingue les deux lacs est leur concentration moyenne en acide orthosilicique : là où, à Alchichica, la colonne d'eau est globalement très pauvre en silice avec une concentration qui augmente depuis la surface vers l'interface eau-sédiments au fond du lac (en moyenne entre 5 et  $19 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{H}_4\text{SiO}_4$ ), à Atexcac, la valeur de concentration en  $\text{H}_4\text{SiO}_4$  dans la colonne d'eau est beaucoup plus élevée avec une moyenne de  $\sim 1 \text{mmol.L}^{-1}$ . Ici, les concentrations élémentaires et en espèces chimiques dans les colonnes d'eau d'Alchichica et d'Atexcac ont été données en moyenne, mais pour la plupart, leurs activités sont affectées par la profondeur et par les changements redox saisonniers de l'eau du lac. Notamment, les variations entre les différentes périodes de productivité primaire dans la colonne d'eau influencent les cycles de l'azote, du phosphore, du carbone, etc. Par exemple, des efflorescences (i) de diatomées pendant la période de mélange, ou (ii) de cyanobactéries à l'installation de la période de stratification et (iii) de bactéries oxydantes du soufre pendant la fin de la période de stratification, sont observées chaque année (Alcocer et al., 2022).



**Figure 20.**

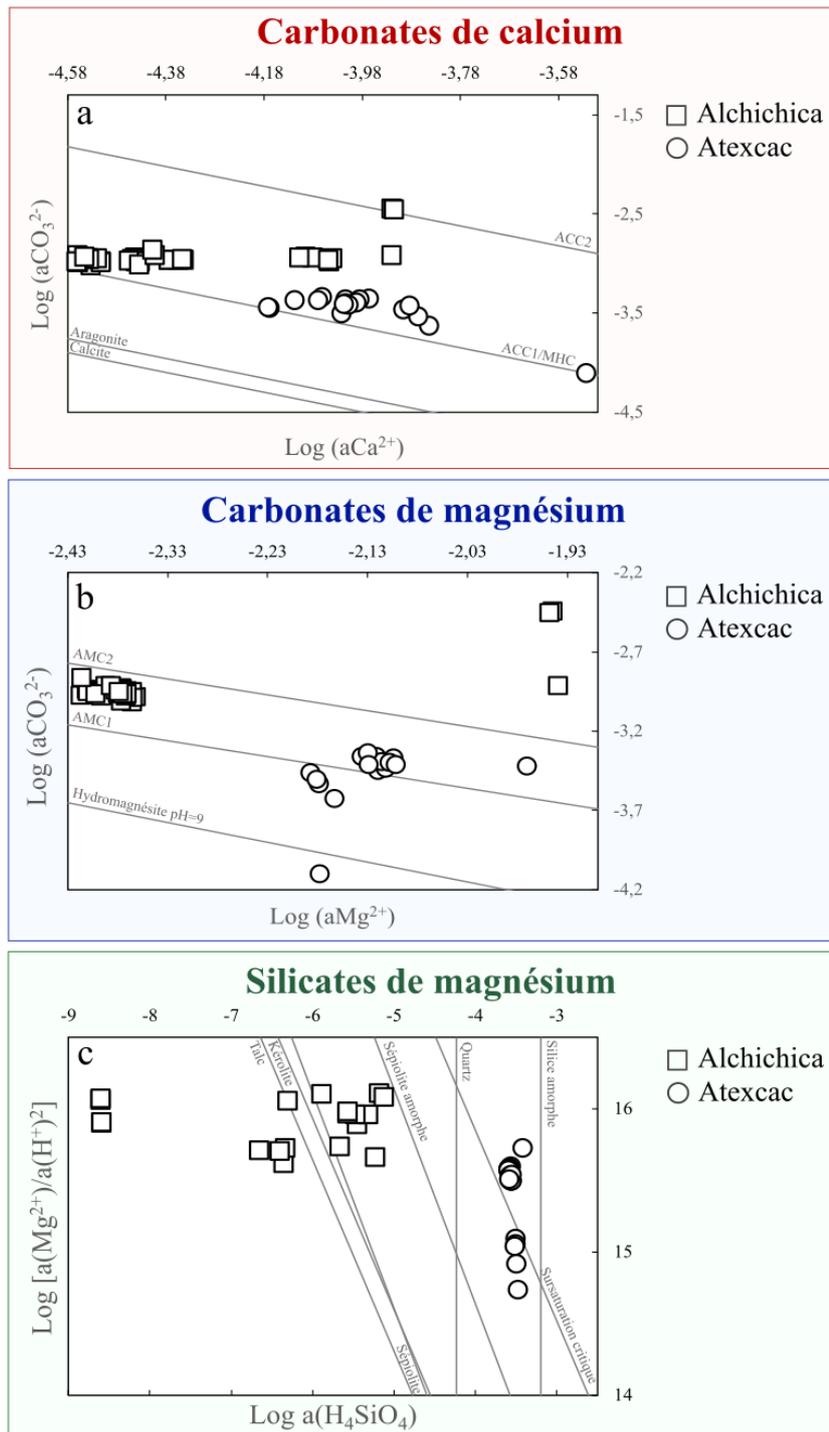
**Variations en fonction de la profondeur de plusieurs paramètres physico-chimique dans la colonne d'eau des lacs Alchichica et Atexcac en mai 2019 (début de stratification) et en octobre 2022 (fin de stratification).** Les précisions sont estimées à 5 % pour les mesures des concentrations. (A à H) De haut en bas, profils en fonction de la profondeur respectivement du P (mM), NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (μM), Chlorophylle a (μg.L<sup>-1</sup>), Phycocyanine (μg.L<sup>-1</sup>) ; (I à N) Turbidité (FTU), Matière organique dissoute (RFU), Si (mM).

### 1.2.5. Saturation des colonnes d'eau d'Alchichica et Atexcac vis-à-vis des carbonates et des silicates

Les lacs Alchichica et Atexcac appartiennent à une série de lacs de cratères mexicains qui définissent un gradient de salinité-alcalinité induit possiblement par des stades plus ou moins poussés d'évaporation (Zeyen et al., 2017). Alchichica et Atexcac sont les représentants les plus hauts de ce gradient en termes d'alcalinité-salinité. Par conséquent, Zeyen et al. (2017) et Zeyen et al. (2021) ont soumis l'hypothèse d'un seuil d'alcalinité puis de solubilité vis-à-vis de la monohydrocalcite nécessaire à la formation des microbialites. De plus, en théorie, le

rapport Mg/Ca du dissous contrôle l'identité de la phase minérale carbonatée précipitant dans les lacs (Zeyen et al., 2021). Plus généralement, les saturations des solutions vis-à-vis des phases minérales permettent de définir si une phase peut précipiter, sachant que cela ne préjuge pas en revanche des aspects cinétiques de la précipitation. Une solution peut être favorable thermodynamiquement à la précipitation d'une phase minérale, mais cette dernière peut ne pas se produire du fait d'une cinétique trop lente. Ici, les saturations des colonnes d'eau des lacs Alchichica et Atexcac ont été représentées dans le système des carbonates et le système des silicates (Fig. 21). Il apparaît que ces lacs sont très sursaturés vis-à-vis de nombreux carbonates de calcium/magnésium et de leurs précurseurs amorphes (amorphous calcium carbonates, ACC ; amorphous magnesium carbonates, AMC). Une différence majeure qui distingue les lacs Alchichica et Atexcac est la saturation de leur colonne d'eau vis-à-vis des silicates. Là où, à Atexcac, le lac est sursaturé vis-à-vis de la sépiolite amorphe et du seuil de nucléation homogène des silicates de magnésium (« supercritique ») défini par Tosca et al. (2011), à Alchichica, la faible activité en acide orthosilicique ne permet pas la saturation de la colonne d'eau vis-à-vis de la sépiolite amorphe. Celle-ci est presque atteinte avant d'arriver à l'interface eau-sédiments (Muller et al., 2023). Comme évoqué, de nombreux phénomènes cinétiques rentrent en jeu dans ces processus de précipitation, notamment entre le système des carbonates et le système des silicates, et il faut donc coupler ces analyses de saturation à une détection effective de la précipitation des phases. C'est une approche que nous avons utilisée dans l'étude des sédiments prélevés au fond du lac d'Alchichica (Muller et al., 2023, Annexes A). L'évolution de la saturation des eaux porales de cette carotte a été mesurée en parallèle d'une caractérisation fine des phases minérales de la carotte. Ainsi, il a été démontré que si la colonne d'eau du lac est sous-saturée par rapport à la sépiolite amorphe, les eaux porales deviennent très vite saturées vis-à-vis de cette phase en-dessous de quelques centimètres de profondeur. Il a été proposé que cela était lié à la dissolution des frustules de diatomées, très abondantes dans les sédiments, conduisant à des teneurs en acide orthosilicique importantes. En parallèle, il a été observé aux profondeurs où la saturation avec la sépiolite amorphe est atteinte la formation de silicates de magnésium hydratés mal cristallisés (de type stévensite), parfois en remplacement pseudomorphique des diatomées elles-mêmes. Aux plus grandes profondeurs de la carotte prélevées (plusieurs dizaines de centimètres), la proportion massique en stévensite peut ainsi atteindre plus de 50 %. Il a été proposé que ce processus pouvait tamponner les concentrations porales en acide orthosilicique à des valeurs plus faibles que s'il n'avait pas lieu et que cela pouvait limiter le relargage du Si vers la colonne d'eau. De plus, ce processus consomme de l'alcalinité sans séquestrer de carbone inorganique (sous forme de carbonates). Au final,

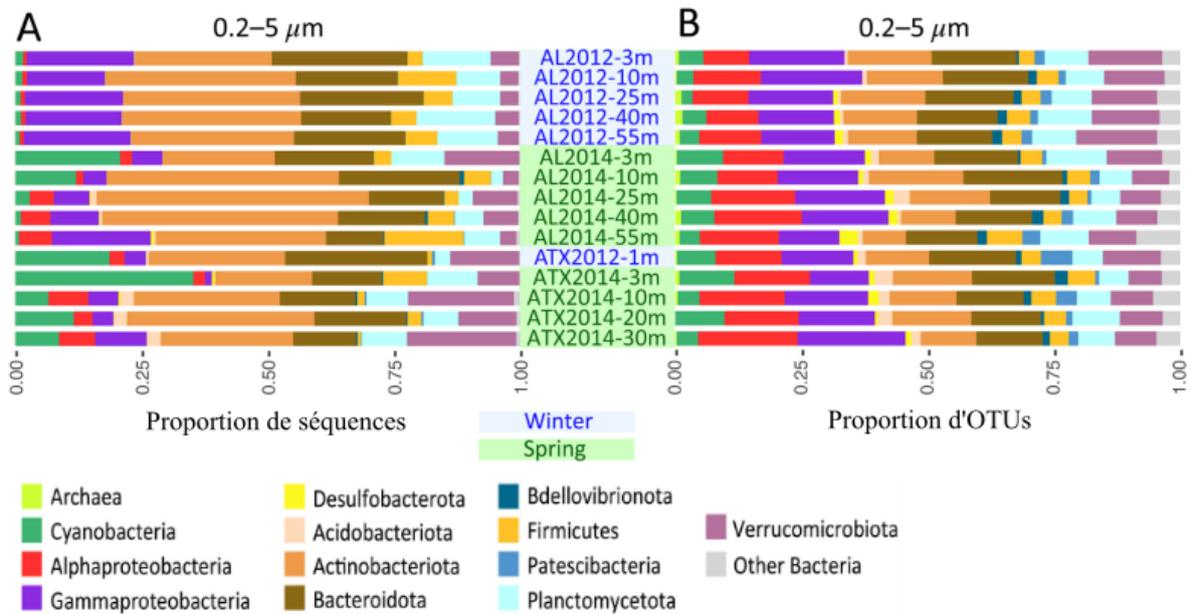
Alchichica est un site particulièrement intéressant pour étudier ce processus dont il reste à mieux évaluer l'ampleur et les déterminants dans le reste du monde.



**Figure 21.** Représentations des saturations des lacs Alchichica (carrés) et Atexcac (cercles) dans des diagrammes de solubilité pour le système des carbonates de calcium (a), des carbonates de magnésium (b) et des silicates de magnésium (c).

### 1.2.6. Communautés microbiennes majeures des colonnes d'eau

Les compositions des communautés microbiennes des colonnes d'eau des lacs Alchichica et Atexcac ont également été caractérisées, notamment par metabarcoding du gène de l'ARNr 16S par Iniesto et al. (2022) ou Alcántara-Hernández et al. (2022) (Fig. 22).



**Figure 22.**

**Histogrammes montrant la diversité et l'abondance relative des phylums et classes dominantes des procaryotes (archées, bactéries) des communautés microbiennes de la colonne d'eau des lacs Alchichica et Atexcac en janvier 2012 et en mai 2014 sur la fraction planctonique comprise entre 0,2 et 5 µm.** (A) Abondance relative d'OTUs (operational taxonomic units ; déterminée par la fréquence de séquence de ces OTUs) classées dans des clades de haut rang taxonomique. B, diversité d'OTUs (nombre d'OTUs différentes) classées phylogénétiquement. Figure modifiée de Iniesto et al. (2022).

De manière générale, ce sont les bactéries qui dominent les communautés planctoniques des lacs Alchichica et Atexcac. Le phylum cyanobacteria est notamment présent, mais son abondance varie en fonction des saisons. Par exemple, les pics principaux des cyanobactéries ont été observés dans la colonne d'eau de surface à la fin du printemps à Alchichica (près de 70 % des séquences procaryotes de 2014 analysées par Iniesto et al., 2022), ce qui corrobore les efflorescences déjà notées à cette période. A Atexcac, ces fluctuations ont été observées à la fois en hiver et en été, et reliées également à des efflorescences au moins en début de la période de stratification de la colonne d'eau. Ces cyanobactéries sont surtout filamenteuses, avec une dominance de *Nodularia* spp. (Nostocaceae) à Alchichica mais aussi de *Microcystis* à Atexcac lors de l'efflorescence de printemps (Iniesto et al., 2022). Dans les deux lacs, les Actinobactéries, Bacteroidetes, Planctomycetes et Verrucomicrobiota sont des groupes relativement abondants en été et en hiver, et font également des efflorescences de bactéries

hétérotrophes (Iniesto et al., 2022). En particulier, les colonnes d'eau des lacs Alchichica et Atexcac sont enrichies en Actinobactéries comme des *Nitriliruptoraceae* qui sont, de manière cohérente, plutôt acclimatée à des solutions saline-alkalines (Iniesto et al., 2022). Enfin, les protéobactéries sont très largement représentées dans les colonnes d'eau des lacs Alchichica et Atexcac en termes d'abondance mais aussi de diversité taxonomique, avec une dominance par les gammaprotéobactéries. L'abondance de ces dernières fluctue en fonction des saisons, avec un maximum à partir de la fin de la période de stratification et pendant l'hiver (Iniesto et al., 2022). Cette distribution saisonnière a été mise en relation avec le fait que de nombreuses familles des protéobactéries identifiées sont des phototrophes anoxygéniques (par exemple *Rhodobacteraceae* pour les alphaprotéobactéries ou *Chromatiaceae* pour les gammaprotéobactéries) (Iniesto et al., 2022). De plus, une forte présence de gammaprotéobactéries chimiolithoautotrophes (*Thiomicrospiraceae*) capables d'oxyder les sulfures (ce qui conduit notamment à la formation d'inclusions intracellulaires de soufre élémentaire) a été mise en évidence dans les colonnes d'eau profondes d'Alchichica et d'Atexcac, non seulement avec les données de métabarcoding du gène de l'ARNr16S du plancton mais aussi par nous-mêmes par des observations au MEB d'échantillons prélevés en 2022 (Fig. 23).

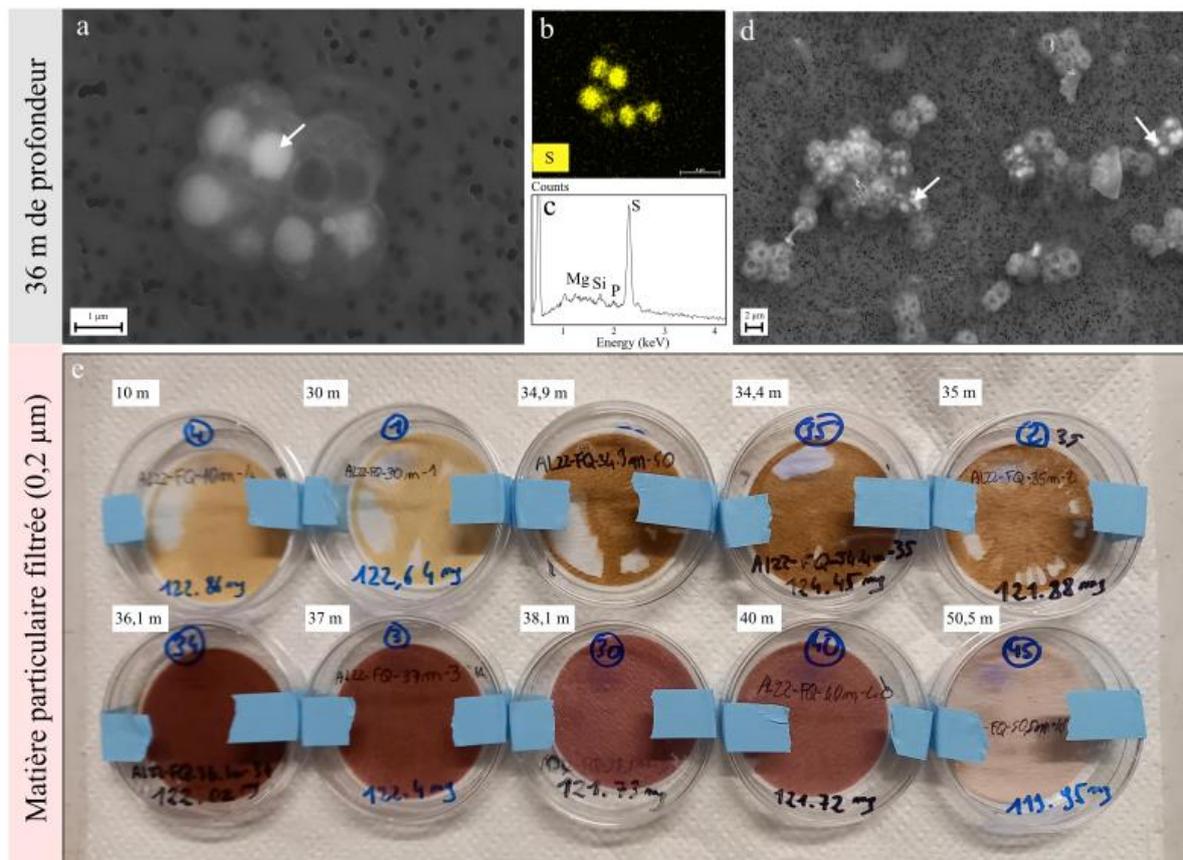


Figure 23.

**Bactéries oxydantes du soufre dans la colonne d'eau du lac Alchichica pendant la période de fin de stratification en octobre 2022.** (a) Image MEB en électrons rétrodiffusés de cellules contenant des inclusions de soufre élémentaire intracellulaire (flèche blanche) ; (b) Carte élémentaire du soufre en EDXS de l'image a ; (c) Spectre EDXS de l'image a ; (d) Image MEB en électrons rétrodiffusés montrant des bactéries avec des inclusions de soufre élémentaire intracellulaire (flèches blanches) ; (e) Filtres quartz de 0,2  $\mu\text{m}$  sur lesquels des échantillons de la colonne d'eau du lac Alchichica ont été filtrés en octobre 2022 entre 10 et 50,5 m, présentant différentes couleurs en fonction de la profondeur.

De manière générale, la diversité microbienne planctonique a été reliée à la salinité et à l'alcalinité des lacs de la TMVB (Iniesto et al., 2022). Plus précisément dans les lacs Alchichica et Atexcac, il existe des fluctuations entre l'hiver et l'été dans l'abondance des différentes communautés microbiennes planctoniques, ce qui suggère des acclimations saisonnières aux changements redox de la colonne d'eau, mais aussi en fonction des cycles jour-nuits.

### 1.3. Minéralogie et écologie microbienne générales des microbialites des lacs Alchichica et Atexcac

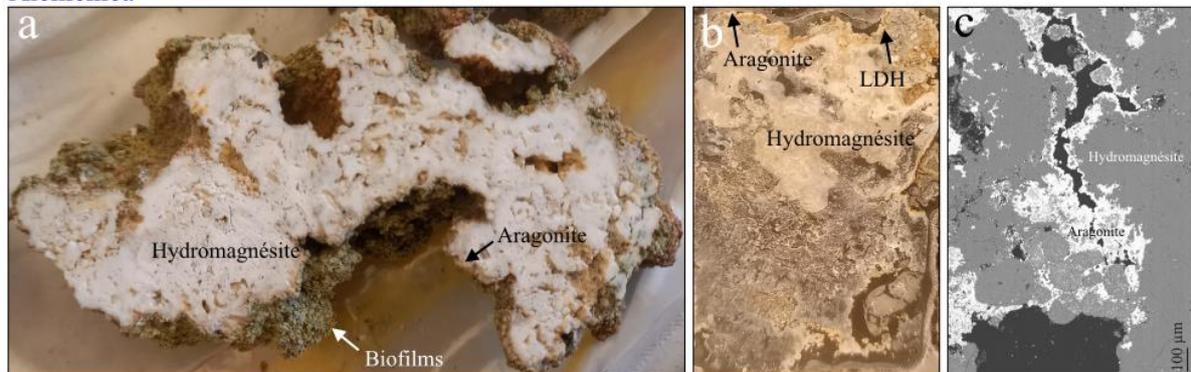
En parallèle de la chimie des colonnes d'eau et de la diversité microbienne des communautés planctoniques, on s'intéresse dans ces lacs aux roches carbonatées qui s'y forment, les microbialites. Là encore, la chimie et la minéralogie des microbialites ont été étudiées ainsi que la diversité des communautés microbiennes associées aux microbialites.

#### 1.3.1. Phases minérales retrouvées dans les microbialites d'Alchichica et Atexcac

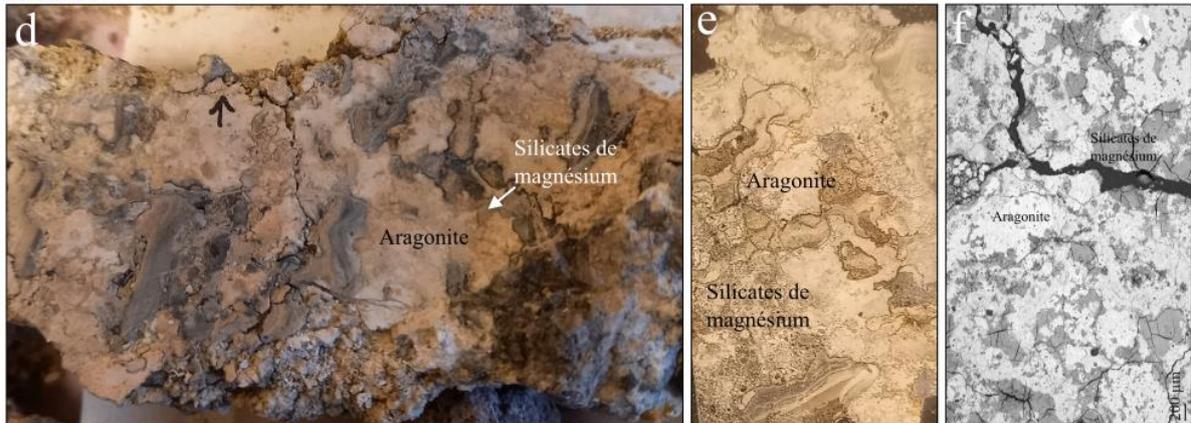
Les microbialites peu profondes (entre 0 et 15 m) d'Alchichica et d'Atexcac sont principalement constituées de phases carbonatées et parfois silicatées (dans le cas d'Atexcac) (Fig. 24). A Alchichica, les phases dominantes sont l'aragonite ( $\text{CaCO}_3$ ) et l'hydromagnésite ( $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ). L'aragonite se forme surtout en surface des microbialites, en contact avec des amas de cellules microbiennes. Notamment, les cellules d'un ordre spécifique de cyanobactéries, les *Pleurocapsales* (et également dans une moindre mesure les *Chroococcales*), semblent associées préférentiellement à l'aragonite (Gérard et al., 2013). A Atexcac, les phases dominantes sont l'aragonite et des silicates de magnésium (kérolite,  $\text{Mg}_3\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ , et/ou stévensite). D'autres phases minérales minoritaires ont également été détectées dans les microbialites des deux lacs. A Alchichica, des hydroxydes lamellaires doubles (Lamellar Double Hydroxydes, LDH) comme la pyroaurite ( $\text{Mg}_6\text{Fe}_2(\text{OH})_{16}[\text{CO}_3] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) et l'iowaite ( $\text{Mg}_6\text{Fe}_2(\text{OH})_{16}\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) contiennent du fer et se localisent préférentiellement à l'interface entre l'aragonite et l'hydromagnésite (Zeyen et al., 2019). Il a été proposé que la présence de

ces phases retrouvées dans des microbialites de surface à l'ouest du lac sont le produit de résurgences locales de solutions souterraines riches en fer à partir du substratum volcanique (Zeyen et al., 2019). Dans les microbialites d'Atexcac, la kéroélite préserve très bien les microfossiles de cyanobactéries et de diatomées, entre autres, et il a été proposé que cette phase authigène peu cristalline puisse avoir un fort potentiel de fossilisation sur les microbialites (Zeyen et al., 2015). En revanche, à Alchichica, les reliquats de formes biogéniques sont en majorité contenus dans l'aragonite et sont beaucoup moins bien préservés. Quelques occurrences de calcite et d'hydromagnésite ont également été détectées dans les microbialites du lac Atexcac (Chagas et al., 2016). De plus, dans les deux lacs, les microbialites contiennent plus ou moins de phases détritiques comme de l'anorthite, de l'albite et/ou des pyroxènes, porteurs d'aluminium, de silice et de fer.

#### Alchichica



#### Atexcac

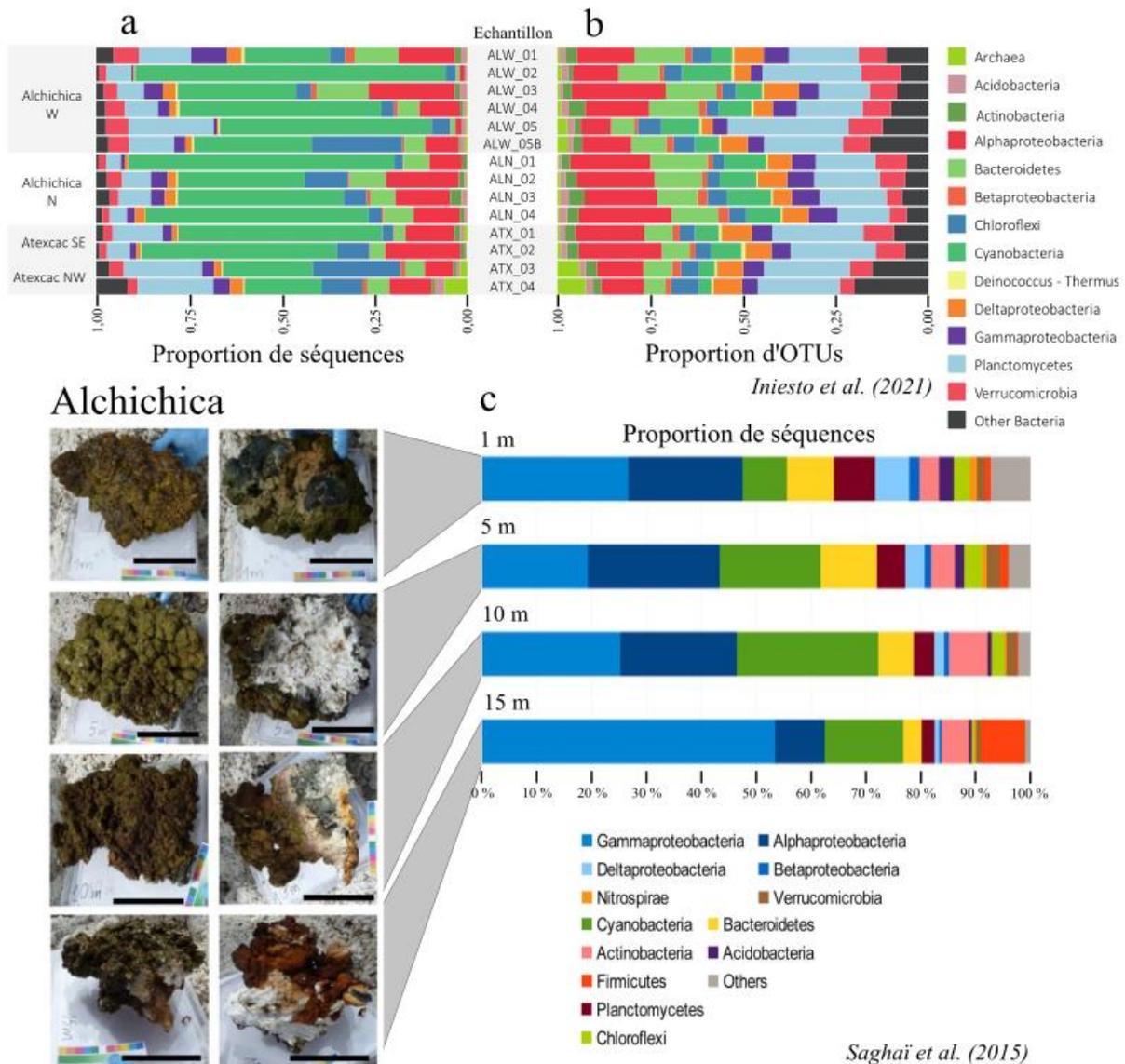


**Figure 24.**

**Phases minérales principales des microbialites d'Alchichica et d'Atexcac.** (a) Vue d'ensemble d'une coupe d'un échantillon de 10 m de profondeur à Alchichica prélevé en 2022, avec une dominance de l'hydromagnésite sur les autres phases minérales ; (b) Lame mince de l'échantillon présenté dans l'image a ; (c) Image MEB en électrons rétrodiffusés d'une zone d'une microbialite de 10 m de profondeur prélevée en 2019 montrant l'aragonite sur la surface de la microbialite et l'hydromagnésite au cœur ; (d) Vue d'ensemble d'une coupe d'un échantillon de 20 m de profondeur à Atexcac prélevé en 2022, montrant des phases d'aragonite et d'hydromagnésite ; (e) Lame mince de l'échantillon présenté dans l'image d ; (f) Image MEB en électrons rétrodiffusés d'une zone d'une microbialite de 20 m de profondeur prélevée en 2019 montrant un mélange entre de l'aragonite et des silicates de magnésium.

### 1.3.2. Composition des communautés microbiennes des microbialites d'Alchichica et Atexcac

La composition des communautés microbiennes des microbialites des lacs Alchichica et Atexcac a été évaluée par métabarcoding du gène d'ARNr 16S/18S et par métagénomique (pour Alchichica) dans plusieurs études (Fig. 25a, -b). A Alchichica notamment, l'étude des gènes codant pour l'ARN ribosomique 16S dans les métagénomiques de microbialites d'un transect de 1 à 15 m de profondeur a montré que les communautés microbiennes des microbialites sont principalement composées de bactéries très diverses, à dominance hétérotrophe, avec des variations d'abondances en fonction de la localisation et de la profondeur (Fig. 25c, Saghāi et al., 2015). Parmi les bactéries, les protéobactéries (gammaprotéobactéries et alphaprotéobactéries) et les Bacteroidetes dominent en abondance, avec également une forte abondance en général des Planctomycetes, Actinobactéries, Firmicutes, Verrucomicrobia. Les *Pleurocapsales*, largement impliquées dans la carbonatation des microbialites (Gérard et al., 2013) sont apparues de plus en plus abondantes en profondeur avec les *Chroococcales*, alors qu'en surface des *Nostocales* associées à des *Synechococcales* filamenteuses dominent (Saghāi et al., 2015 ; Águila et al., 2021). De manière intéressante, c'est dans des microbialites actuelles d'Alchichica que des bactéries produisant des carbonates intracellulaires (*Gloeomargarita lithophora*) ont été découvertes (Couradeau et al., 2012). A Atexcac, le séquençage de l'ADNr 16S a montré que la diversité des communautés microbiennes procaryotes des microbialites est portée majoritairement par les protéobactéries et les Planctomycetes (Iniesto et al., 2021). Les abondances relatives des bactéries varient également avec la localisation des microbialites mais, dans l'ensemble, les cyanobactéries suivies des Planctomycetes, Chloroflexi et alphaprotéobactéries constituent les membres majoritaires des communautés microbiennes (Iniesto et al., 2021). De manière plus générale, une estimation globale de la composition microbienne des microbialites des lacs mexicains de la TMVB, incluant Alchichica et Atexcac, a montré que ces dernières ont en commun un groupe restreint de 247 OTUs, et les auteurs ont suggéré un rôle majeur de ce cœur microbien dans la formation des microbialites de cette zone (Iniesto et al., 2021).



**Figure 25.** Communautés microbiennes associées aux microbialites d'Alchichica et d'Atexcac en janvier 2012. (a, b) Abondances relatives (a, nombre de séquences) vs. diversités relatives (b, nombre d'OTUs) des communautés microbiennes présentes dans les échantillons d'Atexcac et d'Alchichica en janvier 2012 (Iniesto et al., 2021) ; (c) Histogrammes des abondances relatives des communautés microbiennes des microbialites d'Alchichica associés aux images des échantillons de microbialites sur lesquels les communautés ont été prélevées (Saghāi et al., 2015). Figure modifiée de Iniesto et al. (2021) et Saghāi et al. (2015).

#### 1.4. Échantillonnage de microbialites de la zone profonde dans les lacs Alchichica et Atexcac

Dans les lacs Alchichica et Atexcac, il a été découvert récemment que des microbialites sont présentes à des profondeurs relativement élevées. Actuellement, et à notre connaissance, les microbialites les plus profondes ont été échantillonnées à 40 m dans le lac Alchichica et à 27 m dans le lac Atexcac. Lors des campagnes de terrains de 2019 et de 2022, nous avons fait

appel à des plongeurs pour collecter ces échantillons de microbialites qui constituent les objets d'étude principaux de cette thèse (cf Fig. 26).



**Figure 26.**  
Prélèvement d'un échantillon de microbialite dans le lac Atexcac en mai 2019.

### *1.5. Evaluation de la croissance des microbialites des lacs Alchichica et Atexcac*

Il est difficile d'évaluer si des microbialites sont en croissance ou non au temps de l'échantillonnage. Plusieurs critères indirects sont couramment utilisés, comme la pigmentation des biofilms ou une géochimie des solutions permettant la précipitation des carbonates. Dans les lacs Alchichica comme Atexcac, bien que les tapis microbiens ne soient pas de la même couleur en fonction de la profondeur et de l'année d'échantillonnage, ils présentaient tous une pigmentation à leur sortie de l'eau lors des campagnes de terrain de 2019 et de 2022. De plus, à toutes les profondeurs dans les deux colonnes d'eau, la solution est sursaturée vis-à-vis des carbonates de calcium/magnésium amorphes. Ces deux observations suggèrent que les microbialites de surface comme les microbialites de profondeur sont en croissance dans les lacs Alchichica et Atexcac. Pour évaluer cette croissance, ainsi que les communautés microbiennes et carbonates susceptibles de se former dans la colonne d'eau, différentes expériences de formation des microbialites ont été menées. Par exemple, il a été montré que les microbialites croissent rapidement dans des conditions de surface de ces deux lacs (~0,6 mm par an ; les nouvelles microbialites formées contiennent de l'hydromagnésite et de l'aragonite) (Iniesto et

al., 2021). De plus, des basaltes ne présentant aucun encroûtement ont été placés dans la colonne d'eau du lac Alchichica à 10, 20 et 40 m de profondeur lors de la campagne de terrain de 2022. Ils n'ont pas encore été échantillonnés, mais leur analyse au bout de deux ans dans la colonne d'eau pourra donner une idée sur la vitesse et le type de croissance des microbialites de profondeur.

## 2. Méthodes

L'étude des assemblages biofilms-phases minérales, notamment dans les microbialites, nécessite l'utilisation de nombreuses techniques. J'ai participé à l'écriture d'un chapitre de livre publié dans *Methods in Microbiology*, intitulé « Micro- and nanoscale techniques for studying biofilm-mineral interactions » (Stigliano et al., 2023, Annexes D) qui a livré une description d'une partie de cette diversité de méthodes spécifiquement appliquées aux études des interactions minéral-vivants. Nous avons entre autres passé en revue l'application à cette thématique des microscopies optiques (OCT et CLSM), électroniques (SEM, TEM, FIB), la microscopie à force atomique (AFM), l'interférométrie à balayage vertical (VSI) et les spectroscopies vibrationnelles et à rayons X. Par ailleurs, dans la liste qui suit des méthodes utilisées au cours de la thèse, plusieurs parties ont été faites avec la collaboration de différentes personnes.

### 2.1. Echantillonnage des microbialites et des solutions *in situ*

#### 2.1.1. Microbialites

Les microbialites analysées sont issues de plusieurs campagnes d'échantillonnages. Celles sur lesquelles nous nous sommes focalisés proviennent des campagnes de terrain de mai 2019 et d'octobre 2022. Ces deux séries d'échantillonnages sont tombées toutes les deux pendant la période de stratification de la colonne d'eau, mais une série a eu lieu en début de stratification (mai 2019) et l'autre en fin de stratification (octobre 2022) (*cf* Fig. 16). Dans les deux cas, des microbialites ont été prélevées sur un transect en profondeur sur les côtés nord et ouest des lacs Alchichica et Atexcac. Les microbialites ont toutes été prélevées par des plongeurs, notamment celles provenant des plus grandes profondeurs.

En 2019, des microbialites de quatre profondeurs différentes ont été échantillonnées pour Alchichica : 5, 10, 20 et 40 m, et quatre aussi pour Atexcac : 10, 16, 23 et 30 m. En 2022, les microbialites de cinq profondeurs ont été échantillonnées par les plongeurs : 3, 10, 20, 30 et 40 m pour Alchichica et trois profondeurs pour Atexcac : 10, 20 et 27 m (Fig. 16). La colonne d'eau était anoxique en-dessous de 20 m de profondeur en 2019 et en-dessous de 36 m de profondeur en 2022 à Alchichica. A Atexcac, la colonne d'eau était anoxique en-dessous de 20 m de profondeur en 2019 et en-dessous de 23 m de profondeur en 2022 (Fig. 19). Toutes ces microbialites prélevées dans la colonne d'eau ont été supposées vivantes au moment

de l'échantillonnage puisque les cellules associées à la surface des microbialites étaient fortement colorées (au moins en 2019). Au total, la campagne de terrain de 2022 a conduit à la production de 708 échantillons (en comptant tous les types d'échantillons générés). Sur le terrain, une partie des microbialites extraites de la colonne d'eau ont été séchées à l'air puis mises dans des sacs d'échantillonnage. A leur arrivée au laboratoire, elles étaient encore humides donc elles ont été ressorties à l'air libre et ont fini de sécher. Les microbialites provenant des profondeurs anoxiques lors de leur échantillonnage sur le terrain (c'est-à-dire 20 et 40 m en 2019, ~30 et 40 m de profondeur en 2022 pour Alchichica et 23 et 30 m en 2019, 27 m de profondeur en 2022 pour Atexcac) ont été remontées et séchées comme les autres à l'air libre. Des fragments de microbialites de toutes ces profondeurs ont été également fixés *in situ* immédiatement après collecte dans l'éthanol grade moléculaire (>80 % final) pour des analyses moléculaires de diversité microbienne. De retour au laboratoire, ces échantillons ont été conservés à -20 °C.

### 2.1.2. Solutions

#### *Récupération des solutions dans la colonne d'eau*

Des échantillons de la colonne d'eau ont été prélevés sur des transects en profondeur au milieu du lac à Alchichica et à Atexcac. Pour cela, une bouteille Niskin a été plongée dans l'eau depuis un bateau. La profondeur d'échantillonnage a été évaluée en utilisant des marques ajoutées sur la corde tous les mètres et vérifiée avec une montre de plongée attachée à la bouteille. En tout, en 2019, 13 échantillons ont été prélevés à Alchichica et 5 à Atexcac. En 2022, 11 échantillons ont été prélevés à Alchichica et 9 à Atexcac.

#### *Données de sondes in situ sur les colonnes d'eau*

Les mesures de profils de température ( $\pm 0,01$  °C), de pH ( $\pm 0,1$  unité de pH), d'O<sub>2</sub> ( $\pm 0,1$  mg.L<sup>-1</sup>), de conductivité (0,001 mS.cm<sup>-1</sup>), d'ORP (oxidation reduction potential,  $\pm 20$  mV), de turbidité ( $\pm 2$  % en FTU, formazine turbidity unit), de concentrations en chlorophylle a ( $\pm 0,01$  µg.L<sup>-1</sup>) et en phycocyanine ( $\pm 0,01$  µg.L<sup>-1</sup>) en profondeur ont été réalisées *in situ* à l'aide d'une sonde multiparamètres YSI Exo2.

#### *Préparation des échantillons sur le terrain*

Des échantillons ont été préparés directement sur le terrain en vue d'analyses en laboratoire. Notamment, les échantillons d'eau ont été filtrés quelques heures après leur collecte

à travers des filtres en polyéthersulfone (PES) de 0,2 µm et conservés dans des tubes stériles pour les analyses chimiques des solutions. Pour chaque profondeur, 6 ml d'eau filtrée ont été acidifiés avec de l'acide nitrique à 2 % pour l'analyse des cations. Le reste n'a pas été acidifié et a été utilisé pour les analyses des principaux anions. Pour les mesures du carbone inorganique dissous (DIC), des tubes Exetainer de 12 ml ont été remplis à ras-bord de solutions filtrées. Des échantillons de la colonne d'eau ont également été passés à travers un sweenex, ce qui a permis de récupérer la fraction particulaire sur des filtres de 0,2 µm. Ces filtres ont ensuite été posés sur des scotch carbone double-face préalablement collés sur des plots MEB. Ces préparations ont été faites pour chaque échantillon des colonnes d'Atexcac et d'Alchichica. De plus, afin d'analyser le plancton des colonnes d'eau d'Alchichica et Atexcac, cinq litres d'eau environ par profondeur ont été filtrés à l'aide d'une pompe péristaltique et récupérés sur un filtre isopore de 0,2 µm. Ensuite, les filtres ont été pliés en quatre et mis dans des cryotubes. Pour fixer les échantillons de biomasse planctonique, les tubes ont été remplis d'éthanol grade moléculaire (>80% final). Ces manipulations ont également été faites pour le lac La Preciosa afin d'analyser le plancton de la colonne d'eau et la fraction particulaire sur les filtres.

## *2.2. Analyses minéralogiques*

### *2.2.1. Analyses en bulk*

Les échantillons de microbialites ont d'abord tous été coupés à la scie sous un filet d'eau en plus petits morceaux afin de faciliter les préparations qui suivaient. Un échantillon de chaque profondeur a ensuite été broyé dans un mortier en agate.

### *Analyses chimiques au SARM*

Entre 1,5 et 2 g de poudre ont été analysés par le Service d'Analyse des Roches et Minéraux (SARM, Centre de Recherches Pétrographiques et Géochimiques, Nancy, France) pour la composition chimique bulk en éléments majeurs et mineurs. Les analyses des éléments majeurs ont été effectuées par ICP-AES sur un ICap 6500 (Thermo Fischer) après fusion alcaline des échantillons de roche suivie d'une dissolution dans HNO<sub>3</sub>. Les incertitudes se situent entre 2 % et 25 % pour les mesures des éléments majeurs et entre 5 et 20 % pour les mesures des éléments mineurs, en fonction de leurs concentrations. Les analyses bulk du carbone organique ont été réalisées après décarbonatation par H<sub>2</sub>O + HCl à 2 %, à l'aide de l'analyseur élémentaire carbone-soufre du SARM (HORIBA EMIA320V2). Les analyses bulk

du carbone total ont été effectuées sur le même analyseur en utilisant une autre partie de l'échantillon, mais sans l'étape de décarbonatation.

### *Préparation des lames minces*

Certains des échantillons de microbialites coupés à la scie ont été envoyés au laboratoire Bourgogne Lithologie de Dijon afin de préparer des lames minces de ~30 µm d'épaisseur. En 2019, des lames ont été préparées sur des microbialites de 5, 10 (x2), 20 et 40 m de profondeur pour Alchichica et de 15 et 20 m de profondeur pour Atexcac. En 2022, les lames ont été préparées sur des échantillons de 3, 10, 20, 30 et 40 (x2) m de profondeur pour Alchichica et 10, 20 et 27 m de profondeur pour Atexcac. Les échantillons ont été imprégnés dans de la résine LR-white avant d'être coupés puis polis.

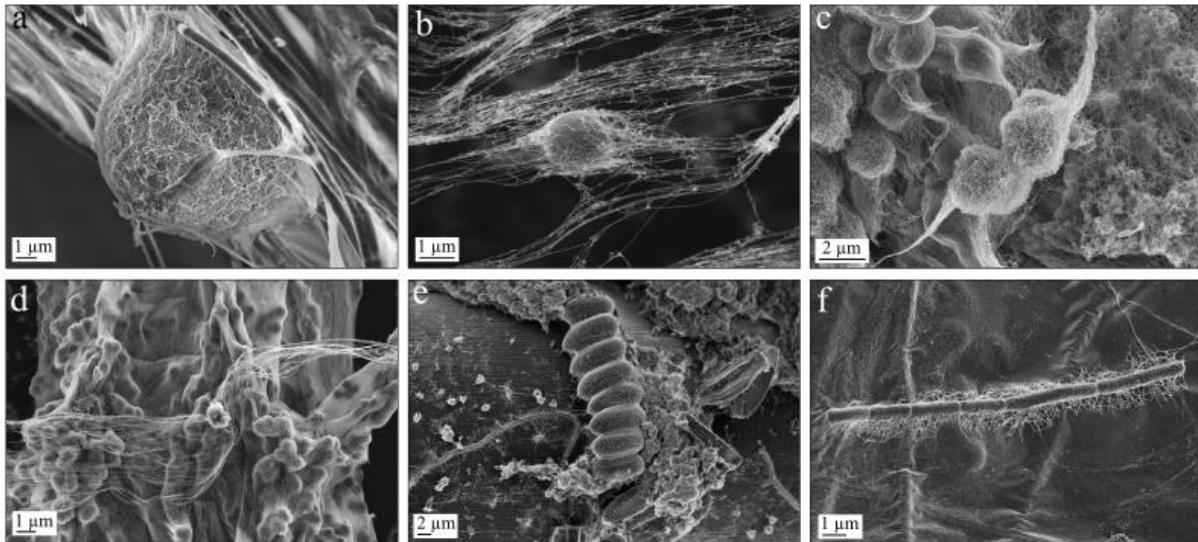
### *Préparation de sections polies pour le MEB*

Pour les observations au MEB, des sections polies épaisses (~2 à 7 mm d'épaisseur) ont été préparées à partir d'échantillons non imprégnés par de la résine. Ces sections épaisses ont été polies à l'aide d'une polisseuse mécanique EM TXP en utilisant successivement des papiers abrasifs de 15,3, 9, 3, 2 puis 0,5 µm sous un filet d'eau milli-Q. Les sections polies ont ensuite été rincées dans des bains à ultrasons avec de l'eau milli-Q. Certains échantillons des microbialites de surface qui étaient très friables ont été enrésinés suivant le protocole fourni dans le kit AGAR 100 RESIN KIT (R1031, résine epoxy). Les sections polies obtenues ont toutes été collées sur des plots MEB à l'aide de scotch carbone double face, avant d'être métallisées au carbone.

### *Préparation des échantillons de microbialites avec séchage au point critique*

Afin d'observer au MEB une structure des tapis microbiens des microbialites la mieux conservée possible, des échantillons prélevés à la surface des microbialites du lac Alchichica provenant de la mission de terrain de 2022 ont été séchés par contournement du point critique (CPD) sur un Leica EM-CPD-300 avant d'être préparés pour les observations au MEB. Le principe de cette méthode est de sécher l'échantillon, donc de remplacer le liquide par du gaz, en contournant le point critique du CO<sub>2</sub> afin de ne pas franchir la transition liquide-gaz (eau-air) qui du fait de fortes tensions de surface peut endommager les structures biologiques notamment (Fig. 27). Pour cela, les échantillons ont d'abord été trempés successivement dans des bains d'éthanol de plus en plus concentrés (30, 50, 70, 96 puis 100 %). Pour chaque bain,

les échantillons sont restés environ 10 min sur une plaque d'agitation à 125 rpm. Une fois le dernier bain passé, c'est-à-dire lorsque le liquide dans les échantillons est de l'éthanol 100 %, les échantillons sont déposés dans le support dans le portoir du CPD. La chambre contenant le portoir a ensuite été remplie aux trois quarts par de l'éthanol pur puis fermée. Une fois la bouteille de CO<sub>2</sub> ouverte, les paramètres d'échange avec le CO<sub>2</sub> ont été définis selon un programme contenant 20 cycles. Enfin, les échantillons ont été collés sur des plots MEB à l'aide d'un scotch carbone avant leur métallisation.



**Figure 27.**  
Exemples d'images MEB en Inlens (basse tension) de séchage par contournement du point critique de biofilms provenant d'aquarium en laboratoire dans lesquels ont été incubées des microbialites (a à f).

#### *Métallisation des échantillons destinés aux observations MEB*

Tous les échantillons qui ont été observés au MEB, peu conducteurs, ont été métallisés au carbone dans un Leica EM-SCD-500 afin de réduire l'accumulation des électrons à leur surface, c'est-à-dire la charge. Les plots MEB avec les échantillons ont été placés dans une cloche surmontée par une tête d'évaporation. La tête d'évaporation contenait deux électrodes entre lesquelles une tresse de carbone avait été fixée préalablement, protégée par un cache amovible. Une fois les électrodes branchées, la mise en place du vide a été lancée jusqu'à atteindre  $2 \cdot 10^{-4}$  Torr, puis un courant de 2,5 A a été appliqué entre les électrodes. Après ouverture du cache, le carbone a été déposé, puis le métalliseur a été éteint.

## FTIR

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier permet d'identifier des composants dans un échantillon en donnant leurs empreintes spectrales vibrationnelles (caractérisées par des absorptions/transmissions spécifiques des rayons infrarouges) sous formes de spectres. Classiquement, deux méthodes peuvent être utilisées : la réflexion totale atténuée (attenuated total reflectance, ATR) et la transmission. En ATR, le faisceau de rayons infrarouges est reflété en interne dans un cristal à fort indice de réfraction avec une absorption quasi-nulle (par exemple ici un diamant). Lorsque le cristal est en contact avec l'échantillon, chaque réflexion permet la production d'une onde évanescente dont l'énergie est modifiée/atténuée de manière spécifique par l'échantillon. Cette technique ne nécessite pas de préparation ni de grandes quantités d'échantillon et est indépendante de l'épaisseur, elle est donc très rapide. En transmission, on obtient des informations spectrales qualitatives sur une gamme de 400 à 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Néanmoins, elle nécessite une préparation de l'échantillon. Dans la thèse, c'est surtout la technique par transmission qui a été utilisée, en préparant des pastilles de KBr contenant les échantillons en poudre. Ces pastilles ont été faites avec ~250 mg de KBr pour 1,5 à 2 mg d'échantillon, le tout broyé dans un mortier en agate. Le mélange obtenu a été pressé deux fois de suite sous 8 tonnes pendant une minute. Puis, les pastilles ont été placées dans une étuve à 120 °C pendant 12 à 24 h. Juste avant de les mettre dans le spectromètre, les pastilles ont été de nouveau pressées sous 8 tonnes pendant une minute deux fois de suite. Les spectres en transmission et en ATR ont été enregistrés entre 400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$  avec un spectromètre Nicolet 6700 (ThermoFisher) à l'IMPMC. A chaque série d'échantillons analysée en FTIR, des mesures du « background » ont été faites et enlevées du spectre selon l'équation  $A = -\log(I/I_0)$  avec A l'absorbance, I l'intensité du faisceau après passage de l'échantillon et  $I_0$  l'intensité du faisceau incident (correspondant au background). Des spectres de contrôle du KBr pur ont été produits à chaque fois sur le KBr utilisé pour faire les pastilles et ont été soustraits des spectres des échantillons. De plus, des spectres de l'air ambiant ont été obtenus en ouvrant le couvercle du spectromètre et ont été soustraits des spectres des échantillons (avec une pondération par un coefficient) lorsque les bandes correspondant à l'eau et au  $\text{CO}_2$  étaient visibles. Par la suite, les indexations des bandes et les normalisations des spectres ont été analysées sur le logiciel Spectragryph.

## DRX

La diffraction des rayons X permet de caractériser les phases cristallines et la structure de ces phases dans un échantillon en poudre. C'est une technique non-destructive qui peut être (semi)quantitative lorsqu'on y applique la méthode Rietveld par exemple. L'échantillon est exposé à des rayons X qui sont diffusés lorsqu'ils atteignent les nuages électroniques des plans réticulaires spécifiques des réseaux cristallins présents. Ces rayons X interfèrent entre eux (diffraction, avec des interférences constructives ou destructives) dans certaines directions, ce qui modifie leur intensité. L'intensité des rayons X est récoltée sur une gamme choisie d'angles entre l'échantillon et le faisceau incident (en  $2\theta$ ), ce qui permet de remonter à la nature des phases cristallines présentes dans l'échantillon. Ici, les mesures ont été effectuées sur des échantillons en poudre à l'aide d'un diffractomètre Panalytical X'Pert Pro MPD équipé d'une anode au cobalt (Co-K $\alpha$ ) à l'IMPMC. Les gammes choisies étaient en général comprises entre 5 et 100° ( $2\theta$  [Co, K $\alpha_{1,2}$ ]) avec un mode de balayage continu. Les acquisitions de données ont été réalisées à 45 kV, 40 mA, avec des pas de 0,008°/s et un temps de comptage total de ~4h à ~8h par échantillon. Ensuite, les diffractogrammes de chaque échantillon ont été analysés à l'aide du logiciel QualX, permettant la soustraction du bruit de fond, la recherche de pics et la comparaison avec les diffractogrammes DRX de phases minérales de référence de la base de données COD (Crystallography Open Database).

### 2.2.2. Analyses en microscopie

## Optique

Toutes les lames minces des échantillons de microbialites ont été analysées à l'aide d'un microscope optique Leica DM2500P à l'IMPMC avec des objectifs x5 à x40, en lumière polarisée non analysée et/ou en lumière polarisée analysée.

## XRF

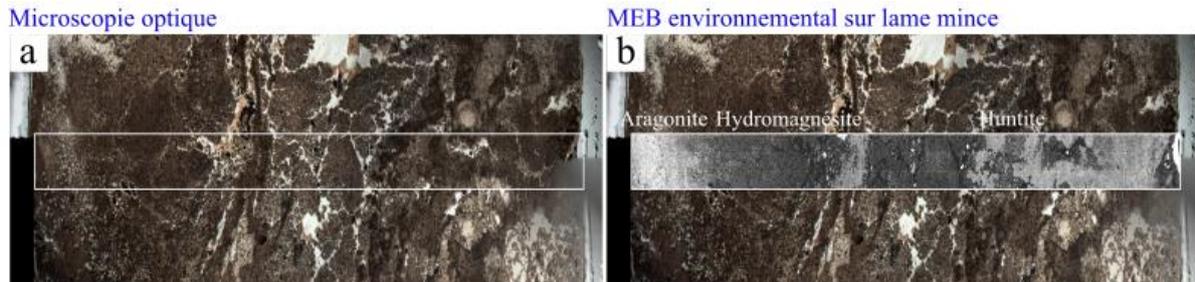
La spectrométrie de fluorescence des rayons X permet d'avoir accès à la composition chimique des échantillons pour les éléments plus lourds (ou aussi lourd) que le carbone. L'échantillon exposé aux rayons X émet en retour des photons X dont l'énergie est spécifique des éléments présents. Notamment, cette technique génère des cartographies élémentaires sur des surfaces planes comme des lames minces ou des talons de lames minces ; c'est ce qui a été utilisé ici. Dans l'ensemble, des zones de ~4 x 2,5 cm<sup>2</sup> choisies dans les lames minces de

microbialites ont été scannées avec un spectromètre  $\mu$ XRF Bruker M4 Tornado au Laboratoire Géosciences Océan à Brest et à Biogéosciences à Dijon. Des cartes élémentaires des éléments majeurs et traces ont été obtenues pour trois lames minces des échantillons de 2022 et une lame mince de l'échantillon de 40 m de profondeur collecté en 2019. Les mesures ont été réalisées sous un vide de 20 mbar, en utilisant une énergie d'excitation des rayons X de 50 kV et un courant de 600 ou 270  $\mu$ A à Brest et Dijon, respectivement. Les cartes élémentaires mesurent jusqu'à 2000 x 1500 pixels et ont été acquises pendant 4,5 heures, avec une taille de spot de 20 ou 25  $\mu$ m et un temps d'arrêt de 5 ou 10 ms par pixel à Brest et à Dijon, respectivement.

### *MEB*

La microscopie électronique à balayage permet d'obtenir des images de la surface d'un échantillon en haute résolution (jusqu'à  $\sim 1,5$  nm, due à l'utilisation d'un faisceau d'électrons dont la longueur d'onde est plus faible que celle des photons). Celui qui a été utilisé dans cette thèse est un Zeiss Ultra 55 sous un vide poussé (au minimum  $1,5 \cdot 10^{-5}$  Torr dans la chambre d'analyse) à l'IMPMC. L'échantillon est exposé à un faisceau primaire d'électrons (fournis par un canon à émission de champ FEG-Schottky) accélérés à une énergie donnée (ici les tensions d'accélération utilisées variaient entre 1 et 15 keV). Plusieurs interactions ont lieu entre les électrons et la matière de l'échantillon, dont les signaux donnent des informations différentes et sont récoltés par des détecteurs spécifiques. L'intensité des électrons secondaires, de faible énergie, a été récoltée par un détecteur Everhart Thornley ou en basse tension par un détecteur annulaire et a permis d'imager la topographie des échantillons. L'intensité des électrons rétrodiffusés a été récoltée par un détecteur 4 quadrants et renvoie un contraste différent en fonction de la densité électronique de la matière éclairée par le faisceau primaire. De plus, des rayons X sont émis lors de l'interaction entre les atomes de l'échantillon et les électrons incidents. Leur intensité, caractéristique de l'élément, est transmise à un microanalyseur EDS QUANTAX et, par spectrométrie des rayons X à dispersion d'énergie (EDXS), le spectre obtenu permet de remonter à la chimie élémentaire de la zone ciblée dans l'échantillon. Ces différents signaux sont émis simultanément mais leur détection n'a pas été faite en même temps pour tous. Par exemple, les analyses élémentaires par EDXS ont été faites dans des conditions précises, en l'occurrence ici avec une tension d'accélération de 15 keV, une distance de travail de 7,5 mm et une ouverture de 60  $\mu$ m en « high current ». Dans la thèse, une à plusieurs sections épaisses polies et non enrésinées pour chaque échantillon de microbialite ont été analysées au MEB. Plusieurs cartes élémentaires EDXS ont été semi-quantifiées via le logiciel ESPRIT (Bruker) selon la méthode Pb-ZAF (Pouchou et Pichoir, 1991).

Pour une lame mince sur laquelle nous voulions précisément déterminer la répartition spatiale des différentes phases minérales, nous avons utilisé un MEB environnemental du site Buffon permettant de ne pas métalliser la surface de la lame mince (Fig. 28).



**Figure 28.**

**Exemple d'une identification de phases sur une lame mince par l'utilisation de MEB environnemental, donc sans métallisation.** (a) Image en microscopie optique d'une lame mince d'une microbialite prélevée en 2019 à 40 m de profondeur à Alchichica ; (b) Image en MEB environnemental en électrons rétrodiffusés sur un transect de la lame mince montrée sur l'image a où plusieurs phases ont été identifiées par les différents contrastes.

### *FIB*

Le FIB (Focused Ion Beam) permet d'obtenir des coupes ultrafines de l'échantillon avec une localisation submicrométrique, afin de pouvoir les observer en microscopie électronique à transmission, grâce à l'utilisation d'un faisceau d'ions. Dans la thèse, deux coupes ultrafines ont été découpées par FIB dans un échantillon de microbialite de 40 m de profondeur prélevé en 2022. Le découpage par FIB a été réalisé avec un Zeiss Crossbeam Neon40 à l'IMPMC. La procédure d'extraction a été suivie comme décrit par Debrie et al. (2022). Une bande de platine ( $3\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ ,  $2\ \mu\text{m}$  d'épaisseur) a d'abord été déposée sur la région d'intérêt. Ensuite, un faisceau de  $\text{Ga}^+$  de 30 keV fonctionnant à environ 5 nA a été utilisé pour la coupe initiale, produisant dans un premier temps une excavation grossière des deux côtés de la zone d'intérêt de l'échantillon. L'intensité a été réduite à 1 nA dans une deuxième étape durant laquelle la zone d'intérêt a été prédécoupée juste avant d'être fixée à un micromanipulateur *in situ*. Pour la dernière étape, cette lamelle a été soudée à la grille TEM par un dépôt de platine (faisceau  $\text{Ga}^+$  fonctionnant à 20 pA) puis un amincissement supplémentaire des deux côtés de la lamelle a été réalisé avec le faisceau  $\text{Ga}^+$  fonctionnant à un courant faible et décroissant (de 500 pA à 100 pA), afin d'atteindre un état de l'échantillon transparent aux électrons ( $\sim 100\ \text{nm}$  d'épaisseur) pour les analyses MET.

## *MET*

La microscopie électronique en transmission utilise également un faisceau primaire d'électrons mais récupère ceux qui sont transmis par l'échantillon. Cette méthode permet de combiner une très haute résolution avec les détections multiples des différents signaux générés par les interactions entre les électrons et l'échantillon. Le MET a peu été utilisé pendant cette thèse, seulement pour imager des échantillons de microbialites prélevées à 40 m de profondeur à Alchichica en 2022. Les deux lamelles FIB de cet échantillon ont donc été analysées à l'aide d'un microscope électronique à transmission JEOL 2100F à l'IMPMC, fonctionnant à 200 kV et équipé d'un canon à émission de champ, d'un dispositif STEM permettant une imagerie à contraste en mode HAADF (High Angle Annular Dark Field) et d'un détecteur JEOL EDXS. Les cartes élémentaires acquises par EDXS en mode STEM ont été analysées à l'aide du logiciel JEOL analysis station. Les phases minérales ont été identifiées à l'aide de la diffraction électronique sur zone sélectionnée (SAED). Les diagrammes SAED ont été traités à l'aide du logiciel ImageJ.

## *CLSM*

La microscopie confocale à balayages laser (CLSM) permet d'obtenir des images de la fluorescence visible de l'échantillon avec une faible profondeur de champ et a l'avantage de pouvoir être utilisée sur des échantillons épais. Les échantillons peuvent être préalablement colorés avec des sondes fluorescentes, ou non (dans ce cas c'est leur autofluorescence qui est détectée, ce qui était valable pour nos échantillons). Après leur excitation par un rayonnement laser, les échantillons émettent des photons qui sont focalisés par un pinhole devant le détecteur, ce qui élimine le reste de la lumière qui ne vient pas du plan focal. Toutes les lames minces des microbialites ainsi que d'autres échantillons divers ont été analysées avec un Zeiss LSM 710 à l'IMPMC en utilisant exactement les mêmes conditions lorsqu'on voulait les comparer, c'est-à-dire en général une longueur d'onde d'excitation de 488 nm à 15 % de l'intensité maximale du laser. Les spectres d'émission ont été collectés en mode lambda dans la gamme de longueurs d'onde 400-750 nm, avec un détecteur Quasar T-PMT à 34 canaux multiples. Les données ont été traitées avec le logiciel Zen Blue (Zeiss).

## *Raman*

La spectroscopie Raman est une spectroscopie vibrationnelle, comme le FTIR, qui permet de déterminer la composition moléculaire/minéralogique de l'échantillon à une échelle

microscopique. La diffusion inélastique de la lumière (par l'effet Raman) est mesurée après excitation de l'échantillon par un rayonnement laser monochromatique focalisé sur un point précis ( $\sim 1 \mu\text{m}$ ). Le décalage entre la longueur d'onde récupérée et la longueur d'onde d'excitation (décalage Raman) est spécifique des types de vibrations des molécules dans l'échantillon, et c'est le signal de ce décalage qui est détecté sous la forme d'un spectre. Cette technique a surtout été utilisée sur des lames minces de microbialites de 40  $\mu\text{m}$  de profondeur prélevées en 2019 et en 2022 à Alchichica, à l'aide d'un spectromètre Renishaw InVia couplé à un microscope Leica DM2500 à l'IMPMC. L'objectif utilisé était surtout le x50 et l'étalonnage de l'énergie a été fait sur une lame de silicium. Les échantillons présentaient une faible autofluorescence, de sorte que la spectroscopie Raman a pu être réalisée à l'aide d'une diode laser à 785 nm. La résolution spatiale était de  $\sim 5 \mu\text{m}^2$  et le signal a été récupéré à l'aide d'un détecteur CCD RENCAM et du logiciel WIRE 4.1 de Renishaw.

### *XANES et SR-XRF*

La spectroscopie XANES (x-ray absorption near-edge structure) permet notamment d'évaluer la spéciation d'un élément chimique au sein d'un échantillon en utilisant le rayonnement synchrotron. Au cours de cette thèse, des données XANES au seuil K du soufre ont pu être obtenues sur des échantillons de microbialites prélevées à différentes profondeurs dans le lac Alchichica, au cours d'un temps de faisceau sur la ligne ID21 à l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) de Grenoble. Suite à l'exposition des échantillons à un faisceau de rayons X monochromatique et focalisé, on collecte le signal de fluorescence. En scannant le faisceau sur l'échantillon, on obtient ainsi des cartographies du signal d'émission de fluorescence (XRF) qui nous donne la distribution quantitative des éléments chimiques comme le soufre, le phosphore, le magnésium et la silice. De plus, sur un spot donné, on peut faire varier l'énergie d'excitation et mesurer l'intensité de fluorescence en fonction de l'énergie des rayons X incidents dans une gamme d'énergie proche du seuil de l'élément chimique d'intérêt (spectroscopie XANES). 88 spectres XANES au seuil K du soufre ont été produits. Ces spectres ont été acquis sous un vide de  $10^{-6}$  bars. Les rayons X ont été monochromatisés à l'aide d'un cristal Si(111). La taille du faisceau était de  $0,67 \mu\text{m} \times 0,44 \mu\text{m}$  et le flux de photons était d'environ  $10^9$ - $10^{10}$  photons. $\text{s}^{-1}$ . Une énergie autour de 2,5 keV a été utilisée pour les spectres XANES au seuil K du soufre, dans une gamme comprise entre 2,47 et 2,51 keV avec un pas de 0,25 eV. Les cartographies de fluorescence des rayons X (XRF) ont été acquises à l'aide d'un détecteur au silicium (silicon drift diode, SDD). Les cartographies de fluorescence ont été produites sans atténuateur (dwell time de 0,1 à 0,2 s). L'étalonnage de l'énergie a été

effectué sur un échantillon de référence de gypse ( $\text{CaSO}_4$ ) avec une énergie de la white line (pic intense d'absorption) à 2,482 keV. Quelques cartographies en  $\mu\text{XRF}$  du phosphore ont également été obtenues sur les mêmes zones que les cartographies du soufre. De plus, deux cartographies couplant des acquisitions en  $\mu\text{XRF}$  et des spectres XANES au seuil K du soufre pour chaque pixel ont été acquises avec un pas d'énergie de 0,1 eV sur une zone de  $98 \mu\text{m} \times 98 \mu\text{m}$  pour des sections de microbialites de 30 et 40 m de profondeur prélevées en 2022 à Alchichica.

Ensuite, les spectres XANES au seuil K du soufre ont été analysés à l'aide du logiciel Athena. Le saut de seuil de chaque spectre a été normalisé à 1 après avoir ajusté la ligne de base à zéro. Ensuite, les spectres ont tous été interprétés à l'aide d'une combinaison linéaire et d'un ajustement par déconvolution des spectres. Dans une première méthode, des spectres de référence de composés organiques et inorganiques du soufre ont été utilisés, provenant des bases de données internes ID21 ESRF et de la littérature (en particulier JcT-1 pour le CAS et organosulfate de Kajitani et al., 2023). La seconde méthode a consisté à modéliser le continuum (saut de seuil) et les différents pics du spectre par des arctangentes et des Pseudo-Voigts, respectivement. Ici, nous avons utilisé deux fonctions arctangentes pour ajuster la transition des photoélectrons éjectés (suivant la méthode décrite par Einsiedl et al., 2007). Chaque pic a été ajusté par une à plusieurs Pseudo-Voigts. Les cartographies SR-XRF acquises sur les échantillons de microbialites ont été traitées à l'aide du logiciel PyMca, avec les mêmes paramètres exactement pour pouvoir les comparer, incluant le rapport luminosité/contraste et le gain par exemple. Les histogrammes du nombre de pixels et de leur intensité ont été extraits à l'aide du logiciel ImageJ.

### 2.3. Analyses chimiques

#### 2.3.1. Fraction dissoute

Toutes les analyses chimiques des solutions des lacs Alchichica et Atexcac ont été réalisées à l'Institut de Physique du Globe de Paris. Les concentrations en cations majeurs et mineurs ( $\text{Na}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{B}^{3+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ti}^{2+}$ ) ont été mesurées par spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES). Avec cette technique, les éléments présents dans l'échantillon sont ionisés suite à leur injection dans un plasma (argon) et émettent un rayonnement électromagnétique caractéristique dont l'intensité récupérée est comparée à un étalon de concentration connue. Les concentrations des

principaux anions ( $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $NO_3^{2-}$ ,  $PO_4^{3-}$  et  $SO_4^{2-}$ ) ont été mesurées par chromatographie ionique. Les mesures de carbone inorganique dissous (DIC) ont été réalisées par spectrométrie de masse couplée à de la chromatographie gazeuse sur un Precision 2003 (GC-IRM) pour les échantillons de 2019 et 2022, selon le protocole décrit dans Assayag et al. (2006).

Par la suite, les activités des espèces chimiques, dont l'activité du  $CO_2(aq)$ , ainsi que les indices de saturation (SI) des solutions par rapport aux différentes phases minérales, ont été calculés à l'aide du logiciel PHREEQC (Parkhurst et Appelo, 2013) et de la base de données "thermoddem.dat" (Blanc et al., 2012). Les calculs des activités et des produits de solubilité ont été basés sur la méthode Hückel-Debye prenant en compte la température. Pour tous les modèles de spéciation obtenus, la balance de charge électrique était comprise entre -10 et 10 %. Le SI est défini comme le logarithme du rapport entre le produit de l'activité ionique (IAP) et la constante de solubilité ( $K_s$ ) selon la formule :  $SI = \log (IAP/K_s)$ . Les diagrammes de stabilité dans les systèmes des carbonates de calcium/magnésium ont été produits avec le logiciel GWB Community (Act2), en utilisant les paramètres physico-chimiques des lacs Alchichica et Atexcac, et les activités chimiques des espèces dissoutes définies via PHREEQC en entrées.

### 2.3.2. Fraction particulaire

Afin d'analyser la composition de la matière particulaire des colonnes d'eau des lacs Alchichica et Atexcac, des filtres quartz (Quartz Fibre Filters AQFA04700) ont été préalablement pesés au  $\mu g$  près sur une balance de précision. Après la filtration des échantillons d'eau de différentes profondeurs d'Alchichica, Atexcac et la Preciosa jusqu'à saturation des filtres sur le terrain, les filtres ont été de nouveau pesés en laboratoire sur une balance de précision afin d'obtenir la masse de la matière particulaire en fonction du volume d'eau passé. Les filtres ont ensuite été divisés en plusieurs parties afin de faire différentes analyses. Pour les analyses de la composition chimique, un quart de filtre pour chaque profondeur collectée a été pesé puis préparé en vue des analyses par ICP-AES. Pour cela, les quarts de filtres ont chacun été déposés dans de l'acide nitrique à 1 M de sorte à ce qu'ils soient complètement recouverts (~5 mL d' $HNO_3$  1M) et mis sous agitation à 125 rpm pendant une semaine environ. Une fois la coloration des filtres totalement partie, les échantillons ont été dilués avec de l'eau Milli-Q (pour atteindre une concentration finale maximum de 0,3 M de  $HNO_3$ ) avant d'être envoyés à l'IPGP pour des analyses en ICP-AES.

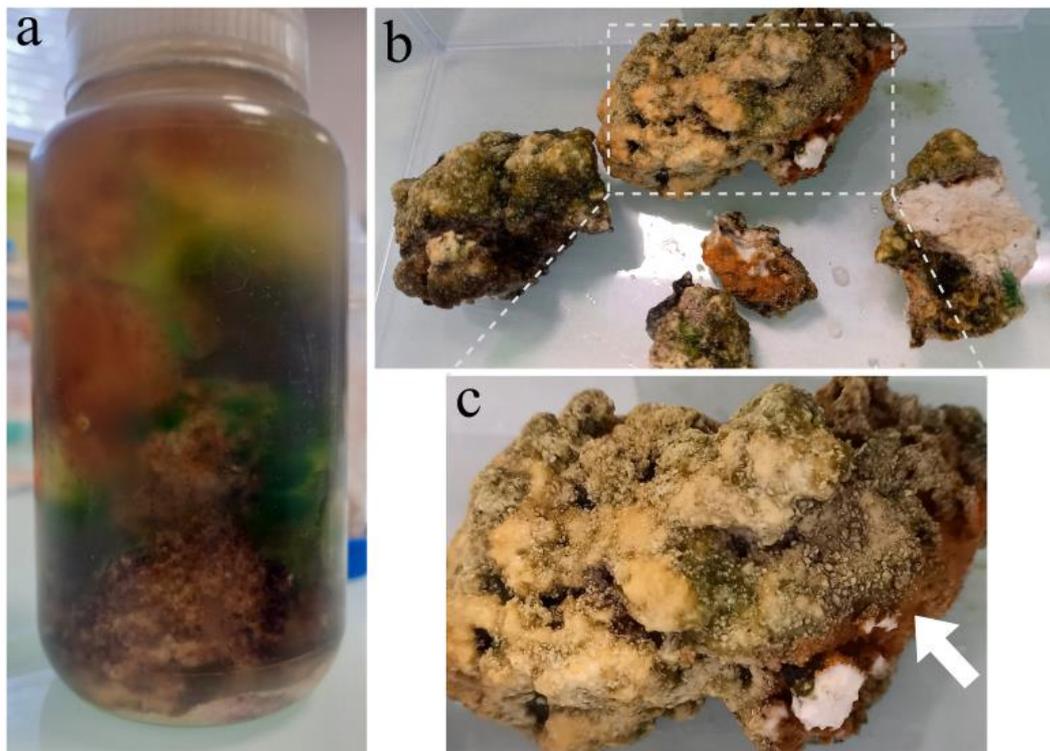
## 2.4. Analyses de la diversité microbienne

### *Mésocosmes*

Le but de cette expérience était de comparer l'évolution temporelle des compositions microbiennes des microbialites de différentes profondeurs et de différents lacs placés sous des conditions d'anoxie continue. Pour cette expérience sur le long terme, des échantillons des campagnes de terrain de 2012, 2019 et 2022 ont été utilisés. Des fragments de microbialites des lacs Alchichica et Atexcac mesurant de 2x2x2 cm à 10x10x10 cm ont été placés dans des boîtes transparentes en plexiglas sous atmosphère anoxique ( $H_2$  (10 %)- $N_2$  (85 %)- $CO_2$  (5 %)) dans une boîte à gant BagCoy à l'IDEEV. Au départ, la solution dans laquelle ont été placés les échantillons de microbialites était celle de leurs lacs respectifs. Par la suite, pour compenser les pertes en eau dues à l'évaporation et aux prélèvements, la solution ajoutée était de l'eau Volvic ( $Ca^{2+}$  à 0,29 mM,  $Mg^{2+}$  à 0,33 mM,  $Na^{2+}$  à 0,5 mM,  $K^+$  à 0,16 mM,  $SO_4^{2-}$  à 0,08 mM,  $HCO_3^-$  à 1,16 mM,  $NO_3^-$  à 0,1 mM,  $Cl^-$  à 0,38 mM et Si à 1,13 mM). En 2021, une boîte contenant des microbialites de 15 m de profondeur qui avaient été collectées en janvier 2012 dans le lac Alchichica (échantillons de Iniesto et al., 2021) et une boîte contenant des microbialites de 40 m de profondeur collectées en mai 2019 à Alchichica ont été placées dans la boîte à gants. Ces boîtes ont été placées dans des conditions de lumière naturelle (cycles jour/nuit) pendant environ un an et demi (appelés mésocosmes A). En 2022, une boîte contenant des microbialites d'une profondeur de 40 m prélevées dans le lac Alchichica en octobre 2022 et une boîte contenant des microbialites d'une profondeur de 27 m prélevées dans le lac Atexcac en octobre 2022 ont également été placées dans la boîte à gants pendant un an (appelés mésocosmes B). Des fragments des microbialites ont été prélevés dans la boîte à gants à  $t=0$ , 1, 4, 12, 15 et 21 semaines pour les deux mésocosmes B, et à  $t=0$ , 3, 9, 13, 30, 53, 59, 64, 67 et 73 semaines pour les deux mésocosmes A. Chacun des échantillons était conservé dans un tube à  $-80$  °C jusqu'à l'extraction de leur ADN. Les prélèvements à  $t=1$ , 4, 6 et 21 semaines pour les mésocosmes A ont été perdus.

### Enrichissements

Afin de mieux caractériser les espèces microbiennes qui sont actives dans les microbialites de profondeurs saisonnièrement anoxiques et qui pourraient contribuer à leur formation, l'idée ici était d'enrichir certains organismes provenant d'une microbialite déjà acclimatée à l'anoxie saisonnière. En l'occurrence, nous avons choisi un échantillon de tapis microbien d'une microbialite prélevée à 40 m de profondeur dans le lac Alchichica en mai 2019 et qui présentait une couleur rouge distincte (Fig. 29).



**Figure 29.**

**Tapis microbien associé à un échantillon de microbialite de 40 m de profondeur du lac Alchichica.** (a) Bouteille contenant les échantillons en anoxie, avec le tapis microbien rouge visible ; (b) Échantillons utilisés pour inoculer les milieux d'enrichissement, sur lesquels et autour desquels se sont développés les tapis microbiens rouges visibles sur l'image a ; (c) Vue de près de l'échantillon avec le tapis microbien rouge (flèche blanche).

Cet échantillon avait été stocké dans un tube Falcon fermé par un septum à température ambiante. Pour faire ces enrichissements, quatre milieux de cultures minéraux différents ont été choisis afin d'essayer de couvrir les conditions de croissance d'une gamme de phototrophes anoxygéniques potentielles. Ces milieux de culture adaptés aux bactéries photosynthétiques ont été préparés en version solide (contenant 2% agarose) en triplicat dans des boîtes de Pétri : le milieu BG11 classiquement utilisé pour la culture des cyanobactéries, le BG11 supplémenté avec des microbialites broyées et autoclavées (BG11mb), un milieu spécifique pour les

bactéries de type *Chromatium* (Chrom, Schmidt and Kamen, 1970) et un milieu spécifique pour les *Chloroflexi* (Chlor, Zheng et al., 2021). Cinq microlitres du tapis microbien de départ ont été prélevés et inoculés dans chaque boîte de Pétri contenant les milieux préalablement préparés. Les boîtes de Pétri ont ensuite été scellées avec du parafilm et stockées dans la boîte à gants avec des cycles jour/nuit (12h – 12h). Par la suite, les phénotypes des micro-organismes dont les colonies différaient visuellement les unes des autres ont été identifiés par microscopie optique. Les boîtes de Petri BG11, BG11mb, Chrom et Chlor dans lesquelles les premières colonies sont apparues après onze mois ont été ouvertes dans la boîte à gants. Pour chaque morphotype identifié, la biomasse d'une colonie isolée a été transplantée dans une nouvelle boîte du même milieu. Les organismes restants de ces colonies ont été transférés dans des tubes de 0,5 ml contenant du Tris (10 mM) pour l'amplification des fragments du gène marqueur de l'ADNr 16S et leur séquençage par la méthode Sanger. Dans l'ensemble, entre quatre et six repiquages ont été faits par morphotype afin de les isoler, même si, dans les boîtes de Pétri à la fin les cultures n'étaient pas forcément axéniques.

#### *Extraction de l'ADN*

L'ADN a été extrait sous hotte avec le kit POWER Soil pour des échantillons de microbialites et des échantillons de plancton collectés sur des filtres. Tous ces échantillons ont été conservés à -80 °C (dans des tubes Falcon pour les microbialites et cryotubes pour les filtres avec le plancton) jusqu'à leur décongélation juste avant l'extraction d'ADN. Pour les fragments de microbialites, ils ont été broyés sous hotte dans des mortiers en agate lavés à l'eau puis l'éthanol entre chaque utilisation. Pour les filtres contenant le plancton, ils ont d'abord été coupés en deux et séparés en deux tubes d'extraction sous la hotte. Dans ces tubes, chaque moitié de filtre a été coupée en petits morceaux avec des ciseaux stérilisés préalablement. Pour récupérer toute la biomasse détachée des filtres, les cryotubes qui contenaient les filtres dans l'éthanol avant leur transfert dans les tubes d'extraction ont été centrifugés. Le surnageant d'éthanol a été vidé et le culot a été récupéré et remis en suspensions dans le tube d'extraction contenant les filtres en morceaux. Une fois les échantillons de microbialites et les filtres broyés dans les tubes contenant des billes et le tampon, ils ont été mis en agitation sur une plaque tournante à 4 °C pendant une nuit.

Afin de déstabiliser les membranes des cellules, chaque tube d'extraction a subi trois cycles de chocs thermiques, c'est-à-dire qu'ils ont été trempés successivement dans des bains

d'azote liquide puis des bains marie à 67 °C pendant 5 min pour chacun des bains. Ensuite, le protocole fourni par le kit a été suivi, avec quelques variations :

(i) 60 µL de la solution C1 après passage au bain marie à 60 °C ont été ajoutés dans chaque tube d'extraction. Les tubes ont été vortexés 25 min à 1000 rpm puis centrifugés 1 min à 12000 rpm à température ambiante.

(ii) Le surnageant (au moins 500 µL) a été transféré dans un tube de 2 mL fourni, 250 µL de tampon C2 ont été ajoutés puis ils ont été vortexés 5 s (le passage au vortex a été fait pour chaque tube tout de suite après l'ajout du tampon C2, pas après la série entière). Tout de suite après l'ajout du tampon C2 et le passage au vortex, les échantillons ont été incubés à 4°C (au réfrigérateur et toujours dans la glace) pendant 5 min. Puis les tubes ont été centrifugés à température ambiante pendant 1 min, à 12000 rpm.

(iii) 600 µL du surnageant ont été transférés dans un autre tube de 2 mL, puis 200 µL de la solution C3 ont été ajoutés, avant de vortexer (comme pour l'étape ii le vortex tout de suite après l'ajout de la solution, pas après la série entière) et d'incuber à 4 °C pendant 5 min. Les tubes ont été centrifugés à température ambiante pendant 1 min à 12000 rpm.

(iv) Au maximum 750 µL du surnageant ont été transférés dans un tube de 2 mL pour chaque échantillon. Deux fois 595 µL de solution C4 ont été ajoutés (après que la solution ait été secouée) et les échantillons ont été retournés plusieurs fois sur leur portoir.

(v) Cette préparation a été passée dans une colonne en trois fois : à chaque fois, environ 700 µL ont été transférés dans la colonne et centrifugés pendant 1 min. Le tube sous la colonne a été vidé entre chaque passage. Une centrifugation courte a été faite à la troisième fois pour récupérer le maximum d'ADN.

(vi) 500 µL de tampon C5 ont été ajoutés dans les colonnes, puis ces dernières ont été centrifugées pendant 30 s à 12000 rpm. Les tubes sous les colonnes ont été vidés avant une autre centrifugation pendant 1 min à 12000 rpm. Chaque colonne a été posée sur un tube de 2 mL et a été mise à sécher pendant 10 min, bouchon ouvert (les tubes étaient couverts et les gouttes sur le bord de la colonne ont été éliminées) pour éliminer l'éthanol résiduel du tampon de lavage.

(vii) Enfin, 50 µL du tampon C6 (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) préalablement chauffé à ~60 °C ont été ajoutés dans les colonnes. Après 2 minutes à température ambiante, les colonnes

ont été centrifugées 30 s à 12000 rpm. Ensuite de nouveau 50 µL du tampon C6 ont été ajoutés avant une attente de 2 minutes puis centrifugation pendant 30 s. Après ces éluions, la colonne a été jetés et les tubes contenant l'ADN récupérés.

### Clonage

Afin d'obtenir des séquences individuelles pour chaque organisme, les amplicons d'ADNr 16S de certains morphotypes enrichis dans des cultures qui n'étaient pas axéniques, ont été clonés. Le principe est d'insérer un fragment d'ADN dans un hôte (ici *E. coli*) via un vecteur (plasmide) afin de récupérer des copies de cet ADN et de les séparer (chaque colonie portant un plasmide d'un seul type après transformation). Pour cela, des milieux LB-Agar ont été autoclavés (12,8 g de LB-Agar en poudre pour 400 mL d'eau désionisée) auxquels ont été rajoutés 400 µL d'ampicilline (à 100 mg/mL) après l'autoclavage. Ces milieux ont été versés dans des boîtes de Pétri et ont polymérisé pendant une nuit. Après une décongélation des milieux X Gal qui permettent de détecter les inserts dans les plasmides (s'il y a un insert d'ADN étranger dans le gène *lacZ* du plasmide, celui-ci ne produit plus de β-galactosidase transformant le X-galactose en sous-produits de couleur bleue, donc les colonies transformées et contenant l'insert restent blanches), 40 µL de ces milieux ont été ajoutés par boîte. Pour tous les clonages, nous avons utilisé le kit TOPO TA Cloning et une transformation chimique. La réaction de ligation de l'amplicon d'ADNr 16S dans le vecteur linéarisé contenait le produit de PCR (en quantité déterminée empiriquement, 1.5 µL dans notre cas), le vecteur (0.5 µL) et un mélange de sels (0.5 µL) fournis par le kit, le tout ajusté avec l'eau ultrapure à 3 µL. Pendant 30 min, les tubes ont été laissés à température ambiante afin de favoriser la ligation des inserts dans les plasmides. Ensuite, les 3 µL ont été déposés et mélangés dans un tube de cellules compétentes d'*E. coli* (perméabilisées afin d'améliorer leur transformation par de l'ADN du plasmide recombinant, et qui avaient été sorties du congélateur à -80 °C 10 min avant), dans la glace. Ces tubes ont été laissés 30 min sur la glace pour favoriser la diffusion des plasmides et leur attachement à la surface cellulaire. Pendant ce temps, les milieux SOC pour la culture d'*E. coli* qui maximisent son efficacité de transformation ont été décongelés. L'étape de transformation par heat-shock permettant aux plasmides d'entrer dans les cellules compétentes a été faite avec un passage de 30 s des tubes dans un bain-marie à 42 °C suivi de 10 min dans la glace. Ensuite, 250 µL du milieu SOC ont été ajoutés dans chaque tube, et tous les tubes ont été mis à agiter à 37 °C pendant 1 h à 220 rpm. Puis les échantillons de ces tubes ont été étalés sur les milieux des boîtes de Pétri, c'est-à-dire dans des milieux contenant du LB-Agar, de l'ampicilline (pour la sélection des cellules contenant les plasmides, donc résistantes à l'ampicilline) et du SOC+X-

Gal (pour la sélection des cellules contenant les plasmides avec inserts qui empêchent l'opéron LacZ de s'exprimer et deviennent blanches). Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant une nuit. Les colonies avec une couleur blanche ont été sélectionnées et conservées dans du Tris à 10 mM autoclavé jusqu'à leur lyse et leur centrifugation pendant 30 s à 10000 rpm en vue des PCR pour amplifier l'insert cloné.

### *Amplification de l'ADN par PCR*

Les PCR permettent d'amplifier en chaîne des séquences ciblées d'ADN (grâce à des amorces) via l'utilisation de l'ADN polymérase. Au cours de la thèse, toutes les amplifications n'ont pas été faites exactement de la même manière. Par exemple, à cause de contaminations, certaines ont nécessité l'utilisation de dNase+DTT. De même, en fonction des étapes suivantes de séquençage et des échantillons, plusieurs couples d'amorces ont été utilisés (tableau 2):

<b>Amorce</b>	<b>Séquence</b>
B27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
U515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
CYA106F	CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA
Ar109F	AC(G/T)GCTGCTCAGTAACACGT
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT
CYA1380R	TAACGACTTCGGGCGTGACC

**Tableau 2.**  
**Séquences des amorces utilisées lors des différentes amplifications d'ADN.**

(i) Pour le métabarcoding d'amplicons du gène d'ARNr 16S, 2 couples universels également : U515F et 1492R et B27F et 1492R

(ii) B27F et 1492R pour les bactéries de manière générale (pour les échantillons qui ont été clonés)

(iii) CYA106F et CYA1380R plus spécifiquement pour les cyanobactéries (pour les échantillons issus des enrichissements, dont ceux qui ont été clonés)

(iv) Ar109F et 1492R spécifiquement pour les Archées (sur les échantillons issus des enrichissements, mais cela n'a rien donné)

De manière générale, la préparation utilisée pour les PCR, appelée Mastermix, suivait le mélange suivant : pour 50 réactions de PCR, 950  $\mu\text{L}$  d'eau, 125  $\mu\text{L}$  de tampon, 37,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  et 25  $\mu\text{L}$  de dNTPs. Puis, pour une réaction de PCR, les solutions préparées contenaient 22,75  $\mu\text{L}$  de la solution Mastermix, 1  $\mu\text{L}$  (à 10  $\mu\text{M}$ ) de l'amorce forward (F), 1  $\mu\text{L}$  (à 10  $\mu\text{M}$ ) de l'amorce reverse (R) et 0,2  $\mu\text{L}$  de la polymérase Taq (+ ou - 0,63  $\mu\text{L}$  de DNase et 0,63  $\mu\text{L}$  de DTT pour la décontamination potentielle de traces d'ADN exogène). Pour les échantillons issus du clonage, le mélange de la solution Mastermix était différent : pour 48 réactions, 780  $\mu\text{L}$  d'eau, 200  $\mu\text{L}$  de tampon, 20  $\mu\text{L}$  de dNTPs, 4  $\mu\text{L}$  de l'amorce F à 100  $\mu\text{M}$  (T7), 4  $\mu\text{L}$  l'amorce R à 100  $\mu\text{M}$  (M13) et 5  $\mu\text{L}$  de la polymérase Go-Taq ont été utilisés. Entre 2 et 5  $\mu\text{L}$  par tube des solutions des ADN des échantillons étaient ajoutés. Les réactions de PCR ont été faites dans l'ensemble en utilisant un programme de thermocycleur avec 2 min de dénaturation de l'ADN à 94 °C suivis de 35 cycles (chacun de 30 s à 94 °C, 45 s à 58 °C, 90 s à 72 °C). Pour les échantillons à faible biomasse nécessitant une décontamination éventuelle, les préparations des solutions ont en plus été faites sous une hotte avec UV. Les cycles utilisés étaient légèrement différents pour les PCR. La préparation des gels pour l'électrophorèse se faisait en général avec 0,4 g d'agarose pour 40 mL du tampon TAE. Ensuite, entre 0,5 et 3  $\mu\text{L}$  d'échantillon ont été mis dans les puits. Des contrôles négatifs avec uniquement la solution ajoutée aux échantillon et/ou avec la solution ajoutée aux échantillons et les amorces ont été faits à chaque PCR.

### *Purification*

En vue du séquençage ultérieur, les solutions contenant les amplicons obtenus pour les échantillons de microbialites et de plancton du Mexique 2022 ont été purifiées avec le kit Qiagen (QIAquick) en suivant les instructions du fournisseur. Les échantillons ont été maintenus sur la glace et les centrifugations ont été faites à 13000 rpm, à température ambiante. Pour cela, avec un tube et une colonne par échantillon, 24  $\mu\text{L}$  d'éthanol à 100 % ont été ajoutés dans les échantillons. Pour un volume d'échantillon obtenu par PCR, 5 volumes de tampon PB ont été ajoutés et vortexés. Les échantillons ont été transférés dans les colonnes posées sur des tubes de 2 mL, puis centrifugés pendant 1 min. Le liquide restant a été jeté. 750  $\mu\text{L}$  de tampon PE ont été ajoutés puis les échantillons ont de nouveau été centrifugés pendant 1 min, deux fois, en vidant le liquide restant entre les deux centrifugations. Chaque colonne a été placée dans un tube propre en enlevant toutes les gouttes d'éthanol restant et laissée à sécher 10 min sur la paille, couverte. Ensuite, 30  $\mu\text{L}$  de tampon d'élution (EB, 10 mM Tris, pH 8.0) ont été ajoutés avant une centrifugation pendant 1 min, puis 20  $\mu\text{L}$  du même tampon EB ont été ajoutés. Après 1 min à sécher sur la paille, les tubes avec les colonnes ont de nouveau été centrifugés

pendant 1 min puis la colonne a été jetée et le tube contenant les amplicons purifiés a été conservé.

### *Séquençage Sanger*

Le séquençage par la méthode Sanger permet de déterminer avec fiabilité la séquence nucléotidique de l'ADN des fragments allant jusqu'à environ 800-1000 pb. Le séquençage des brins complémentaires qui se chevauchent permet de déterminer des séquences plus longues, compatibles avec la longueur de séquence des amplicons les plus longs que nous avons produits. Il se fait d'abord via des PCR contenant des dNTPs modifiés (souvent avec un marqueur fluorescent) intégrés aléatoirement aux séquences lors de l'étape d'élongation. Ces dNTPs permettent de stopper l'élongation du brin par l'ADN polymérase, ce qui génère statistiquement des fragments d'ADN de toutes les longueurs possibles entre 1 pb et la taille en pb de la séquence d'ADN ciblée. Ensuite une électrophorèse capillaire sépare ces fragments par taille et permet la reconstruction de la séquence entière via la lecture de la fluorescence associée à chaque bande du gel, de la plus petite à la plus large. Dans notre cas, nous avons pu obtenir des séquences de bonne qualité, après assemblage, de jusqu'à environ 1500 pb (la taille des amplicons les plus longs) pour certains échantillons.

Les échantillons séquencés par la méthode Sanger au cours de cette thèse ont été envoyés au service de séquençage Genewiz de Azenta, soit dans des tubes individuels, soit dans des plaques de 96 puits dans le cas des échantillons issus du clonage.

### *Séquençage Nanopore*

Le séquençage par Nanopore repose sur l'application d'une différence de potentiel de part et d'autre d'un pore biologique ou artificiel comme des membranes de nitrure de silicium poussant les brins à passer à l'intérieur (ici flow-cells R10 utilisés). En théorie le passage de la séquence d'ADN par le pore permet sa lecture en mesurant le courant ionique à l'intérieur du pore qui diffère spécifiquement selon le nucléotide traversant.

Ici, les séquençages ont été faits en utilisant le kit de ligation V14 (SQK-LSK114) à l'ESE, permettant en théorie une précision de lecture des séquences de plus de 99 % (score de qualité phred de Q20). Dans la pratique, les résultats obtenus étaient de moins bonne qualité avec un score phred au maximum de Q18 et en moyen de Q13. Le basecalling a été fait en simplex (permettant d'éviter la formation de chimères pour les 16S dans le cas d'un basecalling

en duplex, c'est-à-dire la lecture des doubles brins). Ces données n'autorisent donc pas des assignations précises au-delà du genre, mais sont suffisantes pour estimer l'assemblage microbien général des échantillons.

Au préalable, les échantillons ont été marqués spécifiquement par une petite séquence appelée MID (molecular identifier) permettant de les distinguer des autres une fois tous les échantillons multiplexés. Dans un premier temps, les proportions d'ADN dans chaque échantillon doivent être équivalentes. Pour cela, nous avons mesuré en utilisant une machine qPCR les quantités d'ADN des différents amplicons sur plaque à l'aide d'une gamme de fluorescence faite avec des étalons contenant 0, 2, 4, 8 et 10 ng d'ADN. Une fois de nouveaux tubes préparés avec des quantités d'ADN équimolaires de l'ensemble de tous les amplicons, les échantillons ont été purifiés. Pour cette étape, de l'éthanol a été ajouté sur les échantillons et ceux-ci ont été placés dans des tubes contenant des billes magnétiques au-dessus d'un barreau aimanté. L'ADN n'étant pas soluble dans l'éthanol, il s'agrège au niveau des billes, ce qui permet d'enlever le surnageant contenant les potentielles impuretés. Une fois cela fait, l'ADN a été resolubilisé dans de l'eau et les échantillons ont été récupérés. De nouveau, la quantité d'ADN a été mesurée afin qu'elle soit équivalente dans tous les échantillons. Pour le protocole proposé par le kit, les doses d'ADN demandées étaient de 200 fmol dans 50  $\mu$ L ; les volumes ont donc été ajustés en fonction de la concentration d'ADN voulue.

Ensuite, chaque étape du protocole V14 (SQK-LSK114) a été suivie, à la différence d'un ajout de 100  $\mu$ L de billes (beads) à l'étape 9 au lieu des 40  $\mu$ L indiqués. L'ADN des échantillons a été de nouveau quantifié en utilisant le Qubit par fluorimétrie, et des électrophorèses ont permis de vérifier que les bonnes longueurs d'ADN avaient été récupérées.

Lors de la première étape de séquençage pour laquelle la Flow Cell permettant le passage des brins d'ADN dans les pores est amorcée, les bibliothèques ont été préparées. Cette étape permet de convertir les échantillons en molécules identifiables par la Flow Cell et à l'ADN d'y adhérer par ligation. Par la suite, le séquençage a été lancé.

### *Traitement des données brutes*

L'étape de séquençage dure plusieurs heures à jours et consiste à récupérer le signal électrique produit par la perturbation du courant lors du passage de la molécule à travers le nanopore. Un algorithme du logiciel MinKNOW détecte ce signal lors de l'étape appelée basecalling. Les séquences d'ADN peuvent être lues avec un basecalling en simplex (un brin)

et en duplex (double brin). Même si le basecalling en duplex permet la lecture du brin complémentaire tout de suite après le basecalling en simplex, et augmente en théorie la précision de la lecture (effectué par le logiciel Dorado), dans le cas du séquençage d'amplicons de gènes d'ARNr 16S, le risque de créer des chimères du fait de la lecture d'un brin complémentaire d'un autre amplicon (dû au haut niveau de conservation de ce marqueur) est élevé. Nous pratiquons donc un basecalling en simplex. Les séquences obtenues avaient un Q score moyen de 18,04 pour une longueur moyenne de ~900 pb (donnés par le logiciel NanoPlot). Les séquences de basse qualité et les potentielles chimères informatiques sont éliminées grâce à des scripts codés en perl ad hoc.

Une fois les séquences obtenues avec un score de qualité de lecture pour chacune, elles ont dû être assignées à l'échantillon d'origine (distinction par le MID ajouté lors des PCR), et séparées en plusieurs groupes représentant ces échantillons (étape de démultiplexing). Pour cela, les séquences ont été mises à la même orientation puis triées selon leur MID et filtrées par longueur. Puis ces MID ont été enlevés des séquences une fois celles-ci associées aux échantillons.

Ensuite, les séquences ont été regroupées en fonction de leurs ressemblances par une approche de clustering. Pour cela, des séquences sont regroupées par taux de similarité nucléotidique, et un représentant de chaque groupe est choisi (la séquence représentative utilisées comme « barcode »). Ici, le regroupement a été fait avec un taux de similarité à 100 % afin de ne pas choisir la séquence de consensus en fonction de sa taille mais en fonction de son abondance dans l'échantillon. Seulement 0,6 % des séquences ont été regroupées par cette méthode (on peut les considérer comme des « vraies séquences » car obtenues en version identique à plusieurs reprises), ce qui laisse 99,4 % de séquences seules, pas en multicopie strictement identique (singletons). Un deuxième regroupement a alors été fait à 95 %, que l'on considère ici comme des unités taxonomiques opérationnelles (OTUs, operational taxonomic units). Ces deux regroupements ont été comparés via un script permettant de savoir si les séquences « vraies » regroupées à 100% étaient retrouvées dans les séquences du regroupement à 95 %. Dans ce cas, ces séquences ont été mises à part dans un fichier au format fasta en tant que séquences représentatives. Dans le cas contraire, soit les groupes contenaient trois séquences ou moins, et alors le représentant a été sélectionné en fonction du Q score le plus élevé, soit les groupes contenaient plus de trois séquences, et dans ce cas une séquence consensus devait être générée. A la fin, les séquences consensus générées à partir du regroupement à 95 % ont été utilisées comme séquences représentatives de l'OTU également

(après avoir vérifié que la distribution de leurs taxonomies à l'échelle de l'ordre était similaire à celle des « vraies » séquences).

Enfin, une fois les séquences représentatives des échantillons regroupées dans un fichier fasta, elles ont été assignées à une taxonomie grâce au pipeline SINA SILVA. Cet algorithme compare avec un taux de similarité à 99 % les séquences représentatives de nos échantillons avec des séquences de bonne qualité connues contenues dans la base de données d'ARNr 16S SILVA (Quast et al., 2013). A partir de cette assignation taxonomique pour les procaryotes, une matrice des séquences en fonction des échantillons contenant le nombre d'OTUs pour chaque échantillon a été générée. Le niveau de détail de la classification taxonomique pour chaque séquence dépendant de la qualité ou de la divergence réelle de lecture lors du séquençage, certaines assignations n'allaient pas au-delà de la classe. D'autres allaient jusqu'au niveau du genre et de l'espèce, mais nos séquences étant plus divergentes, en général, nous avons considéré la classification à partir de l'ordre ou famille (ce qui reste suffisant pour estimer les variations taxonomiques à grande échelle pour des échantillons environnementaux). Les séquences correspondant à des chloroplastes ou à des mitochondries, qui témoignent de la présence d'eucaryotes, ont été enlevées de la matrice des données procaryotes. Les histogrammes de l'abondance relative (évaluée au nombre relatif/fréquence de séquences) vs. de la diversité (évaluée au nombre relatif/fréquence d'OTUs) ont été produits à partir de la matrice générale.

### *Blast et arbres phylogénétiques*

Pour les séquençages Sanger, les qualités des séquences obtenues ont été visualisées à l'aide du logiciel Ugene et les assignations initiales ont été faites par BLAST. Cet outil compare les séquences obtenues à celles de la base de données non-redondante de GenBank (NCBI) et permet d'assigner à la séquence le taxon le plus proche par similarité dans cette base de données (blast hit). Dans le cas de nos séquences, les blast hits correspondaient à des séquences présentes dans la base de données GenBank à plus de 98 % en général (même genre/espèce). Pour une assignation approfondie, nos séquences ont été alignées entre elles et avec des séquences de référence et les meilleurs blast hits en utilisant le programme MAFFT en ligne (Kato et al., 2019). Les arbres phylogénétiques qui ont permis de catégoriser les enrichissements faits en boîte à gant ont été inférés à partir des alignements de nos séquences sur celles choisies dans les articles de Couradeau et al. (2011) ou de Williams et Kelly (2013) notamment. A partir de cet alignement, nous avons reconstruit des arbres phylogénétiques par maximum de

vraisemblance avec le programme FastTree. Cette approche repose sur un modèle d'évolution probabiliste d'évolution de séquence. Enfin, les arbres phylogénétiques ont visualisés avec le logiciel FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

### *Analyses statistiques multivariées*

Plusieurs analyses statistiques multivariées ont été utilisées dans cette thèse. Elles ont été faites à l'aide du logiciel Rstudio. Les analyses en composantes principales donnent une représentation des principaux axes expliquant la variance des échantillons de manière quantitative. Ces analyses sont utilisées sur des jeux de données multidimensionnels. Ici, des analyses en composantes principales ont été utilisées sur des données physico-chimiques de solutions aqueuses contenant ou non des microbialites (chapitre 1). Des analyses de proximité non-métriques (non metric multidimensional scaling, NMDS) ont également été produites sur les données de diversité microbienne. Ces analyses permettent également de distinguer les principales causes de variance dans un jeu de données, mais de manière non paramétrique. Le jeu de données peut contenir des variables quantitatives et/ou qualitatives. Pour les données de diversité microbienne, les analyses par NMDS se sont basées sur des mesures de dissimilarités appelées distances de Bray-Curtis qui sont adaptées à des analyses d'abondances d'espèces.



# **Chapitre I. Conditions géochimiques de formation des microbialites actuelles**

## 1. Introduction

De nombreux travaux ont décrit des microbialites et leur environnement de formation au cas par cas. Comme il est nécessaire de comprendre les relations qui existent entre minéralogie, microbiologie et géochimie pour analyser les systèmes complexes formés par les microbialites, de plus en plus d'analyses couplent ces approches, notamment en reliant les compositions microbiennes aux compositions minéralogiques et/ou les compositions minéralogiques aux paramètres physico-chimiques du milieu (Couradeau et al., 2013 ; Gérard et al., 2013 ; Couradeau et al., 2015 ; Dupraz et al., 2009).

Le nombre de ces études et des approches utilisées atteste des diversités minéralogiques, microbiennes et physico-chimiques qui caractérisent ces objets. Par exemple, les microbialites peuvent être constituées par un nombre important de phases minérales allant des carbonates (aragonite, calcite, hydromagnésite, magnésite, monohydrocalcite, dolomite, huntite) aux silicates (*e.g.* silicates de magnésium comme la kérolite ou la stévensite). Actuellement, le système des carbonates est le plus largement répandu au sein des microbialites. Plusieurs études approchent la complexité minéralogique de ces phases minérales dans les microbialites en s'appuyant sur leur composition chimique et/ou leur texture (Dupraz et al., 2011 ; Zeyen et al., 2015 ; Planavsky et Ginsburg, 2009 ; Sprachta et al., 2001 ; Lencina et al., 2022). De nombreux articles s'attachent également à analyser les diversités taxonomiques et fonctionnelles des communautés microbiennes de microbialites (White et al., 2016 ; Iniesto et al., 2021 ; Saghāi et al., 2015 ; Bosak et al., 2012 ; Kanik et al., 2020 ; Águila et al., 2020 ; Bellanger et al., 2023) Même si dans l'ensemble les photosynthèses (oxygénique et/ou anoxygénique) utilisées par les cyanobactéries sont très largement répandues et impliquées dans la carbonatogenèse, ces études soulignent aussi la diversité biologique des microbialites (Bosak et al., 2007). Enfin, une très large gamme d'environnements de formation a été décrite, que ce soit en termes de salinité, de climat, de géologie du substratum, de physico-chimie de la solution (Rishworth et al., 2020 ; Centeno et al., 2012 ; Camoin et Gautret, 2006).

Là encore, ces travaux se sont souvent focalisés sur des microbialites en particulier appartenant à un environnement précis. Si, à l'échelle locale, ils permettent de mieux interpréter la composition du système, il reste difficile d'avoir une vue d'ensemble de leur diversité dans le monde. De plus, l'origine de ces diversités (minéralogique, environnementale, microbienne) interroge. Par exemple, qui de la diversité environnementale ou microbienne contrôle la diversité minéralogique ? Enfin, derrière ces diversités, existe-t-il des processus communs ?

Existe-t-il des conditions environnementales ou géochimiques nécessaires pour la formation des microbialites quels que soient par ailleurs les attributs de ces dernières ? Dans ce contexte, certaines études comparatives ont synthétisé des données existantes sur un ensemble de microbialites provenant de différents endroits (Chagas et al., 2016 ; White, 2020 ; Zeyen, 2016 (thèse) ; Suarez-Gonzalez et al., 2019). Ces études ont décrit les corrélations existantes entre certains des paramètres physico-chimiques comme la salinité et/ou l'alcalinité de systèmes de microbialites lacustres en général (Chagas et al., 2016 ; Zeyen et al., 2021). Par exemple, Zeyen et al. (2021) ont analysé une série de lacs de cratères de volcan du Mexique dont 9 abritaient des microbialites et un n'en abritait pas. Ils ont montré que ces différents lacs, même s'ils étaient tous situés dans un contexte géologique plus ou moins similaire (le bassin versant de certains contenait des dépôts carbonatés Mésozoïque, d'autres non), montraient une diversité de compositions chimiques. Notamment, ces auteurs ont montré l'existence d'un gradient d'alcalinité carbonatée formé par cette série de lacs, qu'ils ont expliqué comme le résultat de degrés d'évaporation différents et/ou d'intensité d'altération du substratum géologique différente. De manière intéressante, ils ont aussi proposé qu'une valeur d'alcalinité minimale était nécessaire pour la formation des microbialites et que plus l'alcalinité était élevée, plus les microbialites étaient massives. Cette variation d'alcalinité était de plus corrélée à une variation du rapport Mg/Ca dans les solutions, paramètre clé contrôlant la nature des phases carbonatées composant les microbialites. Ainsi à de bas Mg/Ca, on observe des microbialites composées principalement de calcite. Puis à des valeurs croissantes, de la calcite magnésienne, puis de l'aragonite et de l'hydromagnésite. Enfin, ils ont aussi observé que les lacs mexicains où se forment les microbialites se dispersaient sur la ligne de solubilité de la monohydrocalcite et de carbonates de calcium amorphes.

Cette étude donnait ainsi des éléments de réponse quant à la question de l'existence de paramètres nécessaires pour la formation des microbialites mais cela restait dans un cadre géologique assez spécifique, ouvrant la question de savoir si ces corrélations peuvent être observées dans d'autres types d'environnement abritant des microbialites.

Par conséquent, nous avons regroupé le plus d'observations possibles faites dans la littérature sur des microbialites afin d'évaluer les corrélations possibles ou non entre différents paramètres physiques, chimiques, et minéralogiques de leur milieu de formation. Cet assemblage d'un grand groupe de données concernant les microbialites actuelles a constitué une première partie de la thèse. Pour chaque occurrence trouvée, nous avons listé les paramètres physico-chimiques relatifs à l'environnement, en fonction de ceux qui étaient disponibles dans

les études. Ces paramètres comprenaient entre autres pour les solutions le pH, la température, les concentrations en cations et anions majeurs, les concentrations en éléments traces, quelques données d'isotopie du carbone et de l'oxygène et d'indices de saturation vis-à-vis de carbonates de calcium et de magnésium, et les combinaisons minéralogiques principales des microbialites.

Des analyses statistiques ont alors été produites afin d'analyser la diversité de ces milieux de formation des microbialites puis pour rechercher des corrélations entre certains paramètres environnementaux et, par la suite, la physico-chimie des solutions de formation des microbialites actuelles listées a été comparée à la physico-chimie caractérisant des milieux où la présence de microbialites n'avait pas été documentée. Globalement, ces analyses ont renforcé l'hypothèse que la saturation de la solution vis-à-vis des ACC/MHC est une condition nécessaire à la formation de microbialites carbonatées.

Ce regroupement de données et leurs analyses ont abouti à l'écriture de l'article « The chemical conditions necessary for the formation of microbialites » paru dans la revue *Geochemical Perspectives Letters*. Des données supplémentaires incluant la description de la base de données, le détail des méthodes et les perspectives de ce travail ont été ajoutées à la suite du manuscrit inclus dans cette partie.

## 2. Manuscrit de l'article (texte principal)

### The chemical conditions necessary for the formation of microbialites

J. Caumartin<sup>1</sup>, K. Benzerara<sup>1</sup>, R. Havas<sup>2</sup>, C. Thomazo<sup>2,3</sup>, P. López-García<sup>4</sup>, E. Duprat<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Sorbonne Université, Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR CNRS 7590, Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC), 75005 Paris, France*

<sup>2</sup>*Université de Bourgogne, Biogéosciences, UMR CNRS EPHE 6282, Dijon, France*

<sup>3</sup>*Institut Universitaire de France, Paris, France*

<sup>4</sup>*Institut Diversité, Ecologie et Evolution du Vivant, UMR 8079, Université Paris-Saclay, France*

#### Abstract

Whether biological and/or physico-chemical variations may have changed the abundance of microbialites over geological times remains debated. This calls for a better appraisal of the conditions necessary for the formation of modern microbialites. Here, we compiled data sets from 140 aqueous environments where modern microbialites have been reported, including their respective physico-chemical parameters. By analysing this data base, we find that solutions where microbialites form have a relatively high saturation with calcite, the chemical activities of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{CO}_3^{2-}$  being controlled by the solubility of amorphous calcium carbonate (ACC) or monohydrocalcite (MHC) in most of these localities. Further statistical analyses of two data bases listing ~8000 continental aqueous systems show that only a few of them display saturation with ACC/MHC, appearing as candidates for the detection of overlooked microbialites.

#### Introduction

Microbialites are organosedimentary deposits formed by benthic microbial communities that mediate authigenic mineral precipitation (Burne and Moore, 1987). They are found throughout the geological record up to 3.43 billion years ago and are considered as among the oldest traces of life on Earth (Allwood *et al.*, 2007). It has been argued that the diversity of

microbialites has varied over geological time with an overall decline at the end of the Proterozoic (*e.g.*, Awramik, 1971). The causes of these fluctuations have fed debates opposing two major models: (i) one involving biotic causes suggests that grazing by Metazoans induced the decline of microbialites (Walter and Heys, 1985), and (ii) a second “abiotic” model proposes that changes in the chemical composition of the ocean were responsible for microbialite decline (Fischer, 1965; Kempe and Kaźmierczak, 1994; Peters *et al.*, 2017).

While this debate is difficult to directly tackle, it emphasises that we still do not understand the conditions necessary for microbialites to form. Modern microbialites have been described in diverse environments (*e.g.*, marine, freshwater, hypersaline) and in the presence of very diverse microbial communities (*e.g.*, Iniesto *et al.*, 2020). Presently, there are many reports in the literature characterising the aqueous geochemistry of single sites where modern microbialites form. However, only a few meta-analyses gathering some of these data provide a broader, statistical overview (*e.g.*, Zeyen *et al.*, 2021). Here, we achieve an unprecedented compilation of data sets from 140 locations where modern microbialites form, spanning freshwater, brackish, saline and hypersaline environments (Lien A1.1, Annexes). We analyse the variability of the chemical parameters of microbialite-hosting environments and look for possible invariants. Moreover, in order to assess the rareness/commonness of conditions encountered in microbialite-hosting environments, we compare our data base with two data bases of continental aqueous systems.

## Results

### *Physico-chemical parameters of microbialite-hosting environments*

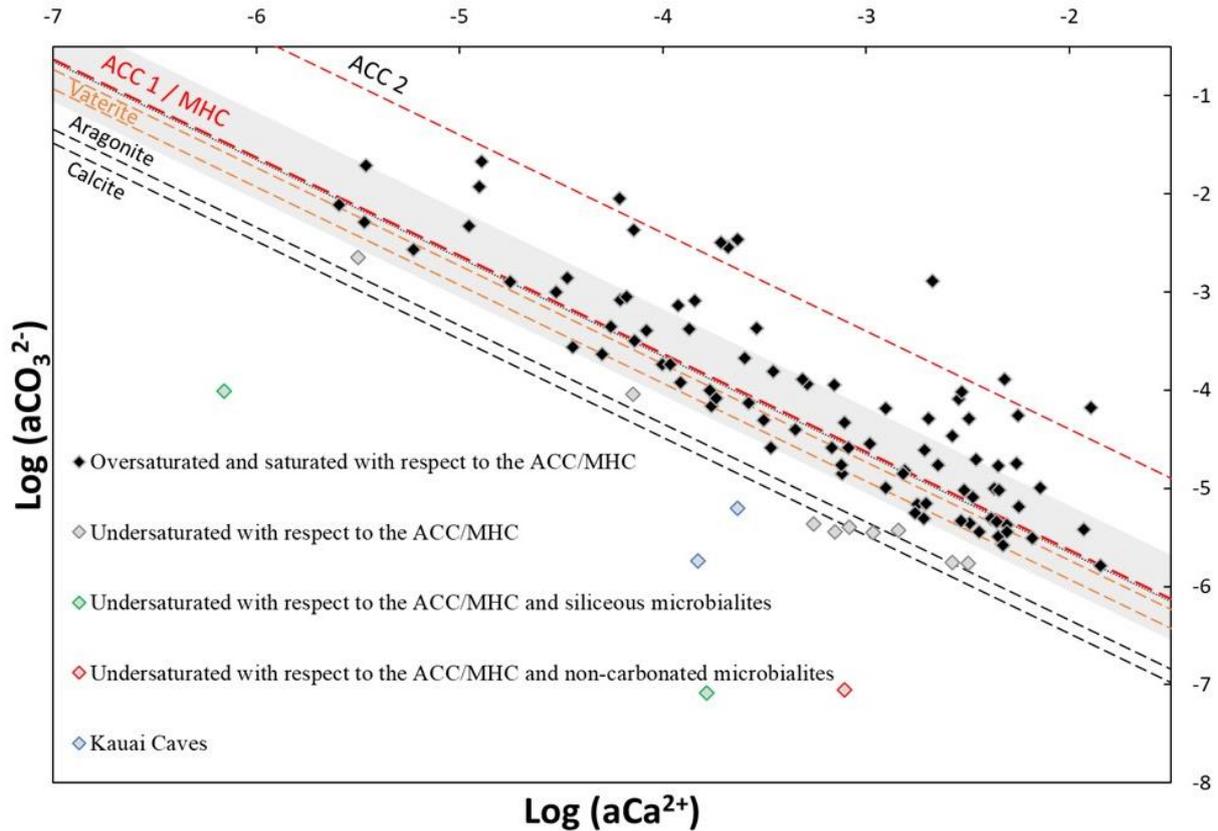
The compilation was achieved by systematically searching the terms “stromatolite”, “thrombolite” or “microbialite” in the literature (see Supplementary Information). The 140 compiled modern microbialite-hosting systems occur on all continents (Fig. S1.4.) in a diversity of climates and geological contexts. Most of the environments were freshwater, but 34 were marine. The data base includes emblematic microbialites, such as those of Shark Bay, Lagoa Vermelha or the Bahamas, that have received much attention as modern analogues of ancient microbialites. Dissolved  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations were measured in a majority (~90 %) of the corresponding aqueous solutions and ranged from 0.001 to 643 mM and 0.001 to 1325 mM, respectively. Concentrations of other major chemical species ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) were also generally well documented (~88 % of systems on average). Measurements of the dissolved

inorganic carbon (DIC) concentrations ranged between 0.022 and 6236 mM. These measurements were less documented (~76 % of systems) in the data base, despite their importance in carbonate-rich environments. In seven lakes, alkalinity values were available and considered to be equal to DIC (Dickson *et al.*, 1981; Fig. S1.5.).

Overall, microbialite-forming waters in our data base span a high diversity of water chemical types as defined by Boros and Kolpakova (2018), which were: saline (53 % of the occurrences), soda-saline (23 % of the occurrences) and soda (24 % of occurrences) (Fig. S1.9.). Principal component analyses (PCA) were conducted on 10 chemical variables measured on 545 samples of microbialite-hosting environments in order to find the variables contributing to most of the data set variability. It showed that most of the variance (~62 %) in the data set was explained by (i) salinity (logarithms of Na, Cl, K activities) (35.22 %), and (ii) the logarithm of  $\text{CO}_3^{2-}$  activity anticorrelated with the logarithm of  $\text{Ca}^{2+}$  activity (26.32 %) (Fig. S1.7.).

#### *Assessment of the saturation index of waters in which modern microbialites form*

The anticorrelation between  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{CO}_3^{2-}$  activities was further analysed by plotting their logarithms against each other. This plot also allows us to assess the saturation index (defined as  $\text{SI} = \log(\text{IAP}/K_s)$ , where IAP is the ion activity product and  $K_s$  is the equilibrium constant) of solutions with various  $\text{CaCO}_3$  phases such as anhydrous crystalline phases and amorphous phases (ACC). Four hundred and sixteen chemical measurements performed on 102 microbialite-forming environments that were available in the data base. The mean value was considered for the environments for which several measurements were available (Fig. 1.1). Conclusions were similar when using the median.



**Figure 1.1.**

**Plot of the log of the activities of  $\text{CO}_3^{2-}$  vs.  $\text{Ca}^{2+}$  for 102 microbialite-hosting environments.** Solubility lines (dashed lines) are reported for calcite ( $\log K_s = -8.48$ ), aragonite ( $\log K_s = -8.34$ ), monohydrocalcite (MHC;  $\log K_s = -7.6$ ), vaterite (De Visscher and Vanderdeelen., 2003), ACC1 as reported by Kellermeier *et al.* (2014;  $\log K_s = -7.63$ ) and ACC2 as reported by Brečević and Nielsen (1989;  $\log K_s = -6.39$ ). Only mean values are provided for each environment by a diamond. Green diamonds correspond to siliceous microbialites; red diamond corresponds to a clayey microbialite. Black diamonds correspond to environments saturated and oversaturated with ACC1 and/or vaterite; grey diamonds correspond to environments undersaturated with vaterite. The grey zone highlights a 95 % confidence interval on the saturation values of microbialite-hosting environments with respect to ACC1/MHC.

A large majority (89 %) of aqueous environments were highly supersaturated with respect to calcite and aragonite and aligned between the solubility lines of vaterite and an ACC phase (ACC2) as determined by Brečević and Nielsen (1989) (Fig. 1.1). Diverse ACC phases exist with  $\log K_s$  varying between  $-7.63$  and  $-6.04$ . Here, many points align close to the solubility lines of MHC and ACC1 phase (another ACC phase as determined by Kellermeier *et al.*, 2014).

A few environments ( $n = 5$ ) appeared significantly undersaturated with calcite. However, three of them harboured microbialites that were siliceous (*e.g.*, Great Obsidian Pool, Mound Spring; Fig. S1.10) or formed by pure trapping and binding of clays (*e.g.*, Lake Untersee, Antarctica; Fig. S1.10). In two others (Kauai caves, Hawaii), microbialites formed

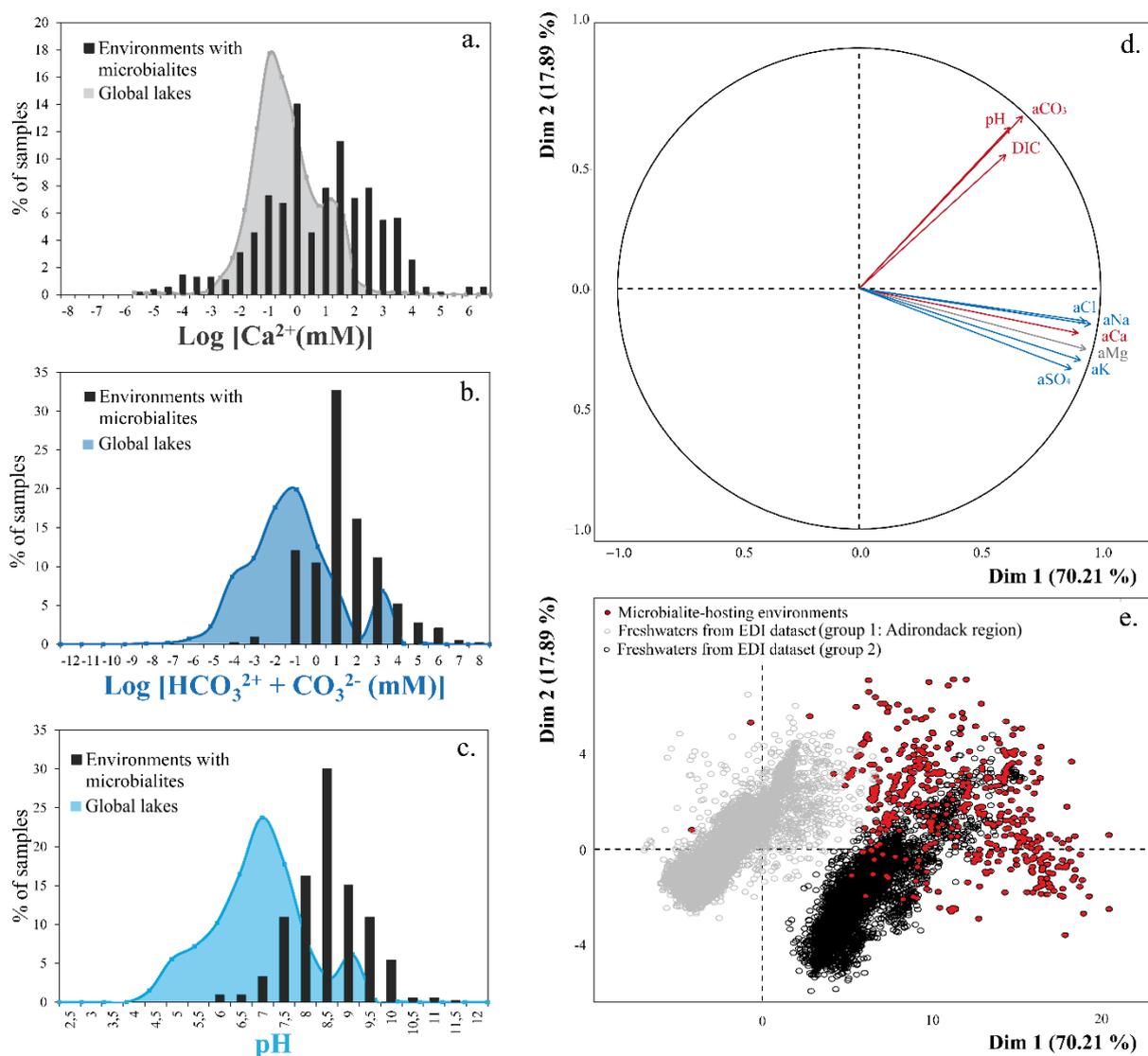
on cave walls in freshwater seeping out of basalts and may experience significant chemical variations by evaporation and CO<sub>2</sub> degassing (Léveillé *et al.*, 2007).

Finally, some environments hosting carbonate microbialites were on average supersaturated with anhydrous carbonates but undersaturated with ACC and vaterite ( $n = 9$ ; Figs. 1.1., S1.10). Only one single analysis was available for Ciocaia drill (Romania). However, several ones were available for the other locations. For Pavilion Lake, solution geochemistry varied over time, reaching saturation with ACC at certain periods (Fig. S1.10.). For Lake Kelly, none of the several available measurements were saturated with ACC but it was reported that microbialites may no longer actively form (Lim *et al.*, 2009). Last, at least four other environments showed spatial chemical heterogeneities. They were undersaturated with ACC on average but supersaturated with ACC at certain locations. For example, Lakes Joyce and Hoare (Antarctica) have chemically stratified waters, and microbialites form at depths where DIC water content rises (Mackey *et al.*, 2018). Pastos Grandes (Bolivia) harbours groundwater outflows chemically evolving by evaporation along their travel away from the source. Microbialites form when water reaches saturation with ACC (Muller *et al.*, 2022). Overall, 98 % of aqueous environments hosting modern microbialites were saturated with ACC at least part of the time.

#### ***Comparison of the chemistry of modern microbialite-hosting aqueous solutions with two global freshwater data bases***

The chemical compositions of carbonate microbialite-hosting environments were compared with many aqueous environments listed in two general data bases, in order to assess how unique the former might be. The Global Lake Ecological Observatory Network (GLEON) data base compiles 105,678 samples from 6422 North European lakes with only temperature, pH, DIC and Ca<sup>2+</sup> concentrations as physico-chemical parameters (Weyhenmeyer *et al.*, 2019; see Supplementary Information). The Environmental Data Initiative (EDI) groups 28,455 samples from 1547 North American lakes with several additional parameters (Supplementary Information). Some of the lakes compiled in the EDI and GLEON data bases possibly harbour microbialites but if this is the case, they have not been described in the literature and therefore are not in our microbialites data base. The comparison showed that pH, DIC and calcium concentrations in the carbonate microbialite data base were significantly higher on average than in lakes from the GLEON and EDI data bases (Wilcoxon comparison tests of means; threshold of 0.05 and  $p$  values of  $0, 2.1 \times 10^{-210}$  and  $3.8 \times 10^{-175}$ , respectively) (Figs. 1.2.a–c, 1.3. and

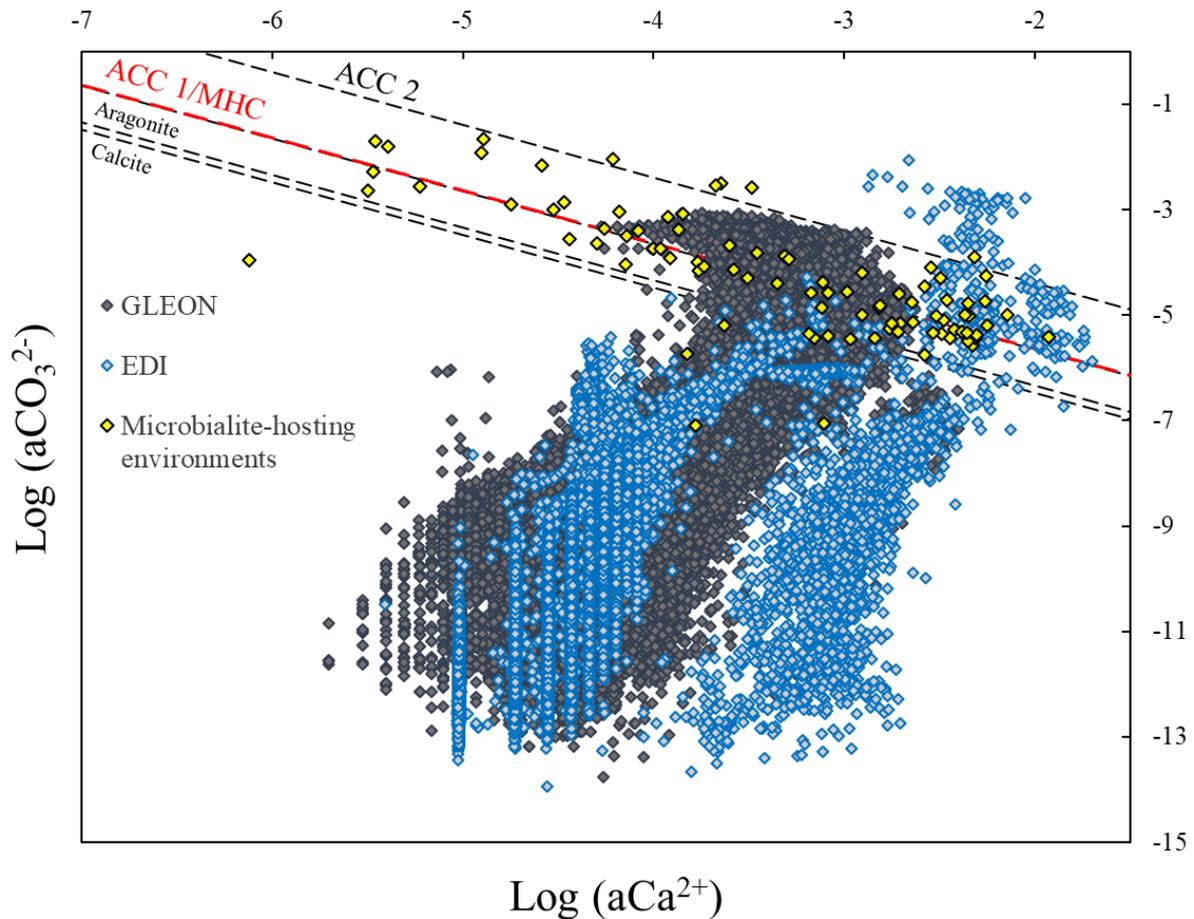
Fig. S1.8.). A principal component analyses on the physico-chemical parameters from EDI and microbialite-hosting environments data bases outlined that ~88 % of the variance of all these aqueous environments is explained by the activity of  $\text{Cl}^-$  or  $\text{Ca}^{2+}$  (70.2 % of the variability) and DIC (17.9 %) (Fig. 1.2d). The EDI lakes spread as two groups in the plot of the two PCA dimensions. One group contains Adirondack region lakes with Mirror Lake, USA, whereas the second group is composed of all other more saline lakes. In this plot, microbialite-forming solutions mostly plot separately and stretch orthogonally to the freshwaters from the EDI data base (Fig. 1.2e). GLEON data were not included in this PCA analysis, because too many parameters were missing.



**Figure 1.2.**

**Comparison of the microbialite-hosting environments and lakes in the EDI and GLEON data bases.** Compared distributions are (a) the log  $[\text{Ca}^{2+}(\text{mM})]$ , (b) the log  $[\text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^{2-}(\text{mM})]$  and (c) the pH of the microbialite-hosting environments (black bars) and the EDI and GLEON data bases (grey or blue surface).  $\text{Ca}^{2+}$  activities were calculated using all major ion concentrations in the EDI database,

whereas they were approximated to concentrations in the GLEON data base. Errors due to this approximation are estimated to be minor (Fig. S-7). (d) Correlation circle from the global PCA of the physico-chemical parameters of EDI lakes and microbialite solutions. The logarithms of the activities and DIC were used. The colours correspond to those used to differentiate the principal components on the microbialite-hosting environments PCA (Fig. S-4). (e) Plot of all aqueous environments hosting microbialites (red dots) and from the EDI data base (black and grey dots) along the two main dimensions of the ACP.



**Figure 1.3.** Plot of the activity of  $\text{CO}_3^{2-}$  vs.  $\text{Ca}^{2+}$  for all lakes from the EDI (blue diamonds), GLEON (grey diamonds) and microbialite-hosting environments (yellow diamonds) data sets. Solubility lines of aragonite, calcite, monohydrocalcite and ACC are the same as in Figure 1.

Finally, by plotting the EDI and GLEON environments in the  $\text{CaCO}_3$  solubility diagram, less than 5 % of them show saturation with ACC/MHC (Fig. 1.3).

## Discussion

### *Saturation with vaterite/ACC/MHC as a necessary condition for the formation of microbialites*

The need for a relatively high apparent critical saturation of the solutions so that microbialites form is suggested by the analysis of the compiled data base. Arp *et al.* (2001)

argued that a SI of  $\sim 1$  relative to calcite was required for biofilm calcification to occur, based on the study of modern non-marine calcifying cyanobacterial biofilms. Such a value approximately corresponds to the solubilities of vaterite, ACC1 or MHC. Moreover, Fukushi *et al.* (2020) observed that several alkaline lakes were saturated with MHC and suggested this phase as a precursor of anhydrous carbonates. Accordingly, many microbialite-hosting environments in our data base are alkaline. More recently, the same observation was done by Zeyen *et al.* (2021) in microbialite-hosting lakes in Mexico, who suggested ACC as an alternative precursor. In order to explain these observations, they proposed that ACC may precipitate first, before transforming to the less soluble MHC, then anhydrous carbonate phases, including vaterite. Here, based on a new data base of 140 microbialite-bearing systems, encompassing freshwater, saline and hypersaline conditions, we generalise this observation to all environments where microbialites form, suggesting that saturation with ACC1/MHC or with vaterite appears as a necessary condition for the formation of modern microbialites. This model may be further adjusted in the future. The ACC1 solubility line reported in Figure 1 is a lower bound for ACC. Indeed, the solubility of ACC increases with the Mg content (Mergelsberg *et al.*, 2020). According to Blue and Dove (2015), the partition coefficient  $K_d$  of Mg vs. Ca in ACC is constant (0.047) for pH below 9.5. Based on this, the Mg/Ca ratio in ACC possibly formed in microbialite-bearing systems ranges between 0.012 and 225, which may correspond to a variation in solubility by  $\sim 1$  log unit.

Several conditions may allow the achievement of relatively high SI values with  $\text{CaCO}_3$  as observed in microbialite-hosting environments. Aqueous alkaline environments are fed by fluxes of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{HCO}_3^-$  ions *e.g.*, from water-rock interactions, and/or atmospheric inputs (Pulido-Villena *et al.*, 2006). This generally does not directly create high saturation conditions, except when locally *e.g.*,  $\text{Ca}^{2+}$ -rich groundwater outflows in high DIC lakes such as in Lake Van (Shapley *et al.*, 2005). In many cases, evaporation is a major driver for concentrating solutions and achieving high saturation with  $\text{CaCO}_3$  (Pecoraino *et al.*, 2015). This is consistent with the abundance of microbialites in saline environments. The SI values of aqueous solutions are not controlled by the precipitation of crystalline anhydrous  $\text{CaCO}_3$ , which are the least soluble  $\text{CaCO}_3$  phases. Instead, SI values are higher. Recently, Pietzsch *et al.* (2022), suggested that in some alkaline lakes, orthophosphate concentrations are high and inhibit crystalline anhydrous  $\text{CaCO}_3$  precipitation, allowing the onset of saturation levels as high as the solubility of ACC. Unfortunately, this cannot be further tested here since dissolved  $\text{PO}_4^{2-}$  concentrations are only reported in eleven microbialite-forming environments of our data base. Similarly, the

role of exopolymeric substances (EPS) in locally controlling SI values could be questioned. Whether this inhibition may be a major process in all reported microbialite-hosting environments will require further data acquisition. Once  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{CO}_3^{2-}$  activities reach values high enough so that MHC/ACC solubility is attained, we hypothesise that any further input of  $\text{Ca}^{2+}$  and/or DIC to the system can contribute to the accumulation of carbonates, partly as microbialites, helping to control their overall abundance in the aqueous system.

Another outcome of the present analyses is that they may help in finding localities where modern microbialites have been potentially overlooked so far, by screening aqueous environments based on their SI with  $\text{CaCO}_3$  (Fig. 1.3). Some environments listed in the GLEON and EDI data bases are saturated with ACC/MHC. However, we presently do not know if they host microbialites. Two options are possible: (i) all these environments host microbialites; this would imply that saturation with ACC/MHC is a necessary and sufficient condition for microbialite formation, and (ii) some of these environments do not contain microbialites, which means that some other conditions may be necessary in addition to saturation with ACC/MHC to form microbialites.

Presently, it may be speculated that changes in seawater chemistry, possibly at the end of the Proterozoic, from ACC-saturated to ACC-undersaturated seawater, may have caused the decline of microbialite abundances (Fig. S1.11.). However, to be validated, this speculation will need further constraints on the value of  $\text{SI}_{\text{ACC}}$  in past oceans.

Finally, a control of water chemistry by MHC/ACC precipitation as a necessary condition for the growth of microbialites does not mean that microbial communities or any biological parameter have no impact at all in the formation of microbialites. Instead, it suggests that in order for them to participate in authigenic microbialite formation, at least some specific physico-chemical environmental conditions, *i.e.* saturation with ACC/MHC, must be met.

### *Acknowledgements*

This project received financial support from the CNRS through the MITI interdisciplinary programs and the ANR Microbialites. The authors thank Elodie Muller and Nina Zeyen for their help on setting up of the data set. JC is funded by a grant from the Interface pour le vivant doctorate programme at Sorbonne Université.

### 3. Données supplémentaires

#### 3.1. Materials and Methods

##### *Setup of a new modern microbialite-hosting environment database and description of the database*

Modern microbialite localities were identified by searching the literature published between 1962 and 2022. For this purpose, the terms “microbialite”, “microbialite-forming mat”, “stromatolite” and “thrombolite” were used in search engines such as Web of Science or Google Scholar as well as the ScienceDirect, SpringerLink and ResearchGate platforms. Papers describing microbialites and containing chemical data on the aqueous environments where these microbialites form, were retrieved from papers listed in the database. Sedimentary structures referred to as “tufas” or “travertines” were not compiled in the database because of the significant differences sometimes attached to these terms (Pentecost and Viles, 1994). While there might be some subjectivity in choosing the term microbialites instead of another one, we did not add further subjective bias by reappraising ourselves the validity of the terms used in published studies.

The physicochemical parameters of the aqueous environments in which modern microbialites form were further searched when needed in additional publications not focusing on microbialites. Overall, we managed to compile 140 localities with 30 major variables into this database. Concentrations provided in  $\text{mg L}^{-1}$  or ppm were converted into mM in the database. For 81 localities, several water sample analyses were available and all of these data are reported, resulting in a total of 610 aqueous geochemistry analyses in the database.

##### *Environmental Data Initiative (EDI) and Global Lake Ecological Observatory Network (GLEON) datasets*

The dataset of freshwater environments from the Global Ecological Observatory Network (GLEON, <https://gleon.org/>) was previously analysed by Weyhenmeyer *et al.* (2019). It groups 160,660 analyses of lake samples and reports six parameters: water depth, pH, temperature,  $\text{Ca}^{2+}$ , and dissolved  $\text{CO}_2$  and DIC contents. Only data of lakes with available data for  $\text{Ca}^{2+}$  and DIC concentrations were extracted and used here, which represent 105,678 samples from 6,422 North European environments. Of those, at least 78 % had pH and/or temperature parameters.

The dataset from the Environmental Data Initiative (EDI, <https://portal.edirepository.org/nis/browseServlet?searchValue=limnology>) in the section “limnology” contains analyses of 29,176 samples from ~1600 environments, with 18 main variables: lake elevation, size, water depth, pH, temperature, conductivity, DIC, dissolved organic matter, dissolved oxygen,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , Si,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  contents. Only 28,455 analyses from over 1,547 lakes from North America were selected as they included both  $\text{Ca}^{2+}$  and DIC contents. Interestingly, this database contained more parameters than the GLEON one, including the concentrations of several other major ions for over 40 % of the data. This allowed us to compare this database with the modern microbialite database on more parameters using PCA (Fig. 1.2 in the main text).

### *Speciation calculations*

The activities of major ions were calculated with the PHREEQC software (Parkhurst and Appelo, 2013) based on the Hückel-Debye method, and taking into account the temperature in the activity calculation for the solubility products of  $\text{CaCO}_3$ . The thermodynamic database “thermoddem.dat” (Blanc *et al.*, 2012) was used, with the solubility constants of calcite and aragonite from Plummer and Busenberg (1982), monohydrocalcite (MHC) from Hull and Turnbull (1973), and those of amorphous calcium carbonate (ACC measured by Brečević and Nielsen (1989), at  $K_{\text{sp}} = 10^{-6.4}$  (*i.e.* ACC2) and Kellermeier *et al.* (2014), at  $K_{\text{sp}} = 10^{-7.63}$  (*i.e.* ACC1).

For the calculation of activities in the microbialite-hosting aqueous solutions, all available chemical species concentrations and temperature were considered. In the GLEON dataset only  $\text{Ca}^{2+}$  content, DIC content, temperature and pH were available to calculate the ion activities. The water chemistry analyses from all the databases were validated by verifying that the electric charge imbalance was between -10 % and +10 %.

### *Statistical analyses*

The distributions of the major ion concentrations in the GLEON and EDI datasets *vs.* in the microbialite dataset are shown in Figure S1.8. The differences between these distributions in the GLEON and EDI datasets *vs.* in the microbialite dataset were statistically tested. As these values are not normally distributed, the non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney test was chosen with a *p*-value threshold of 5 %.

### *Principal component analyses (PCA)*

Similar to what was done by Zeyen *et al.* (2021), we conducted PCA to assess which parameters explain most of the variability in the datasets. In these analyses, each axis (or principal component) is a linear combination of variables defined so that they maximise the spatial discrimination of samples; coordinates of vectors on each axis indicate the coefficient of the variables in the linear combination. The longer the orthogonal projection of an arrow on a given axis, the stronger the contribution of the variable to this axis. The smaller the angle between arrows, the stronger the positive linear correlation between corresponding variables. Orthogonal arrows indicate no correlation, while arrows pointing in opposite directions indicate a negative correlation. The samples are plotted in two dimensions using their projections onto the first two principal components. The part of the total sample variability explained by each axis is indicated in the axis label (Zeyen *et al.*, 2021). We compared EDI and microbialite-hosting environments. One PCA was performed on the microbialite-hosting environments dataset (Fig. S1.7.). A second PCA was performed on the combined EDI and microbialite-hosting environments datasets (Fig. 1.2d, e). For each PCA dataset, the parameters missing for more than half of the environments were removed. The environments where more than half of the parameters were missing were then removed. The missing values were further imputed based on the nearest neighboring environments. Imputation of missing values and PCA were performed using the R packages *missMDA*, *FactoMineR* and *Factoshiny* (Lê, Josse and Husson, 2008; Josse and Husson, 2016). The GLEON dataset was not used in this analysis because most of the water chemistry parameters describing the microbialite-hosting environments are missing.

### 3.2. Contenu de la base de données des microbialites actuelles et perspectives d'améliorations

#### *Informations présentes dans la base de données*

Les informations géochimiques qui ont été récoltées à partir de la littérature sur les environnements abritant les microbialites actuelles ont été publiées sous forme de tableau (tableur Excel, lien A1.1, Annexes). Pour un environnement donné, un ou plusieurs points de mesure sont disponibles (correspondant souvent à des dates, des localisations spatiales, des localisations en profondeur ou des microbialites différentes). Le tableau est composé de 618 lignes (échantillons de microbialites) et 90 colonnes (paramètres disponibles) pour 140 environnements au total. Il répertorie (en colonnes) des paramètres de localisation et de dates des échantillonnages faits dans les différentes études, un aperçu des phases minérales principales décrites pour les microbialites, les données physico-chimiques de la colonne d'eau dans laquelle les microbialites ont été trouvées (température, pH, conductivité, cations/anions majeurs/mineurs, éléments traces), certaines données très partielles sur l'isotopie de l'oxygène ou du carbone par exemple, les valeurs des logarithmes des activités des espèces chimiques majeures calculées à l'aide du logiciel Phreeqc avec l'indice de saturation moyen obtenu pour le milieu, le type d'environnement et les sources. Ces données peuvent être très partielles en lien d'une part avec la manière dont nous les avons récoltées dans la littérature (informations qui ont été oubliées et/ou qui n'ont pas été vues lors de notre compilation dans la base de données) et d'autre part le fait que certains paramètres sont mesurés fréquemment par les expérimentateurs alors que d'autres le sont rarement. Par exemple, les mesures des concentrations en dioxygène dissous, nutriments, éléments traces, ou de l'isotopie de la solution entre autres sont apparues moins documentées de manière générale. Sur les paramètres essentiels pour évaluer l'état de la saturation d'une solution vis-à-vis des phases carbonatées, ~8 % des points de mesure ne contenaient pas de valeurs ni pour la concentration en  $\text{HCO}_3^-$ , ni pour la concentration en  $\text{CO}_3^{2-}$  ni pour le DIC ; ~10 % des points de mesure ne contenaient pas de valeurs pour la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  et ~10 % des points de mesure ne contenaient pas de valeurs pour la concentration en  $\text{Mg}^{2+}$ . Même si ces proportions représentent une faible part des environnements listés dans le tableau, elles appellent à l'avenir à des mesures plus systématiques de ces paramètres dans les milieux qui contiennent des microbialites.

Par ailleurs, d'autres microbialites actuelles ont été échantillonnées depuis la publication de notre article dans GPL ou ont été oubliées, et leurs paramètres environnementaux n'ont pas

été listés dans la base de données. Par exemple, des thrombolites vivantes ont été découvertes dans un lagon côtier de la baie Californienne (Ensenada de La Paz, Beltrones, 2022). De plus, les tapis microbiens calcifiants sont également des structures répandues dans de nombreux environnements et dans certains cas sont des précurseurs de microbialites. Les travertins, malgré un manque de consensus sur leur définition, sont également des objets géobiologiques qui pourraient s'apparenter à des microbialites (Pentecost, 2005). Ces occurrences n'ont pas été référencées dans la base de données (qui se concentre sur les termes « microbialite » et « stromatolite »). Pourtant, en fonction des appellations, il est possible que l'on parle du même objet, ce qui a introduit un biais dans le choix des environnements listés. Parmi quelques-uns de ces environnements où par exemple des « tapis microbiens minéralisant » ont été reportés, on trouve notamment certains lacs au sud de l'Australie (Hamilton, Sleaford Mere, Nguyen et al., 2022), ou une grotte submergée du Sud-Est de l'Italie (Cape of Otranto ; Guido et al., 2022).

#### *Répartition des microbialites actuelles dans le monde*

Les localisations des environnements abritant des microbialites actuelles dont les paramètres physico-chimiques sont listés dans la base de données ont été représentés sur une carte du monde (Fig. S1.4.). Cette représentation met en avant leur diversité géographique. Malgré cette diversité, plus de 48 % des environnements ont été répertoriés en Amérique du Sud et Centrale.



**Figure S1.4.**  
All modern microbialite-hosting environments listed in the database represented on a world map (provided by Microsoft Excel).

*Potentiels environnements de formation de microbialites actuelles sélectionnés sur la base de leur indice de saturation*

Comme suggéré dans la partie discussion de l'article publié dans GPL, il est possible que ce type d'étude puisse aider à trouver des localités dans le monde où les microbialites n'auraient pas été détectées auparavant, sur la base de l'indice de saturation de la solution vis-à-vis de la monohydrocalcite. Si ces environnements saturés vis-à-vis des ACC/MHC hébergeaient tous des microbialites, alors cette condition de saturation s'avèrerait non seulement nécessaire mais aussi suffisante à la formation des microbialites. A l'inverse, si dans certains milieux la saturation vis-à-vis des ACC/MHC est atteinte mais qu'aucune microbialite n'est présente, alors d'autres conditions sont nécessaires, en plus de la saturation, pour former des microbialites. L'étude de tels milieux nécessiterait d'abord de s'assurer qu'aucune microbialite n'est présente, ce qui est difficilement faisable à moins de sonder en détail tout le bassin étudié. Pour autant, ces localités constitueraient des cas très intéressants à analyser pour

mieux caractériser en premier lieu la nature nécessaire et/ou suffisante des conditions de formation des microbialites, ainsi que leurs potentiels catalyseurs/inhibiteurs.

Parmi les 7969 lacs des bases de données GLEON et EDI, environ 318 étaient en moyenne saturés en ACC/MHC et apparaissent donc comme favorables au développement de microbialites. En examinant la littérature sur certains de ces lacs, nous avons trouvé des rapports sur (i) la précipitation de carbonate biogénique dans le lac Locknesjön (Suède ; Labuhn et al., 2021), (ii) la précipitation de tuf dans le lac Sinijärv (Estonie ; Laumets et al., 2013), (iii) les tapis microbiens calcifiants dans le lac Deer (Canada ; Zorz et al., 2019), (iv) la boue calcaire cyanobactérienne dans les lacs Storfjärden, Hållsjön et Käringsjön (Suède ; Brunberg et Blomqvist, 1999), et (v) la production saisonnière de  $\text{CaCO}_3$  dans le lac Ripley (États-Unis ; Garrison et Pillsbury, 2009). Ces environnements sont listés dans le tableau A1.1 (Annexes) et constituent une première base pour la recherche d'autres endroits contenant des microbialites ou non, donc susceptibles de permettre un ajustement du modèle. Seules de futures campagnes systématiques et minutieuses permettront de déterminer si des microbialites actuelles peuvent ou non se former dans ces localités. Si certaines ne contiennent vraiment pas de microbialites, il sera important de comprendre quels autres paramètres (y compris les paramètres biologiques) peuvent empêcher leur formation dans un environnement chimiquement favorable et vérifier si les conditions chimiques en question sont permanentes et/ou rencontrées à toutes les profondeurs sur le système aqueux.

### *Cas particuliers des environnements très sursaturés vis-à-vis des ACC*

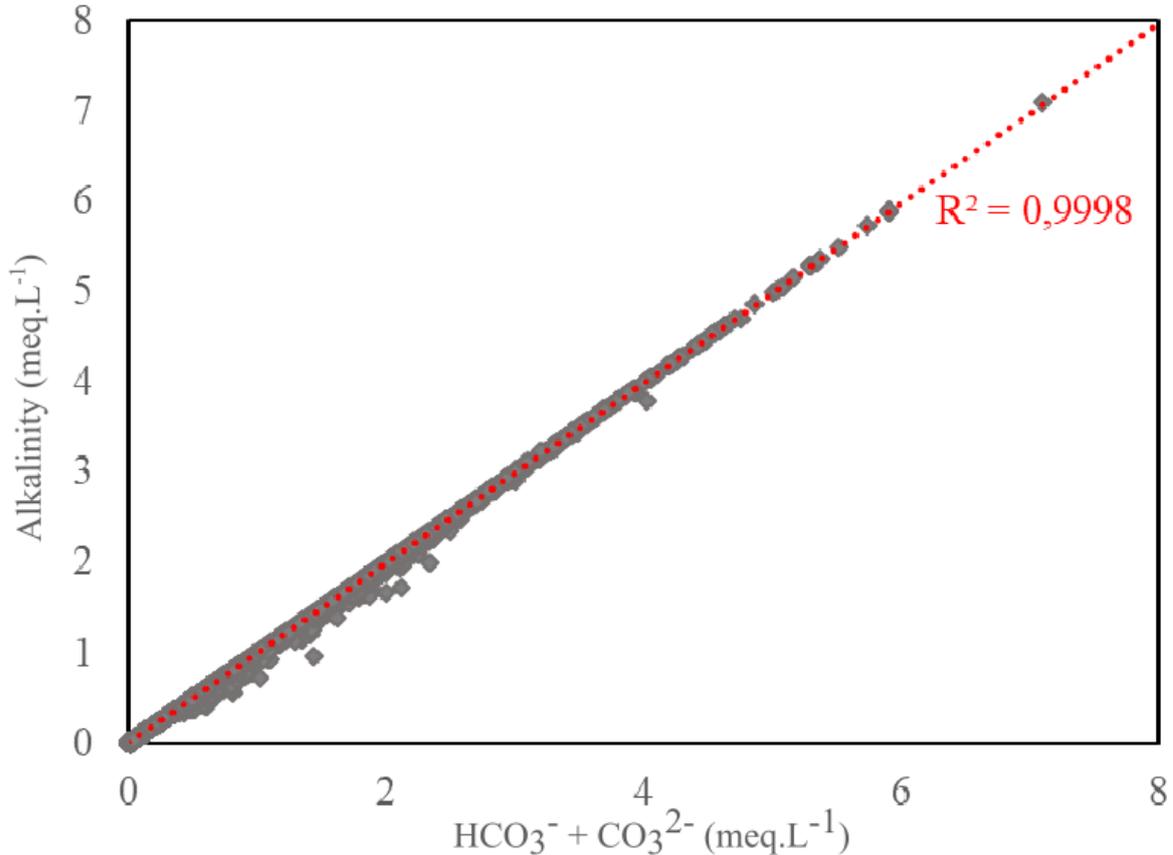
De nombreux environnements d'eaux douces provenant des bases de données EDI et GLEON utilisées dans ce travail en comparaison avec les milieux abritant des microbialites présentent une forte sursaturation vis-à-vis non seulement de la calcite mais aussi des ACC. Ces environnements ont été listés dans le tableau A1.2 (Annexes). Pour une partie d'entre eux, il n'a pas été fait mention de la présence de microbialites dans la littérature. Pour d'autres (~9 %), des microbialites sont présentes. A l'avenir, il sera intéressant de trouver plus d'informations sur ces environnements, concernant leur géochimie, géologie, diversité microbienne et présence ou non de microbialites, entre autres. Notamment, la question de savoir pourquoi des microbialites précipitent dans certains de ces environnements et pas d'autres se pose de nouveau ici. Par exemple, si on ne trouve pas de microbialites au-delà d'un certain seuil de saturation vis-à-vis des carbonates de calcium, on peut se demander quels processus propres à ces solutions inhibent leur formation. Une idée serait en premier lieu de savoir quelles sont les

phases minérales précipitées dans les eaux de ces milieux, et quels sont les paramètres environnementaux qui permettent d'atteindre une telle sursaturation (la précipitation de carbonates devrait abaisser la saturation vers la ligne de solubilité des phases carbonatées, pour aller vers l'équilibre). Il est possible par la suite qu'une caractérisation de la chimie générale des solutions montre potentiellement des corrélations de ces très fortes sursaturations en carbonates de calcium avec la présence d'espèces chimiques (*e.g.* des phosphates, des ions magnésium) que l'on pourrait considérer comme des inhibiteurs de la formation de microbialites dans ce cas précis. Ces considérations sont très spéculatives mais mettent en avant l'intérêt de se pencher sur les caractéristiques géochimiques de ces milieux sursaturés.

### *3.3. Evaluation plus étendue de la chimie générale propre aux environnements de formation des microbialites actuelles*

#### *Quelques sources d'incertitudes sur les analyses statistiques qui ont été faites*

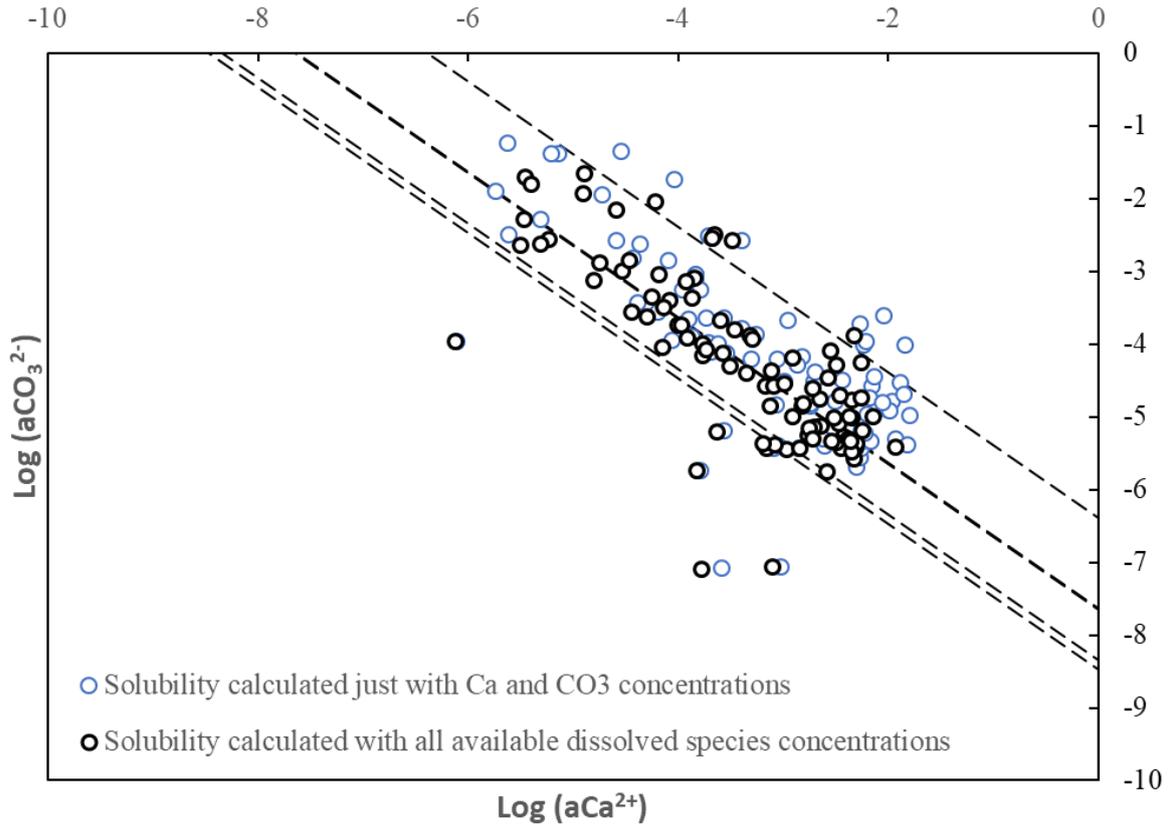
Comme mentionné précédemment, certaines données comme la concentration en DIC manquaient dans quelques environnements de la base données des environnements abritant des microbialites actuelles. Pour sept d'entre eux, l'alcalinité avait été mesurée. Dans le but de savoir si nous pouvions approximer le DIC à l'alcalinité dans ces milieux, nous avons vérifié qu'il existait une corrélation 1 :1 entre ces paramètres (Dickson, 1981). Nous avons utilisé pour cela les 6422 données GLEON (qui ne se focalisent pas sur les environnements à microbialites) pour lesquelles le DIC et l'alcalinité étaient disponibles. La figure S1.5 montre cette corrélation. Le coefficient de détermination  $R^2$  étant égal à 0,9998, l'erreur due à l'approximation a été estimée mineure. Nous avons donc utilisé la valeur de l'alcalinité des sept environnements pour approximer leur DIC et pouvoir évaluer leur état de saturation vis-à-vis des carbonates.



**Figure S1.5.**

**Linear correlation between the alkalinity and the DIC in freshwater environments from the GLEON dataset.** We note that the pH range encompassed by these lakes is such that H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and CO<sub>2</sub> are not important contributor to DIC.

Une autre approximation a été faite concernant la modélisation des états de saturation des différents points de mesure des bases de données GLEON et EDI. Dans le cas de la base de données EDI, les activités du calcium ont été calculées en utilisant toutes les concentrations ioniques majeures présentes. Dans la base de données GLEON, elles ont été estimées en utilisant uniquement les concentrations en calcium et en DIC, et le pH. Ces deux cas de figure différents ont pu être testés sur les points de la base de données des microbialites actuelles dans le but d'évaluer l'erreur due à cette approximation (Fig. S1.6.). La comparaison des états de saturation entre le modèle prenant en compte toutes les concentrations disponibles et le modèle prenant en compte uniquement les concentrations en calcium, DIC et le pH a montré des variations relativement faibles. En tout cas, ces variations ne modifient pas les conclusions générales.



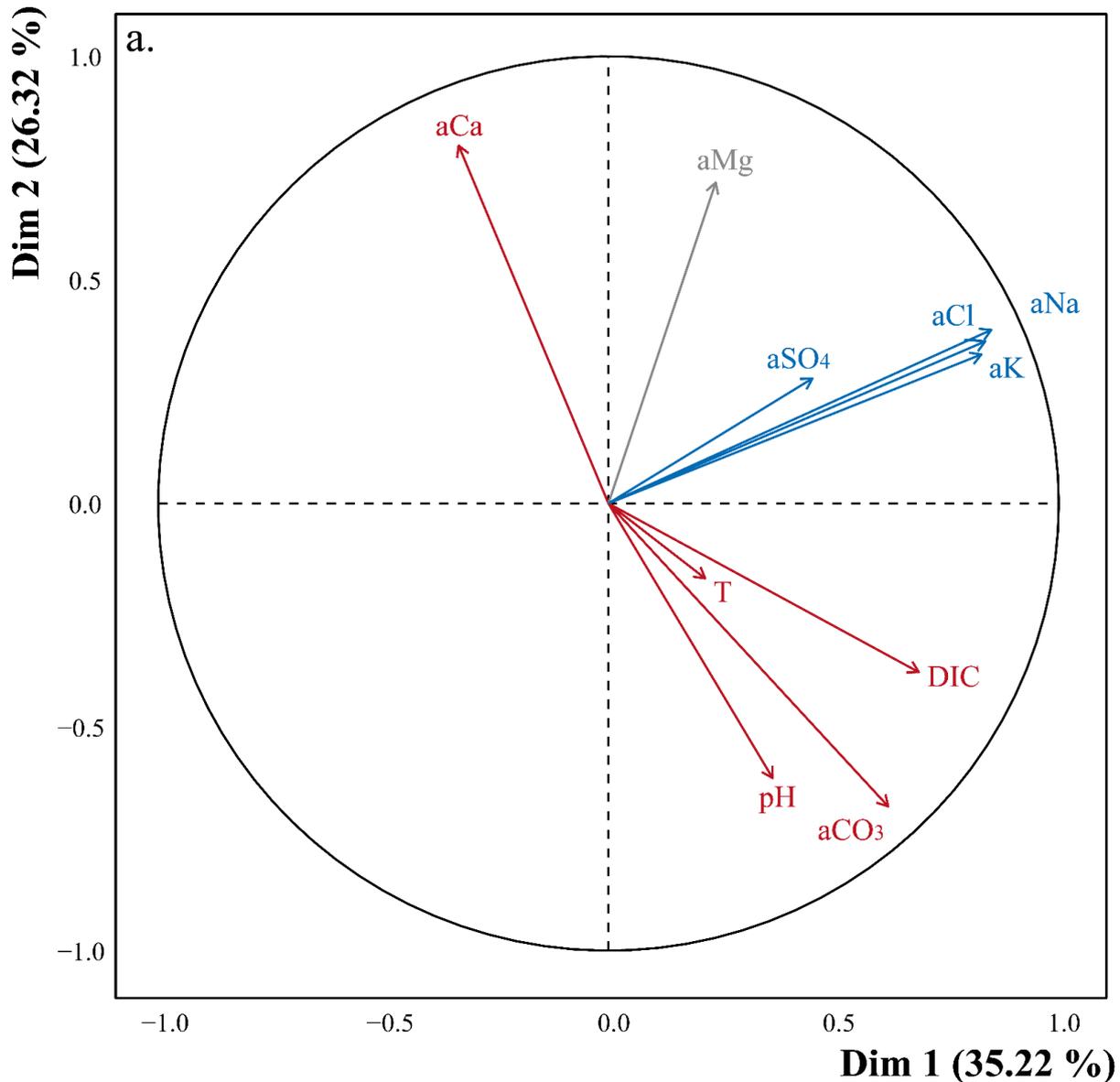
**Figure S1.6.**

Comparison between activities in the microbialite-hosting environments (i) calculated based on the knowledge of all the dissolved species concentrations available (open black points; “standard” approach) vs. (ii) approximated based on the knowledge of pH, Ca and DIC concentrations only (open blue circles; “approximated” approach). The differences between the approximated and standard calculated activities appear minor. The mean difference based on Euclidean distances between the values of the log(activities) calculated by the two approaches was 0.2.

#### *Particularités physico-chimiques des environnements abritant des microbialites actuelles*

Les paramètres expliquant la variabilité des milieux hébergeant des microbialites actuelles ont été étudiés plusieurs fois dans le passé. Par exemple, la corrélation entre l’alcalinité et la salinité dans ces milieux avait déjà été mentionnée comme un facteur de variabilité de la chimie de ces environnements (Zeyen et al., 2021 ; Chagas et al., 2016). Ici, nous avons effectué des analyses en composantes principales (ACP) sur 10 variables chimiques mesurées sur 545 échantillons d’environnements contenant des microbialites afin de trouver les variables contribuant à la plus grande partie de la variabilité de l’ensemble des données (Fig. S1.7.). Cette analyse a montré qu’effectivement la majeure partie de la variance (~62 %) de l’ensemble des données était expliquée par (i) la salinité (logarithmes des activités Na, Cl, K) (35,22 %), et (ii) le logarithme de l’activité du CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, lui-même anticorrélé au logarithme de l’activité du Ca<sup>2+</sup> (26,32 %). Dans ces environnements, le logarithme de l’activité du magnésium tient une

position intermédiaire entre le pôle expliquant la variabilité plutôt par la salinité du milieu et le pôle expliquant la variabilité plutôt par l'anticorrélation Ca-DIC, ce qui suggère un rôle important de la concentration en magnésium, en partie décorrélé de l'action de l'alcalinité et de la salinité, sur la variance des environnements hébergeant des microbialites actuelles.



**Figure S1.7.**

**Correlation circle from the PCA on 10 physicochemical parameters from 545 aqueous samples collected from microbialite-forming environments.** Ten variables were available, which are:  $\log(a\text{CO}_3)$ ,  $\log(\text{DIC})$ , pH,  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ),  $\log(a\text{Ca})$ ,  $\log(a\text{Mg})$ ,  $\log(a\text{Na})$ ,  $\log(a\text{Cl})$ ,  $\log(a\text{K})$  and  $\log(a\text{SO}_4)$ . The variance of these environments is explained for almost 62 % by a dimension (blue arrows, explains ~35.22 % of variability) grouping the chemical species responsible for salinity as well as sulfates and by another dimension (red arrows, explains ~26.32 % of variability) characterising the carbonates contents, pH and temperature anticorrelated to the calcium and to a lesser extent magnesium contents.

Hormis le fait que les solutions de formation des microbialites actuelles partagent la caractéristique d'être saturées vis-à-vis des ACC/MHC, d'autres paramètres de ces solutions diffèrent en moyenne des eaux où l'on ne trouve pas de microbialites. La figure S1.8 montre les distributions des logarithmes des principales espèces chimiques dissoutes et de l'indice de saturation vis-à-vis des ACC/MHC des environnements d'eau douce des bases de données EDI et GLEON en comparaison avec celles des environnements contenant des microbialites actuelles. La représentation de ces distributions montre que les concentrations en Mg, Na, Cl, K et sulfates, en plus de celles en Ca, DIC et du pH de la base de données des microbialites carbonatées sont en moyenne plus élevées que dans les lacs des bases de données GLEON et EDI. Pour autant, ce test, même s'il est statistiquement robuste au regard du nombre d'environnements considérés, ne compare les chimies des solutions de formation des microbialites actuelles qu'avec des solutions d'eau douce pour une grande partie localisées en Amérique du Nord. Une perspective serait d'élargir cette gamme de solutions de comparaison à d'autres régions du monde pour confirmer ces différences observées entre les environnements à microbialites et les autres.

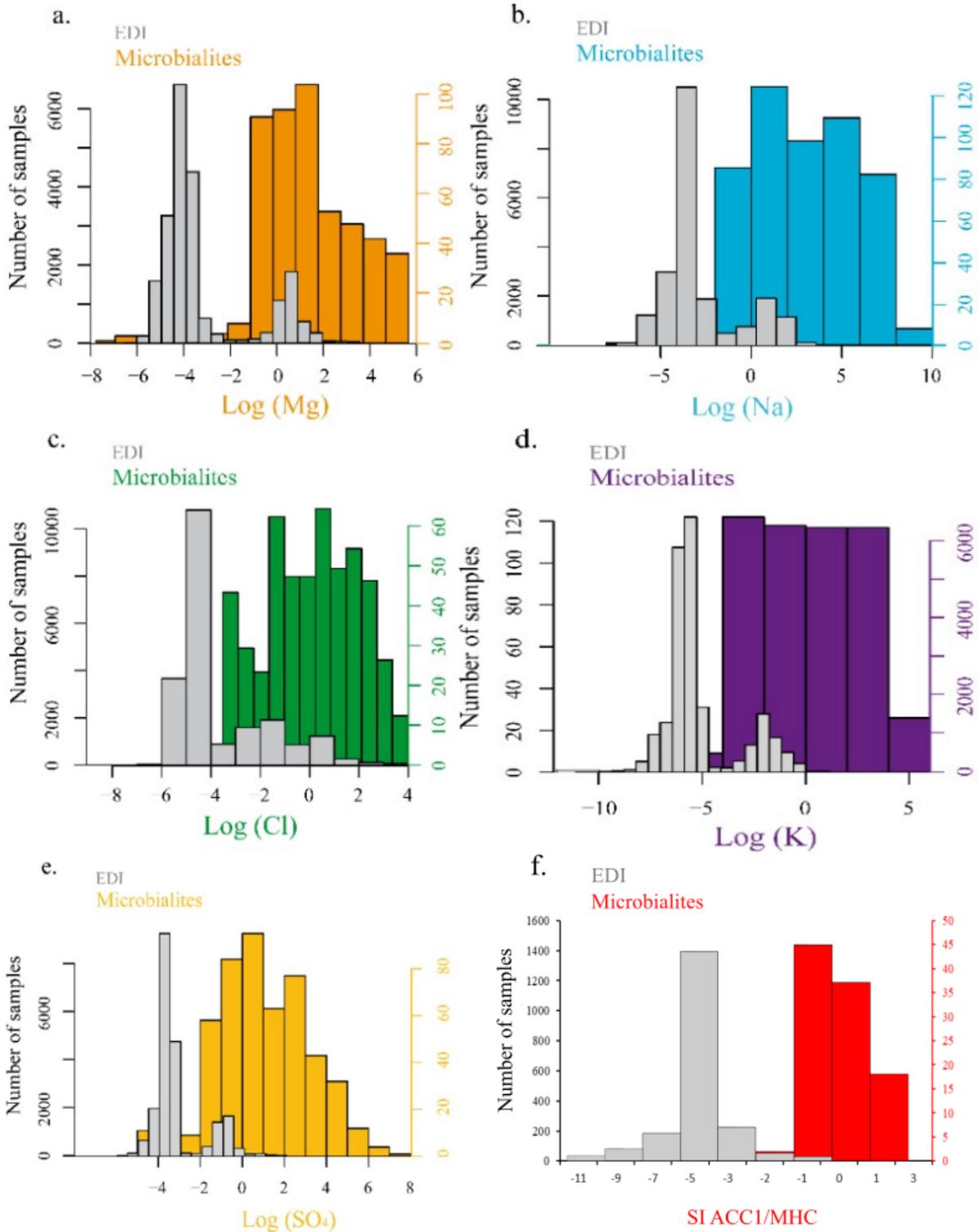


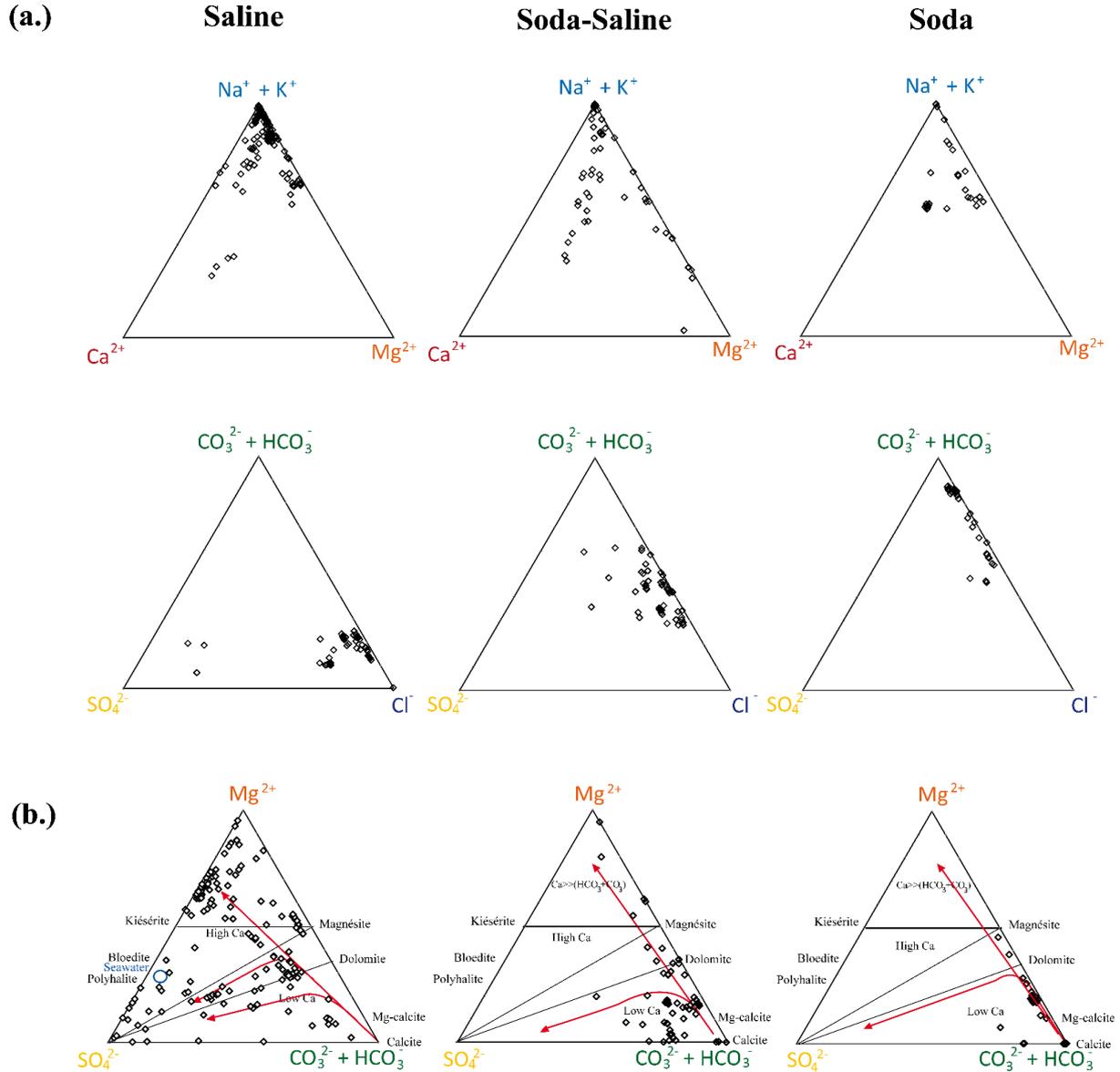
Figure S1.8.

Compared distributions of the logarithms of the main dissolved chemical species (and saturation index (SI) of ACC1/MHC) in North American (grey) vs. microbialite-hosting (coloured) lakes. (a) Magnesium logarithm, (b) sodium logarithm, (c) chloride logarithm, (d) potassium logarithm, (e) sulfates logarithm, (f) SI of ACC1/MHC.

Mais on peut noter aussi que les solutions abritant des microbialites actuelles sont très diverses. Pour évaluer cette diversité, des classifications existent et peuvent être utilisées en tant qu'outils de comparaison, comme les diagrammes de Piper ou le classement défini par Boros et Kolpakova (2018). Dans cette dernière classification, les chimies des solutions se partagent en trois grandes catégories : "saline" pour les lacs dont les concentrations en calcium et en carbonates sont inférieures à 25 %, "soda-saline" pour les lacs dont les teneurs en  $\text{Ca}^{2+}$  et en DIC sont supérieures à ~25 %, où  $\text{Na}^{2+}$  est le cation dominant et où les carbonates ne sont pas les anions dominants, et "soda" pour les lacs dont les teneurs en  $\text{Ca}^{2+}$  et en DIC sont supérieures à 25 % et où  $\text{Na}^{2+}$  et les carbonates sont respectivement les cations et les anions dominants. Par conséquent, les types chimiques des environnements aqueux contenant des microbialites actuelles ont été déterminés selon l'approche de Boros et Kolpakova (2018) en les représentant dans des diagrammes ternaires  $\text{Ca}^{2+}\text{-Na}^+\text{+K}^+\text{-Mg}^{2+}$  et  $\text{SO}_4^{2-}\text{-Cl}^-\text{-CO}_3^{2-}\text{+HCO}_3^-$  (Fig. S1.9.a). Selon cette classification, 53 % des environnements abritant des microbialites sont salins, 23 % soda-salins et 24 % soda sur un total de 95 environnements pour lesquels toutes les concentrations ioniques majeures sont disponibles. Ainsi, dans l'ensemble, les eaux de formation des microbialites de la base de données couvrent une grande diversité de types chimiques d'eau.

D'autres types de représentations permettent de modéliser des chemins théoriques qui permettent d'expliquer l'évolution d'une composition chimique vers une autre, notamment par des processus comme l'évaporation. Ce sont notamment les modèles proposés par Hardie et Eugster (1970) qui permettent de simuler théoriquement des trajectoires que pourraient suivre certains environnements dans un contexte évaporitique. Pour estimer par exemple ce type d'évolution dans le cas des solutions abritant des microbialites et dans le but d'évaluer si certains de ces environnements pourraient être regroupés selon ces points communs, les solutions de la base de données avaient également été représentées dans un diagramme ternaire  $\text{Mg}^{2+}\text{-SO}_4^{2-}\text{-(HCO}_3^-\text{+CO}_3^{2-})$  (Deocampo et Jones, 2003) (Fig. S1.9.b). Dans ces diagrammes, les flèches rouges indiquent les évolutions chimiques attendues lors de l'évaporation et de la précipitation de la calcite et de la dolomite. Cette représentation a permis de montrer entre autres que de nombreux environnements salins abritant des microbialites pourraient résulter d'une évolution avancée d'une solution initialement riche en  $\text{Ca}^{2+}/\text{HCO}_3^{2-}$ . Cependant, il est aussi possible que plusieurs environnements salins aient eu un faible  $\text{Ca}^{2+}/\text{HCO}_3^-$  initial et se soient enrichis en sulfates. En revanche, pour les environnements de type soda-salin contenant des microbialites, la plupart pourraient a priori résulter de l'évolution d'une solution initialement

faible en  $\text{Ca}^{2+}/\text{CO}_3^{2-}$  et être restés relativement pauvres en sulfates. Dans l'ensemble, ces différentes représentations confirment avant tout que les environnements abritant des microbialites actuelles sont hydrochimiquement diversifiés.



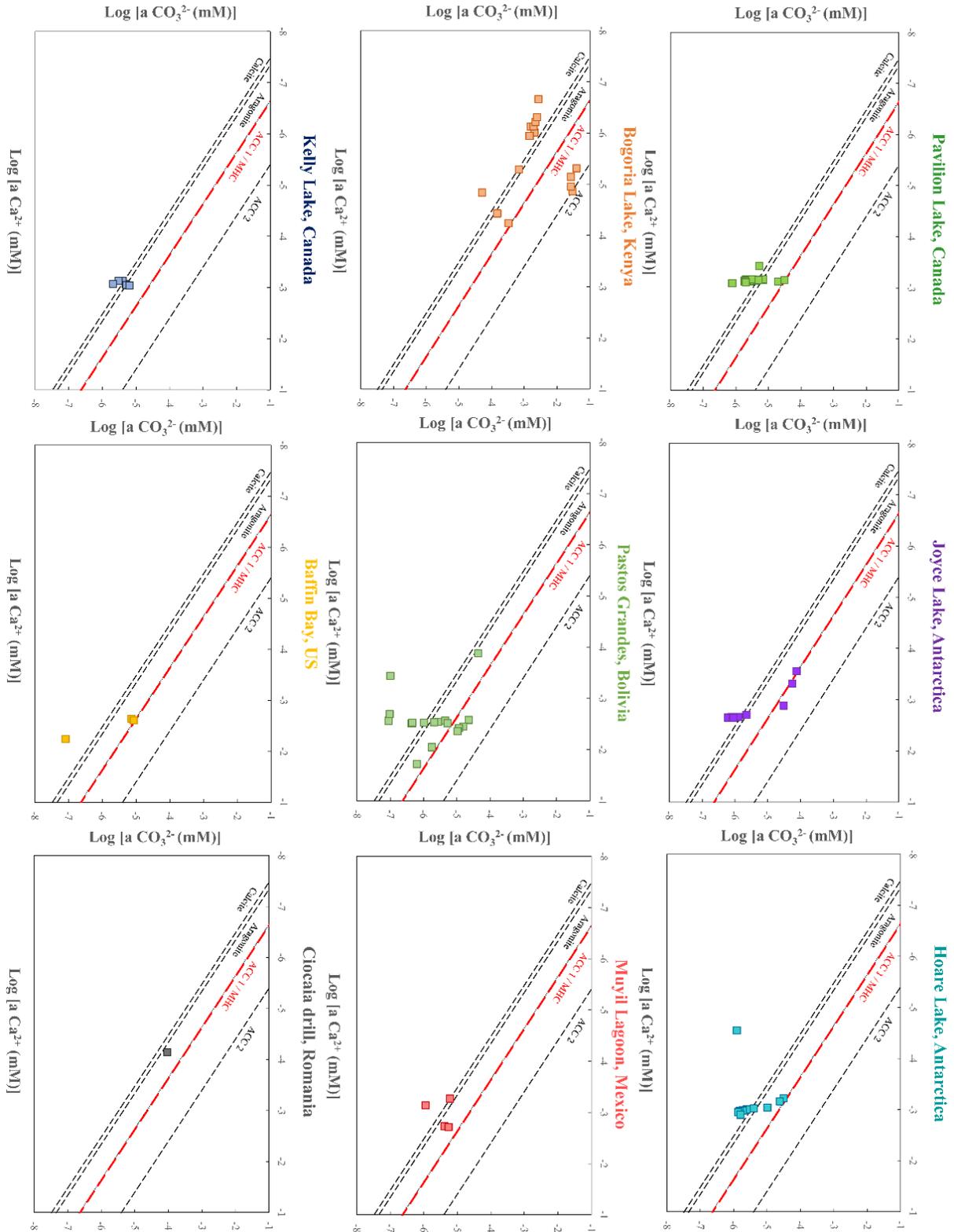
**Figure S1.9.**

**Ternary diagrams of microbialite environments. (a) Chemical types are assessed based on the approach of Boros and Kolpakova (2018). (b) Deocampo and Jones' (2003) triangles that show chemical evolution of aqueous environments by evaporation and precipitation depending on their initial  $\text{Ca}^{2+}/\text{HCO}_3^-$  ratio (red arrows) between modern microbialite-hosting environments.**

*Existence de microbialites dans des solutions sous-saturées vis-à-vis des ACC/MHC*

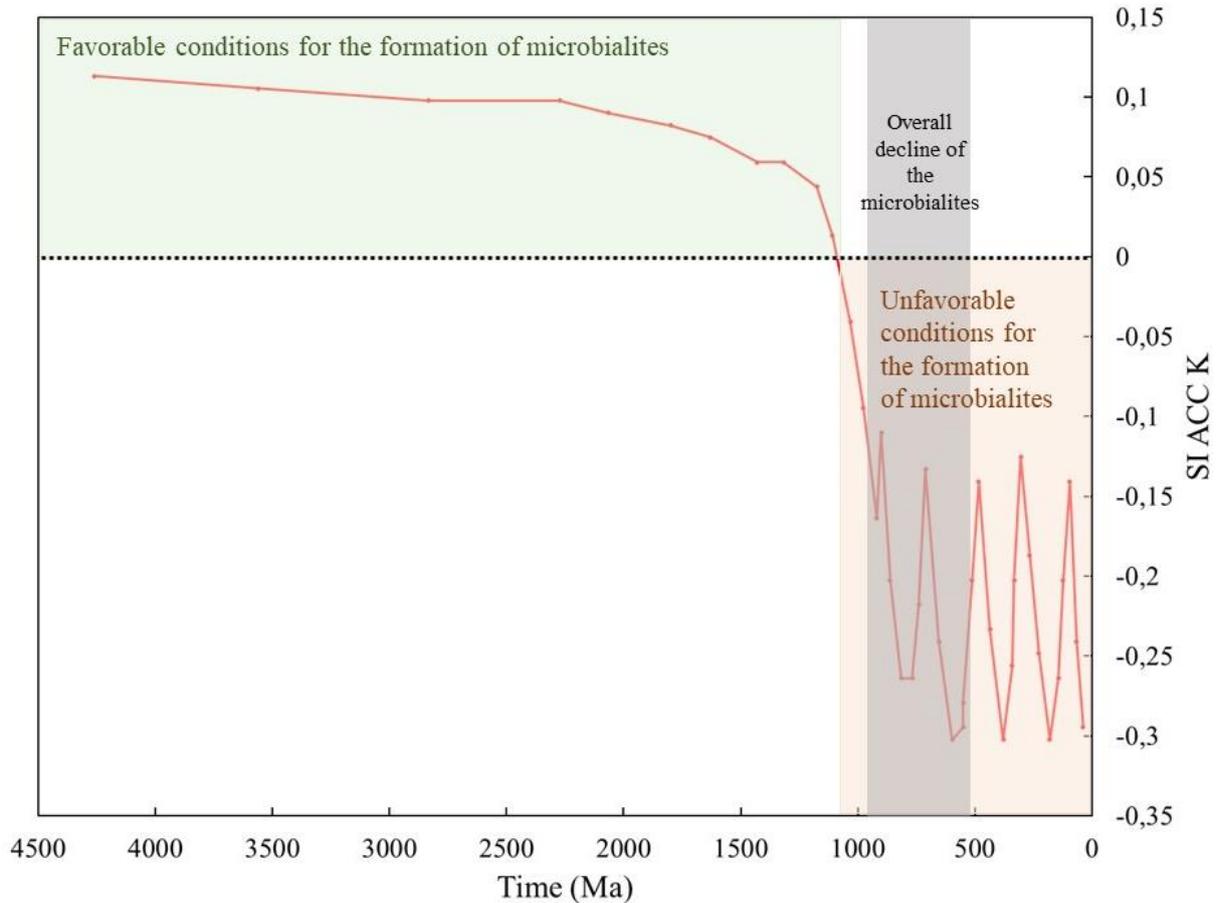
Plusieurs solutions dans lesquelles des occurrences de microbialites ont été rapportées présentaient une sous-saturation vis-à-vis des ACC/MHC (Fig. 1.1). Les cas particuliers de ces environnements ont été passés en revue dans le corps de l'article, dans lequel les sources de ces

différences apparentes de saturation ont été expliquées. Entre autres, le fait que certaines des microbialites en question soient siliceuses, formées uniquement par piégeage d'argile, fossilisées ou soumises à des variations fréquentes de la  $p\text{CO}_2$  expliquent en partie ces sous-saturations. Pour d'autres environnements représentés dans la figure S1.10 comme les lacs Pavilion, Joyce, Hoare ou les lagunes de Pastos Grandes, une variabilité chimique est présente soit sur plusieurs années par évaporation par exemple, soit de manière saisonnière, soit spatialement. De manière intéressante, les saturations vis-à-vis des carbonates varient principalement avec l'activité des ions carbonates dans les diagrammes de solubilités pour ces environnements, ce qui suggère que les fluctuations du DIC uniquement sont à l'origine de ces variations. Dans le cas des lacs Hoare et Joyce (Mackey et al., 2018), le DIC augmente selon un transect en profondeur et délimite potentiellement une profondeur-seuil de formation des microbialites. Dans le cas de Pastos Grandes, les solutions suivent une série d'évaporation à mesure de leur éloignement de la source de résurgence des eaux (Muller et al., 2023).



**Figure S1.10.** Plots of  $\text{CO}_3^{2-}$  vs.  $\text{Ca}^{2+}$  activities for aqueous environments undersaturated with ACC on average. Different squares represent analyses at different times or different locations along the aqueous system. It appears that 73 % of these environments reach saturation with ACC at least once in the time and/or place of sampling; it is assumed the variability in their chemistry makes them outliers.

## 3.4. Perspectives d'interprétations géochimiques des environnements passés



**Figure S1.11.**

**Geological evolution of the saturation index (SI) of seawater with respect to MHC/ACC1 adapted from the model by Kempe and Kazmierczak (1994).** The  $K_{s-ACC}$  was derived from Kellermeier *et al.* (2014; ACC1). The black dashed horizontal line indicates saturation with MHC/ACC1.

*Modèle d'un déclin des microbialites Protérozoïque-Phanérozoïque lié à des variations hydrochimiques*

Les microbialites ont subi plusieurs déclinés en abondance et en diversité, dont un particulièrement marqué à la fin du Protérozoïque entre 0,7 et 0,8 Ga (Awramik, 1971). Deux modèles majeurs ont été proposés pour expliquer ce déclin. (i) D'une part, un scénario le relie à l'augmentation des métazoaires qui peuvent brouter et enfouir les microbialites en s'appuyant sur une covariance entre l'abondance de ces métazoaires et celle des microbialites (Garrett, 1970 ; Walter et Heys, 1985). (ii) D'autre part, une exclusion compétitive par les algues associée à un changement majeur de l'hydrochimie auraient contribué à ce déclin (Fischer, 1965 ; Monty, 1973 ; Kempe et Kazmierczak, 1994). Notamment, l'hypothèse d'un océan Précambrien alcalin a été formulée sur la base d'arguments thermodynamiques, suivie par une diminution de l'alcalinité commençant au Protérozoïque, puis une modulation de cette alcalinité

dans les océans due à la réduction des sulfates (Kempe et Kazmierczak, 1994). Cette hypothèse soutient plutôt le deuxième scénario d'un changement hydrochimique majeur à l'origine du déclin des microbialites. Notamment, Kempe et Kazmierczak (1994) ont tracé une courbe de l'évolution théorique du SI de la calcite au cours des temps géologique, tamponné à 0,8 par la précipitation de  $\text{CaCO}_3$ . Dans ce sens, comme nos données semblent indiquer un contrôle de la formation des microbialites par la saturation des solutions vis-à-vis des carbonates de calcium, nous avons retracé à partir du modèle de Kempe et Kazmierczak (1994) l'évolution de la saturation océanique vis-à-vis des ACC (Fig. S1.11). De manière intéressante, sur cette représentation spéculative, l'eau de mer aurait pu être saturée par rapport aux ACC/MHC depuis l'Archéen jusqu'à la fin du Protérozoïque (SI ACC = 0,12 à 0,01 environ) mais serait devenue fortement sous-saturée par rapport aux ACC/MHC après le Néoprotérozoïque (SI ACC de -0,3 environ). On pourrait donc postuler que, suivant la théorie de Fischer (1965) et Monty (1973), des changements dans la chimie de l'eau de mer, peut-être à la fin du Protérozoïque, pourraient avoir causé le déclin des abondances de microbialites. De manière certaine, pour être validée, cette spéculation nécessiterait beaucoup d'autres contraintes supplémentaires sur la valeur du SI ACC dans les océans du passé. De plus, le contrôle de la chimie de l'eau par la précipitation des ACC comme condition nécessaire à la croissance des microbialites ne signifie pas que les communautés microbiennes et /ou d'autres paramètres biologiques n'ont eu aucun impact dessus.

Globalement, une meilleure compréhension des paramètres généraux qui conditionnent la formation des microbialites actuelles permettra potentiellement, par principe d'actualisme, de mieux comprendre les fluctuations dans l'abondance/la nature des microbialites au cours des temps géologiques.

## **4. Conclusions et perspectives**

Dans ce premier chapitre, nous avons généralisé l'hypothèse d'une saturation de la solution vis-à-vis des carbonates de calcium amorphes et/ ou de la monohydrocalcite comme condition nécessaire à la formation des microbialites, via la construction et l'analyse d'une base de données. Cette base de données, en répertoriant les paramètres physico-chimiques de 140 systèmes abritant des microbialites actuelles, a permis de mettre en place un modèle de saturation ajustable à l'avenir en fonction des nouvelles découvertes et analyses de microbialites qui auront lieu. Globalement, il est supposé qu'une fois les solubilités des ACC/MHC atteintes dans une solution, tout apport supplémentaire en carbone inorganique et/ou en calcium peut contribuer à la précipitation de carbonates, notamment sous formes de microbialites. Pour autant, les indices de saturation des différentes phases minérales carbonatées évoquées dans ce chapitre sont influencés par les concentrations et les flux d'autres espèces chimiques/ions comme les phosphates dissous ou le magnésium. Par exemple, il a été suggéré que des concentrations élevées en phosphates dissous peuvent inhiber la précipitation de carbonates de calcium anhydres cristallins et en conséquence augmenter les niveaux de saturation des solutions par rapport à ces phases (Pietzsch et al., 2022). Comme peu de données sont disponibles sur ces concentrations dans les solutions de formation des microbialites actuelles, il est difficile de déterminer si cette inhibition a un rôle majeur ou non dans la mise en place des niveaux de saturation de la solution en carbonates de calcium, et donc dans la formation des microbialites. Un autre intérêt de recenser de nombreuses données préalablement acquises sur un sujet d'étude donné, en l'occurrence les microbialites actuelles, est que ce type de travail peut mettre en évidence certaines lacunes dans l'acquisition de ces données de manière générale. Typiquement ici, cela a soulevé l'importance de mesurer entre autres les concentrations en phosphates dissous dans les milieux. De nombreuses autres données, parmi celles qui ont été répertoriées dans ce travail, apparaissent manquantes pour réaliser une méta-étude détaillée des environnements de formation des microbialites actuelles. Entre autres, les concentrations des solutions en éléments traces, l'abondance des EPS dans les microbialites vivantes, le fait que les microbialites soient encore actives ou non dans un milieu donné, etc, constituent des informations qu'il pourrait être intéressant de connaître à l'avenir pour mieux caractériser la potentialité d'un milieu à accueillir des microbialites.

Dans ce chapitre, nous nous sommes focalisés uniquement sur les paramètres physico-chimiques qui caractérisent les milieux de formation des microbialites actuelles. Pourtant, de

nombreuses études ont souligné la large gamme de communautés microbiennes, de leurs métabolismes et de leurs hétérogénéités spatiales dans les microbialites. L'hypothèse sur la saturation formulée ici suggère que certaines conditions physico-chimiques environnementales doivent être réunies au préalable pour permettre la participation des communautés microbiennes à la formation des microbialites. Par conséquent, cette hypothèse n'exclut pas l'impact des paramètres biologiques sur la formation des microbialites, ni la possibilité que certains de ces paramètres biologiques soient également une condition nécessaire à la formation des microbialites, dans le cas où la saturation vis-à-vis des ACC/MHC de la solution serait une condition nécessaire mais non suffisante. Une perspective à ce travail pourrait donc être de lister les analyses en métabarcoding/métagénomique qui ont déjà été faites sur des microbialites au cas par cas et effectuer sur ce groupement de données d'écologie microbienne le même type d'analyses statistiques que pour les paramètres physico-chimiques par exemple à l'échelle des classes/ordres procaryotes/eucaryotes, mais aussi à des échelles plus restreintes comme celle de la structure d'un biofilm. Ce type d'approche a déjà été utilisé sur un groupe de microbialites actuelles provenant de lacs de cratères mexicains. Notamment, Iniesto et al. (2021) ont montré qu'il existait un ensemble de taxons microbiens (core microbiome, 247 OTUs), partagé par l'ensemble des microbialites de ces lacs (*cf* introduction). Cela suggère que ce groupe de communautés microbiennes en particulier pourrait être impliqué dans la carbonatogenèse, et éventuellement constituer une autre condition nécessaire potentielle à la formation de microbialites dans ce type de milieu. Il serait intéressant de généraliser des analyses de la diversité microbienne à de nombreux autres cas de microbialites et de rechercher ce cœur microbien dans d'autres environnements. A partir de là, il serait théoriquement possible de spéculer, en fonction de la saturation de la solution et de la composition microbienne des microbialites, sur les natures nécessaires et/ou suffisantes des conditions chimiques et biologiques du milieu.

Enfin, les combinaisons des phases minérales présentes dans les microbialites reflètent en partie la physico-chimie du milieu, même si ces combinaisons sont les produits de nombreux autres facteurs environnementaux comme la nature du substratum géologique, la présence de biofilms et/ou de communautés planctoniques, etc. Ces combinaisons minéralogiques sont décrites au cas par cas en général, de même que pour les conditions physico-chimiques et biologiques, et sont données pour une large majorité des microbialites répertoriées dans la base de données. Pour autant, les relations entre les paramètres environnementaux et la composition chimique des phases minérales des microbialites sont complexes et difficiles à appréhender de

manière globale. Des analyses multivariées par exemple sur les phases minérales décrites en fonction d'autres paramètres environnementaux comme la composition des communautés microbiennes présentes, seraient intéressantes à faire en théorie afin de déterminer par exemple des conditions de formation de silicates ou de phosphates, moins répandus, dans les microbialites.

Toujours dans la continuité de ce travail où nous nous sommes intéressés aux microbialites actuelles, il pourrait également être pertinent d'établir une méta-analyse cette fois sur des microbialites anciennes. Cela permettrait de chercher les corrélations existantes ou non entre différentes caractéristiques des microbialites fossiles et de généraliser les observations nombreuses qui ont déjà été faites. Dans ce cas, les paramètres étudiés concerneraient en priorité des caractéristiques sédimentaires comme des traceurs géologiques/isotopiques. Cette question a fait l'objet d'un travail de thèse recensant les valeurs isotopiques d'un grand groupe de microbialites fossiles par Laurane Fogret (thèse). Plusieurs autres questions concernant la mise en commun et l'analyse de groupements d'observations faites au cas par cas sur des microbialites restent ouvertes.

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés au système des carbonates de calcium puisque la plupart des microbialites sont carbonatées. Pour autant, les saturations des environnements abritant des microbialites qui ont été répertoriés dans la base de données peuvent aussi être modélisées dans des diagrammes de solubilités concernant (i) les carbonates de magnésium et (ii) les silicates. Concernant le premier cas, aucune tendance/corrélation n'a été observée entre la saturation des solutions vis-à-vis des carbonates de magnésium et la présence/absence de microbialites. Cela renforce l'hypothèse que les chimies des milieux contenant des microbialites sont dominées par les saturations vis-à-vis des carbonates de calcium bien que certains auteurs aient mis en avant l'influence de la concentration en magnésium sur la solubilité des carbonates de calcium (Mergelsberg *et al.*, 2020). Dans le deuxième cas, comme très peu de microbialites ont une composition minéralogique dominée par des silicates de magnésium, ces milieux ont été exclus des analyses. Néanmoins, il pourrait être intéressant de comprendre de manière plus globale comment les saturations des solutions vis-à-vis des silicates influencent l'encroûtement des communautés microbiennes et dans quelle mesure ces silicates sont remplacés par exemple par des carbonates dans certains milieux (*e.g.* Alchichica ; Zeyen *et al.*, 2015), donc dans quelle mesure ces deux systèmes de précipitation se concurrencent lors de la formation des microbialites. Ces questions sont aussi valables pour d'autres types de systèmes de phases minérales dans lesquels des microbialites pourraient se

former comme les phosphates ou les sulfates. Par exemple, il a été reporté la présence de microbialites phosphatiques sur une zone côtière en Afrique du Sud, dans un environnement d'eau douce (Cape Recife, Büttner et al., 2020). De manière intéressante, ces microbialites permettent la précipitation alternative de carbonates de calcium et de phosphates de calcium associés à des structures biogéniques. De même, d'autres microbialites actuelles qui se forment plutôt dans des environnements évaporitiques sont aussi composées au moins très partiellement de sulfates de calcium comme le gypse (Debie et al., 2022).

Enfin, et pour terminer, la mise en place et les analyses d'une base de données répertoriant des environnements contenant des microbialites actuelles ont permis de renforcer l'hypothèse que la saturation de la solution vis-à-vis des ACC/MHC est une condition nécessaire à la formation de microbialites carbonatées, mais laissent ouvertes de nombreuses questions sur de potentiels autres paramètres contrôlant les milieux de leur formation.



**Chapitre II. Enregistrements de  
l'euxinie de la colonne d'eau dans les  
microbialites profondes du lac  
Alchichica**

## **1. Introduction**

Dans le chapitre précédent, nous avons vu qu'il existait un grand nombre d'occurrences de microbialites actuelles se formant dans une grande diversité d'environnements en termes de salinité, composition chimique des eaux, climats etc. Les interprétations faites des signaux portés par les microbialites fossiles pourront profiter d'une meilleure évaluation de cette diversité. En effet, cela permettra de mieux comprendre quels principes/observables sont éventuellement universels, partagés par toutes ces microbialites, et lesquels en revanche sont plus dépendants de situations locales. Cependant, on constate aussi que malgré toute cette diversité chez les microbialites actuelles, nous ne disposons pas ou peu de microbialites se formant dans des conditions anoxiques (un cas reporté pour des microbialites se formant près de sources de méthane ; Himmler et al., 2018). Or, les microbialites anciennes, celles de l'Archéen et une bonne partie de celles du Protérozoïque, se sont formées dans des eaux anoxiques, parfois en conditions euxiniques. Ceci limite par conséquent notre compréhension de certains processus biologiques et/ou géochimiques qui ont pu être impliqués dans la formation des microbialites anciennes. La découverte de microbialites actuelles dans les lacs d'Alchichica et d'Atexcac, exposées de manière saisonnières à des eaux anoxiques/euxiniques, nous offre ainsi une opportunité précieuse de nous interroger sur la façon dont elles fonctionnent lors de ces épisodes, et ce qui peut être enregistré au sein de la partie minérale par rapport à ces conditions. C'est ce dernier point qui sera l'objet de ce chapitre, rédigé sous la forme d'un article à soumettre.

Par définition, une solution est euxinique lorsqu'elle est anoxique et qu'elle contient des sulfures d'hydrogène (Lyons et al., 2009 ; Kemp et al., 2009). Actuellement, ces milieux lacustres sont localisés et rares. Il est estimé par exemple à partir d'analyses Fe-S-Mo de roches silicoclastiques que moins de 0,5 % des fonds marins sont euxiniques, avec deux exemples majeurs comprenant la mer Noire et le bassin de Cariaco au Venezuela (Lyons et al., 2009). Certains fjords en Norvège ou au Danemark contiennent aussi des eaux euxiniques du fait d'un échange restreint avec l'océan (Meyer and Kump, 2008). Plus globalement, comme la concentration totale en sulfates dissous dans un système aqueux reflète en théorie sa capacité à devenir sulfureux ou euxinique en conditions anoxiques, on peut s'attendre à retrouver des conditions euxiniques dans l'hypolimnion de lacs redox-stratifiés riches en sulfates. Notamment, plusieurs caractéristiques sont partagées par les environnements stratifiés actuels dont l'hypolimnion est euxinique : par exemple, ils sont en général profonds et peuvent

présenter une covariance entre les concentrations en phosphate dissous et en sulfures d'hydrogène dissous en profondeur (expliquée globalement par une réduction des oxydants et une libération d'hétéroatomes à partir de molécules organiques comme S, N et P dans la zone anoxique) (Meyer and Kump, 2008 ; Ozaki et al., 2011).

L'euxinie impose donc deux conditions de départ à la colonne d'eau : (i) une restriction en oxygène (permanente ou temporaire selon le mode de stratification de la colonne d'eau) et (ii) un cycle du soufre particulièrement développé pouvant prévaloir sur ceux d'autres éléments. Le paramètre (i) entraîne des conditions réductrices en profondeur. Des éléments comme le fer, le manganèse, l'uranium, le vanadium, ou le soufre peuvent précipiter sous leurs formes réduites. L'utilisation de la pyrite sédimentaire (texture, contenu en terres rares) comme proxy de conditions euxiniques/anoxiques, en parallèle d'autres proxy, a été répandue (Emmings et al., 2022 ; Large et al., 2022 ; Large et al., 2014). Les communautés microbiennes anaérobies utilisent des accepteurs d'électrons alternatifs au dioxygène comme les nitrates, le manganèse(IV), le fer(III) ou les sulfates selon le potentiel redox de l'environnement, qui lui-même varie avec la profondeur dans la colonne d'eau (Canfield et Thamdrup, 2009). Ainsi, les traces de la réduction de ces éléments peuvent donner des informations sur les conditions d'oxygénation du milieu. Ces « traces » se présentent dans l'enregistrement sédimentaire comme des phases minérales spécifiques (*e.g.*, hydroxydes de fer(II) comme les rouilles vertes, oxydes de Fe(II) et Fe(III) comme la magnétite, carbonates de fer(II) et/ou de manganèse(II)) et/ou un enrichissement en ces espèces réduites dans des phases minérales composées principalement d'autres éléments (*e.g.*, du Mn(II) ou Fe(II) dans la calcite). Pour autant, ces éléments, souvent des métaux de transition, ne sont pas forcément disponibles dans les milieux, ce qui rend alors cette source d'information inopérante.

(ii) Les paramètres bio-géochimiques d'un milieu euxinique sont également influencés par le cycle du soufre global, et notamment la présence de sulfures. Le soufre existe sous de nombreux états d'oxydation allant de (-2) à (+6) ; de fait, son cycle géochimique est complexe et a un rôle majeur dans le fonctionnement des colonnes d'eau. Bien que présent dans la structure de nombreuses protéines (notamment dans les acides aminés cystéine et méthionine ; Canfield, Kristensen et Thamdrup, 2005) et étant un élément nutritif essentiel pour les organismes, le soufre peut devenir toxique pour certains êtres vivants à partir d'un certain taux et sous certaines formes (Luo et al., 2018). Cet élément rentre majoritairement sous forme de sulfates dans les lacs, et participe à de nombreux types de réactions, notamment des réactions d'oxydo-réduction catalysées par les microorganismes. Ces processus consistent globalement

en des réductions dissimilatrices et assimilatrices, de l'oxydation et de la disproportionation. La sulfato-réduction est considérée comme une étape majeure du cycle du soufre dans les lacs et conduit par exemple à la formation de polysulfures après une réoxydation intermédiaire (Luo et al., 2018 ; Eckert et al., 2015). Même si celle-ci a lieu majoritairement dans les zones anoxiques comme les interfaces eau-sédiments avec un potentiel redox très négatif ou alors au niveau de l'oxycline, certaines bactéries sont aussi capables de réduire le soufre dans des zones oxygénées (Zamana et Borzenko, 2011). Dans les milieux stratifiés, les formes du soufre fluctuent en fonction des variations (saisonnnières en particulier) des réactions redox éventuellement catalysées par la biologie. Par exemple, les sulfures peuvent être oxydés en soufre élémentaire ou sulfites par des bactéries chimiotrophes et phototrophes dans les zones oxiques et anoxiques. Ces réactions multiples mènent à la formation d'espèces chimiques dissoutes, de colloïdes, de complexes, ou de phases minérales plus ou moins caractéristiques de l'euxinie.

Globalement, l'euxinie définit donc un état complexe de la colonne d'eau et est susceptible d'être enregistrée par les phases minérales lors de leur précipitation à partir des éléments réduits et/ou sulfidiques disponibles. C'est pourquoi il est possible d'envisager que les microbialites fossiles formées dans des conditions d'anoxie et/ou d'euxinie aient été modifiées par ces conditions. Dans quelle mesure ces microbialites ont des minéralogies/biologies différentes de celles qui se sont formées dans des conditions oxiques, et comment ces modifications ont été conservées au cours du temps, restent des questions ouvertes. Une approche pour trouver des éléments de réponse est d'étudier des analogues actuels, c'est-à-dire des microbialites formées dans des conditions euxiniques. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés spécifiquement aux microbialites prélevées en profondeur du lac Alchichica, au Mexique.

Comme précisé dans la partie « matériel d'étude et méthodes », le lac Alchichica se stratifie d'environ avril à octobre, ce qui s'accompagne de modifications de la physico-chimie de la colonne d'eau. Pendant la période de mélange en hiver, les eaux de surface oxygénées du lac sont refroidies par l'atmosphère et entraînées en profondeur du fait de leur plus grande densité, impliquant le mélange du dioxygène dissous dans toute la colonne d'eau. En été, les eaux de surfaces sont réchauffées et deviennent moins denses, ce qui entraîne une stratification de la colonne d'eau à partir d'une certaine profondeur. Parallèlement, les mécanismes de respiration consomment le dioxygène dissous disponible jusqu'à ce que, à un certain point, l'anoxie stricte soit atteinte en profondeur dans l'hypolimnion. La stratification du lac sépare

donc une masse d'eau oxygénée de surface d'une masse d'eau anoxique en profondeur. De plus, les analyses chimiques de la colonne d'eau ont montré que la concentration en soufre dissous est élevée dans le lac Alchichica (entre ~10 et ~12 mM en moyenne sur une année) en comparaison d'autres colonnes d'eau de lacs mexicains de la même zone comme Atexcac (~3 mM). Bien que les concentrations en sulfures dissous n'aient pas été déterminées à Alchichica, leur odeur présente lors de l'échantillonnage de la colonne d'eau profonde a clairement attesté de leur présence. Par conséquent, le lac Alchichica a été considéré ici comme saisonnièrement euxinique en profondeur.

Ainsi, un premier objectif était de comprendre si l'euxinie saisonnière du lac Alchichica peut être enregistrée par les microbialites ? Si c'est le cas, quels en sont les indicateurs dans la minéralogie ? Pour trouver des éléments de réponses à ces questions, nous nous sommes focalisés sur l'analyse des espèces du soufre dans la composition minéralogique des microbialites.

## **2. Paper draft, in preparation**

### **Varying sulfur speciation in modern carbonate microbialites forming under oxic and euxinic conditions**

Jeanne Caumartin<sup>1</sup>, Karim Benzerara<sup>1</sup>, Luis Carlos Colucho Hurtarte<sup>2</sup>, Marine Cotte<sup>2</sup>, Neha Mehta<sup>1</sup>, Robin Havas<sup>3</sup>, Christophe Thomazo<sup>3,4</sup>, Vladimir Betancourt<sup>5</sup>, Rosaluz Tavera<sup>5</sup>, Didier Jézéquel<sup>6</sup>, Purificación López-García<sup>7</sup>

<sup>1</sup>*Sorbonne Université, Museum National d'Histoire Naturelle, UMR CNRS 7590, Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC), 75005 Paris, France*

<sup>2</sup>*European Synchrotron Radiation Facility, Beamline ID21, 38000 Grenoble, France*

<sup>3</sup>*Université de Bourgogne, Biogéosciences, UMR CNRS EPHE 6282, Dijon, France*

<sup>4</sup>*Institut Universitaire de France, Paris, France*

<sup>5</sup>*Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Universidad Nacional Autónoma de México, DF Mexico, Mexico*

<sup>6</sup>*IPGP, CNRS UMR 7154, Université de Paris & UMR CARRTEL, INRAE-USMB, France*

<sup>7</sup>*Unité d'Ecologie Systématique et Evolution, CNRS, Université Paris-Saclay, AgroParisTech, Gif-sur-Yvette, France*

#### **Abstract**

Modern microbialites have been often used as models to interpret paleoenvironmental information carried by ancient microbialites. However, most modern microbialites grow under oxic conditions, hence offering limited analogy for the most ancient microbialites that formed under anoxic and sometimes sulfidic conditions. Modern carbonate microbialites forming under seasonal sulfidic anoxic conditions were recently discovered at depth in Lake Alchichica, Mexico, while shallower microbialites experience oxic conditions only. Here, we studied sulfur speciation in these microbialites down to the submicrometer scale, using synchrotron-based X-ray absorption near-edge structure spectroscopy (XANES) coupled with laboratory X-ray fluorescence mapping (XRF) and scanning electron microscopy (SEM) with energy dispersive X-ray spectrometry (EDXS). First, we detected pervasive sulfur in shallow and deep

microbialites. Second, sulfur speciation varied depending on the sampling depth: while carbonate associated sulfates (CAS) possibly associated with organic sulfur compounds were found at all depths, more reduced sulfur species appeared to be enriched in the aragonitic layers of deep microbialites, in association with biogenic structures remnants. These variations in sulfur speciation recorded in modern microbialites show that they do not form under oxic conditions only but also during seasonal anoxic periods. Moreover, this suggests that sulfur speciation in microbialites, if preserved over time, may be used as a proxy to infer past redox conditions.

## **Introduction**

Microbialites are organo-sedimentary rocks formed by benthic microbial communities that induce/influence/control mineral precipitation and/or by the trapping/binding of detrital sediments (Burne and Moore, 1987). They occur abundantly in the geological record, from the oldest ones dating back to the Archean era and being among the oldest traces of life (Allwood, 2006), to the most recent ones forming currently in a wide range of aqueous environments (Caumartin et al., 2023). As these emblematic objects record at least partly the geochemical and biological conditions under which they grow, they constitute interesting archives to reconstruct paleoenvironments.

Redox conditions in the oceans have dramatically changed over geological time through successive events of anoxia and euxinia (Lyons et al., 2009; Canfield et al., 2008) until full oxygenation conditions nowadays. Particularly, it was estimated that before ~2.5 Ga, oxygen was absent of the atmosphere and oceans (Shaw, 2008; Meyer and Kump, 2008). Before this period until 1.8 Ga, some redox proxies such as banded iron formations (BIFs), redox-sensitive mineral phases (*e.g.* uraninites, siderites, pyrites), cerium anomalies or isotopic fractionations (*e.g.* sulfur) suggest that dissolved iron was more abundant than sulfate resulting in anoxic and ferruginous conditions (Canfield et al., 2008). Sometimes after the emergence and diversification of cyanobacteria, a transition towards higher oxygen conditions occurred in the atmosphere and shallow oceans (Great Oxygenation Event, GOE) (Lyons et al., 2014; Raiswell and Canfield, 2012). Canfield et al. (2008) argued that instead of being totally oxygenated, the deep ocean became euxinic until glacial events beginning at 0.7 Ga (Lyons et al., 2009). Then, during the early Phanerozoic, ferruginous anoxic periods interspersed by euxinic periods prevailed in the deep ocean, before reaching the oxygen values currently known (Lyons et al., 2009). Several Phanerozoic biotic crises such as the end-Permian extinction are attributed to these episodic euxinic events in the ocean (Meyer and Kump, 2008). Moreover, mineral species diversified considerably after the establishment of oxidizing conditions in the atmosphere, rising from around 1,500 to 4,000 in number (Hazen et al., 2008). Therefore, oxygen level variations during geological times appear critical for the establishment and diversification of mineral-living interactions. Microbialites, since they record geochemical and biological environmental fluctuations, might offer an interesting paleoenvironmental archive which could provide details of local variations in oxygenation. However, this requires to understand how such variations might be recorded by microbialites. The oldest microbialites

were probably formed under conditions different in terms of oxygenation compared with most modern microbialites (*e.g.* oxic environment). For example, organisms such as anoxygenic phototrophs may have played a major role in their formation, using chemical species alternative to oxygen as electron donor, which contrasts with some modern microbialites where cyanobacteria appear to be more important (Bosak et al., 2007; Visscher et al., 2020). This questions the possibility to use modern microbialites from oxic environments as pertinent analogues of ancient microbialites which formed in anoxic or euxinic environments to derive any relationship between oxygenation conditions and what is geochemically recorded in these rocks. This is why we need case studies of modern microbialites forming under anoxic or euxinic conditions.

Here, we studied modern microbialites found at different depths, including some located down to 40 m, in the alkaline Lake Alchichica, Mexico. This lake is monomictic and stratifies seasonally with an oxycline oscillating between ~20 and ~36 m. The hypolimnion (bottom water column) becomes anoxic from ~April to ~October. Moreover, Lake Alchichica water column contains a relatively high concentration of sulfur, between 10 and 12 mM, creating seasonal euxinic conditions at depth (Muller et al., 2023). Overall, this shows that deep microbialites in Lake Alchichica experience seasonal euxinic conditions. Following that, we wonder if these deep microbialites record anoxic periods in their mineral assemblages, and how to identify these traces. We particularly compare the speciation of sulfur in deep microbialites with that in shallow microbialites, which grow under permanent oxic conditions. To this end, we combined scanning electron microscopy coupled with energy-dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDXS) analyses with synchrotron-based X-ray fluorescence (Synchrotron Radiation (SR)-XRF) mapping and X-ray absorption near-edge structure (XANES) spectroscopy at the sulfur K-edge.

## **Materials and methods**

### *Alchichica lake geochemical settings*

Lake Alchichica (19°24'49.45''N et 97°24'11.25''W) is a crater lake located in the Neogene-Eocene Trans-Mexican volcanic belt (TMVB) in the Serdán-Oriental Basin of central Mexico at an altitude of 2,326 m (Ferrari et al., 2012; Zeyen et al., 2021; Chako-Tchamabé et al., 2020). It is an oligotrophic endorheic lake mainly fed by rain and groundwater inflows (Zeyen et al., 2019). Alchichica presents the highest alkalinity/salinity concentrations among a series of Mexican lakes (including Atexcac, Quechulac, La Preciosa, Aljojuca, and Tecuitlapa) that spread along an alkalinity/salinity gradient (Zeyen et al., 2017). The lake physico-chemical parameters have been analyzed since at least 1941, showing that Alchichica is a monomictic lake, becoming seasonally stratified with one mixing event per year during winter. Its water column becomes anoxic below 30-36 m, usually from April to October (Alcocer et al., 2022). Moreover, Lake Alchichica is particularly well known for harboring modern microbialites, forming a carbonate reef along its shores.

### *Microbialite and water samples*

#### *Microbialites samples*

Alchichica microbialites were collected during two field campaigns conducted in May 2019 and October 2022 in the northern part of the lake. Five depths were sampled in 2022 at 3, 10, 20, 30 and 40 m. Three of these samples were more particularly analyzed here: those collected at 10, 30 and 40 m (Tableau A2.1, Annexes). Moreover, four samples collected during the 2019 field campaign at 5, 10, 20 and 40 m depth were also analyzed. All microbialites were collected by divers. The water column of Lake Alchichica was anoxic (*i.e.*, dissolved oxygen below detection limit) at depths below 36 m in 2022 and 23 m in 2019. The chemical and mineralogical compositions of shallow Lake Alchichica microbialites have been well studied by Zeyen et al., (2019, 2021). They are mainly composed of carbonates, with a dominant hydromagnesite ( $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )-aragonite ( $\text{CaCO}_3$ ) assemblage for shallow microbialites and hydromagnesite-aragonite-huntite ( $\text{CaMg}_3(\text{CO}_3)_4$ ) for microbialites deeper than 20 m (Caumartin et al., in prep.). We assume that all the microbialites analyzed here were living at the time of sampling as they were covered by a living biofilm.

### *Water samples*

Samples of the water column were collected during the two field campaigns in May 2019 and October 2022. A Niskin bottle was used to collect them from a boat anchored close to the center of the lake (Tableau A2.2, Annexes). Measurements of temperature ( $\pm 0.01$  °C), pH ( $\pm 0.1$  pH unit), O<sub>2</sub> ( $\pm 0.1$  mg.L<sup>-1</sup>) and conductivity ( $\pm 0.001$  mS.cm<sup>-1</sup>) depth profiles were carried out *in situ* using an YSI Exo2 multiparameter probe. In parallel, labels added to the rope every meter from the Niskin bottle allowed to assess the depth of sampling and these depths were checked using the depth gauge of a dive watch attached to the bottle. Twenty-four water samples were collected at different depths between 0 and 60 m. They were filtered a few hours after collection through 0.2 µm polyethersulfone (PES) filters and kept in sterile tubes for chemical analyses. For each depth, 6 mL of filtered water were acidified with 2 % nitric acid for ICP-AES analyses. The remainder was not acidified and used for major anion analyses by ion chromatography. Twelve-milliliter-exetainer tubes were further filled with filtered solutions for dissolved inorganic carbon (DIC) measurements. In order to assess the seasonal variations of the water column oxygenation in Lake Alchichica at different depths with a more statistically representative dataset, dissolved oxygen concentration values recorded since 1980 were compiled from the literature.

### *Methods*

#### *Chemical analyses of water solutions*

The water chemistry data of the water column of Lake Alchichica were measured from samples collected during two field campaigns in May 2019 and October 2022. All chemical analyses of Lake Alchichica solutions were carried out at the Institut de Physique du Globe de Paris (Tableau A2.2, Annexes). Concentrations of major and minor cations (Na<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, B<sup>3+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Li<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ti<sup>2+</sup>) were measured with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). Concentrations of major anions (F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> and SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) were measured with ion chromatography. DIC measurements were performed using an analytical Precision 2003 gas chromatography isotope-ratio mass spectrometry (GC-IRM) for the 2019 and 2022 samples, following the protocol described in Assayag et al. (2006).

### *Bulk chemical analyses of microbialites*

Between 1.5 and 2 g of the microbialite samples were crushed and powdered in an agate mortar. Major and minor element compositions were measured by the Service d'Analyse des Roches et Minéraux (SARM, Centre de Recherches Pétrographiques et Géochimiques, Nancy, France). After alkali fusion of rock samples with  $\text{LiBO}_2$  followed by dissolution in  $\text{HNO}_3$ , major element analyses were performed using an ICP-AES ICap 6500 (Thermo Fischer). The uncertainties were between 2 % and 25 % on the major element measurements and between 5 and 20 % for the minor element measurements, depending on their concentrations. Bulk analyses of organic carbon were carried out by decarbonation with 2 %  $\text{H}_2\text{O}+\text{HCl}$  using a carbon-sulfur elemental analyzer (HORIBA EMIA320V2). Bulk analyses of total carbon and sulfur were performed on the same analyzer using a second fraction of the sample, but without the decarbonation phase.

### *Preparation of thin and thick sections*

The three microbialites sampled at 10, 30 and 40 m depth in October 2022 were impregnated by LR-white resin, then cut into petrographic thin sections measuring  $\sim 30 \mu\text{m}$  in thickness by the Bourgogne Lithologie service in Dijon. In parallel, slabs from the same three microbialite samples but not impregnated with resin were cut and polished with a mechanical polisher EM TXP using successively 15.3, 9, 3, 2 and  $0.5 \mu\text{m}$  abrasive pastes under a stream of milli-Q water. These polished thick sections measured between 5 to 7 mm in thickness. They were all rinsed in ultrasonic baths with milli-Q water.

### *Scanning electron microscopy and energy-dispersive X-ray spectrometry (SEM-EDXS)*

The three thick non-resin-embedded sections were mounted on aluminum SEM stubs using double-sided carbon tape. They were further carbon-coated. SEM and EDXS analyses were conducted using a Zeiss Ultra 55 field emission gun SEM at IMPMC. Backscattered electron images were obtained using an accelerating voltage of 15 keV, a working distance of  $\sim 7.5 \text{ mm}$  and an aperture of  $60 \mu\text{m}$ , at high current, using an angle selective backscattered (AsB) detector. A Bruker EDS QUANTAX detector was used to determine the elemental compositions of selected areas of the samples by energy-dispersive X-ray spectrometry (EDXS). The EDXS elemental maps were semi-quantified using the ESPRIT software (Bruker) using the Pb-ZAF method (Pouchou and Pichoir, 1991).

### *Laboratory X-ray fluorescence spectroscopy (XRF)*

Elemental maps of major and trace elements were acquired for the thin sections of the 10-, 30- and 40-m deep microbialites using a Bruker M4 Tornado XRF spectrometer at the Laboratoire Géosciences Océan in Brest. Measurements were achieved using an X-ray excitation energy of 50 kV and a current of 600  $\mu\text{A}$ , under a 20-mbar vacuum. Areas were scanned with a spot size of 20  $\mu\text{m}$ , over a total area of 2000 x 1500 pixels, *i.e.*  $\sim 4 \times 3 \text{ cm}^2$ . The dwell time was set at 5 ms per pixel and each scan lasted for over 4 hours for each of the three samples.

### *Micro-X-ray fluorescence mapping and X-ray absorption near-edge structure (XANES) spectroscopy at the sulfur K-edge*

XANES and SR-XRF measurements were conducted on the 10, 30 and 40-m-deep microbialites on the ID21 beamline at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) in Grenoble. Samples were transferred to the microscope maintained under a vacuum of  $10^{-6}$  bar. X-rays were monochromatized using a Si(111) crystal monochromator. The beam size was 0.67  $\mu\text{m}$  x 0.44  $\mu\text{m}$  and the photon flux was about  $10^9$ - $10^{10}$  photons. $\text{s}^{-1}$ . X-ray fluorescent maps were acquired using an incident beam at  $\sim 2.5$  keV. X-ray fluorescence emission spectra were recorded using a silicon drift diode (SDD) detector with a dwell time between 0.1 and 0.2 s without attenuator. Phosphorus SR-XRF maps were also obtained over the same areas as the sulfur maps. The scanned areas measured between 25  $\mu\text{m}$  x 60  $\mu\text{m}$  and 500  $\mu\text{m}$  x 500  $\mu\text{m}$  with a spatial resolution between 0.4 and 4  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ . Moreover, the energy of the incident X-ray beam was tuned over a 2.47-2.51 keV range with an increment of 0.25 eV to measure XANES spectra at the sulfur K-edge. The energy calibration was achieved based on the white line of a gypsum ( $\text{CaSO}_4$ ) standard at an energy of 2.482 keV.

### *XANES and SR-XRF data processing*

The sulfur K-edge XANES spectra were analyzed using the Athena software. All spectra were aligned to the gypsum white line at 2.482 keV. The edge jump of each spectrum was normalized to 1 after fitting the baseline of the pre-edge at zero. Then, spectra were all modelled using peak fitting by spectrum deconvolution. We used two arctangent step functions to fit the edge jump, following the method described by Einsiedl et al. (2007). Each peak was fitted with a Pseudo-Voigt function (Wiltfong et al., 2005 ; Vogt et al., 2023). Specifically, one or two pseudo-Voigts were needed to correctly fit the sulfate peak. Overall, this fitting provided

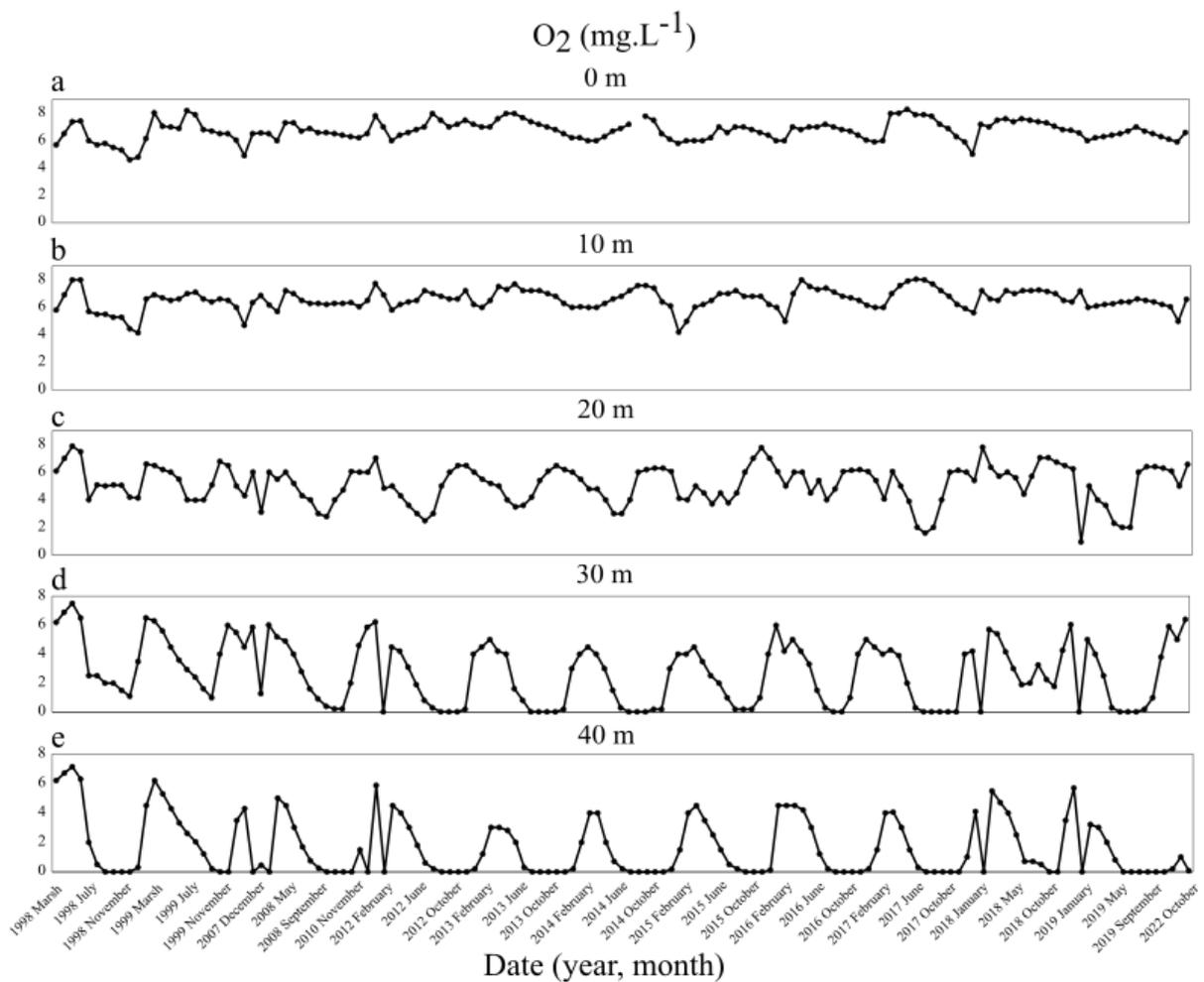
relative quantifications (*i.e.* that can be compared between microbialites) of the different S-species.

The SR-XRF maps were processed using the PyMca software. All the sulfur SR-XRF maps are presented here with the exact same conditions including brightness/contrast ratio and gain. The intensity distributions (histograms) of the elemental maps were extracted using the ImageJ software.

## Results

### Water column

The annual mean temperature of Lake Alchichica water column is  $\sim 16\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Alcocer et al., 2022). The bulk chemistry of Lake Alchichica water column at varying depths has been well documented since at least 1998 (Alcocer et Lugo, 2003; Sanchez-Medina et al., 2016; Kaźmierczak et al., 2011; Bautista-Reyes et al., 2012; Valdespino-Castillo et al., 2014; Alcántara-Hernández et al., 2022; Vilaclara et al., 2022; Alcocer et al., 2022; Zeyen et al., 2021; Muller et al., 2023; Havas et al., 2023; Caumartin et al., in prep.). In particular, the record of dissolved dioxygen concentrations shows that Lake Alchichica water column stratifies seasonally each year between  $\sim$ April and  $\sim$ October and anoxia is reached under a depth varying between 20 and 30 m (Fig. 2.1). Anoxia occurs every year since at least 1998.

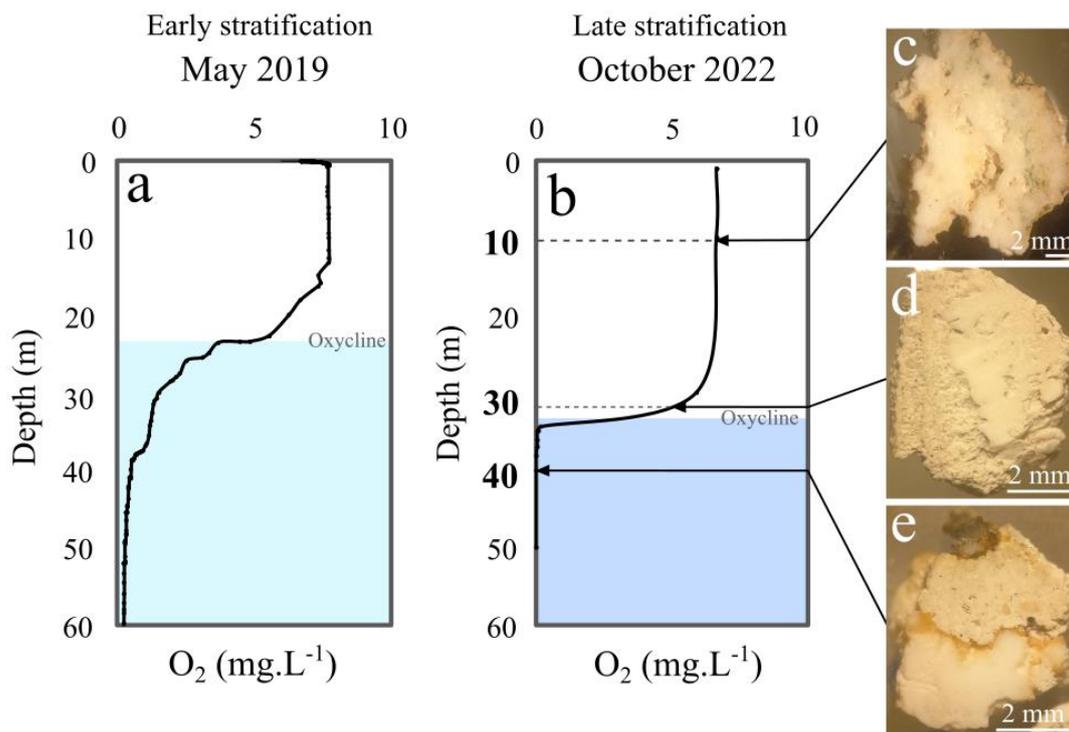


**Figure 2.1.**

**Variations of dissolved oxygen concentration ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) in the water column of Lake Alchichica as a function of time (from 1998 to 2022).** These variations are shown for five different depths: 0 m (a), 10 m (b), 20 m (c), 30 m (d) and 40 m (e). Data are from Alcocer and Lugo (2003), Sanchez-Medina et

al. (2016), Kaźmierczak et al. (2011), Bautista-Reyes et al. (2012), Valdespino-Castillo et al. (2014), Alcántara-Hernández et al. (2022), Vilaclara et al. (2022) and *in situ* measurements from the 2019 and 2022 field campaigns in Mexico.

Consistently, Lake Alchichica water column was anoxic at the depths where we collected some of the microbialite samples in May 2019, corresponding to the early stratification period and in October 2022, corresponding to the late stratification period (Fig. 2.2). The concentrations of major cations and anions were also measured at the same time as deep microbialite collection during the 2019 and 2022 field campaigns (Tableau A2.2, Annexes). The pH was estimated to  $\sim 9.2 \pm 0.1$  (over the whole water column and the two collection times) and the dissolved inorganic carbon (DIC) was high, at around  $36 \pm 0.05$  mM in 2022. The dissolved Mg and Ca concentrations were measured at  $18.1 \pm 0.26$  mM and  $0.22 \pm 0.005$  mM, respectively. Overall, the water column at all depths was supersaturated with respect to calcium and magnesium carbonate phases such as aragonite, hydromagnesite and huntite.



**Figure 2.2.**

**Depth profiles of the dissolved oxygen concentration in the Lake Alchichica water column (in  $\text{mg.L}^{-1}$ ; precision at  $0.1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) with associated sampled microbialites.** (a)  $\text{O}_2$  profile during early stratification in May 2019. The anoxic bottom layer of the water is colored in light blue. (b)  $\text{O}_2$  profile during late stratification in October 2022. The anoxic bottom layer of the water is colored in dark blue; (c) Thick section photograph of a microbialite sampled at 10 m depth; (d) Thick section photograph of a microbialite sampled at 30 m depth; (e) Thick section photograph of a microbialite sampled at 40 m depth.

Last, the water column sulfur concentration was also measured in May 2019 and October 2022, together with the dissolved iron content (Fig. 2.3). S and Fe concentrations were relatively constant over depth, with mean values reaching 10.35 mM and 0.72  $\mu$ M respectively, and some decrease for both elements and both field campaigns below the oxycline. Some variations of Fe were observed in 2022 with a peak at 7.42  $\mu$ M just above the oxycline. Although the sulfide concentration was not measured, the characteristic smell of H<sub>2</sub>S was clearly present for the water samples collected below 30 m depth in 2022.

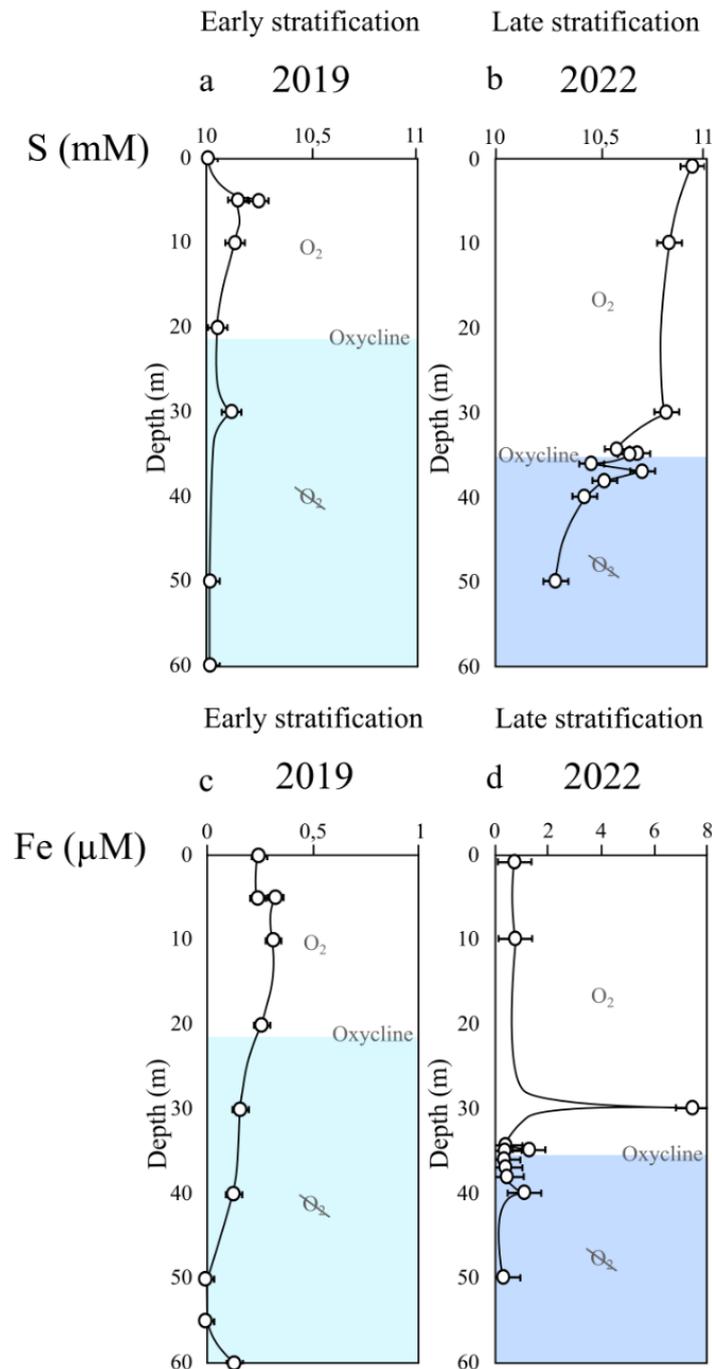
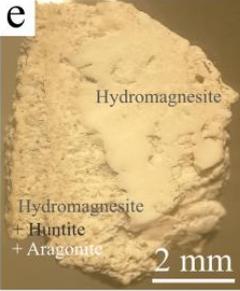


Figure 2.3.

**Sulfur and iron depth profiles in Lake Alchichica depending on the sampling period (in mg.L<sup>-1</sup>).**

(a) Sulfur depth profile during early stratification in May 2019. The anoxic bottom layer of the water is colored in light blue; (b) Sulfur depth profile during late stratification in October 2022. The anoxic bottom layer of the water is colored in dark blue; (c) Iron depth profile during early stratification in May 2019. The anoxic bottom layer of the water is colored in light blue; (d) Iron depth profile during late stratification in October 2022. The anoxic bottom layer of the water is colored in dark blue.

**Bulk chemical and mineralogical analyses**

	Microbialite samples collected in 2022	Mineral phases in microbialites thick sections	Bulk microbialite average S content (%wt) (2019-2022)
10 m depth			0.04
30 m depth			0.03
40 m depth			0.04

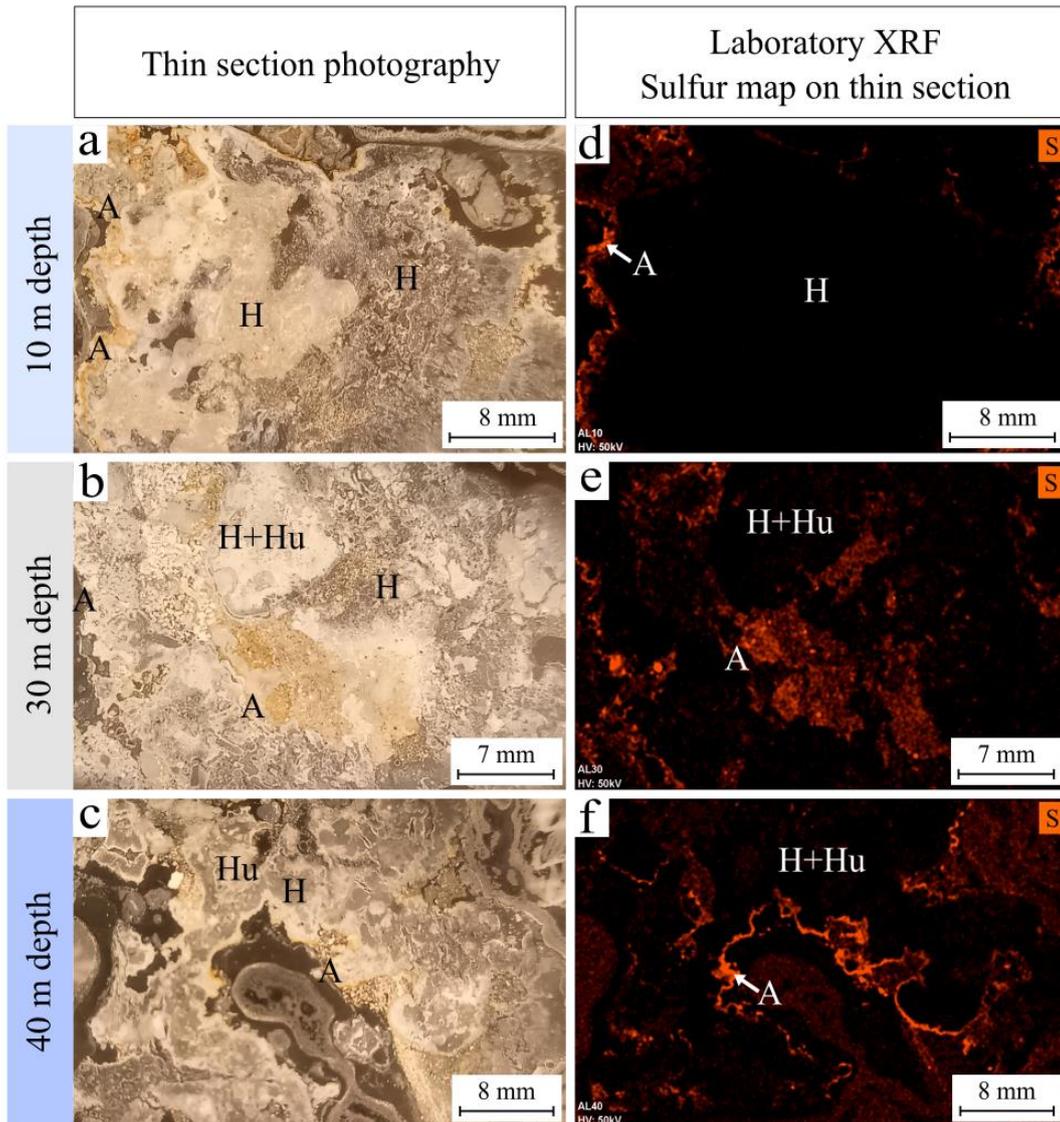
**Figure 2.4.**

**General appearance of the three Lake Alchichica microbialite samples studied.** (a) Picture of the 10 m-deep microbialite sample collected in October 2022; (b) Picture of the 30 m-deep microbialite sample collected in October 2022; (c) Picture of the 40 m-deep microbialite sample collected in October 2022; (d) Thick section picture of the 10-m-deep microbialite sample of the image a showing two main phases (arrows): aragonite on the edges of the microbialites and hydromagnesite deeper in the microbialite; (e) Thick section picture of the 30-m-deep microbialite sample of the image b showing a mixture between hydromagnesite, aragonite and huntite; (f) Thick section picture of the 40-m-deep microbialite sample of the image c showing aragonite on the edges of the microbialite and oxidized lamina in the middle and otherwise a mix between hydromagnesite and huntite phases; (g) Bulk average sulfur content (%wt) of the 10-m-deep microbialite sample; (h) Bulk average sulfur content (%wt) of the 30-m-deep microbialite sample; (i) Bulk average sulfur content (%wt) of the 40-m-deep microbialite sample.

The three microbialites analyzed in this study were collected in 2022 at 10 m (oxic water column), 30 m (close to the oxycline) and 40 m (seasonally anoxic water column) in depth (Fig. 2.1). The three samples showed marked differences in color (Fig. 2.4). The shallowest, at a depth of 10 m, was covered by a green biofilm. The sample from the 30 m depth (close to the oxycline in October 2022) showed a dark surface covered by a red biofilm. Finally, the deepest sample (40-m-deep) showed a black surface that change to light grey on exposure to air and was also covered by thin red biofilms. The mineralogical compositions of the three microbialites as attested by X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, were: aragonite and hydromagnesite for the 10-m-deep sample, aragonite, hydromagnesite and huntite for the 30-m and 40-m deep samples (Fig. A2.1a, -b, -c, Annexes). Last, no correlation was identified between the depth of sampling and the bulk chemical composition of microbialites (Fig. A2.1d, Annexes). Alchichica microbialites at all depths contained sulfur but at a relatively low concentration (Fig. 2.4g, -h, -i;  $0.035 \pm 0.002$  wt%, on average). In addition, the organic carbon content of the microbialites did not vary according to the depth and was relatively low with an average content of  $0.17 \pm 0.008$  wt% (Tableau A2.1, Annexes).

#### *Laboratory-based XRF analyses of microbialite thin sections*

The thin sections of the three microbialites collected at 10, 30 and 40 m were scanned by laboratory-based XRF to assess the sulfur spatial distribution within microbialites (Fig. 2.5). This supported the bulk sulfur detection in Alchichica microbialites. Moreover, XRF maps showed that sulfur was preferentially distributed at the outer rims for all microbialites, in correlation with the distribution of aragonite. By contrast, the signal was relatively low in hydromagnesite, composing the bulk mass of the microbialites. Last, sulfur seemed to be more widespread in abundance in deep microbialites (30 and 40 m depths) compared with the shallow one, where it was located only in aragonite on the edges of the sample.



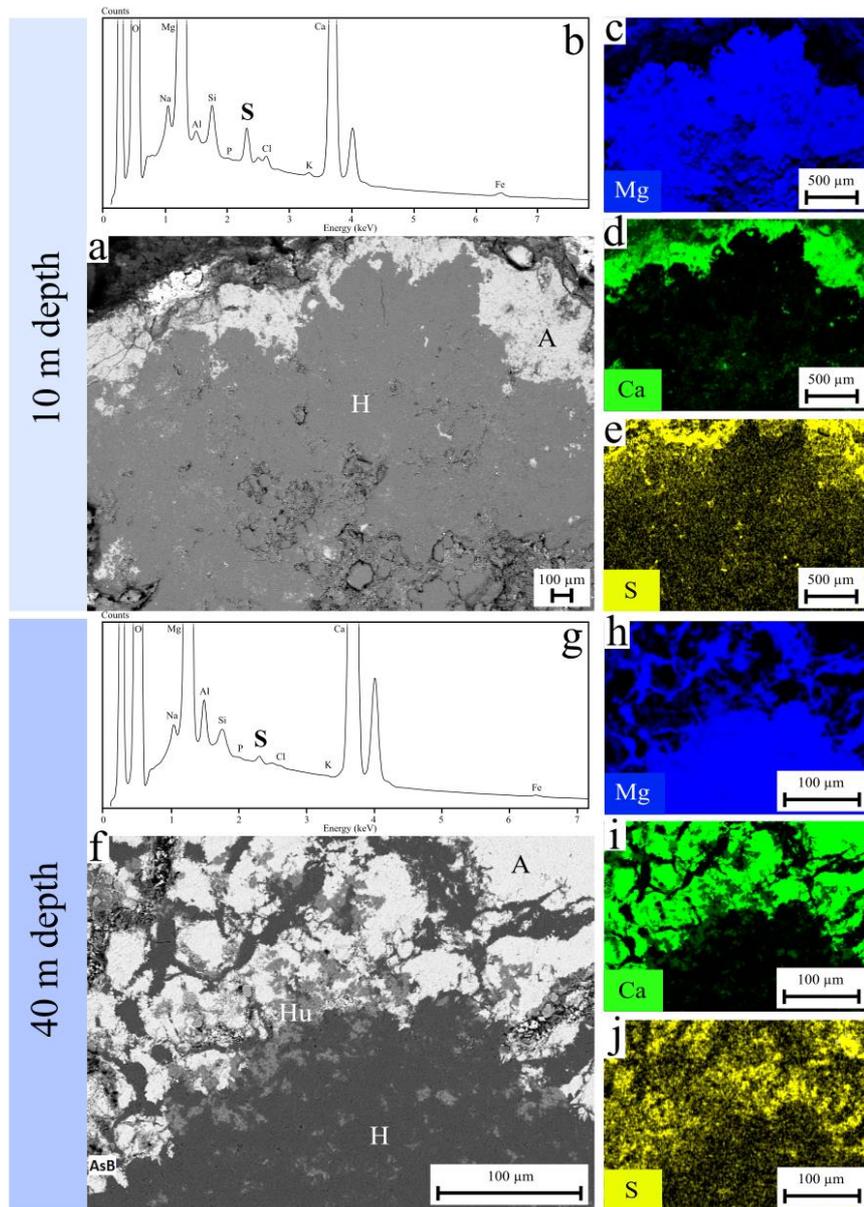
**Figure 2.5.**

**Comparison between the optical microscopy images and laboratory-XRF sulfur maps measured on thin sections of Lake Alchichica microbialites collected in October 2022 at different depths.** The following abbreviations were used for the mineral phases : A for aragonite, H for hydromagnesite and Hu for huntite; (a) Thin section image of the 10-m-deep microbialite sample showing aragonite on the edge of the microbialite and different areas of deeper hydromagnesite; (b) Thin section image of the 30-m-deep microbialite sample where patches of aragonite are localized within a larger area of a hydromagnesite-huntite mixture; (c) Thin section image of the 40-m-deep microbialite sample showing aragonite on the edges of the microbialite, deeper layers of hydromagnesite and huntite patches; (d) Laboratory-XRF sulfur map of the 10-m-deep microbialite sample showing a little amount of sulfur only on the edges of the microbialite (corresponding to the aragonitic area); (e) Laboratory-XRF sulfur map of the 30-m-deep microbialite sample showing sulfur areas co-localized with aragonite, and a little part in hydromagnesite; (f) Laboratory-XRF sulfur map of the 40-m-deep microbialite sample showing sulfur on the outer rim of the microbialite and a faint signal within the microbialite.

***Sulfur distribution assessed by SR-XRF and SEM-EDXS analyses***

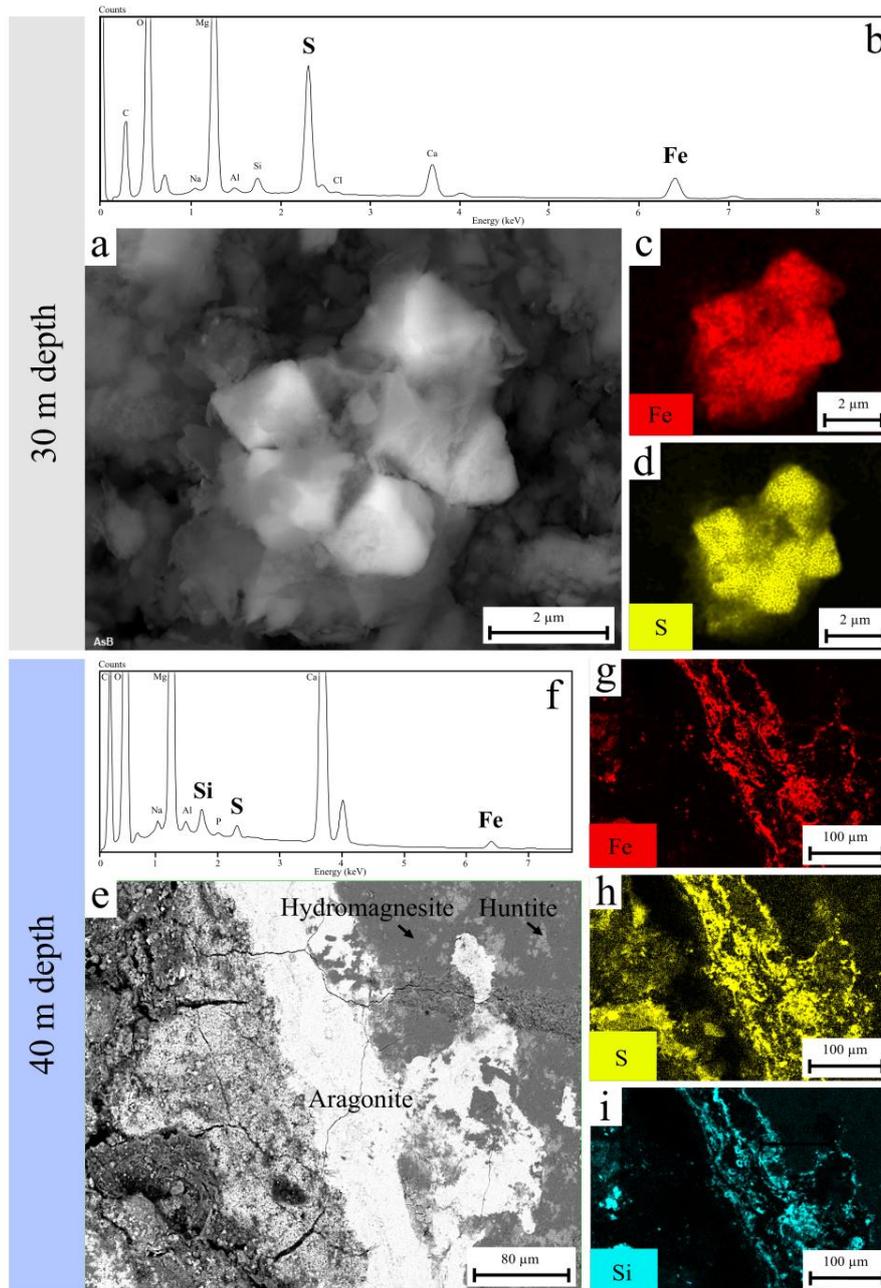
Representative areas of the 10 and 40-m-deep microbialites, measuring 0.35 mm x 0.27 mm and 2.65 mm x 1.95 mm, respectively, were mapped by SEM-EDXS semi-quantitatively (Fig. 2.6). Consistently with laboratory XRF analyses, (i) sulfur was detected in microbialites by SEM-EDXS with a semi-quantified content of 0.22 wt%; (ii) sulfur was mostly distributed in aragonite in the outer rim of microbialites. In the 40-m-deep sample, the sulfur also appeared relatively widespread in the huntite phase (Fig. 2.6j).

We also looked for additional sulfur-bearing mineral phases in the microbialites (Fig. 2.7, Fig. A2.2, Annexes). We evidenced iron sulfides mostly in 30-m-deep microbialites, but also few occurrences in the 40-m-deep sample (Fig. 2.7a, -b, -c, -d). These iron sulfides appeared as aggregated, ~1  $\mu\text{m}$  in size, euhedral crystals with a Fe/S molar ratio of ~1/2 to ~1/3, consistent with pyrite. The sulfur was occasionally associated with both iron and silicon. Last, part of the detected sulfur was associated with detrital phases containing Al, Si, Fe, Ti and Cu.



**Figure 2.6.**

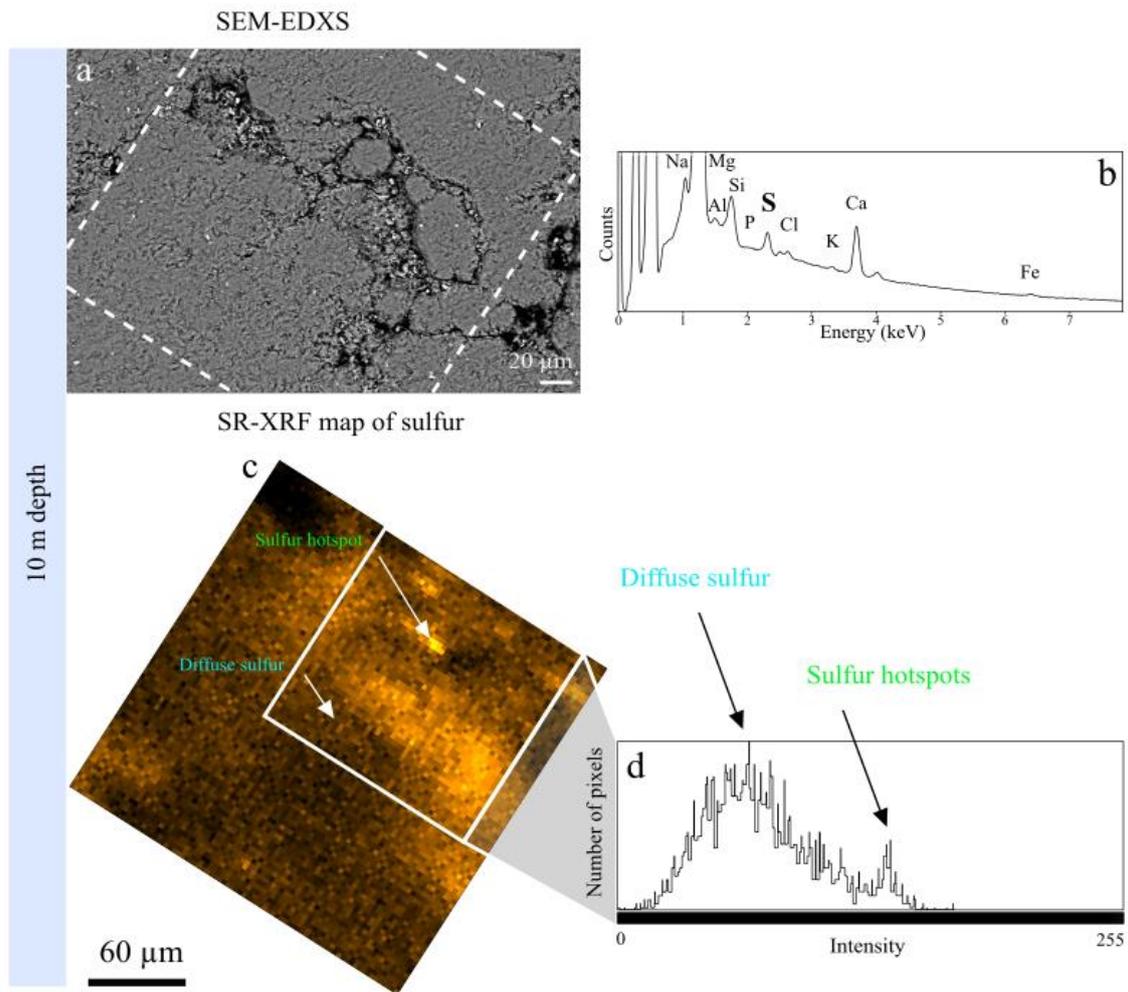
**SEM-EDXS detection of sulfur in Lake Alchichica microbialites collected in October 2022.** (a) SEM image in the backscattered electron mode of an area in the 10-m-deep microbialite thin section showing an outer rim composed of aragonite (A, white) and a deeper part composed of hydromagnesite (H, dark grey); (b) EDXS spectrum of the area shown in (a). The sulfur peak is detected at 2.307 keV; (c) EDXS elemental map of magnesium on the same zone as image a, mostly showing the distribution of hydromagnesite; (d) EDXS elemental map of calcium on the same zone as image a, showing the aragonitic part of the microbialite; (e) EDXS elemental map of sulfur on the same zone as image a, showing the sulfur enrichment on the outer rim of the microbialite; (f) SEM image in the backscattered electron mode of an area in the 40-m-deep microbialite thin section showing a fractured aragonite layer (A, white) on top of a hydromagnesite core (H, dark grey). Huntite patches appear at the aragonite-hydromagnesite interfaces (Hu, light grey); (g) EDXS spectrum of the image f area highlighting the detection of sulfur with a peak at 2.307 keV; (h) EDXS elemental map of magnesium on the same zone as image f, showing mainly the hydromagnesite part of the microbialite; (i) EDXS elemental map of calcium on the same zone as image f, showing mainly the aragonitic area of the microbialite; (j) EDXS elemental map of sulfur on the same zone as image f, showing the sulfur-enriched areas of the microbialite.



**Figure 2.7.**

**Some sulfur-bearing mineral phases in Lake Alchichica microbialites collected in October 2022 detected by SEM-EDXS analyses.** (a) SEM image in the backscattered electron mode of a euhedral ~1  $\mu\text{m}$  crystals aggregate in a 30-m-deep microbialite; (b) EDXS spectrum of the image an aggregate highlighting the detection of sulfur and iron; (c) EDXS elemental map of iron on the same zone as image a; (d) EDXS elemental map of sulfur on the same zone as image a; (e) SEM image in the backscattered electron mode of an aragonitic zone (white) surrounded by hydromagnesite-huntite in a 40-m-deep microbialite; (f) EDXS spectrum of the image e showing the detection of silicon, sulfur and iron in this zone; (g) EDXS elemental map on the image e of iron showing laminae within the aragonitic layer; (h) EDXS elemental map on the image e of sulfur with a similar spatial distribution as iron; (i) EDXS elemental map on the image e of silicon showing a similar spatial distribution as sulfur and iron.

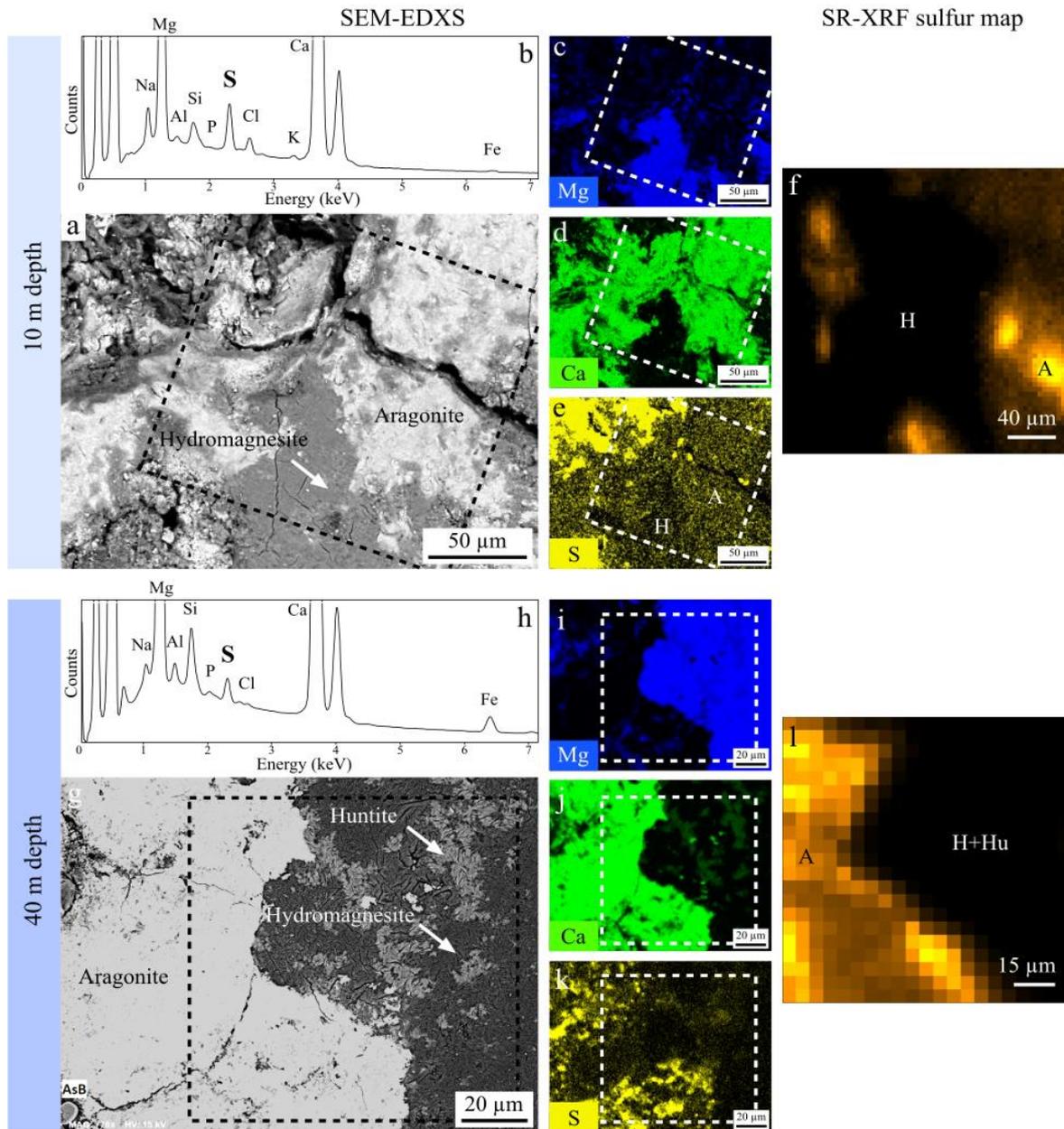
Synchrotron-based SR-XRF maps, providing a sub-micrometer spatial resolution and very good detection limits, were acquired on different areas from the 10, 30 and 40-m-deep samples. In total, 14 maps were acquired: 6 for the 10-m-deep sample, 2 for the 30-m-deep sample and 6 for the 40-m-deep sample (Fig. A2.3, Annexes). All were systematically reanalyzed by SEM-EDXS maps afterwards. These analyses globally show two distinct distributions for sulfur: one in a diffuse form and another one in the form of hotspots (Fig. 2.8).



**Figure 2.8.**

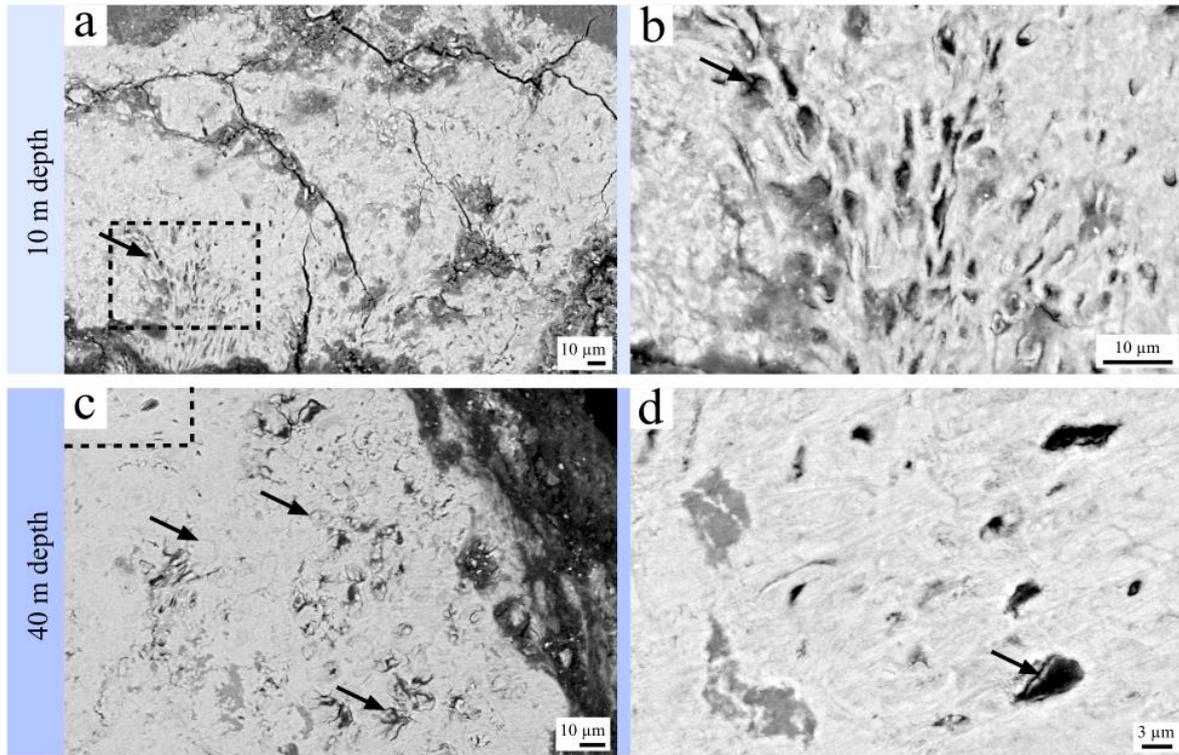
**Correlative SEM-EDXS and SR-XRF assessment of the distribution of sulfur in Lake Alchichica microbialites.** (a) SEM image in the backscattered electron mode of a hydromagnesite-aragonite (small white crystals dispersed over the area) zone in the 10-m-deep microbialite sample. The dashed white square indicates the area over which an EDXS spectrum and a SR-XRF sulfur map were acquired; (b) Average EDXS spectrum corresponding to the area depicted by a white square in a, highlighting the detection of sulfur; (c) SR-XRF sulfur map on the same area as that observed by SEM in image a. The arrows indicate one sulfur hotspot and one diffuse sulfur area; (d) Histogram of the intensity in the S map over the area depicted by a white rectangle in image c. The distribution shows two peaks: the larger one covers a wide range of intensity under ~130 and is associated with diffuse sulfur and the second one ranging from ~130 to ~200 is associated with the most intense sulfur hotspots.

Moreover, coupled SR-XRF and SEM-EDXS maps showed that sulfur hotspots distributed mainly in the same zones as diffuse sulfur, *i.e.* preferentially in aragonite, in the outer rim of microbialites from all depths (Fig. 2.9). These areas contained remnants of biological structures encrusted by aragonite (Fig. 2.10).



**Figure 2.9.** Preferential sulfur distribution in aragonitic layers of the Lake Alchichica microbialites collected in October 2022. The dashed squares indicate the zone where further SR-XRF analyses were performed. The following abbreviations were used: A for aragonite, H for hydromagnesite and Hu for huntite; (a) SEM image in the backscattered electron mode of an aragonite-hydromagnesite area close to the outer rim of the 10-m-deep microbialite sample; (b) Average EDXS spectrum of the whole area shown in image a, showing the detection of sulfur; (c) EDXS elemental map of magnesium on the same zone as image a, showing the hydromagnesite zone; (d) EDXS elemental map of calcium on the same zone as image a, showing aragonite; (e) EDXS elemental map of sulfur on the same zone as image a; (f) SR-XRF sulfur map area highlighted by the dashed lines and showing sulfur associated with aragonitic

zones; (g) SEM image in the backscattered electron mode of an aragonite-hydromagnesite-huntite interface on one edge of the 40-m-deep microbialite sample; (h) EDXS spectrum of the image g showing particularly the detection of sulfur; (i) EDXS elemental map of magnesium on the same zone as image g showing the hydromagnesite-huntite zone; (j) EDXS elemental map of calcium on the same zone as image g showing the aragonitic zone; (k) EDXS elemental map of sulfur on the same zone as image g; (l) SR-XRF sulfur map acquired on the zone of image g highlighted by the dashed square and showing sulfur associated with aragonitic layer.

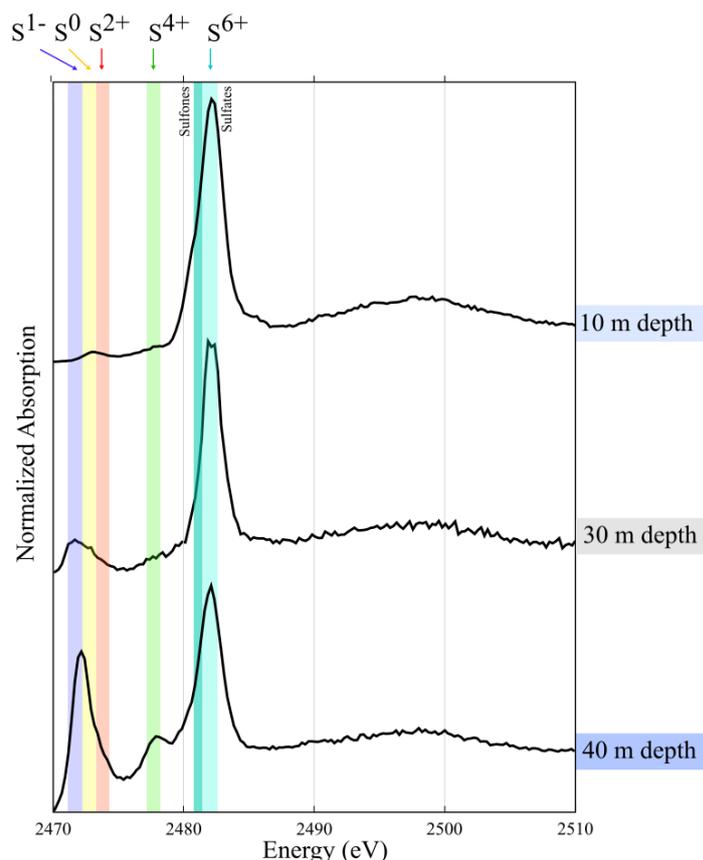


**Figure 2.10.**

**Remnants of biogenic structures in aragonite in Lake Alchichica microbialites.** (a) SEM image in the backscattered electron mode of an aragonitic layer located at the surface of the 10-m-deep sample. Aragonite appears in white, while hydromagnesite appears in dark grey. The arrow indicates one zone where biogenic structures are observed (surrounded by a dashed black rectangle); (b) Close-up outlined by a rectangle in image a, showing rounded objects interpreted as biogenic structures encrusted by aragonite; (c) SEM image in the backscattered electron mode of an aragonitic layer located at the surface of the 40-m-deep sample. Aragonite appears in white. The arrows indicate biogenic structures; (d) Close-up of the area outlined by a dashed rectangle in image c, showing rounded object interpreted as microfossils (pointed by arrows).

### Sulfur speciation measurements by SR-XANES spectromicroscopy

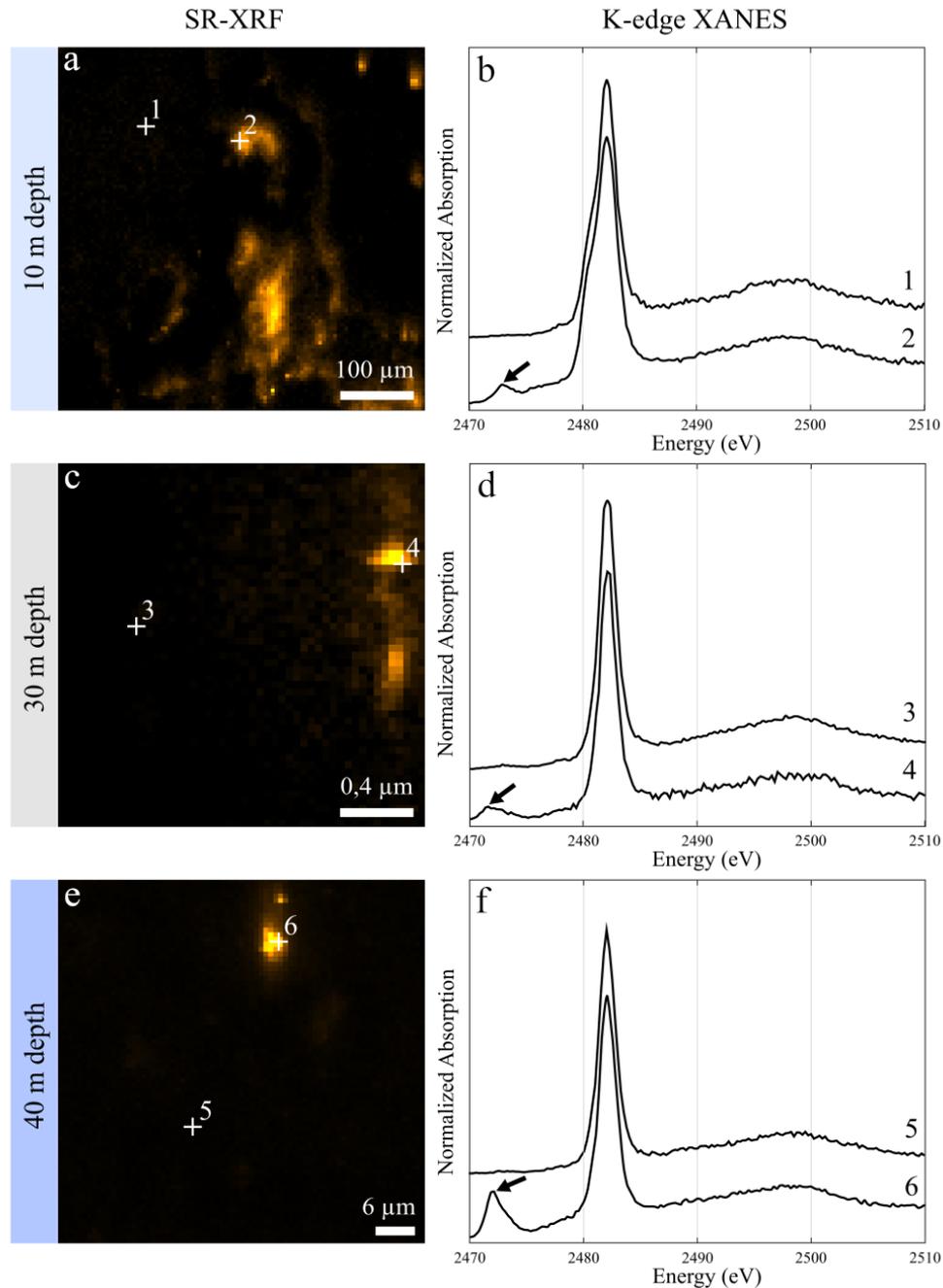
XANES spectra at the S K-edge were measured in order to assess the sulfur speciation in the samples (Fig. 2.11 & A2.4, Annexes): 28 spectra on the 10-m-deep sample; 37 on the 30-m-deep sample and 23 on the 40-m-deep sample. For all spectra, the main peaks distributed over six main energy ranges, associated with different sulfur redox states/species (Fig. 2.11). Peaks were attributed to different S species according to Orthous-Daunay et al. (2010): (i) Peaks in the 2481.9-2482.1 eV energy range corresponded to sulfates (S(VI)); (ii) the 2479.8-2480.5 eV energy range corresponded to S(V), most likely sulfones; (iii) the energy range between 2476.0 and 2478.1 eV corresponded to S(IV), most likely sulfoxides or sulfites; (iv) Peaks in the 2472.9-2473.9 eV energy range were indexed as S(II), possibly thiols, thioethers or aromatic rings functions; (v) peaks in the 2472.5-2472.9 eV energy range corresponded to S<sup>0</sup> (elemental sulfur); finally, (vi) peaks in the 2471.3-2472.2 eV energy range were attributed to S(-I), *i.e.* sulfides such as in pyrite.



**Figure 2.11.**

**Sulfur K-edge XANES spectra of Lake Alchichica microbialites collected in 2022.** Oxidation states of sulfur which were attributed to distinct energy ranges are highlighted by different lines in dark blue for S<sup>-1</sup>, yellow for S<sup>0</sup>, red for S<sup>+2</sup>, green for S<sup>+4</sup> and light blue for S<sup>+6</sup>. (a) One representative sulfur K-edge XANES spectrum of the 10-m-deep microbialite sample; (b) One representative sulfur K-edge XANES spectrum of the 30-m-deep microbialite sample; (c) One representative sulfur K-edge XANES spectrum of the 40-m-deep microbialite sample.

An overview of all the K-edge spectra shows that the spectral contribution of reduced sulfur species increased with depth (Fig. 2.11). Some spectra in the 40-m-deep microbialite show particularly intense peaks at 2472.08 eV (S(-I)) and 2477.73 eV (S(IV)), which were less pronounced or absent in the 30 and 10-m-deep samples (Fig. 11). The reduced sulfur species were mostly located in sulfur hotspots (Fig. 2.12), whereas diffuse sulfur areas mostly contained sulfates. However, sulfate species were detected in all spectra, including diffuse and hotspot distributions, and whatever the depth of the microbialite (Fig. 2.12, Fig.A2. S4, Annexes).

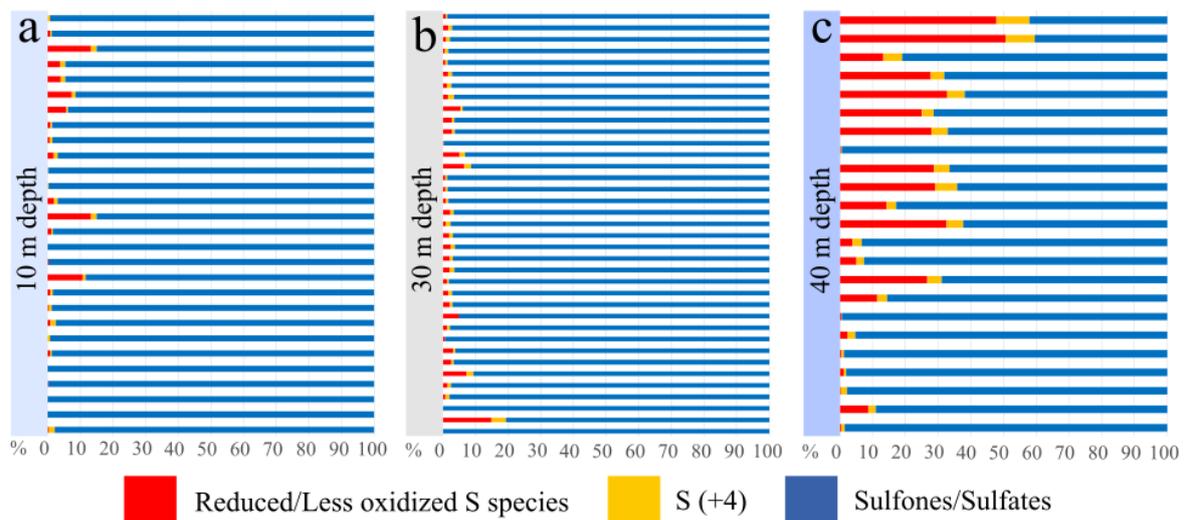


**Figure 2.12.**

**Spatial distribution of sulfur in microbialites at different depths.** (a) SR-XRF sulfur map on an aragonite-hydromagnesite zone (carbonate grains are mixed, see Fig. A2.3) within the 10-m-deep

microbialite sample. The crosses indicate the locations where sulfur K-edge XANES spectra shown in (b) were acquired. Spectrum 1 corresponds a diffuse sulfur zone. Spectrum 2 corresponds to a sulfur hotspot. The arrow highlights a peak characteristic of a reduced S-species in the spectrum 2; (c) SR-XRF sulfur map acquired on an aragonite-hydromagnesite zone within the 30-m-deep microbialite sample. The crosses indicate the locations where sulfur K-edge XANES spectra shown in (d) were acquired; (Spectrum 3 corresponds to a diffuse sulfur zone. Spectrum 4 corresponds to a sulfur hotspot. The arrow highlights a peak characteristic of a reduced species in the spectrum 4; (e) SR-XRF sulfur map acquired on an aragonite-hydromagnesite-huntite zone within the 40-m-deep microbialite sample. The crosses indicate the location where sulfur K-edge XANES spectra shown in (f) were acquired. Spectrum 5 corresponds to a diffuse sulfur zone. Spectrum 6 corresponds to a sulfur hotspot. The arrow highlights a peak characteristic of reduced in spectrum 6.

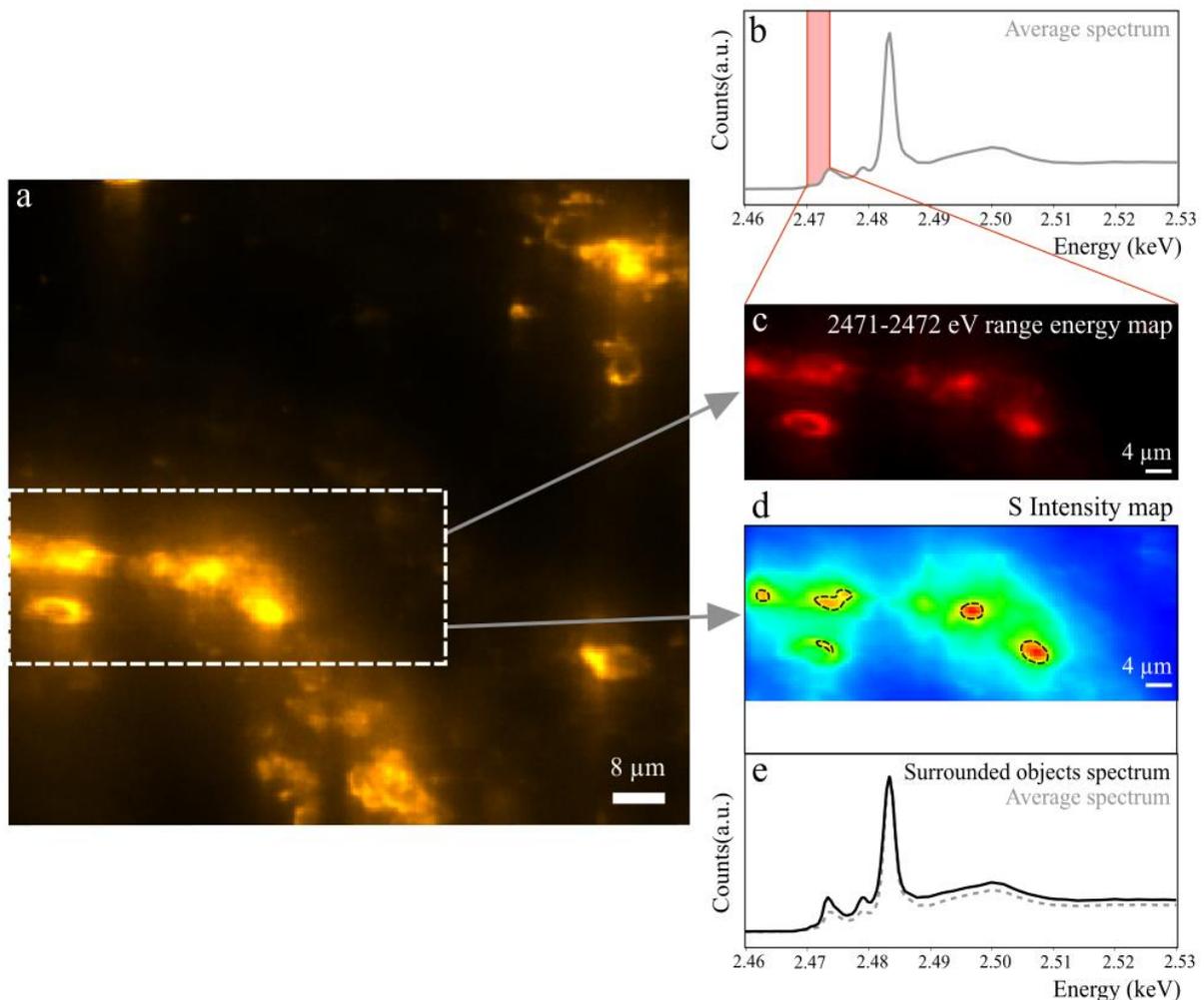
In order to assess more precisely the depth variations of the contribution of the different S species, we decomposed spectra based on two arctangents to model edge jumps and four to seven pseudo-Voigt functions to model peaks (Fig. A2.5, Annexes). The relative contributions of the different species were assessed based on the areas under the pseudo-Voigt profiles (Fig. 2.16). This showed that S(VI) species contribute to most of the XANES signal in the 10- and 30 m deep microbialites, with some signals due to reduced species in some spectra acquired on the 10-m deep microbialites and almost all spectra from 30-m deep microbialites. In 40-m deep microbialites, the contribution of reduced S such as sulfides, elemental sulfur, thiols, and S(IV) species to XANES spectra dramatically increased by ~4.5-fold on average.



**Figure 2.13.**

**Relative quantifications of three different sulfur energy ranges in the Lake Alchichica microbialites collected in October 2022.** The reduced/less oxidized sulfur species proportions (belonging to energy range from ~2471 to ~2473 eV) are represented in red. The S(+4) species proportions (belonging to energy range from ~2476 to ~2479 eV) are represented in yellow. The sulfones/sulfates functions proportions (belonging to energy range from ~2480 to ~2482 eV) are represented in blue. (a) Relative quantifications of sulfur species in the 10-m-deep sample; (b) Relative quantification of sulfur species in the 30-m-deep sample; (c) Relative quantification of sulfur species in the 40-m-deep sample.

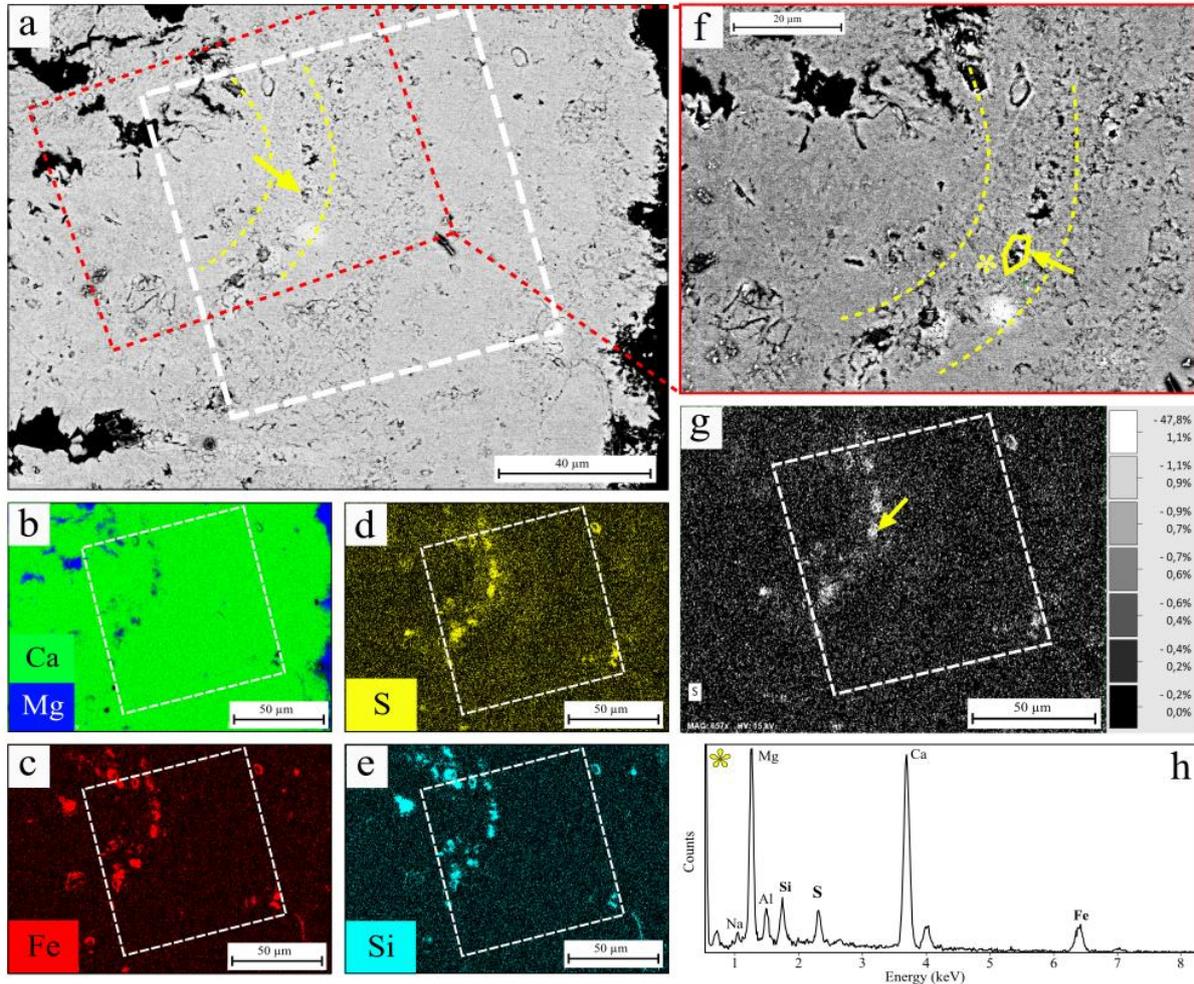
In addition, we acquired a hyperspectral map, *i.e.* an image with one XANES spectrum per pixel, in an aragonitic layer of the 40-m-deep microbialite (Fig. 2.13a). Based on the average spectrum of the area, a spectral region of interest spanning the 2471-2472 eV energy range was selected, corresponding to reduced, S(-I) species (Fig. 2.13b, -c). The corresponding emission map was plotted showing that reduced S species are mostly located in sulfur hotspots measuring about three to six micrometers in width. The average spectrum of these hotspots showed three peaks: the main one, corresponding to S(VI), one at 2472.2 eV and the smaller one at 2477.7 eV, the two latter ones being relatively more intense than in the mean spectrum of the whole scanned area (Fig. 2.13d, -e). Moreover SEM-EDXS analyses of the same area showed that the sulfur-containing hotspots, as also contained magnesium, silicon and iron (Fig. 2.14).



**Figure 2.14.**

**Hyperspectral map acquired on the 40-m-deep microbialite (400 nm/pixel; 64 μm x 24 μm area).** (a) SR-XRF sulfur map acquired on an aragonitic layer within the 40-m-deep microbialite thick section. The dashed rectangle shows the zone where the energy map was acquired. (b) Average sulfur K-edge XANES spectrum of the zone highlighted in image a, showing the energy range (in red) of the reduced sulfur species; (c) Energy map showing the sulfur distribution between 2471 and 2472 eV. Circular objects are highlighted with this projection; (d) Map intensity of sulfur from the zone

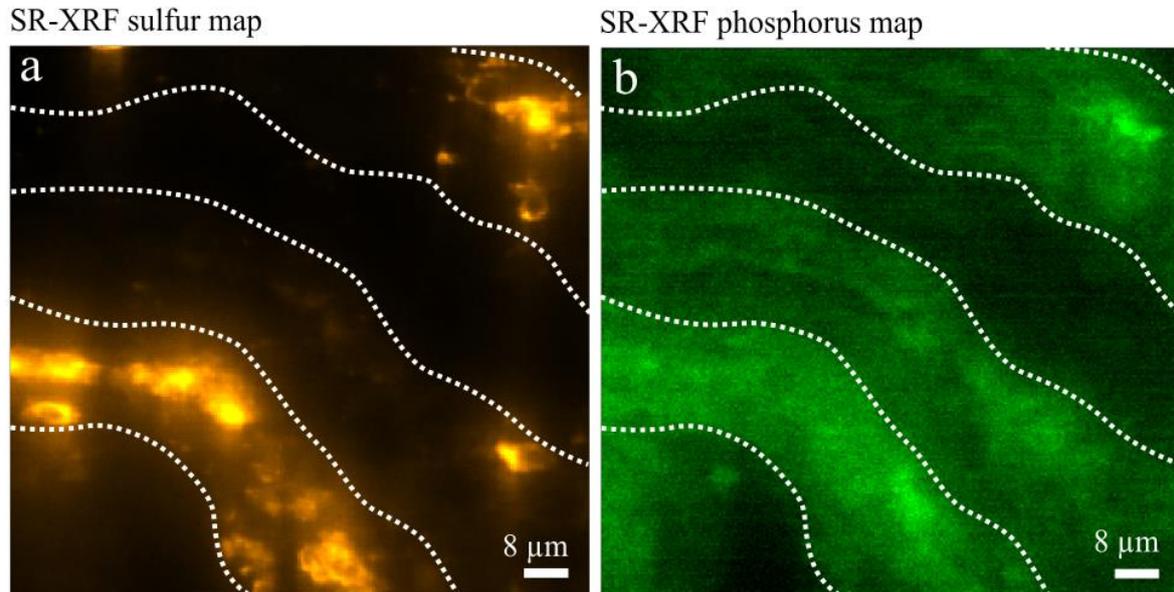
surrounded by a dashed line in image a (with red color the most intense and blue color the less). The circular objects form sulfur hotspots (highlighted by dashed lines) within a diffuse sulfur zone. (e) Sulfur K-edge XANES spectrum of the highlighted circular objects in image d (black line) in comparison with the average sulfur K-edge spectrum of the zone (dashed grey line), showing a more intense peak for the reduced sulfur species.



**Figure 2.15.**

**Association of silicon, magnesium and iron with sulfur in aragonitic layer of the Lake Alchichica microbialite collected in 2022.** (a) SEM image in the backscattered electron mode of an aragonitic layer located within the 40-m-deep sample, including the area in the white square where the SR-XRF map of the figure 13 with the biogenic sulfur-enriched structures was acquired. The yellow dashed lines highlight the laminae enriched in sulfur; (b) EDXS elemental map of calcium (green) and magnesium (blue) of image a showing the aragonitic and hydromagnesite zones; (c) EDXS elemental map of iron of image a; (d) EDXS elemental map of sulfur of image a showing the biogenic structures; (e) EDXS elemental map of silica of image a; (f) Close-up of the image a red rectangle on the remnants of biological structures encrusted in aragonite and corresponding to the SR-XRF map area of the figure 13. The yellow arrow and surrounded zone point one encrusted structure on which an EDXS spectrum was acquired (yellow asterisk); (g) Quantified map of sulfur. (h) EDXS spectrum of the sulfur-enriched zones in image f, corresponding to the yellow arrow on images a, f and g.

Last, SR-XRF measurements on the same area showed that above-mentioned reduced S hotspots were located within discrete P-rich laminae located within the aragonitic outer rim (Fig. 2.15).



**Figure 2.16.** Sulfur-enriched circular objects localized within phosphorus laminae in Lake Alchichica microbialites sampled in October 2022. Laminae are highlighted by dashed white lines. (a) Sulfur SR-XRF map acquired using a synchrotron radiation on the same zone as for the figures 13 and 14; (b) Phosphorus SR-XRF map acquired using a synchrotron radiation on the same zone as the image a.

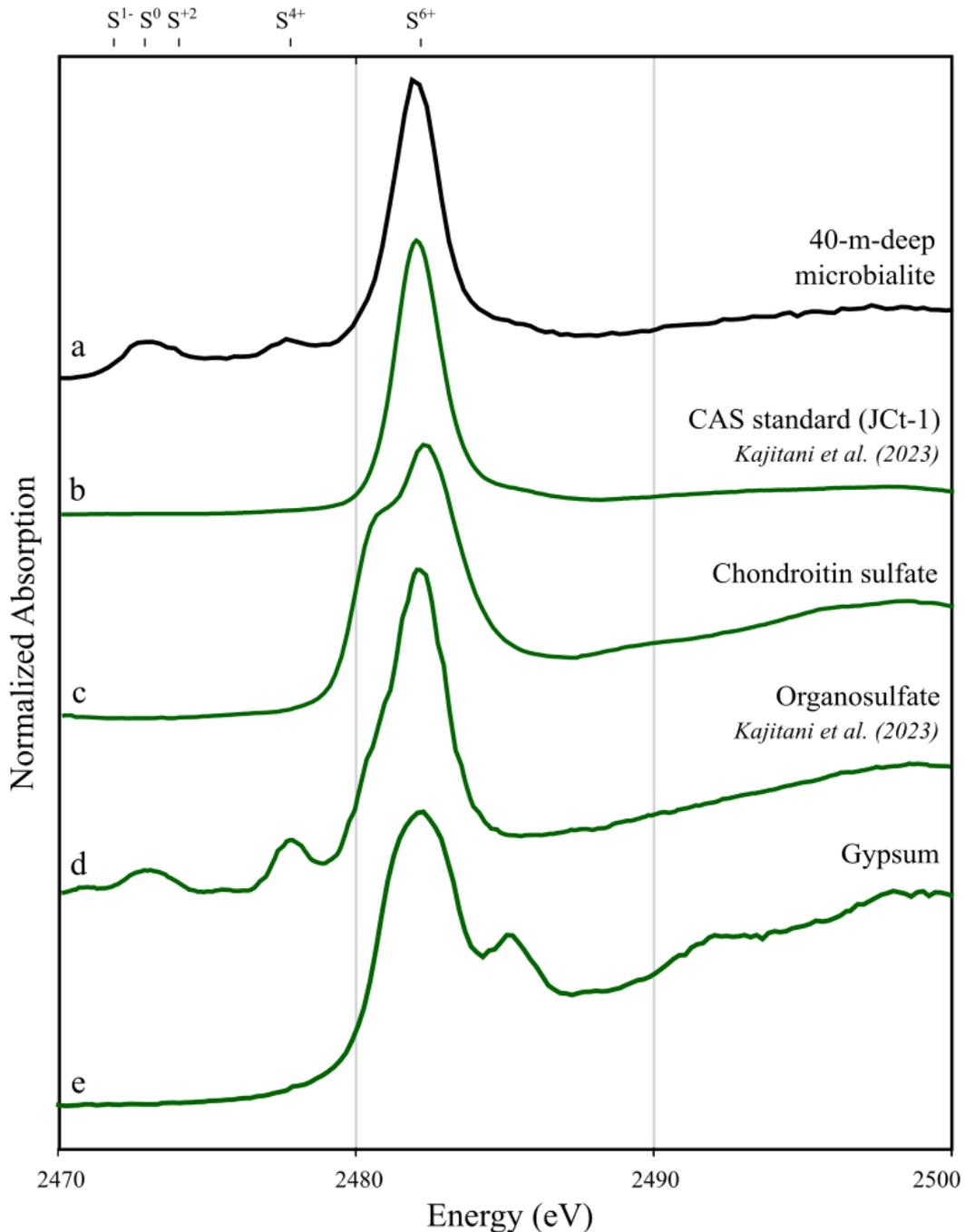
## **Discussion**

### *1. Sulfur detected in Alchichica microbialites is preferentially associated with aragonite, possibly and partly in the form of carbonate associated sulfate (CAS) and/or organic sulfates*

Alchichica microbialites contain sulfur, as unambiguously shown by SEM-EDXS, sulfur K-edge XANES and SR-XRF analyses. As attested by laboratory and SR-XRF and EDXS, sulfur is preferentially located in aragonite laminae in the microbialites at all depths. By contrast, the sulfur signal is much weaker deeper within microbialites, in hydromagnesite- and/or huntite-rich areas. One possible explanation for this distribution pattern of sulfur is that S abundance is controlled by microbial activity. Consistently with this hypothesis, aragonite most often forms outer layers at the surface of microbialites, where it entombs dense aggregates of cyanobacteria affiliated to the Pleurocapsales order (Gérard et al., 2013; Couradeau et al. 2013). As a result, part of the detected sulfur may result from the degradation of organic sulfur originally contained within the cells and eventually oxidized into sulfates. By contrast, no abundant cell remnants are observed within huntite and hydromagnesite.

Another possible, non-exclusive explanation for this distribution is that it is controlled by mineral structures. Sulfur was found predominantly as sulfates in all microbialites, at all depths and in all the microbialite-forming carbonate phases (aragonite, hydromagnesite and huntite) (Fig. A2.6, Annexes), contributing to between 40 % and 90 % of the total S K-edge XANES signal.

Comparison of the XANES spectra of diffuse S in Alchichica microbialites with the XANES spectrum of reference compounds precludes the possibility that S is carried by calcium sulfate mineral phases such as gypsum since the features after the white line do not match (Fig 2.17.). These features at ~2497 eV result from multiple scattering contributions of the sulfur species and can serve as signatures of the mineral phase (Veronesi et al., 2013; Fleet et al., 2005). By contrast, Alchichica microbialite sulfate XANES spectra are very similar to those of (i) carbonate associated sulfates (CAS) but also (ii) organosulfates.



**Figure 2.17.**

**Comparison between sulfur K-edge XANES spectrum of a 40-m-deep microbialite sampled in Lake Alchichica in October 2022 and reference spectra for sulfates.** (a) Representative sulfur K-edge XANES spectrum of the 40-m-deep sample; (b) Reference sulfur K-edge spectrum of a CAS standard called JCT-1 in *Kajitani et al., (2023)*; (c) Reference sulfur K-edge spectrum of a chondroitin sulfate standard from the ID21 organic sulfur compounds database; (d) Reference sulfur K-edge spectrum of an organosulfate from *Kajitani et al. (2023)*; (e) Reference sulfur K-edge spectrum of the gypsum used as standard during the beamtime at ID21.

The CAS hypothesis is plausible. Concentrations of dissolved sulfates (~10 mM) are high throughout Lake Alchichica water column, supporting the idea that it may be incorporated within precipitating phases such as aragonite by substituting carbonate groups. Combined SR-

XRF and SEM observations suggests that at least part of the sulfur appears diffuse, spatially associated with carbonate phases. Carbonate substitution by inorganic sulfates may be easier within aragonite than huntite or hydromagnesite, explaining the aragonite-preferentially-associated distribution pattern mentioned before, but this remains to be supported by future experiments. No spectral signature of CAS was detected by bulk FTIR (Fig. A2.7, Annexes). However, this could be due to the low amount of sulfur in the microbialites, lower than the detection limit of FTIR for these species.

Alternatively, at least a part of the sulfates in microbialites could be in an organic form. Consistently with this hypothesis, the Alchichica microbialite S XANES spectra matches very well that of n-hexadecyl sulfate (organosulfates) as measured by Kajitani et al. (2023), not only with the main sulfate peak, but also with the peaks at lower energies characteristic of sulfite/sulfoxide ( $S^{+4}$ ) and thiol, thioether/aromatic rings ( $S^{+2}$ ) functions. Overall, the sulfates detected in microbialites are possibly a combination of organic sulfates and inorganic sulfates in a CAS form. In the future, sulfur isotopes analyses may enable to better assess the origin of sulfates, for example, and gain a better understanding of the reactions from which they originate.

## ***2. Origins of sulfur in the water column and microbialites of Lake Alchichica***

The lake Alchichica water column contains about 11 mM of total dissolved sulfur (this study; Muller et al., 2023; Alcocer et al., 2022). This sulfur concentration is relatively high compared with lacustrine waters in general (Zak et al., 2021). Sulfur enters lakes mainly in the form of sulfates. Sulfates in Lake Alchichica may have several origins: they may be derived from the bedrock of the lake through mineral weathering (Zak et al., 2021). Alternatively, they may be produced by the hydrolysis of organic matter in the water column, derived from meteoric waters or from aerosols inputs (Zak et al., 2021). As sulfur exists under many forms, with oxidation states ranging from (-II) to (+VI), its geochemical cycle is complex, involving several types of microbially-catalyzed processes such as dissimilatory and assimilatory reductions, oxidation and disproportionation (Canfield, Kristensen and Thamdrup, 2005; Luo et al., 2018; Lamers et al., 2002; Camacho et al., 2010; Haglund et al., 2002). The presence of sulfur in Alchichica microbialites may therefore result either from precipitation into carbonates from dissolved sulfate in the water column, or from cycling by bacteria in the water column and biofilms, or both.

Moreover, even if we did not quantify the relative contributions of the different sulfur redox states in the Lake Alchichica water column, hydrogen sulfides were attested based on their smell in water collected below the oxycline in October 2022. Consistently, abundant cells of *Thiomicrospiraceae* (a gammaproteobacteria), a sulfur-oxidizing chemolithoautotroph, were observed below the oxycline in October 2022 and January 2012, also supporting the presence of dissolved sulfides (Iniesto et al., 2022; Alcocer, 2022). Overall, as anoxic conditions develop at the bottom of Lake Alchichica water column over the summer and fall seasons, deep microbialites experience euxinic conditions during at least part of the year.

### ***3. Euxinic conditions are recorded by reduced sulfur in microbialites***

Whatever the exact speciation, organic or inorganic, of sulfates in Alchichica microbialites, we also undoubtedly detected reduced sulfur functions. Compared with literature references, part of these functions likely corresponds to organic functions such as sulfoxides and/or thiols/thioethers/aromatic rings (*cf* Orthous-Daunay et al., 2010), some of them (~2472.9 eV for *e.g.* thiols/thioethers and ~2477.6 eV for *e.g.* sulfoxides) co-occurring. We also detected pyrite-sulfur and elemental sulfur in Alchichica microbialites. The distinction between elemental sulfur and pyrite-sulfur is not simple since peaks can overlap (Fig. A2.8, Annexes). However, two slightly different energy ranges were observed for these peaks, that we attributed to pyrite-sulfur for ~2471.3-2472.2 eV and elemental sulfur for ~2472.5-2472.9 eV. The reduced sulfur species were mostly co-localized in hotspots of different sizes and shapes, as attested by SR-XRF, mostly within aragonite (but both in aragonite- and hydromagnesite-rich areas for pyrite). Given that a multitude of biological processes intervene in the formation of microbialites and that sulfur is mostly present in aragonite which entombs biofilms, a possibility is that part of this sulfur consists of organic matter degradation byproducts. In addition, the reduced species in Alchichica microbialites, including pyrite sulfur, elemental sulfur, sulfur compounds containing thiols and sulfoxides functions, were sometimes found within phosphorus-lamines in aragonitic surface layers close to the biofilms, which support the hypothesis that the reduced sulfur recordings in Alchichica microbialites could be related to microbial processes.

On the other hand, the relative abundance of reduced sulfur species, including within iron sulfides, increases with depth. We observed for example that the peak corresponding to the +4/+2 oxidation states of sulfur, generally assigned to sulfite/sulfoxide and thiols functions found in organic compounds, becomes more intense at depth. This suggests that S<sup>+4</sup> could be

linked to an increase in the number of organisms that metabolize sulfur at depth (sulfur-oxidizing bacteria, anoxygenic photosynthesis with H<sub>2</sub>S as the source of reducing power), whereas at the surface we would have aerobic metabolisms. In parallel, the hotspots attributed to pyrite distributed in both aragonite- and hydromagnesite-rich areas and increased at depth. Strikingly, many pyrites were present in the 30-m-deep microbialite sample, close to the depth where the oxycline was located at the time of sampling. This is consistent with the hydrochemistry of the water column at this depth in October 2022 since water is anoxic and at the same time a dissolved iron concentration peak is detected right above: this iron detected in the dissolved fraction might correspond to a reactive iron pool (dissolved, (oxy(hydroxides))) which is transformed to iron sulfides below the oxycline. In this case, it is also likely that the sulfides required for pyrite precipitation at the oxycline come from microbial sulfate reduction. Moreover, we observed that hotspots containing elemental sulfur and sometimes thiols/thioethers functions were mostly localized in aragonite near biofilms in deep microbialites. In these hotspots, some had the shape/size of encrusted cyanobacteria and were found in phosphorus-rich lamines probably enriched in organic matter at 40 m depth. Therefore, this sulfur would come for example from sulfur-oxidizing bacteria with elemental sulfur inclusions (both in the water column and in biofilms), and could be related to microorganism anaerobic activity.

Overall, we observed that there is undoubtedly a difference between the sulfur chemical species recorded in shallow microbialites (constant oxic conditions at the water column scale) versus deep microbialites (seasonally anoxic conditions at the water column scale). According to the XANES spectra, this difference is mainly due to the presence of S<sup>0</sup>, pyrites and organic sulfur compounds at depth. Therefore, the sulfur speciation in the microbialites may constitute a way of distinguishing between environments that undergo euxinia at least once a year. One possibility is that reduced sulfur is incorporated within microbialites when no carbonate precipitates, via sulfide formation within the porosity. Alternatively, sulfides may be incorporated within microbialites upon their growth (*i.e.* calcification) during seasons when euxinic conditions prevail. This last possibility is supported by the fact that solutions are supersaturated with amorphous calcium carbonates and monohydrocalcite all the time, a condition which has been shown to be necessary for calcification (Caumartin et al., 2023). In any case, the sulfur speciation suggests that deep microbialites record euxinic conditions in the water column.

However, we do not know exactly what happens to these signatures after diagenesis. First, might be a modification of sulfur-containing organic functions in biofilms. This means that sulfur content in microbialites may partly depend on biofilm degradation, which may itself depend on the composition of microbial communities and their (S-related) metabolic capabilities. In addition, the replacement of aragonite and hydromagnesite by huntite was shown to take place in deep microbialites only. This possibly drives a loss of organic matter in the deep microbialites (highlighted by a loss of autofluorescence) which is likely to remove some of the organic sulfur functions. As a consequence, tracking euxinia in the microbialites imply not only to carefully consider the reworking of the mineral phases between their deposition/precipitation from the water column on the top of the microbialites and the biofilms decay, but also the differential diagenesis between shallow and deep microbialites.

## **Conclusion**

Here, we studied the sulfur speciation in modern Lake Alchichica shallow and deep microbialites that experience constant oxic *vs.* seasonally euxinic conditions, respectively. By combining bulk chemical analyses, laboratory XRF, SEM-EDXS and X-ray absorption near edge structure spectroscopy at the sulfur K-edge, we have shown that the sulfur speciation varies depending on the depth of formation. While sulfate is the major form of sulfur in microbialites at all depths, reduced sulfur species, such as pyrite-sulfur and elemental sulfur were relatively more abundant in deep microbialites forming under seasonally anoxic conditions *vs.* shallow microbialites, suggesting a sulfur signature recording euxinia. Previously, the sulfur isotopic composition of pyrites was proposed as a signature of microbial sulfur cycling in past environments (Marin-Carbonne et al., 2022). Here we show that combining this approach with a systematic assessment of sulfur speciation at multiple scales may strengthen our capability to use microbialites to infer sulfur cycling in alkaline lakes.

### **3. Données supplémentaires**

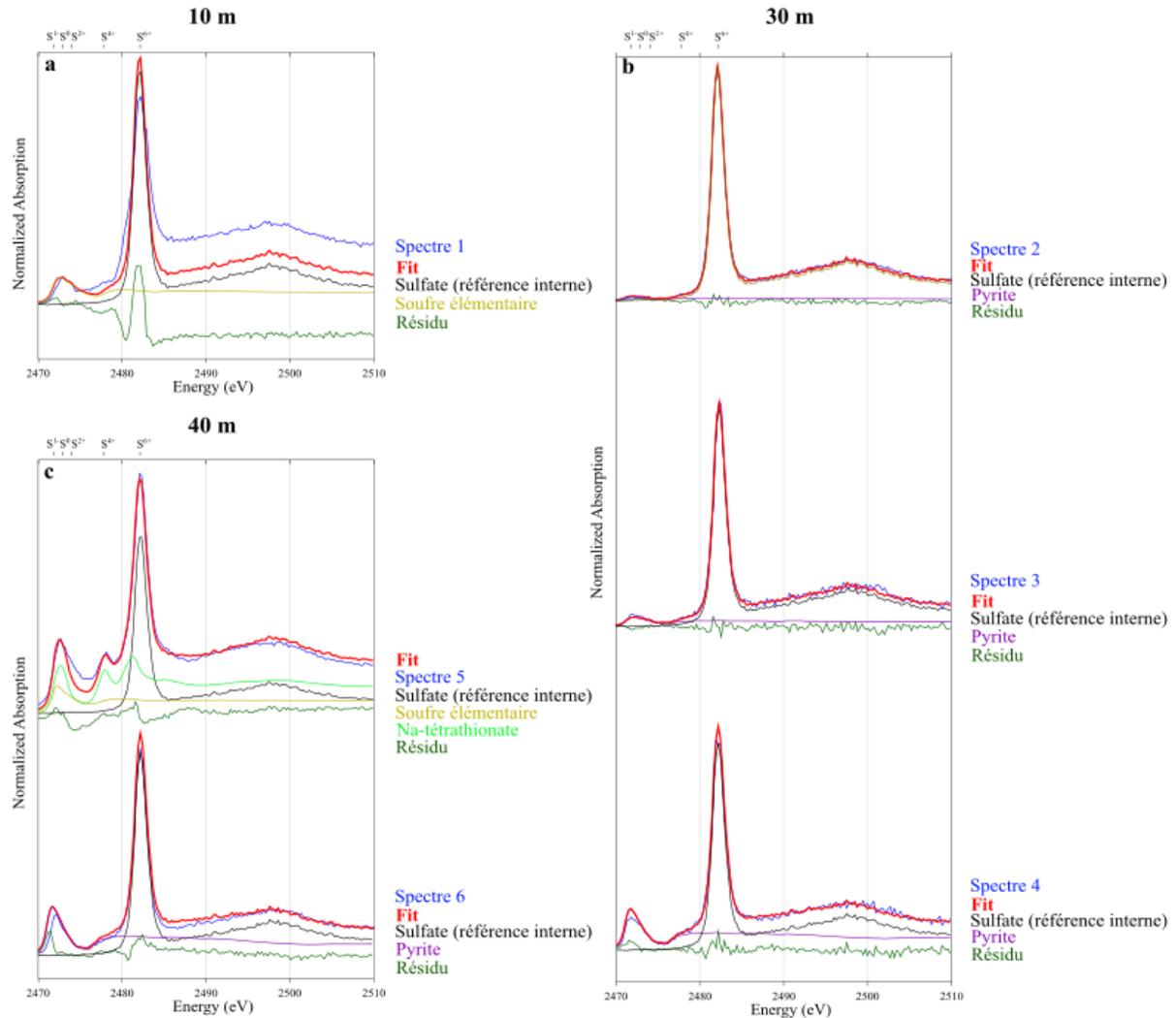
#### *3.1. Données supplémentaires relatives au manuscrit*

Les 8 figures et les 2 tableaux supplémentaires du manuscrit sur les signatures redox du soufre dans les microbialites d'Alchichica sont regroupés en annexes (pages 347 à 356). La partie qui suit montre des essais d'autres méthodes d'analyses des signatures du soufre en XANES et FTIR qui n'ont pas été retenues dans l'article.

#### *Approche par combinaisons linéaires pour l'interprétation des spectres XANES*

Plusieurs types d'analyses ont été testées afin d'interpréter les données XANES récoltées sur les échantillons de microbialites prélevées à 10, 30 et 40 m de profondeur en octobre 2022 à Alchichica. Notamment, une première approche permettant d'identifier les pics des spectres XANES est de les fitter à l'aide de combinaisons linéaires. Ceci permet d'obtenir une quantification relative des composants présents dans les échantillons en prenant en compte les différentes caractéristiques des spectres des standards utilisés et en s'affranchissant de l'utilisation d'un modèle. Mais sa précision est limitée par le nombre/la nature des références utilisées qui ne correspondent pas forcément aux nombres/natures des composants présents dans l'échantillon (Manceau et al., 2012). Cette méthode est basée sur l'hypothèse que la teneur en soufre des échantillons peut être dérivée d'une combinaison linéaire simple entre plusieurs spectres caractéristiques de composants soufrés (Orthous-Daunay et al, 2010). Pour cela, un ensemble de standards a été collecté dans la littérature et dans la base de données de ID21 et comparé aux spectres des microbialites. La figure A2.9 (Annexes) présente une grande partie des principaux spectres de standards organiques et inorganiques qui ont été utilisés comme références et pour beaucoup testés à l'aide du logiciel Athena.

Les combinaisons linéaires ont été produites après normalisation, calibrage et alignement des spectres. La figure 2.18 présente certaines des combinaisons linéaires qui fittaient au mieux les spectres XANES provenant des microbialites.



**Figure 2.18.**

**Combinaisons linéaires sur les spectres XANES au seuil K du soufre des microbialites d'Alchichica prélevées en octobre 2022 avec les références de soufre élémentaire, de pyrite et de Na-tétrathionate de la base de données ID21 et de sulfone de Manceau et al. (2012).** (a) Spectre XANES 1 au seuil K du soufre acquis sur l'échantillon de 10 m de profondeur ; (b) Spectres XANES au seuil K du soufre 2, 3 et 4 acquis sur l'échantillon de 30 m de profondeur ; (c) Spectres XANES au seuil K du soufre 5 et 6 acquis sur l'échantillon de 40 m de profondeur.

Dans l'ensemble, ces combinaisons linéaires ont mis en avant plusieurs choses :

(i) Certains fits étaient corrects, notamment pour l'échantillon de 30 m de profondeur (Fig. 2.18, spectres 2, 3, 4 et 6). Ces spectres ne présentaient en général que le pic des sulfates et parfois un pic à 2471.9 eV attribué à la présence de pyrite. Dans ce cas, les combinaisons linéaires entre une référence pour des CAS et une référence pour la pyrite permettaient de les reconstruire correctement. Les proportions étaient d'environ 58 % pour les CAS et 42 % pour la pyrite (spectre 4 de la figure 2.18 par exemple). Ces spectres provenaient surtout de

l'échantillon de 30 m, de manière cohérente avec un enrichissement en pyrite à cette profondeur, mais aussi de 40 m de profondeur (Fig. 2.18, spectre 6).

(ii) D'autres fits fonctionnaient moins bien. D'une part, la référence interne utilisée pour le CAS (au même titre que les autres références de CAS trouvées dans la littérature) ne couvrait pas la totalité de l'aire sous le pic des sulfates (Fig. 2.18, spectre 1). La partie manquante (produisant en général un épaulement sur le pic des sulfates) était localisée vers 2480 eV et correspondait a priori à une fonction sulfone (Orthous-Daunay et al., 2010). Comme cette caractéristique ressemble à l'épaulement à la même énergie dans le spectre d'un sulfate organique (chondroïtine sulfate), il est également possible que cette partie du pic des sulfates soit due à une composante organique dans les spectres.

D'autre part, notamment dans l'échantillon de 40 m de profondeur, les mauvaises approximations étaient particulièrement présentes dans les spectres présentant des pics intenses localisés à  $\sim 2472.9$  eV et  $\sim 2477.6$  eV. Ces pics covariaient et aucune référence n'a été trouvée pour les fitter. Dans ce cas, il s'agit probablement d'une espèce chimique contenant du soufre à différents états d'oxydation, potentiellement entre (0) et (+5). Les meilleures combinaisons linéaires approchant cette espèce du soufre ont été produites en utilisant un polysulfure, le sodium-tétrathionate (ion tétrathionate :  $S_4O_6^{2-}$ ), en référence, en plus d'une référence pour le CAS et d'une référence pour la pyrite (Fig. 2.18, spectre 5). Ce polythionate peut être engagé en tant qu'intermédiaire dans l'oxydation inorganique de composés soufrés via des oxydants comme le Fe(III) ou le Mn(IV) déjà contenus à proximité des carbonates (par exemple le tétrathionate peut être un produit de l'oxydation des FeS et FeS<sub>2</sub>). De plus, cette espèce chimique peut aussi être impliquée dans une réaction de disproportionation en présence de H<sub>2</sub>S favorisée par un milieu alcalin et donnant en produits du soufre élémentaire et des thiosulfates (Sorokin et al., 2003 ; Ma et al., 2021 ; Sorokin et Kuenen, 2005). D'un autre côté le tétrathionate peut aussi être un produit de métabolismes microbiens, dans lesquels les thiosulfates et les polysulfures apparaissent comme des sources du pouvoir réducteur pour des microorganismes lithotrophes en profondeur (Wentzien et Sand, 2004). La réduction dissimilatrice du tétrathionate en thiosulfate est également une réaction induite par de nombreux microorganismes via l'oxydation de la matière organique (Zopfi et al., 2004 ; Barrett et Clark, 1987).

En théorie, un composant soufré ressemblant au tétrathionate pourrait donc constituer la partie manquante des spectres que l'on voit augmenter dans les échantillons de profondeur

et pourrait être relié à l'euxinie saisonnière. Malgré ces considérations très spéculatives, les pics à  $\sim 2472.9$  eV et  $\sim 2477.6$  eV représentent des parties des spectres qui n'ont pas pu être reproduites, donc les proportions proposées pour les différents composants via cette méthode sont biaisées. C'est entre autres pour cette raison que l'approche par combinaison linéaire pour interpréter les spectres XANES obtenus sur les microbialites n'a pas été retenue.

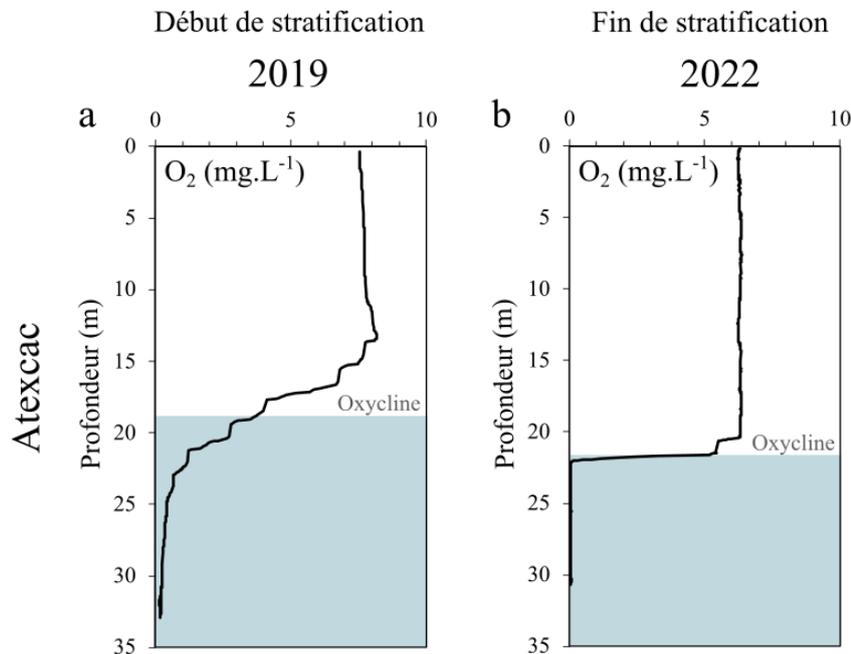
### *Recherche de signatures des CAS dans les échantillons en FTIR*

La présence des CAS dans toutes les microbialites d'Alchichica, et notamment dans l'aragonite, est une hypothèse plausible proposée dans le manuscrit, mais discutable. Des signatures des CAS ont été recherchées à l'aide de FTIR en ATR. Notamment, il a été montré que, dans la calcite, les ions sulfates substitués aux ions carbonates produisent des bandes spécifiques, par exemple vers  $611,8$  ;  $631,8$   $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_4\text{SO}_4$ ),  $1142,9$  ;  $1168,2$   $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_3\text{SO}_4$ ) ; et parfois  $\sim 1021$   $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_1\text{SO}_4$ ) (Balan et al., 2017 ; Floquet et al., 2015). Ces bandes ont été recherchées en utilisant le support FTIR pour l'ATR sur du diamant, avec un détecteur MCT ( $11700$ - $600$   $\text{cm}^{-1}$ ) refroidi à l'azote liquide et en comptant 128 à 200 balayages. Pour cela, les microbialites d'Alchichica provenant de la campagne de terrain de 2019 et 2022, et prélevées entre 3 et 40 m de profondeur, ont été échantillonnées précisément sur différentes zones. Ces zones incluaient soit la surface ( $\sim 2$  à  $3$  mm d'épaisseur) pour avoir un spectre de l'aragonite et des biofilms associés, soit des parties plus en profondeur, dans des zones surtout composées d'hydromagnésite et/ou de huntite. Les spectres obtenus sont montrés dans la figure A2.7 (Annexes) ; ils ne présentent aucune des bandes citées précédemment.

Ces résultats ne signifient pas qu'il n'y pas de CAS dans les microbialites d'Alchichica (d'ailleurs cela reste l'hypothèse retenue pour expliquer le pic des sulfates omniprésent), mais, compte tenu des très faibles concentrations en soufre détectées dans les microbialites, il est possible que ces marques ne soient pas visibles en FTIR. De plus, les bandes recherchées correspondent à des caractéristiques des CAS dans la calcite alors qu'a priori ils seraient plutôt contenus par l'aragonite dans les microbialites. Une perspective dans ce cas serait de produire des spectres FTIR sur des échantillons d'aragonite où il a déjà été fait mention de CAS (par exemple des coraux *Acropora Palmata* et *Montastrea annularis* ; Pingitore et al., 1995), que nous pourrions comparer à des échantillons d'aragonite sans CAS afin de (i) savoir si les CAS produisent des bandes caractéristiques en infrarouge dans l'aragonite et (ii) si oui, par exemple les comparer à celles décrites pour la calcite, et à nos échantillons.

### 3.2. Enregistrements potentiels de l'euxinie par le soufre dans la colonne d'eau et les microbialites du lac Atexcac

Le lac Atexcac présente des caractéristiques de la colonne d'eau semblables à celle d'Alchichica. Ce lac profond d'environ 35 m est également stratifié (Fig. 2.19).



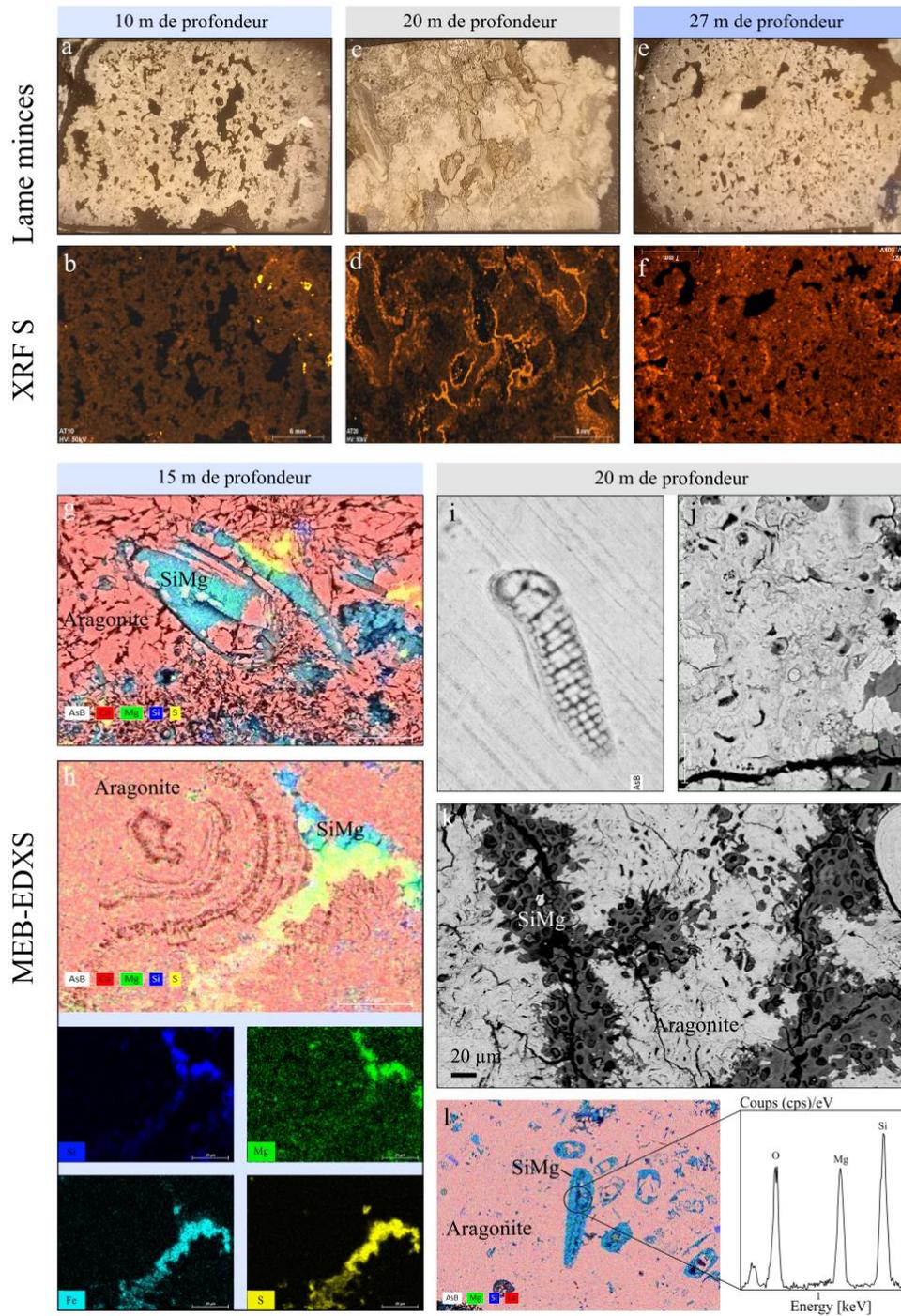
**Figure 2.19.**

**Profils du dioxygène dissous dans la colonne d'eau du lac Atexcac en mai 2019 (a) et en octobre 2022 (b).** Les zones foncées représentent la partie de la colonne d'eau anoxique lors des mesures des profils.

L'oxycline définie par le point d'inflexion de la courbe de dioxygène dissous dans la colonne d'eau se situe entre 20 m de profondeur en début de stratification (Mai 2019 ici) et 23 m en fin de stratification (Octobre 2022 ici). Comme pour Alchichica, le profil du dioxygène dissous en profondeur est beaucoup plus progressif en début de stratification (transition du milieu oxique vers anoxique sur une profondeur d'une dizaine de mètres) qu'en fin de stratification (transition du milieu oxique vers anoxique sur une profondeur de moins d'un mètre). Dans le lac Atexcac, les microbialites sont principalement composées d'aragonite et de silicates de magnésium comme de la kérolite ou de la stévensite (Zeyen et al., 2015). Des occurrences de LDH et de calcite y ont également été trouvées (Zeyen et al., 2015 ; 2019). Comme pour Alchichica, des microbialites ont été échantillonnées aux profondeurs supérieures à celle de l'oxycline (à 23 et 27 m respectivement en 2019 et 2022). Ces microbialites ont été moins étudiées dans cette thèse mais ouvrent néanmoins des perspectives intéressantes d'analyses dans le but de savoir si elles enregistrent et si oui sous quelle(s) forme(s) l'anoxie

saisonnaire. Un point intéressant est que la colonne d'eau du lac Atexcac ne contient pas autant de soufre que celle d'Alchichica (en 2022 2,96 mM en moyenne contre 10,6 mM pour Alchichica). Ce milieu n'est donc pas sulfidique, mais il reste envisageable que les espèces du soufre soient enregistrées et soient des indicateurs des périodes d'anoxie malgré la faible teneur de cet élément en solution. Cela est d'autant plus plausible que le contenu en soufre des microbialites d'Atexcac est du même ordre de grandeur que pour celles d'Alchichica (~0,12 %wt en moyenne en 2022, Fig. 2.19). Sur les cartographies du soufre en XRF de laboratoire, les lames minces faites sur les microbialites d'Atexcac, le soufre apparaît dans l'ensemble associé aux particules détritiques mais surtout aux bordures des microbialites proches des biofilms (en particulier à 20 m de profondeur, Fig. 2.20e). Il est donc possible qu'à Atexcac aussi le soufre soit enrichi dans l'aragonite et associé à des structures biogéniques. Certaines cartographies élémentaires en MEB-EDXS (Fig. 2.20h) montrent une association du soufre avec le fer, ce qui pourrait correspondre à des pyrites, et notamment celles dont les isotopes du soufre avaient été mesurés (Marin-Carbonne et al., 2022).

De plus, à Atexcac, les silicates de magnésium sont très abondants, en lien avec la forte concentration de  $H_4SiO_4$  dans la colonne d'eau. Or, dans ce lac, une très bonne conservation des formes biogéniques par les silicates de magnésium (par exemple les frustules des diatomées ou les cellules des cyanobactéries) y a été reportée (Fig. 2.20g, -i, -j, -k, -l ; Zeyen et al., 2015). Globalement, cela suggère que le soufre organique associé aux cellules dans les biofilms pourrait être mieux préservé dans les microbialites d'Atexcac que dans celles d'Alchichica (Iniesto et al., 2015 ; Iniesto et al., 2016). Dans ce cas, il est possible d'imaginer que les différences dans la spéciation du soufre associé aux silicates de magnésium, même si les concentrations dans la colonne et dans les microbialites sont faibles, pourraient comme à Alchichica être diagnostiques des conditions oxydantes/réductrices environnantes, donc tracer l'anoxie saisonnière. En tout cas, il est possible que la présence de microbialites dans des milieux au moins saisonnièrement anoxiques ne soit pas si rare, et la recherche de l'enregistrement des périodes d'anoxie dans les microbialites méritera d'être étendue à d'autres cas comme les microbialites du lac Atexcac.



**Figure 2.20.**

**Distribution du soufre et des silicates de magnésium dans les microbialites d'Atexcac échantillonnées en mai 2019 et en octobre 2022. Les silicates de magnésium sont abrégés par SiMg.** (a) Photographie d'une lame mince préparée sur une microbialite de 10 m de profondeur échantillonnée en 2022 ; (b) Cartographie élémentaire du soufre en XRF de laboratoire de la zone montrée sur l'image a ; (c) Photographie d'une lame mince préparée sur une microbialite de 20 m de profondeur échantillonnée en 2022 ; (d) Cartographie élémentaire du soufre en XRF de laboratoire de la zone montrée sur l'image c ; (e) Photographie d'une lame mince préparée sur une microbialite de 27 m de profondeur échantillonnée en 2022 ; (f) Cartographie élémentaire du soufre en XRF de laboratoire de la zone montrée sur l'image e ; (g) Cartographie élémentaire du calcium (rouge), magnésium (vert), silice (bleu) et soufre (jaune) en EDXS montrant une diatomée encroûtée dans des silicates de magnésium

dans une matrice d'aragonite, avec des zones enrichies en soufre ; (h) Cartographie élémentaire du calcium (rouge), magnésium (vert), silice (bleu) et soufre (jaune) en EDXS sur un échantillon de 15 m de profondeur montrant des zones enrichies en soufre à côté de lamines biogéniques de silicates de magnésium dans une matrice aragonitique. En-dessous se trouvent les cartographies élémentaires en EDXS associées pour la silice (bleu foncé), le magnésium (vert), le fer (bleu clair) et le soufre (jaune) ; (i) Image MEB en électrons rétrodiffusés d'une diatomée encroûtée dans de l'aragonite dans un échantillon de 20 m de profondeur ; (j) Image MEB en électrons rétrodiffusés d'une zone riche en microfossiles de cyanobactéries et diatomées dans un échantillon de 20 m de profondeur ; (k) Image MEB en électrons rétrodiffusés d'une zone montrant des microfossiles de cyanobactéries encroûtés dans des silicates de magnésium (gris foncé) de fractures dans l'aragonite (blanc) dans un échantillon de 20 m de profondeur ; (l) Cartographie élémentaire du calcium (rouge), magnésium (vert), silice (bleu) en EDXS montrant des restes de diatomées/cyanobactéries encroûtées par des silicates de magnésium dans une matrice d'aragonite. A côté se trouve le spectre EDXS de la zone riche en silicates de magnésium de la diatomée.

### *3.3. Spéciations du fer et du manganèse dans les colonnes d'eau et les microbialites des lacs Alchichica et Atexcac*

Usuellement, l'identification des enregistrements/fluctuations des conditions redox dans les milieux actuels/anciens passe notamment par la spéciation des éléments sensibles au redox (Fig. 2.21). Les plus communs sont des éléments de transition comme le fer et le manganèse, dont les solubilités changent en fonction de leur état d'oxydation. Par exemple, dans un hypolimnion anoxique, les concentrations en fer dissous augmentent a priori. Pour autant, dans la pratique, pour visualiser ces variations dues au redox, les concentrations de ces éléments dans les objets étudiés doivent être suffisantes pour au moins pouvoir les détecter. Or, dans les colonnes d'eau d'Alchichica et Atexcac, les concentrations en fer et en manganèse sont très faibles (Fig. 2.21, par exemple elles étaient en 2022 respectivement en moyenne de 0,0012 mM (Alchichica) et 0,0010 mM (Atexcac), et de 0,0003 mM (Alchichica) et 0,0004 mM (Atexcac), c'est-à-dire très proches de la limite de détection). De même, dans ces deux lacs, les teneurs en fer et en manganèse sont également très faibles dans les microbialites : en 2022, en moyenne respectivement 0,12 % wt (Alchichica) et 0,58 % wt (Atexcac), et sous la limite de détection (Alchichica) et 0,042 % wt (Atexcac). Néanmoins, des particules de diamètre > 0,2 µm contenant du fer et du manganèse sont présentes dans la colonne d'eau des deux lacs (Fig. A2.10, Annexes).

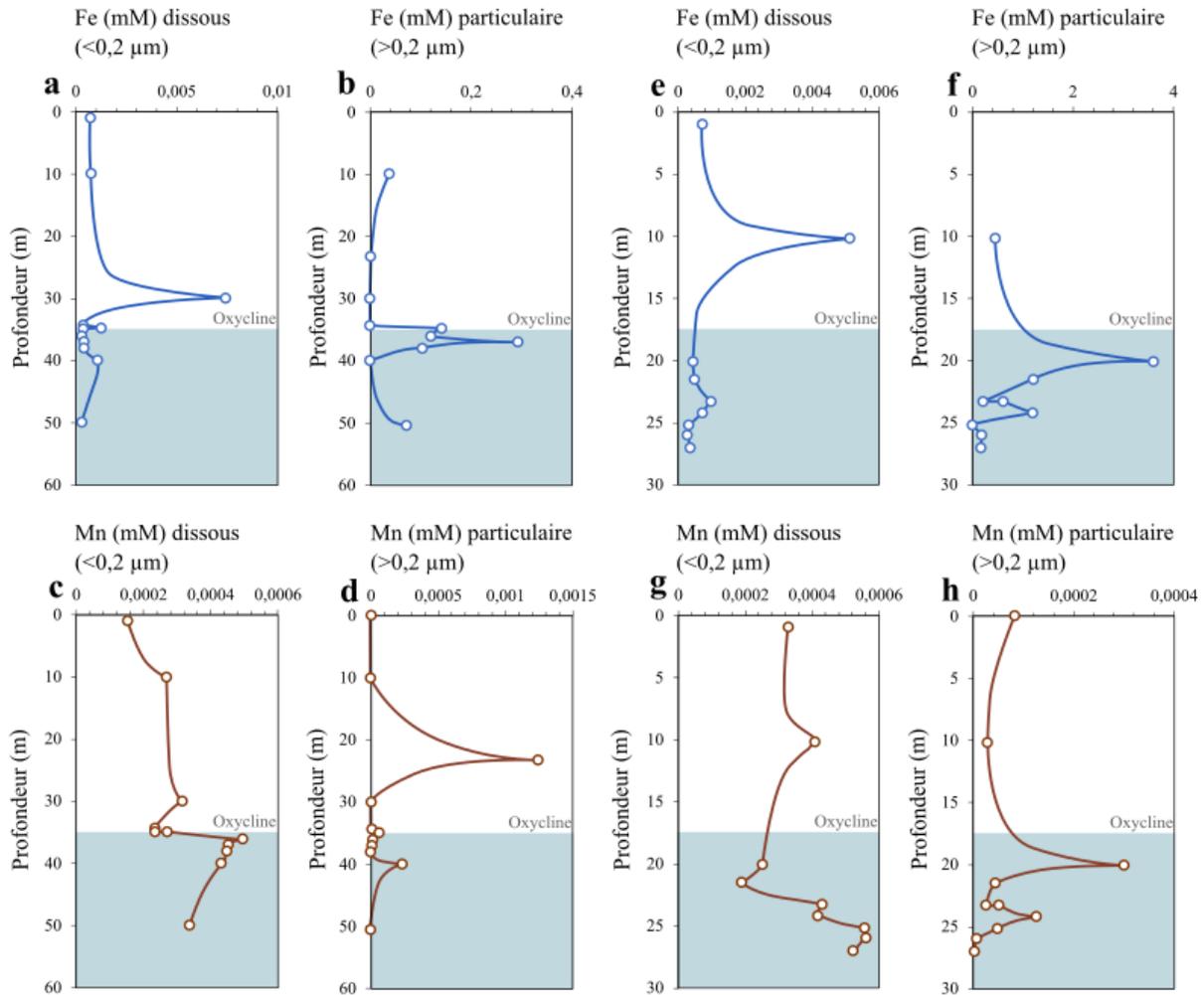
Pourtant, dans ces deux lacs, comme le substratum géologique est en grande partie constitué de basaltes, il était envisageable de s'attendre à ce que les pyroxènes par exemple apportent du fer dissous dans la colonne d'eau. A Alchichica, la présence d'une source de fer a été supposée, de manière très locale à l'ouest du lac, en lien avec un enrichissement en fer (sous formes de pyroaurite/iowaite) dans des microbialites situées dans cette zone (Zeyen et al.,

2019). Hormis cela, les concentrations en fer et en manganèse à Alchichica et à Atexcac restent en traces, et leurs variations dans les colonnes d'eau et dans les microbialites ne sont pas explicables uniquement par des considérations redox. Par exemple, un pic est visible à l'oxycline à Alchichica en fin de stratification, ce qui pourrait refléter la zone de la colonne d'eau où le phosphore dissous (qui augmente en profondeur avec la reminéralisation de la matière organique) interagit avec les hydroxydes de fer qui commencent à précipiter au niveau de la transition vers l'anoxie (Veronesi et al., 2002).

Une autre partie du problème est posée par ce qu'il est possible de détecter des formes du fer et du manganèse, et notamment par la fraction mesurée. D'une part, le fer analysé ici est la fraction filtrée à 0,2  $\mu\text{m}$ . Or dans la colonne d'eau, d'après Raiswell et Canfield (2012), le fer est porté par des colloïdes (particule  $< 0,1 \mu\text{m}$  de diamètre), des nanoparticules (entre 0,1  $\mu\text{m}$  et 100 nm) et des espèces aqueuses ( $< 0,02 \mu\text{m}$ ) qui n'ont pas la même labilité. A cause des interactions électrostatiques, agrégations et colmatages des filtres lors de l'échantillonnage (Howard, 2010), ils considèrent que ce sont les nanoparticules qui sont majoritairement analysées lors d'un passage sur un filtre de 0,2  $\mu\text{m}$ . Ici, le fer dissous des colonnes d'eau n'a donc pas été totalement mesuré. La figure 2.21 montre les différences dans les fluctuations des concentrations en fer et en manganèse que l'on peut détecter à cette échelle en fonction de la fraction observée. On voit par exemple que, à Alchichica, le pic de concentration observé à l'oxycline pour le fer de la fraction particulaire n'est pas colocalisé avec celui du fer considéré comme « dissous », potentiellement en lien avec un phénomène de sédimentation plus ou moins rapide des particules.

**Alchichica 2022**

**Atexcac 2022**



**Figure 2.21.**

**Comparaisons des profils de concentration des fractions dissoutes (particules < 0,2 µm) avec les profils de concentration des fractions particulaires (particules > 0,2 µm) pour le fer et le manganèse dans les colonnes d'eau des lacs Alchichica et Atexcac mesurées en 2022 (+/- 5 %).** (a) Profil du fer dissous dans la colonne d'eau d'Alchichica en 2022 ; (b) Profil du fer particulaire dans la colonne d'eau d'Alchichica en 2022 ; (c) Profil du manganèse dissous dans la colonne d'eau d'Alchichica en 2022 ; (d) Profil du manganèse particulaire dans la colonne d'eau d'Alchichica en 2022 ; (e) Profil du fer dissous dans la colonne d'eau d'Atexcac en 2022 ; (f) Profil du fer particulaire dans la colonne d'eau d'Atexcac en 2022 ; (g) Profil du manganèse dissous dans la colonne d'eau d'Atexcac en 2022 ; (h) Profil du manganèse particulaire dans la colonne d'eau d'Atexcac en 2022.

D'autre part, dans les cas des lacs Alchichica et Atexcac, le carbone organique dissous (DOC) s'accumule dans la partie profonde anoxique de la colonne d'eau en lien avec la dégradation de la matière organique (complexation inorganique en (oxyhydr)oxydes peu réactifs, avec les carbonates, phosphates, silicates et sulfures, Raiswell et Canfield, 2012 ; Havas et al., 2023). Il est donc possible que le fer entre autres soit complexé par la matière organique dans la zone profonde. Pour le cas du manganèse, l'augmentation en 2022 sous

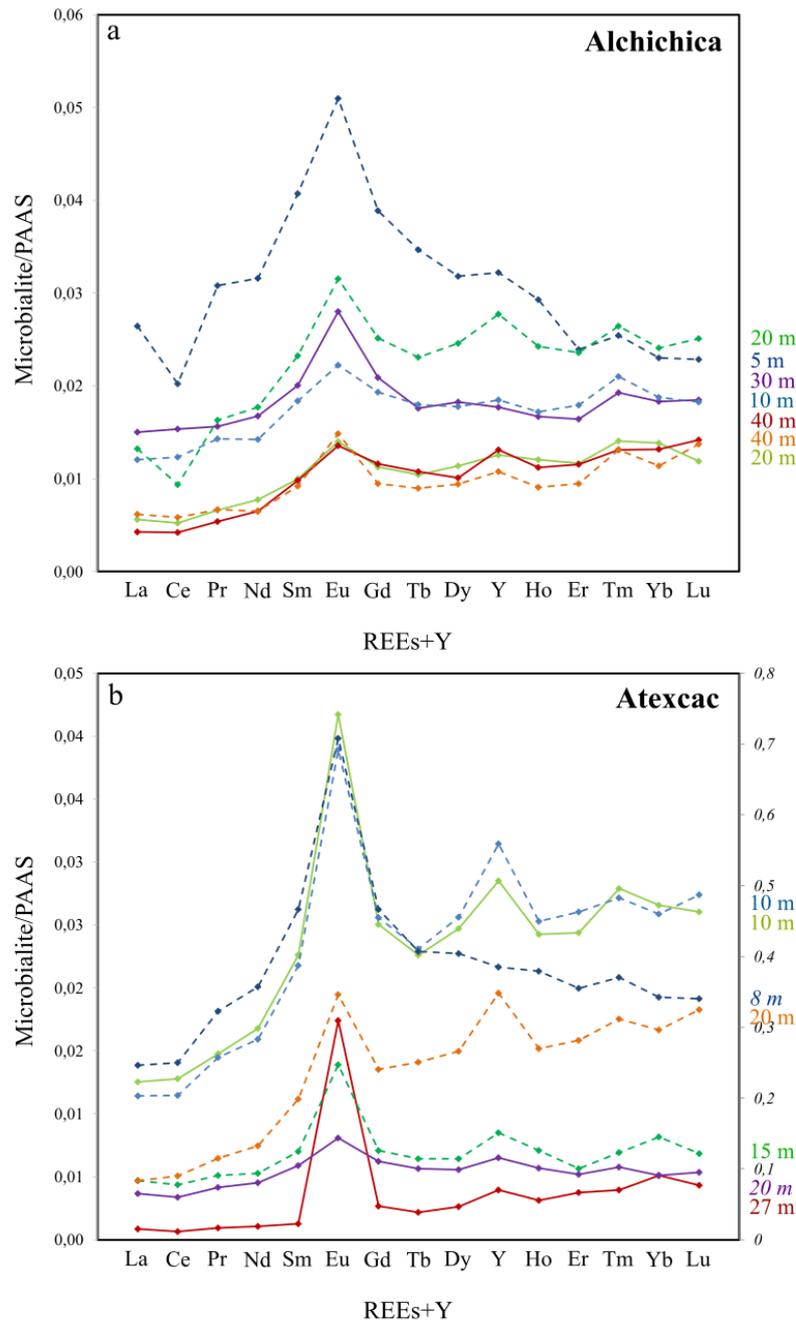
l'oxycline reste explicable par la transition redox du milieu oxique vers le milieu anoxique, où les oxides de manganèse sont réduits, ce qui augmente la fraction dissoute dans la colonne d'eau profonde (Luther et al., 2003). Certains auteurs suggèrent aussi que dans les environnements à faibles teneurs en O<sub>2</sub>, ce sont des augmentations locales du DIC (résultant de métabolismes microbiens anaérobies) qui favorisent la nucléation de carbonates de manganèse directement dans la colonne d'eau (Herndon et al., 2018 ; Force et Cannon, 1988 ; Wittkop et al., 2020). Parallèlement, le taux de sulfures dissous est également relié aux flux biogéniques dans une colonne d'eau euxinique où la décomposition de la matière organique via la sulfato-réduction favorise leur formation (Canfield, Lyons et Raiswell, 1996). Or, comme vu dans les parties précédentes, la quantité de soufre dans la colonne d'eau étant ~1000 fois plus élevée que celle du fer à Alchichica, il est probable qu'elle tamponne le fer en entraînant quasi-immédiatement sa précipitation en agrégats de sulfures de fer (Poulton et Canfield, 2011, Rickard, 2006 ; Raiswell et Canfield, 1998 ; MacDonald et Hyne, 1979). Cela expliquerait en partie pourquoi aucune augmentation de sa concentration n'est observée en profondeur. De plus, malgré ces difficultés d'interprétations, les concentrations en fer et en manganèse dissous ont quand même légèrement augmentées entre mai (2019) et octobre (2022), ce qui laisse supposer que la stratification pendant l'été joue aussi un rôle sur leur concentration et/ou sur la taille des particules qui contiennent ces éléments de transition.

Dans l'ensemble, le fer et le manganèse ont été détectés dans les colonnes d'eau et dans les microbialites d'Alchichica et Atexcac, mais les fluctuations visibles de leurs concentrations ne sont pas corrélables directement avec les variations redox, notamment en lien avec leur très faible quantité. Pour cela, nous n'avons pas pu les utiliser comme des indicateurs valables des conditions d'oxygénation de la colonne d'eau. C'est pourquoi nous nous sommes focalisés sur le cycle du soufre, présent en bien plus fortes quantités dans la colonne d'eau et également sensible aux variations redox.

*3.4. Evaluations en bulk des concentrations en terres rares dans la colonne d'eau et les microbialites des lacs Alchichica et Atexcac*

Hormis les éléments traces sensibles au redox comme le fer ou le manganèse, les concentrations en terres rares sont également souvent utilisées en tant qu'indicatrices de conditions redox (Tostevin et al., 2016). Par exemple, l'anomalie du cérium calculée relativement aux concentrations des autres terres rares normalisées sur une argile de référence (Post-Archean Australian Shale, PAAS) permet d'évaluer en général si les sédiments observés proviennent de milieux oxygénés ou non (Tostevin et al., 2016). S'il est enrichi dans les sédiments, alors l'anomalie est positive et a priori témoigne d'un environnement de dépôt pauvre en dioxygène dissous voire anoxique. Inversement, dans un système oxygène, on s'attend à ce que l'anomalie du cérium soit négative.

Les concentrations en terres rares des microbialites d'Alchichica et d'Atexcac qui ont été échantillonnées en mai 2019 et en octobre 2022, ont été mesurées (Fig. 2.22). Dans les deux lacs, les microbialites profondes provenant des milieux saisonnièrement anoxiques ne présentent pas d'anomalie positive du cérium. Malgré cela, les profils des microbialites les plus profondes ne présentent presque pas d'anomalie négative du cérium (Alchichica, 30 m) alors que certaines microbialites provenant de zones au-dessus ou vers l'oxycline présentent des anomalies négatives du cérium particulièrement marquées (Alchichica, 5 m).



**Figure 2.22.**

**Profils des concentrations en terres rares dans les microbialites d'Alchichica (a) et d'Atexcac (b) échantillonnées à différentes profondeurs en mai 2019 (traits pointillés) et en octobre 2022 (traits pleins).** Dans la partie (b) de la figure (Atexcac), l'échelle des profils des concentrations des échantillons de microbialites de 8 m de profondeur (2019, bleu foncé) et de 20 m de profondeur (2022, violet) sont à droite du graphique car les concentrations en terres rares sont significativement plus élevées (échantillons qui contiennent des particules détritiques abondantes).

Cela peut être expliqué par plusieurs mécanismes. D'abord, les concentrations des terres rares sont affectées préférentiellement par l'abondance des phases détritiques dans l'échantillon observé en bulk, phases qui sont souvent enrichies en aluminium, fer, silice, titane, hafnium, etc (Zeyen et al., 2021). Ces phases détritiques ont très régulièrement été observées dans les

échantillons des microbialites en microscopie optique, en MEB-EDXS ou même au confocal et semblent affecter les microbialites sans distinction de profondeur. Ensuite, les conditions d'anoxie dans la colonne d'eau profonde du lac Alchichica comme dans celle du lac Atexcac sont saisonnières. Par conséquent, les microbialites de ces profondeurs se forment potentiellement aussi pendant des périodes où la colonne d'eau est oxygénée. Comme les concentrations en terres rares ont été mesurées en bulk, il est possible que ces mesures moyennent les anomalies positives et négatives enregistrées par les microbialites au cours des périodes oxiqes/anoxiques. Certaines techniques spatialement résolues comme, de nouveau, de l'ICP-MS par ablation laser (LA-ICP-MS, Gueriau et al., 2015) pallient en théorie à ces problèmes d'échantillonnage, et permettraient en tout cas d'avoir accès à des mesures de ces profils sur des fractions beaucoup plus définies (par exemple en fonction des phases minérales, des localisations sur l'échantillon de microbialite, etc). En tous cas, il faut considérer avec prudence les anomalies en cérium, positives comme négatives. Enfin, il reste à noter que les profils des concentrations en terres rares + yttrium des microbialites prélevées en mai 2019 et en octobre 2022 dans les lacs Alchichica et Atexcac, malgré leur diversité évidente entre les échantillons, sont similaires à ceux qui avaient déjà été observés dans ces lacs. Par exemple, un enrichissement en terres rares lourdes ainsi qu'une plus forte anomalie Y/Ho ont été reportés dans les microbialites actuelles peu profondes d'Alchichica et Atexcac notamment, ce qui est relativement conservé dans les profils des échantillons de 2019 et 2022 (Zeyen et al., 2021).

D'autres éléments encore sont usuellement utilisés dans la détermination des conditions d'oxygénation d'un environnement, tels que l'uranium et le vanadium qui sont également sensibles aux variations redox, mais ceux-ci ne présentaient pas non plus de caractéristiques évidentes de l'anoxie dans les colonnes d'eau et les microbialites des lacs Alchichica et Atexcac, en plus d'être présentes sous formes de traces.

## **4. Conclusions et perspectives**

### *Soufre*

L'état d'euxinie saisonnière de la colonne d'eau du lac Alchichica est vraisemblablement traçable dans les microbialites de l'hypolimnion. Des analyses de la composition en soufre dans les microbialites provenant de l'épilimnion, de l'oxycline et de l'hypolimnion du lac Alchichica ont mis en évidence la présence de soufre dans les microbialites. Notamment, de la SR-XRF et des analyses XANES au seuil K du soufre ont montré que cet élément est présent majoritairement sous forme de sulfates dans tous les carbonates des microbialites, mais se trouve préférentiellement dans l'aragonite. Potentiellement, ces sulfates correspondent à des CAS. De plus, nous avons montré une augmentation significative de l'enregistrement d'espèces réduites du soufre dans les microbialites de profondeur, ce qui en fait semble-t-il une signature de l'euxinie. Toutefois, les conditions d'euxinie sont saisonnières dans la colonne d'eau du lac Alchichica. Les microbialites de profondeur connaissent donc aussi des périodes où les conditions environnementales sont oxydantes. Cela ouvre plusieurs questions, par exemple de savoir si les microbialites de l'hypolimnion d'Alchichica, en postulant qu'elles sont en croissance, ont une période de croissance préférentielle en fonction de l'oxygénation du milieu. De plus, il serait intéressant de trouver des microbialites actuelles qui se forment dans des conditions d'anoxie et/ou euxinie permanentes pour comparer les signatures de ces conditions chimiques dans leurs carbonates avec celles de la colonne d'eau profonde d'Alchichica. Cela permettrait de savoir si ces chimies particulières sont susceptibles de laisser des traces autres et/ou en plus grandes quantités dans des microbialites qui ne se trouvent jamais dans des conditions oxydantes. Dans un cas où les conditions d'euxinie et/ou anoxie seraient continues, on pourrait s'attendre à des changements dans la diversité microbienne (par exemple pas de dormance saisonnière en fonction du redox du milieu pour certaines espèces, abondances différentes des communautés, etc), mais aussi dans la nature et la quantité des phases minérales précipitées. Particulièrement dans des conditions d'anoxie permanente, les phases minérales précipitées dans les microbialites seraient également probablement différentes en fonction d'un milieu ferrugineux ou sulfidique. Une autre piste pour comprendre les influences de l'euxinie et/ou de l'anoxie saisonnière dans des microbialites serait d'en trouver sous la forme de stromatolites, c'est-à-dire avec des laminations. Cette structure permettrait en théorie de donner une idée sur la

temporalité et potentiellement les cycles d'enregistrements de l'euxinie dans la minéralogie des microbialites.

En ce qui concerne la colonne d'eau du lac Alchichica, les concentrations en soufre dissous sont nettement supérieures à celles du fer, donc les conditions sont globalement sulfidiques. Ajoutée à cela l'anoxie annuelle de l'hypolimnion, c'est cette physico-chimie qui suggère une euxinie saisonnière en profondeur dans le lac. Pour autant, bien qu'ils soient présents, les sulfures d'hydrogène n'ont pas été quantifiés. Les mesures des concentrations de ces sulfures d'hydrogène dans la colonne d'eau d'Alchichica par exemple par spectrophotométrie permettraient d'être sûr d'utiliser le terme d'euxinie à bon escient, et de connaître sa quantité à la fois en période de mélange et en période de stratification du lac. A plus grande échelle, un suivi régulier des concentrations en soufre total dissous dans les colonnes d'eau d'Alchichica et d'Atexcac, manquantes actuellement dans la littérature, permettront à l'avenir de mieux caractériser le cycle du soufre dans ces lacs.

#### *Fer/Manganèse/terres rares*

Concernant la chimie en bulk des éléments traces comme le fer, le manganèse et les terres rares dans les microbialites, les différences de concentrations entre la surface et la profondeur ne sont pas significatives. Des cartographies chimiques au MEB ont néanmoins montré une plus forte présence de pyrite dans les microbialites provenant de l'oxycline, ce qui peut être expliqué par la précipitation de presque tout le fer disponible en solution au passage à l'anoxie. De manière plus précise, les techniques utilisant le rayonnement synchrotron peuvent dans ce cas être adaptées à la caractérisation de phases minérales contenant des éléments en faibles quantités. Par exemple, Zeyen et al. (2019) ont évalué la distribution et la spéciation du fer dans des microbialites peu profondes d'Alchichica également via de la spectroscopie d'absorption des rayons X. Ces analyses pourraient être faites sur des microbialites profondes, ce qui permettrait de savoir quelles sont les phases porteuses du fer, et, même si elles sont minoritaires, de les comparer aux phases des microbialites peu profondes. La détection de ces phases pourrait également être envisageable par cathodoluminescence et/ou par des techniques d'imagerie X multi-échelles comme sur la ligne Nanoscopium du synchrotron Soleil. De plus, même si peu de phases contenant du manganèse ont été vues et caractérisées dans les microbialites d'Alchichica, que ce soit en surface ou en profondeur, ces techniques seraient également intéressantes pour chercher à détecter la distribution de cet élément sensible au redox dans les microbialites et voir si des différences surface vs. profondeur peuvent être distinguées.

Dans les colonnes d'eau d'Alchichica et d'Atexcac, le fer et le manganèse ne présentaient pas de variations de concentration significatives en fonction de la profondeur, ni pendant la période de mélange du lac, ni pendant la période de stratification, hormis des pics localement dans la zone de l'oxycline. Cela peut être expliqué par le fait qu'ils soient tamponnés par le soufre dont la quantité est beaucoup plus élevée. Comme ces éléments sont présents en traces dans la colonne d'eau, leurs concentrations sont également proches des limites de détection des différents appareils utilisés pour les mesurer. En 2022, des DGT (Diffusive Gradient in Thin film) ont été placés à 10, 40 et 50 m de profondeur dans la colonne d'eau du lac Alchichica et 10 et 27 m dans la colonne d'eau du lac Atexcac. Ces systèmes de préconcentration *in situ* pour métaux et composés inorganiques permettent d'avoir accès à la spéciation des fractions labiles (une partie de la fraction récupérée avec des filtres à 0,2 µm). Les métaux diffusent à travers plusieurs couches qui forment un gradient de concentration jusqu'à atteindre un gel sur lequel ils sont fixés. L'analyse par ICP-MS des concentrations récupérées donne donc accès en théorie aux états redox des métaux de transition dans la colonne d'eau en filtrant spécifiquement la fraction labile. Ces DGT ont été récupérées et traitées en laboratoire (acidification à l'acide nitrique), mais n'ont pas pu être analysées par ICP-MS pendant la thèse. Leur analyse reste donc une perspective intéressante pour savoir si, à l'échelle de la fraction labile du fer et du manganèse, les variations saisonnières d'oxygénation de la colonne d'eau sont traçables par des métaux de transition.

Au final, il reste difficile d'estimer si les microbialites actuelles provenant du milieu saisonnièrement euxinique du lac Alchichica sont de bons analogues aux microbialites anciennes. Au premier ordre, ces microbialites profondes représentent au moins une partie de l'années des microbialites de milieux anoxiques et sulfidiques, comme l'étaient une grande partie des microbialites Précambriennes. Toutefois, les microbialites de ce lac, que ce soit en surface ou en profondeur, constituent des niches écologiques formées dans une gamme de conditions restreintes qui ne sont pas forcément applicables aux autres environnements abritant des microbialites. Particulièrement, la diversité des environnements à microbialites à déjà été mise en avant dans le chapitre 1. Par conséquent, même si les microbialites profondes d'Alchichica se forment dans des environnements dont la saturation vis-à-vis des carbonates est similaire aux autres environnements contenant des microbialites carbonatées et qu'elles peuvent constituer des analogues de ce type de milieu pour les microbialites fossiles, elles ne sont pas représentatives de toutes les microbialites qui se formaient dans le passé. Malgré cela, en considérant qu'elles sont en croissance, ce sont des objets a priori susceptibles d'enregistrer

les conditions physico-chimiques de leur milieu. Particulièrement, les différentes spéciations du soufre paraissent corrélées à la profondeur, et probablement donc corrélées au potentiel redox du milieu. Par cet aspect, ces microbialites carbonatées pourraient donc constituer de bons analogues des plus anciennes. Les analyses du soufre montrent également que les traces laissées par l'euxinie dans la minéralogie des microbialites peuvent être ténues et nécessitent d'aller les chercher par des méthodes à haute résolution. Dans les microbialites d'Alchichica, la structure des phases minérales dominantes ne paraît pas affectée au premier ordre par l'euxinie saisonnière alors que ceci est visible à plus fine échelle (notamment sur les composants contenant du soufre). Cela appelle à regarder plus finement dans les compositions chimiques/minéralogiques/biologiques des échantillons.



# **Chapitre III. Acclimatation/Adaptation des communautés microbiennes des microbialites à l'anoxie saisonnière**

## **1. Introduction**

Les communautés microbiennes sont une composante principale des microbialites. Elles ont plusieurs moyens d'interagir avec la géochimie du milieu, en influençant, induisant ou contrôlant la précipitation de phases minérales (Görge et al., 2010 ; Dupraz et al., 2009). De nombreuses études ont décrit par des approches moléculaires la composition microbienne de microbialites actuelles, à l'aide de laquelle les phylogénies et les fonctions microbiennes passées sont interprétées (Bosak et al., 2013, Bontognali et al., 2012). Ces études ont permis de mettre en avant une grande diversité des microorganismes associés aux microbialites actuelles en termes de lignées phylogénétiques et de métabolismes, mais aussi des points communs comme l'occurrence voire la dominance quasi-systématiques des cyanobactéries (Foster et Green, 2011). Certains travaux ont également fourni des modèles d'installation des communautés en fonction de la disponibilité des ressources du milieu dans les tapis microbiens associés aux microbialites (Dupraz et al., 2011 ; Muyzer et Ramsing, 1995 ; Camoin et Gautret, 2006). Malgré cela, les liens entre la minéralogie, la géochimie environnementale et les communautés microbiennes sont encore mal compris. Il est donc nécessaire d'évaluer leurs relations et leurs co-variations pour mieux comprendre globalement les écosystèmes formés par les microbialites actuelles et fossiles.

Or, les conditions environnementales terrestres et océaniques ont beaucoup varié au cours des temps géologiques. Elles ont été soumises à une co-évolution permanente entre les microorganismes et les cycles géochimiques généraux comme ceux du carbone, de l'oxygène, du fer, du soufre, du phosphore, etc (Olejarz et al., 2021 ; Lyons et al., 2021 ; Raiswell et Canfield, 2012). En particulier, autour de 2,4 Ga (GOE), l'émergence et la diversification des cyanobactéries a permis une transition drastique depuis les conditions d'anoxie stricte de l'Archéen vers les conditions d'oxie de l'atmosphère et des océans du Protérozoïque jusqu'à celles que l'on connaît actuellement (Fournier et al., 2021). Or, les microbialites contenant les plus anciennes traces de vie non-ambiguës connues sur Terre sont datées de l'Archéen ; par conséquent elles se sont formées en anoxie (Allwood et al., 2006 ; Lyons et al., 2009). A cause de ses nombreux impacts sur la chimie de la solution (disponibilités du fer, du soufre, du manganèse par exemple), la diversité des phases minérales qui peuvent précipiter (formation d'oxydes et oxyhydroxydes en milieu oxique) et les activités métaboliques réalisées par les microorganismes (métabolismes autotrophes comme la photosynthèse anoxygénique en

utilisant comme donneur d'électrons le H<sub>2</sub>, Fe<sup>2+</sup> ou H<sub>2</sub>S), l'anoxie est une pression environnementale majeure qui modifie les écosystèmes (Holland et al., 2006).

Dans ce chapitre, nous nous sommes particulièrement intéressés aux effets de cette condition environnementale, l'anoxie, sur les organismes procaryotes associés aux microbialites. En effet, il est encore difficile d'évaluer dans le détail comment l'anoxie sélectionne et partitionne les communautés microbiennes en fonction de leur métabolisme. Par exemple, même lors de la diversification précambrienne des organismes photosynthétiques oxygéniques après le GOE, la photosynthèse anoxygénique n'a vraisemblablement pas cessé de se développer pour autant (Gutiérrez-Preciado et al., 2018). Dans certains cas, la fixation du carbone par photosynthèses est utilisée dans les couches les plus profondes des tapis microbiens appauvries en dioxygène dissous mais qui se forment dans des solutions globalement oxydantes (Dupraz et al., 2011). A l'inverse, il est également possible que les organismes phototrophes des microbialites de milieu anoxique fixent le carbone en cassant la molécule d'eau, *i.e.* en faisant la photosynthèse oxygénique, malgré des conditions globales réductrices. La nature des autres voies métaboliques auto et hétérotrophes utilisées par les microorganismes des microbialites de milieux anoxiques reste également une question ouverte. De même, bien que certaines études aient modélisé l'organisation structurale et fonctionnelle d'un tapis microbien, permettant d'interpréter ceux du passé, l'influence de l'anoxie sur cette organisation est relativement peu documentée. Ajoutée à cela, la question de la saisonnalité de l'anoxie se pose lors de l'étude d'écosystèmes comme ceux des microbialites des colonnes d'eau profondes des lacs Alchichica et Atexcac. Ainsi, les biofilms et les tapis microbiens étant des structures dynamiques en fonction des pressions de sélection environnementale, il est possible que les diversités phylogénétiques/métaboliques varient selon le taux d'oxygénation du milieu. Par exemple, certaines cyanobactéries présentent une versatilité dans leurs métabolismes et sont capables d'effectuer une transition de la photosynthèse oxygénique vers la photosynthèse anoxygénique lors d'un changement environnemental (Klatt et al., 2016 ; Hamilton et al., 2018 ; Jørgensen et al., 1986). Cette capacité métabolique est particulièrement intéressante lorsqu'on la met en perspective avec les successions « rapides » entre conditions oxydantes et réductrices qui ont été enregistrées au cours des temps géologiques. Les communautés microbiennes ont donc été, et sont toujours, soumises à une multitude de conditions environnementales qui déterminent leurs diversités phylogénétiques et fonctionnelles.

Dans ce sens, les lacs Alchichica et Atexcac sont des écosystèmes intéressants à étudier car ils combinent plusieurs de ces pressions environnementales majeures à différentes périodes

de l'année. Nous avons vu dans les chapitres précédents que (i) les lacs Alchichica et Atexcac sont tous les deux alcalins, condition qui peut influencer la présence de certaines gammaprotéobactéries chimiolithoautotrophes par exemple (Sorokin et Kuenen, 2005 ; Iniesto et al., 2022). (ii) Dans les deux lacs, la colonne d'eau devient strictement anoxique à partir d'une certaine profondeur pendant l'été. (iii) La solution du lac Alchichica est riche en soufre (~11 mM) alors que celle d'Atexcac l'est moins (~3 mM). (iv) Enfin, les deux lacs abritent des microbialites actuelles jusqu'à une grande profondeur dans la colonne d'eau, où l'accès à la lumière est réduit. Ces différentes caractéristiques sont autant de pressions environnementales qui influencent vraisemblablement la nature et l'organisation des communautés microbiennes associées aux microbialites, rendant probables leurs variations non seulement en fonction de la profondeur mais aussi en fonction de la période de l'année. Notamment, à cause de leur stratification saisonnière, les lacs Alchichica et Atexcac abritent de nombreuses niches écologiques spécifiques particulièrement adaptées à l'étude de l'influence de l'anoxie sur la composante microbienne des microbialites. Ainsi, ce chapitre a pour but de comparer globalement les microbialites prélevées en surface (donc en conditions oxiqes permanentes) à celles prélevées en profondeur lors de périodes de stratification des lacs (mai 2019, octobre 2022) afin d'évaluer les différences de compositions microbiennes qui pourraient être liées à l'absence d'O<sub>2</sub> du milieu.

Dans un premier temps, la composition microbienne des microbialites et de la colonne d'eau en surface et en profondeur dans les lacs Alchichica et Atexcac a été évaluée via du métabarcoding du gène de l'ARNr 16S. De manière générale, les compositions microbiennes planctoniques et benthiques (des microbialites) avaient déjà fait l'objet de plusieurs études à Alchichica et Atexcac (*cf* introduction, Iniesto et al., 2021, Iniesto et al., 2022 ; Couradeau et al., 2011 ; Benzerara et al., 2014 ; Gérard et al., 2013), ce qui a permis de les utiliser comme des références comparatives. Notamment, ces travaux, essentiellement focalisés sur les microbialites des eaux oxygénées jusqu'à une profondeur de 15-20 m, avaient montré l'existence d'un cœur de communautés microbiennes associées aux microbialites commun à neuf lacs mexicains formant un gradient de salinité-alcalinité au sein de la TMVB, dont Alchichica et Atexcac font partie (Iniesto et al., 2021). Iniesto et al. (2021) avaient proposé que les organismes appartenant à ce cœur microbien participent et sont potentiellement nécessaires à la formation des microbialites, ce qui ouvre la question de savoir si on retrouve toujours ces mêmes communautés microbiennes dans les microbialites de profondeur. Les premières

analyses ont montré qu'effectivement ce cœur microbien semble conservé dans les microbialites profondes.

Dans un second temps, nous avons incubé des microbialites de milieux oxiques et saisonnièrement anoxiques des lacs Alchichica et Atexcac sous anoxie continue en boîte à gants. Puis nous avons suivi l'évolution de la diversité des communautés microbiennes dans ces conditions au cours du temps, de nouveau à l'aide de métabarcoding. Globalement, c'est l'abondance relative des différents ordres qui évolue en fonction des conditions d'oxygénation auxquelles elles sont exposées.

Enfin, des microorganismes provenant de microbialites de profondeur d'Alchichica (40 m) ont été enrichis sous atmosphère anoxique afin d'évaluer une partie au moins des communautés actives dans la formation des microbialites profondes, donc potentiellement dans leur carbonatogenèse. Cette partie a montré que, tout comme certaines protéobactéries et malgré le passage à l'anoxie, des cyanobactéries proches du genre des *Leptolyngbyales* restent actives dans les microbialites pendant la période de stratification.

Dans la partie qui suit, la caractérisation de la diversité a été faite par séquençage massif d'amplicons de gènes d'ARNr 16S par Nanopore réalisé lors de deux runs indépendants (2022 et 2023).

## **2. Paper draft, in preparation**

### **Acclimation of microbial communities from modern microbialites to anoxic conditions**

Jeanne Caumartin<sup>1,2</sup>, Karim Benzerara<sup>1</sup>, Ana Gutiérrez-Preciado<sup>2</sup>, Miguel Iniesto<sup>2</sup>, Paola Bertolino<sup>2</sup>, Maria Ciobanu<sup>2</sup>, Didier Jézéquel<sup>3</sup>, David Moreira<sup>2</sup>, Purificación López-García<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Sorbonne Université, Museum National d'Histoire Naturelle, UMR CNRS 7590, Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC), 75005 Paris, France*

<sup>2</sup>*Unité d'Ecologie Systématique et Evolution, CNRS, Université Paris-Saclay, AgroParisTech, Gif-sur-Yvette, France*

<sup>3</sup>*IPGP, CNRS UMR 7154, Université de Paris & UMR CARTELE, INRAE-USMB, France*

#### **Abstract**

Microbialites are formed by taxonomically and functionally diversified benthic microbial communities that influence/induce/control the precipitation of mineral phases. Among these complex microbial communities, cyanobacteria represent major actors of the formation of microbialites by promoting oxygenic photosynthesis. Cyanobacteria are also thought to be involved in the rise of the oxygen content in the atmosphere and oceans around 2.4 Ga ago, the so-called Great Oxygenation Event (GOE). Before this period of oxygenation, the environmental conditions were anoxic. The oldest microbialites have been dated back to the Archean eon. Hence, they formed under strictly anoxic conditions. This limits the analogies between modern microbialite-associated microbial communities mostly grown under oxic conditions and ancient microorganisms involved in the formation of fossil microbialites under anoxic conditions. Here, we studied the prokaryotic composition of modern microbialites forming under seasonal anoxic conditions, discovered at depth in the Lake Alchichica water column. We characterized and assessed the evolution over time of microbial communities associated with microbialites under strict anoxic conditions using 16S rRNA gene metabarcoding. We characterized firstly the *in situ* phylogenetic prokaryotic diversity associated with deep microbialites. Then, by monitoring the evolution of microbial communities associated with microbialites incubated under continuous anoxia, we showed that community acclimation occurs through variations of relative taxonomic abundances rather than

through direct variations of OTUs diversity, potentially driven by a prevalence of anoxygenic photosynthesis in anaerobic microbial communities.

## **Introduction**

Microbialites are organosedimentary structures formed by benthic microbial communities that can induce/influence the precipitation of mineral phases in a diversity of environments (Burne and Moore, 1987). When laminated, they are called stromatolites. As both biotic and abiotic factors intervene in their formation, microbialites constitute emblematic geobiological structures to study mineral-life interactions. Notably, some Archean fossil stromatolites dated back to 3.43 Ga are among the oldest non-ambiguous traces of life on the Earth (Allwood et al., 2006; Schopf et al., 2007; Awramik, 1991). Once their biogenicity clearly established, fossil stromatolites may contain information about microbial communities that prevailed under past conditions. Consequently, applying the principle of actualism, modern microbialites can provide valuable information to interpret paleobiologies and reconstruct paleoenvironments evidenced by fossils (Bosak et al., 2013; Visscher et al., 2020). In modern environments, the microbialites under formation are mainly carbonated (Chagas et al., 2016). They may result from trapping-binding of detrital particles and/or authigenic precipitation often involving a major contribution from cyanobacteria (Dupraz and Visscher, 2005; Riding, 2000; Grotzinger and Knoll, 1999). When occurring *in situ*, carbonate precipitation can include the direct or indirect role of microorganisms. For example, extracellular polymeric substances (EPS) produced by microorganisms can in some cases provide nucleation centers for carbonate precipitation (Dupraz et al., 2009). Several microbial activities such as photosynthesis, sulfate reduction or ureolysis, among others, can also induce alkalization, leading to a local supersaturation of the solution and consequently favoring carbonate precipitation (Görge et al., 2021; Dong et al., 2022; Zhu and Dittrich, 2016). Carbonate precipitation can also be genetically controlled by microorganisms. In this case, some microorganisms can produce carbonatogenic conditions intracellularly, even when the extracellular solution is not supersaturated with carbonate phases (Görge et al., 2021, Couradeau et al., 2012). Accordingly, microbes have different ways of influencing carbonate precipitation in microbialites. However, the relationships between environmental geochemistry, microbial communities and their activities in these structures remain difficult to assess. The study of modern microbialite ecosystems provides an ecological framework to understand selection pressures acting on microorganisms and, conversely, the impact of microorganisms on their

mineral environment which, in turn, can provide potential information about past processes of microbialite formation (Bontognali et al., 2012; Ward et Shih, 2019).

Microorganisms play a fundamental role in the biogeochemical cycles of elements such as carbon, oxygen or phosphorus and influence the availability of chemical species in their environment (Olejarz et al., 2021; Lyons et al., 2021). In particular, microorganisms are known to have played a major role in establishing the transition from an anoxic to a permanently oxygenated atmosphere (Fournier et al., 2021; Schirmermeister et al., 2015). Before ~2.4 Ga, there was globally no oxygen in the oceans or atmosphere (Lyons et al., 2009). Surface benthic ecosystems were most likely dominated by phototrophic microbial mats displaying autotrophic metabolisms to fuel the carbon cycle, sometimes favoring carbonate precipitation and leading to the formation of stromatolites (Tice et al., 2011; Flannery et al., 2011). Early photosynthesizers likely used electron donors other than the H<sub>2</sub>O molecule for carbon fixation, such as H<sub>2</sub>S, Fe<sup>2+</sup> or H<sub>2</sub>, therefore carrying out anoxygenic photosynthesis, *i.e.* photosynthetic processes not conducive to the massive release of molecular oxygen (Canfield et al., 2006; Ward et al., 2019; Shen et al., 2001; Kappler et al., 2005). Around 2.4 Ga ago, oxygenic photosynthesis had already evolved in cyanobacteria. The diversification and expansion of oxygenic phototrophs led to the formation of oxygenic oases, releasing oxygen into the oceans and atmosphere (Sánchez-Baracaldo et al., 2022). Following successive events of oxic and anoxia recorded in geological archives, several oxygenation events occurred, including the Great Oxygenation Event (GOE) at about 2.4 Ga, even though most oceans remained anoxic below a given depth during the Proterozoic (Lyons et al., 2009). Later, the Neoproterozoic Oxygenation Event (NOE) allowed the atmosphere and oceans to reach the current oxygenation levels, likely fostered by the cyanobacterial-derived eukaryotic (algal/plant) photosynthesis. This environmental transition modified dramatically the paleobiologies and paleogeochemical cycles, both of them co-evolving. The emergence and diversification of oxygenic photosynthesis and, concomitantly, aerobic respiration after the GOE, did not lead to complete extinction of previous anaerobic metabolisms. These were simply confined to restricted anoxic environments. Furthermore, the anoxygenic photosynthesis continued to evolve and diversify in parallel, depending on the local redox context (Gutiérrez-Preciado et al., 2018). Among other effects of pO<sub>2</sub> fluctuations, the bioavailability of chemical species such as iron, sulfur or phosphorus, is altered in an anoxic solution (Holland et al., 2006; Raiswell and Canfield, 2012). For example, in sulfur-rich environments, the increase in sulfide concentration under reducing conditions is often toxic to cyanobacteria and is likely to inhibit oxygenic photosynthesis,

causing a general change in the metabolisms of phototrophic organisms (Dick et al., 2018). Overall, the Precambrian biogeochemical conditions were drastically different from those encountered today where oceans and many lakes are oxygenated, leading most modern microbialites to be formed in oxic environments. Since Precambrian microbialites were formed under anoxic conditions, can modern microbialites from oxic environments be truly used as analogues of those from past, anoxic environments? This opens numerous questions about the phylogenetic diversity and metabolic function of microbial communities in anoxia-forming microbialites. In particular, how do microbial communities from oxic environments acclimatize and adapt to continuous or seasonally anoxic conditions?

Here, we specifically studied the microbial community composition of plankton throughout the water column and that of microbialites of two Mexican alkaline lakes experiencing seasonal stratification: Alchichica and Atexcac (Zeyen et al., 2021; Iniesto et al., 2021, Iniesto et al., 2022). In these monomictic lakes, the water column becomes anoxic during summer-fall below the oxycline depth (Alcocer, 2022). In addition, they host modern carbonate microbialites that form a reef around the shores of the lakes (Kaźmierczak et al., 2011; Zeyen et al., 2021; Iniesto et al., 2022). Interestingly, microbialites forming at seasonally anoxic depths were discovered and collected by divers in these two lakes during field campaigns in 2019 and 2022. In this study, we characterize the prokaryotic diversity of both plankton and microbialites, using 16S rRNA gene-metabarcoding approaches, enabling a comparison between the microbial community compositions in the oxic surface lake and anoxic deep environments. To better understand how microbialite-associated communities acclimate and/or adapt during their seasonal transition to anoxia, we studied the community composition variations of surface and deep microbialite fragments placed and maintained in laboratory mesocosms under continuous anoxia. The evolution of the microbialite prokaryotic diversity was assessed over time using metabarcoding analyses from regularly collected subsamples. Last, in order to characterize part of the active microbial communities in microbialites from anoxic depths, we isolated microorganisms in cultures under anoxic conditions. Our study unveils microbialite communities thriving in anoxic conditions, potentially offering better analogues of Precambrian stromatolites.

## **Materials and methods**

### *Plankton and microbialite sampling*

Microbialite and plankton samples analyzed in this work were collected in Alchichica (19° 25' N; 97° 24' W) and Atexcac (19° 20' N; 97° 27' W) lakes mainly during two field campaigns (May 2019 and October 2022). One microbialite sample was collected in Lake Alchichica in January 2012. These two monomictic lakes are located in the Trans-Mexican Volcanic Belt (TMVB, Mexico) and stratify from ~April to ~October, becoming totally anoxic at depth.

In October 2022, water samples were collected from six depths in Lake Alchichica (10, 30, 35, 37, 40 and 50 m) and five depths in Lake Atexcac (0, 10.2, 20.1, 23.3 and 27 m, Fig. 3.1, Tableau A3.1). For each depth, five liters of water were sequentially prefiltered through 200 µm and 30 µm pore-diameter filters, before retaining the planktonic biomass on 0.2 µm pore-diameter Nucleopore filters. Biomass-retaining filters were fixed in absolute ethanol and stored at -20 °C. In 2019 and 2022, the microbialite samples were collected by divers at six depths for Lake Alchichica (5, 10, 15, 20, 40 m) and three depths for Lake Atexcac (0, 20 and 27 m, Fig. 3.1, Tableau A3.1). Microbialite fragments were either fixed in ethanol for subsequent DNA analyses, or placed in sterile containers with water from the lake until they could be settled in laboratory mesocosms. One shallow microbialite sample collected at 15 m depth in 2012 and treated in a similar way was also used. We also collected samples of biofilms growing in the mesocosm walls. The labels of plankton, microbialites and biofilms samples contain “pI”, “mb” and “bf” tags, respectively. *In situ* parameters were measured in May 2019 and October 2022 using a YSI Exo2 multiparameter probe (Tableau A3.1).

*Mesocosm incubation and microbial enrichments under continuous anoxia*

Microbialite fragments from lakes Alchichica and Atexcac measuring ~2x2x2 cm to ~10x10x10 cm were placed in transparent Plexiglas boxes in a BagCoy glovebox (anoxic N<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> 85:10:5 atmosphere). The solution added to the mesocosms was first the original lake water completed with Volvic water (Ca<sup>2+</sup> at 0.29 mM, Mg<sup>2+</sup> at 0.33 mM, Na<sup>2+</sup> at 0.5 mM, K<sup>+</sup> at 0.16 mM, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> at 0.08 mM, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> at 1.16 mM, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> at 0.1 mM, Cl<sup>-</sup> at 0.38 mM and Si at 1.13 mM) to fully cover microbialite fragments in boxes. In 2021, a box containing microbialites from 15 m depth collected in January 2012 in Lake Alchichica (samples from Iniesto et al., 2021) and one containing microbialites from 40 m depth collected in May 2019 at Alchichica were placed in mesocosms in the glove box. These mesocosms have been under natural light conditions (day/night cycles) for about one year and a half. In 2022, a box containing microbialites from a depth of 40 m collected in Lake Alchichica in October 2022 and one containing microbialites from a depth of 27 m collected in Lake Atexcac in October 2022 were also placed in mesocosms in the glove box for one year. Samples of microbialite fragments were subsampled at t=0, 1, 4, 12, 15 and 21 weeks for the two 2022 mesocosms, and at t=0, 3, 9, 13, 30, 53, 59, 64, 67 and 73 weeks for the two 2021 mesocosms. Samples were frozen at -80 °C until processing.

Four different culture media for photosynthetic bacteria were prepared in triplicates in Petri dishes: (i) the BG11 medium classically used to grow cyanobacteria, (ii) a specific medium for *Chromatium*-type bacteria (Chrom) and (iii) a specific medium for Chloroflexi (Chlor) (respectively Schmidt and Kamen, 1970 and Zheng et al., 2021). The starting inoculum derived from the microbialite collected at a 40 m depth in Lake Alchichica in May 2019 was maintained in lake water in a Falcon tube sealed with a septum at room temperature during one year. Five microliters of a cell suspension prepared from this microbialite fragment were collected and inoculated into each Petri dish containing the previously prepared media. Petri dishes were then sealed with parafilm and incubated in the anaerobic chamber under diel cycles. Different cell morphotypes were identified from colonies growing on these plates by light microscopy. The BG11, Chrom and Chlor Petri dishes in which the first colonies appeared after eleven months were opened under anoxic conditions. For each identified morphotype, biomass from an isolated colony was transferred into a new dish containing the same medium. The remaining organisms from these colonies were transferred to 0.5 mL eppendorf tubes containing Tris (10 mM, pH 8.0) for subsequent amplification and sequencing of 16S rRNA marker gene fragments.

### *DNA purification and 16S rRNA gene amplicon sequencing*

Microbialite samples were crushed into an agate mortar before DNA extraction. DNA from microbialites, plankton and cultures was purified using the Power Soil DNA Isolation Kit. For the plankton and microbialite samples, 16S rRNA gene fragments of ~970 bp were amplified by PCR using the prokaryote-specific primers U515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) and 1492R (5'-TACCTTGTACGACTT). Amplicons were tagged with 10-nt Molecular Identifiers (MIDs) to allow multiplexing and subsequent sorting of amplicons from different samples. The PCR-amplification reaction (25 µL) contained 0.5 to 3 µL of eluted DNA, 0.2 mM of deoxynucleotide (dNTP) mix, 0.3 µM of each primer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.5 U of the hot-start Platinum Taq Polymerase. PCR reactions encompassed 35 cycles consisting of three steps (denaturation at 94°C for 30 s, hybridization at 55–58°C for 30–45 s, polymerization at 72°C for 90 s) preceded by a 2-min denaturation step at 94°C, and followed by five additional minutes of polymerization at 72°C. To eliminate dNTPS and remaining primers, amplicons were purified with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen). Then amplicons were sequenced by Nanopore, following the protocol supplied in the V14 (SQK-LSK114) kit. For the enrichment samples (colonies), two amplification runs were carried out. First, an almost complete 16S rRNA gene fragment (~1460 bp) was PCR-amplified using the bacteria-specific primers B27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCA) and 1492R. Second, the cyanobacteria-specific primers CYA106F (5'-CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA) and CYA 1380R (5'-TCGGTGGTTGTGCCAGTCG) were used to amplify a gene fragment of ~1270 bp. Since some colonies yielded more than one 16S rRNA gene amplicon (enriched but not axenic cultures), we cloned these amplicons to identify organisms co-existing in colonies. To do so, we used the TOPO TA Cloning kit (Invitrogen) following the instructions of the manufacturer. After the ligation of the insert DNA in the cloning vector, competent *E.coli* cells were heat-shocked transformed. They were then inoculated into LB-agar medium containing ampicillin (100 mg/mL) and incubated at 37°C overnight. Biomass from colonies containing the insert was then transferred to 10 mM Tris, pH 8.0 prior to cell lysis and amplification of cloned 16S rRNA gene fragments using vector primers. Amplicons were then Sanger-sequenced (Azenta, Takeley, UK). Individual Sanger sequences were visualized with the Ugene software (<http://ugene.net/>).

### *Sequence analysis*

In total, we obtained 8,130,276 Nanopore 16S rRNA gene amplicon raw sequence reads, which were processed using a bioinformatic in-house pipeline. After quality control, high-quality, non-chimeric merged reads were first clustered using CD-hit at 100 % identity (Fu et al., 2012). As expected from the Nanopore sequence error level, only a limited number of sequences clustered at 100%, most other sequences formed singletons. Sequences clustering at 100 % sequence identity were retained as representative sequences for subsequently defined Operational Taxonomic Units (OTUs). OTUs were defined as clusters of sequences sharing at least 95 % identity. OTUs were phylogenetically classified based on sequence similarity with sequences from cultured/described organisms or from environmental surveys retrieved from the SILVA database (Quast et al., 2013). We used the Genome Taxonomy Database (GTDB, Parks et al., 2022) as a major taxonomy framework for prokaryotes. OTUs affiliated to chloroplasts and mitochondria were removed from our dataset. Sanger sequences obtained from axenic or enriched cultures were compared by BLAST with those in the non-redundant GenBank database (NCBI) and assigned to the taxon of their closest blast hit as a first step. Subsequently, phylogenetic trees were inferred from alignments of our sequences with those of the closest hits and 16S rRNA gene reference sequences. Sequences were aligned using MAFFT (Katoh et al. 2019). Phylogenetic trees were reconstructed by maximum likelihood with the FastTree program and visualized with FigTree software (Price et al., 2009). The comparison of the OTUs obtained from our samples with those of the "microbial core" from Iniesto et al. (2021) was achieved using a phylogenetic tree produced on all the OTUs including those of the core and of our samples, via FigTree software (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

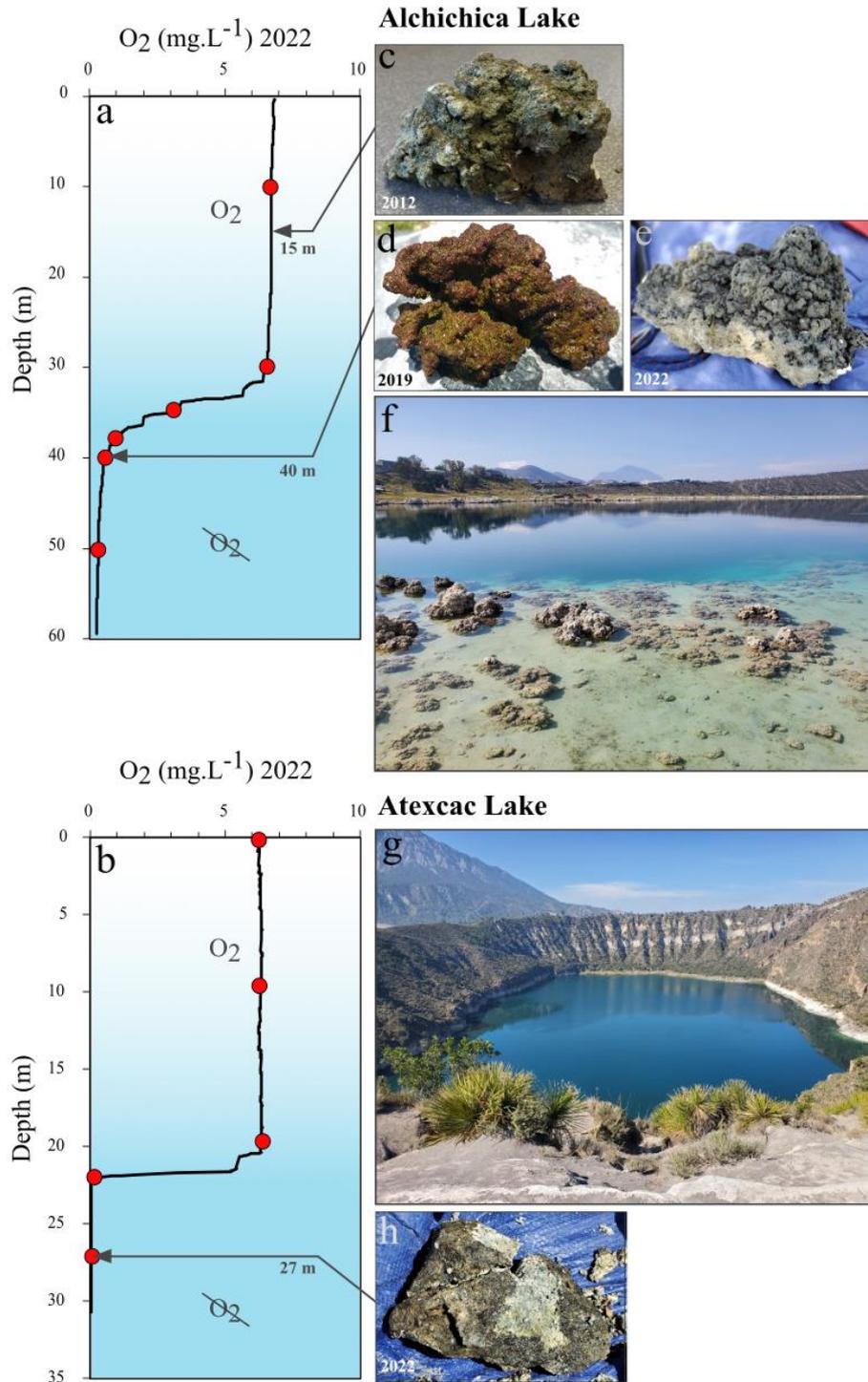
### *Statistical analysis*

Principal component analysis (PCA) and non-metric multidimensional scaling (NMDS) were performed on the diversity and relative proportion of taxa inferred from 16S rRNA gene sequences obtained by Nanopore-based metabarcoding using R (Core et al., 2019). Degrees of community structure dissimilarity corresponding to Bray-Curtis (BC) distances were assigned to each sample. Samples were sorted into several groups according to their nature/provenance: biofilms, microbialites, plankton. Dendrograms were then produced using the "ward.D2" grouping in R software.

## **Results**

### *1. Microbialite and plankton prokaryotic communities across the water columns of lakes Alchichica and Atexcac*

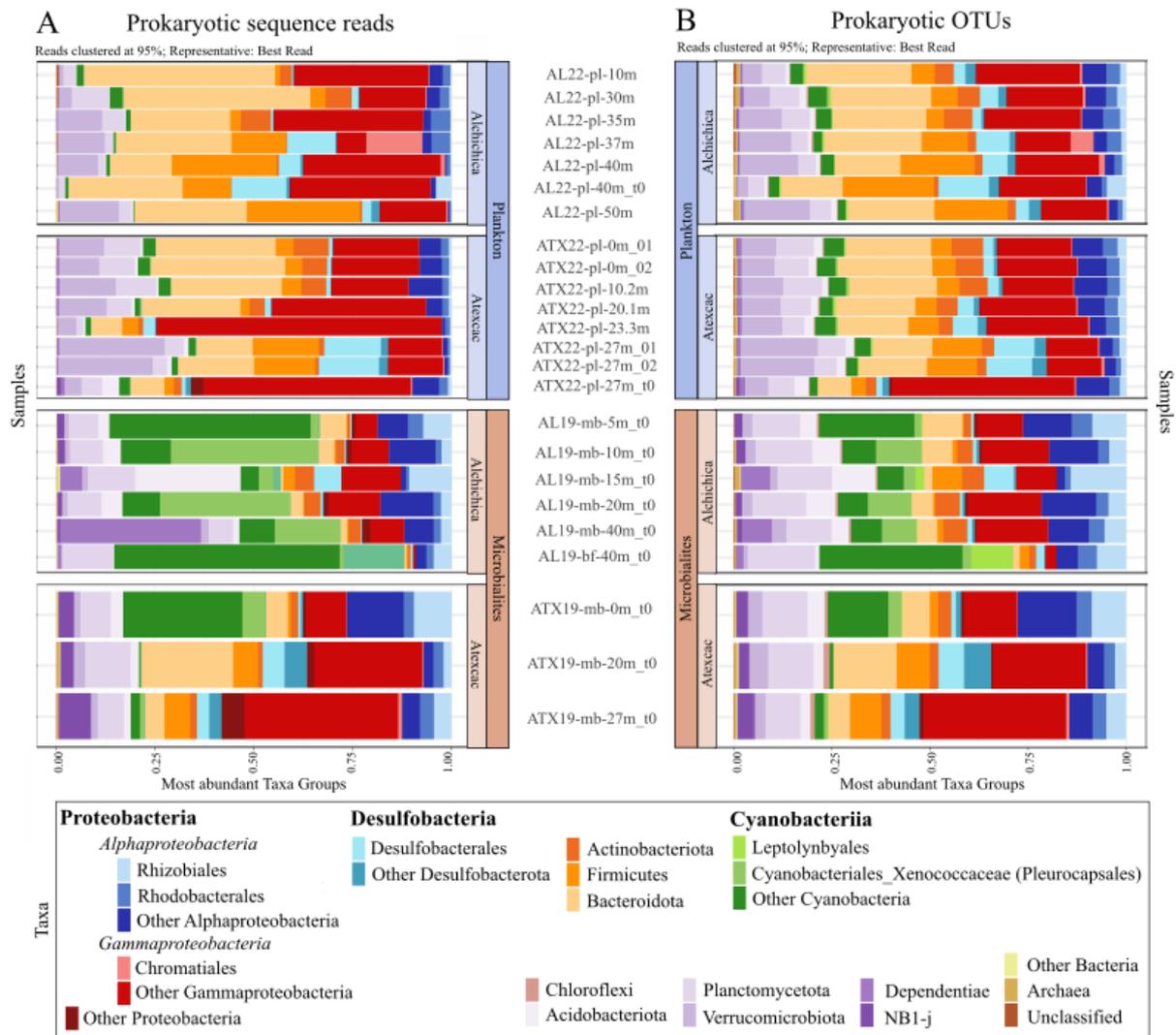
In May 2019, the Lake Alchichica water column was anoxic below 20 m in depth, whereas in October 2022 it was anoxic below a depth of 36 m. In May 2019, the Lake Atexcac water column was anoxic below 20 m in depth, whereas in October 2022 it was anoxic below 23 m in depth. When extracted from the water column, microbialites samples presented differences in colors: biofilms of those from the surface were green and biofilms of those from the depths were red and/or black (Fig. 3.1).



**Figure 3.1.** Dissolved oxygen depth profiles and overview of Alchichica and Atexcac lakes and microbialite samples incubated under continuous anoxia. (a) Depth profile of the dissolved oxygen (in  $\text{mg.L}^{-1}$ ; precision at  $0.1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) in the water column of Lake Alchichica in October 2022. The water column sampling depths are highlighted by red circles; (b) Depth profile of the dissolved oxygen (in  $\text{mg.L}^{-1}$ ; precision at  $0.1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) in the water column of Lake Atexcac in October 2022. The water column sampling depths are highlighted by red circles; (c) 15-m-deep sample of Lake Alchichica microbialite collected in January 2012; (d) 40-m-deep sample of Lake Alchichica microbialite collected in May 2019; (e) 40-m-deep sample of Lake Alchichica microbialite collected in October 2022; (f) Overview of Lake Alchichica in October 2022; (g) Overview of Lake Atexcac in October 2022; (h) 27-m-deep sample of Lake Atexcac microbialite collected in January 2022.

We characterized the prokaryotic diversity by 16S rRNA gene metabarcoding in plankton (cell fraction 0.2-30  $\mu\text{m}$ ) and microbialite samples at different depths in lakes Alchichica and Atexcac. A total of 24 samples were analyzed (15 planktonic; 9 microbialite-associated) (Fig. 3.2). The histograms in figure 3.2A show the relative prokaryotic taxa abundances in the samples (relative abundance of OTUs based on their number of reads as a proxy). The histograms in figure 3.2B show the diversity of OTUs in the samples (the total number of different OTUs for each taxon). The « other bacteria » fraction is detailed in Figure A3.1. These analyses provide comparative information about (i) the natural microbial compositions of microbialites and plankton over a depth transect, (ii) the *in situ* planktonic vs. the *in situ* microbialite microbial communities and (iii) the natural microbial communities of 2019 and 2022 field campaigns with those analyzed by previous studies (*e.g.* Iniesto et al., 2021 and Iniesto et al., 2022).

Overall, the Alchichica and Atexcac 2022 water columns exhibited relatively consistent prokaryotic diversity profiles with depth, even if a slight increase in the Verrucomicrobiota and Firmicutes diversity was observed with depth, as well as a decrease in the Alphaproteobacteria diversity. However, as expected, the relative abundance of the different taxa varies much more according to the depth. Bacteria dominated the planktonic communities and particularly Gammaproteobacteria and Bacteroidota prevailed in the planktonic fraction (covering respectively about 27 % and 31 % of the total normalized relative abundance in Alchichica). In addition, the *Burkholderiales* members appeared to dominate the Proteobacteria planktonic fraction, with a notable peak of *Chromatiales* members at the oxycline depth in the Alchichica water column (Fig. 3.2A and A3.2). A rise in the proportion of Firmicutes, Desulfobacterota and *Rhodocyclaceae* (Gammaproteobacteria) members at depth was also observed in the planktonic fractions of lakes Alchichica and Atexcac (Fig. 3.2, Fig. A3.2, respectively until ~27 % and ~16 % for the *Firmicutes*). Moreover, the relative proportion of Cyanobacteria and Alphaproteobacteria-associated OTUs tended to slightly decrease with depth.



**Figure 3.2.** Prokaryotic community composition in water column plankton and microbialite samples collected at different depths in Lake Alchichica and Lake Atexcac. (a) Relative abundance of the different dominant phylogenetic taxa in water column plankton and microbialites based on the relative proportion of 16S rRNA gene amplicon sequences. (b) Diversity of OTUs from the different taxa in water column and microbialites.

Moreover, in Alchichica microbialites, the diversity of OTUs belonging to high-rank taxa was also more conserved than the relative abundance of taxa (Fig. 3.2). In Atexcac, the diversity of microbialite OTUs assigned to Gammaproteobacteria increased whereas that of Cyanobacteria decreased with depth (Fig. 3.2B). In both lakes, bacteria dominated the prokaryotic fraction of microbial communities. Proteobacteria dominated in Alchichica and Atexcac microbialites (~25 % and ~39 % on average, respectively) with an increase in *Desulfobacterales* with depth at Atexcac. In Alchichica microbialites, the microbial community structure profiles varied differentially between the epilimnion and hypolimnion, with seemingly

a threshold at the oxycline depth (respectively ~20 m and ~36 m depth in 2019 and 2022). For example, cyanobacteria increased in relative abundance at the oxycline depth in Alchichica microbialites, whereas they decreased with depth in Atexcac. In microbialites of both lakes, the proportion of reads associated with *Pleurocapsales* increased with depth, as previously documented (Saghai et al., 2015). Members of the Chloroflexi showed little diversity for a very low relative abundance.

Overall, the natural microbial composition analyses in Alchichica and Atexcac lakes revealed significant differences between the microbialites and the plankton. This was particularly apparent in the Cyanobacteria/Gammaproteobacteria relative abundance ratio.

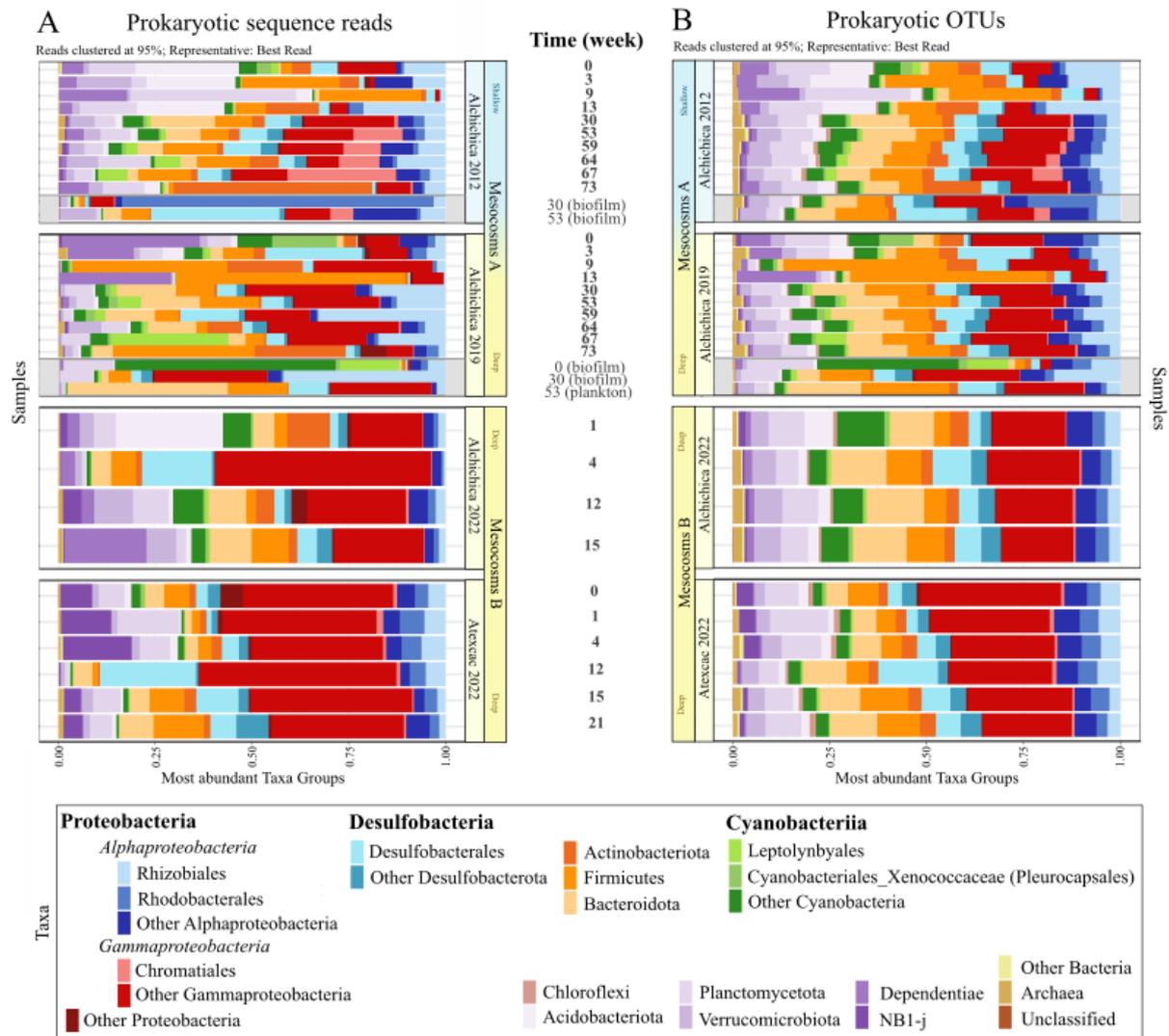
## ***2. Acclimation/adaptation of the prokaryotic communities under continuous anoxia in the laboratory***

### *Microbial community composition of microbialites and plankton over time under continuous anoxia*

We incubated microbialites in mesocosms under continuous anoxia over one year and a half with the aim of characterizing the evolution of the microbial composition over time in response to this major change in their environmental conditions. To this end, two types of mesocosms (mesocosms A and B) were prepared with two objectives: (i) Compare how community composition changed during ~1.5 years in microbialites from the same lake (Alchichica), but from different depths: one from a permanently oxic environment (shallow 15-m-deep samples collected in 2012) vs. one from a seasonally anoxic environment (40-m-deep sample collected in 2019). These were called mesocosms A and were settled in 2021. (ii) Compare community structure changes during ~5 months in microbialites collected from seasonally anoxic environments between two different ecosystems (Alchichica vs. Atexcac lakes with respectively a 40-m-deep sample and a 27-m-deep sample both collected in 2022 below the oxycline depth). These were called mesocosms B and were set up in 2022.

First of all, we observed a general color change of the microbialites and associated biofilms after about five months (Fig. A3.3). In mesocosms A, the surface of the shallow microbialites became pink while that of the deep microbialites became green. In mesocosms B, the Alchichica microbialite fragment surface turned light red, while Atexcac microbialites stayed grey. In order to characterize the time-evolution of the microbial communities associated

with the microbialites in response to continuous anoxia, we regularly collected samples and produced 16S rRNA gene amplicon metabarcoding analyses (Fig. 3.3 and Fig. A3.4).



**Figure 3.3.** Prokaryotic community composition variations over time in microbialite samples from Lake Alchichica and Lake Atexcac maintained in anoxic mesocosms. (a) Histograms showing the relative abundance of major phylogenetic lineages in mesocosms based on 16S rRNA gene amplicon sequences; (b) Diversity of OTUs belonging to different major taxa (*i.e.* number of different OTUs per taxon).

For all mesocosms, the diversity of microbialite OTUs belonging to high-rank taxa was high and, as expected, showed less variations over time than the relative abundance of those taxa. This suggests that, all OTUs present at the beginning of the experiment were kept over time under continuous anoxia, but their relative abundance changed. The plankton and biofilms growing in the mesocosm also exhibited, as expected, a distinct microbial composition. However, local differences were visible in the diversity of some samples (such as in Alchichica 2012, t=9 weeks sample). In some of these, very local differences might be due to sample

heterogeneity and the stochasticity of sampling. Consistently with the microbial composition from the starting natural samples, Bacteria and specifically Proteobacteria taxa dominated the prokaryotic diversity (~34 % in average of the total taxa proportions in all samples). Especially in Alchichica microbialites, proteobacterial relative abundances decreased until t=15 weeks, then increased. The Bacteroidota, Verrucomicrobiota, Actinobacteriota and Planctomycetota groups were also abundant, covering from ~14 % to ~45 % of the total taxa relative proportions. Overall, despite a high heterogeneity in taxa abundances reflecting local-scale differences in microbial communities associated with microbialites (for example the starting Alchichica 2019 sample in which we assume that we collected spatially extended Dependientiae colonies), we identified several general trends of microbial composition evolution over time.

(i) We noted that heterotrophic and/or sulfate-reducing bacteria represented a high proportion of the microbial communities associated with Alchichica and Atexcac microbialites. For example, *Firmicutes* and *Desulfobacterales* lineages tended to slightly increase over time under continuous anoxia (Fig. 3.3).

(ii) Other lineages such as NB1-J or Dependientiae groups were observed in the microbial structure of the microbialites and biofilms samples over time, but in minor amount compared with those previously mentioned, or only locally for some microbialite samples (Fig. 3.3). For example, it is noteworthy that the NB1-J phylogenetic group was more represented in the mesocosms B, and especially over-represented in the Atexcac deep samples (up to 13 % of the total reads number at t=4 weeks).

(iii) OTUs assigned to anoxygenic phototrophs represented variable relative abundances through time, covering ~17 % of the total taxa proportions in Atexcac microbialites, ~8 % in deep Alchichica microbialites, and showing a significant rise up to ~27 % on average after t=15 weeks in shallow Alchichica microbialites. While a relatively high number of *Rhodobacterales* members (~33 % in average of the total anoxygenic phototrophs) were conserved in all samples, the relative proportions of some other anoxygenic phototrophs belonging to Alpha- and Gammaproteobacteria varied over time (Fig. 3.4, Fig. A3.2). This was the case for *Chromatiales* members, which appeared and increased significantly at mid-time in shallow Alchichica microbialites (until a peak at ~90 % of the anoxygenic phototrophs) as well as Gemmatimonadota members. This was also the case for *Rhizobiales*, which decreased significantly in deep Alchichica microbialites after t=15 weeks. In Atexcac microbialites, the relative abundance of *Chlorobia* and *Rhodospirillales* increased after t=15 weeks (~56 % at



t =15 weeks under continuous anoxia, while they increased in Alchichica microbialites after t = 15 weeks. Interestingly, the *Leptolyngbyales* members represented a non-negligible part of the Alchichica and Atexcac cyanobacterial lineages especially in both shallow and deep Alchichica samples where they accounted for most of the Cyanobacteria increase observed after t=15 weeks (~90 % of the Cyanobacteria at t=67 weeks in Alchichica 2019 deep sample, Fig. A3.2). Moreover, *Pleurocapsales*-associated reads showed a slight decrease in Atexcac samples.

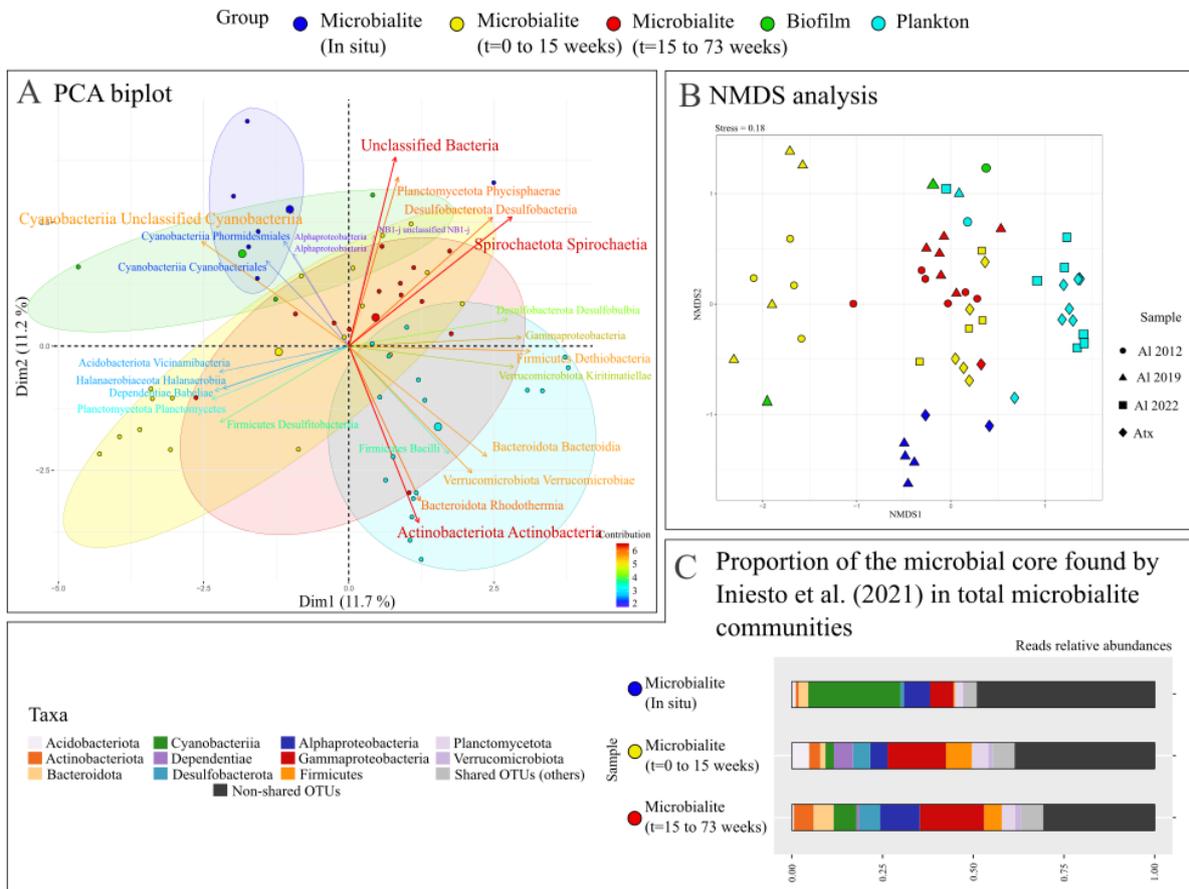
(v) The microbial composition of the biofilms collected on the walls of the boxes and of the planktonic fraction in mesocosms A differed in relative abundance of the different taxa compared with the Alchichica microbialite samples (Fig. 3.3). After 30 weeks, the biofilm on the walls of mesocosms A was largely dominated by *Rhodobacterales* members (sample from 15 m depth), while both gamma- and alpha-proteobacteria (*Rhizobiales*) dominated the samples collected from 40 m in depth. Regarding the plankton, Proteobacteria dominated in mesocosms A after 53 weeks, with co-dominance with Planctomycetota at the surface and Bacteroidota at depth.

#### *Conservation of a core microbial community in microbialites samples*

In order to represent the taxonomic distance between the different microbialite, plankton and biofilm samples and assess their dissimilarities over time under anoxia, we conducted a PCA and an ordination analysis based on Bray-Curtis distances (NMDS analysis) (Fig. 3.5). For the latter method, we generated a correlation matrix taking into account the presence/absence of OTUs, which was then used to associate a degree of similarity with samples in pairs, and to prioritize them into clusters. Then, we compared the OTUs present in the microbialite samples from our study with the OTUs present in the microbial core defined by Iniesto et al. (2021) based on the analysis of microbialites from nine crater lakes in the trans-Mexican volcanic belt. To do so, we reconstructed a phylogenetic tree including the previously defined “microbialite-core” OTUs and the OTUs defined in the present study (Fig. 3.5D, Fig. A3.5).

These analyses showed that the microbialite, plankton and biofilm samples could be distinguished from one another based on their OTUs diversity. Even if their taxonomic variability is not fully explained by the diagrams in figure 3.5A (explaining a total of 22.9 % of their variance), the planktonic microbial diversity carried in particular by Actinobacteria-Bacteroidota is clearly different from the diversity associated with microbialites collected *in*

*situ* in the lakes, carried mainly by Cyanobacteria-associated OTUs. In addition, the microbial diversity of microbialites appeared different between those coming from Lake Atexcac and those coming from Lake Alchichica. Within the Alchichica microbialite samples, those collected in 2019 differed from those collected in 2022, particularly through the cyanobacterial diversity present in 2019 (Fig. 3.5B).



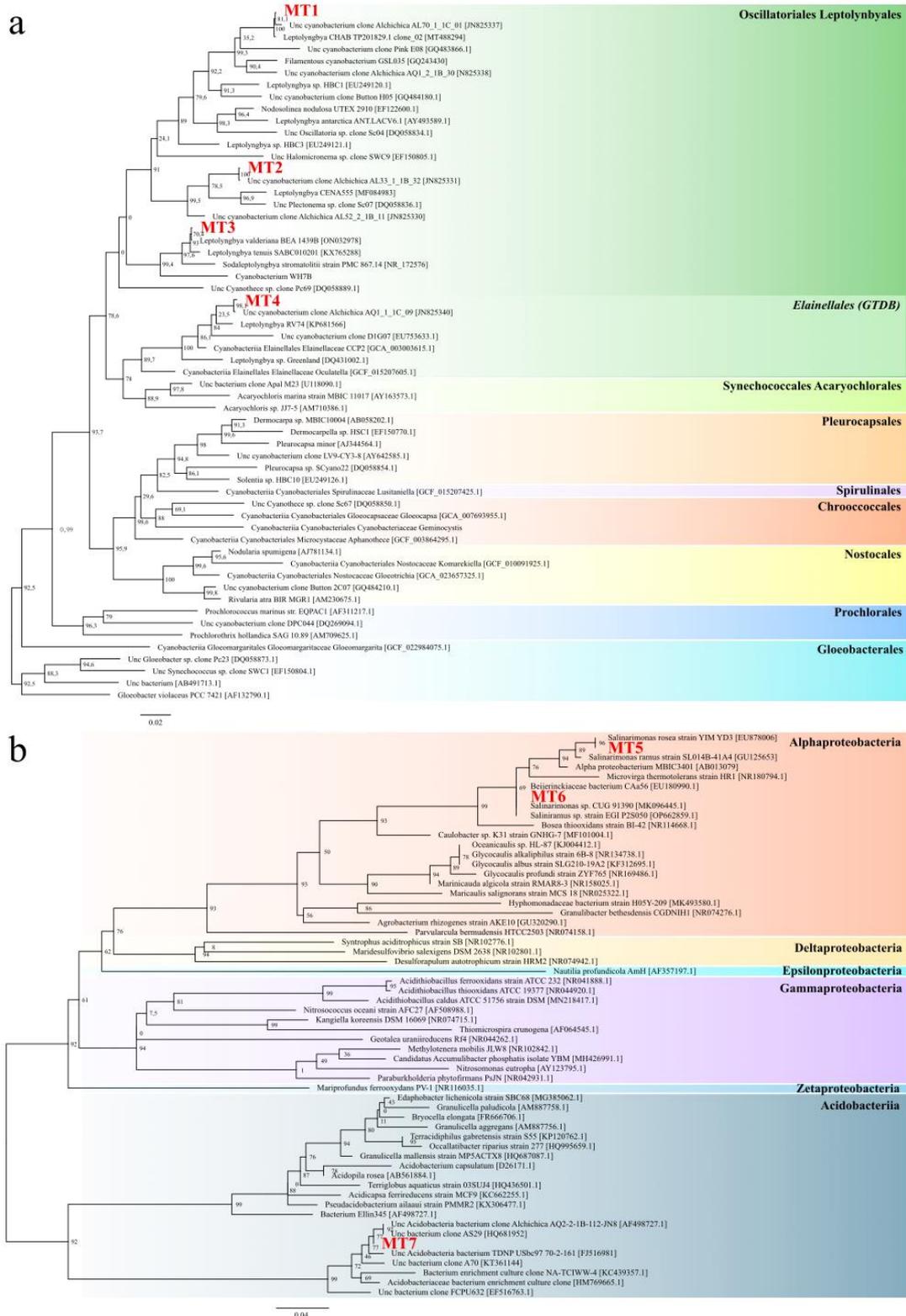
**Figure 3.5.** Statistical comparisons of prokaryotic community composition in samples from microbialites, plankton and biofilms of mesocosms maintained under anoxia over time. For these analyses, samples were grouped into different groups (see color code on the top of the figure): biofilms (green), microbialites collected *in situ* (dark blue), microbialites collected in glovebox between t=0 and 15 weeks (yellow), microbialites collected in glovebox between t=15 and 73 weeks and plankton (light blue). (A) PCA on the sequenced samples explaining 22.9 % of the samples variance. (B) NMDS analyses of the samples clearly showing a distinction based on the Bray-Curtis distance between the same groups of samples as in the image A analysis; (C) Histograms of relative abundances of taxa showing the contribution of sequences belonging to the microbial core found by Iniesto et al. (2021) in the microbialite samples groups *in situ*, collected under continuous anoxia early (between t=0 and 15 weeks) and collected under continuous anoxia late (between t=15 and 73 weeks).

Interestingly, there was a notable distinction in phylogenetic diversity between microbial communities in microbialites incubated under continuous anoxia sampled early during the first 15 weeks and those sampled late at t=15 to 73 weeks. In addition, the 2022 samples are decorrelated from the 2012-2019 samples. The diversity of OTUs in mesocosms tended

to be relatively reduced over time, particularly after 15 weeks under continuous anoxia (Fig 3.5A). Finally, the core of microbial OTUs found by Iniesto et al. (2021) in Mexican microbialites was also found in all our microbialites samples, and the microbial diversity associated with microbialites incubated under continuous anoxia sampled late tended towards the OTUs diversity of the microbial core (about 70 % of diversity is shared with OTUs from the microbial core after 15 weeks under continuous anoxia, Fig. 3.5D).

#### *Cultivation of prokaryotes from Alchichica microbialites under anoxic conditions*

To investigate whether microorganisms from deep microbialites undergoing seasonal anoxia can really grow anaerobically, we carried out cultivation attempts to enrich and/or isolate organisms from a 40-m-deep Alchichica microbialite collected in anoxic waters on different culture media. In total, seven isolates (MT1 to 7) were obtained after one year under continuous anoxia, including four isolates grown in the BG11 medium and three grown in the *Chromatium*-specific culture medium. A diversity of filamentous to coccoid morphotypes were observed for these colonies using optical microscope (Fig. A3.6). Moreover, a wide range of mineral phases including calcium and magnesium carbonates, magnesium silicates and iron sulfides were directly observed by SEM near the cells or even encrusting them (Fig. A3.7). The 16S rRNA gene from the seven morphotypes was amplified, cloned if necessary, then amplicons were purified and Sanger sequenced. The obtained high-quality ~1500 bp sequences are available in Tableau A3.2. The 16S rDNA sequences of these enriched organisms were compared by BLAST to the sequences on GTDB and SILVA databases. Finally, they were aligned to reference sequences and their closest BLAST hits to reconstruct phylogenetic trees (Fig. 3.6). Overall, four isolates grown in BG11 medium were affiliated to the Cyanobacteria taxa (MT1 to 4). Interestingly, three corresponded to *Leptolyngbyales* and one to *Elainellales* (following the GTDB classification). Among these four Cyanobacteria members, three appeared similar to uncultured bacterial clones previously sequenced from Lake Alchichica ([JN825337], [JN825331] and [JN825340]). Two other sequences (MT5 and MT6) belonged to the Alphaproteobacteria, more precisely to the genus *Salinarimonas*, but were not previously identified in Alchichica microbialites in metabarcoding studies. Finally, the last morphotype belonged to the Acidobacteria order and was similar to the [HQ681952] clone already found in Lake Alchichica (MT7).



**Figure 3.6.** Maximum likelihood phylogenetic trees of microorganisms enriched under anoxic atmosphere in a glove box from a Lake Alchichica 40-m-deep microbialite. The trees were constructed from 16S sequences of reference organisms in the NCBI, Silva and GTDB databases and maximum similarity sequences with those obtained for morphotypes 1 to 7 (MT1 to 7, in bold red in the trees). The scale indicates the number of mutations per site for a given branch length. (a) Phylogenetic positions of morphotypes 1 to 4 (MT1 to 4) for the cyanobacteria phylum. (b) Phylogenetic positions of morphotypes 5 to 7 (MT5 to 7) for the Proteobacteria and Acidobacteria phyla.

## **Discussion**

### *Global conservation of a core prokaryotic phylogenetic diversity in redox-stratified Alchichica and Atexcac lakes*

Here, a 16S rRNA marker gene amplicon metabarcoding approach showed that the prokaryotic microbial diversities in the microbialites of lakes Alchichica and Atexcac at t=0 week are nearly the same as those previously estimated using metabarcoding/metagenomics by Saghai et al. (2015), Iniesto et al. (2021), Alcocer et al. (2022). Strikingly, we found the microbial core assessed by Iniesto et al. (2021) in all microbialite samples (50 to 70 % of the total OTUs diversity, Fig. 3.5), including those collected *in situ* during seasonal anoxia or in mesocosms incubated under continuous anoxia (Fig. 3.5, Fig. A3.5). This indicates that the original diversity can be maintained in mesocosms despite the shift of conditions to permanent anoxia. Interestingly, Iniesto et al. (2021) suggested that this specific microbial core shared by different Mexican microbialites belonging to the TMVB lakes and forming an alkalinity-salinity gradient (including Alchichica and Atexcac), may play an active role in the formation of the microbialites. Similarly, the conservation of a microbial core specific to microbialites also dominated by Proteobacteria, followed by Cyanobacteria and Acidobacteria has been observed in Pavilion Lake by metagenomics along a depth gradient, also suggesting that a specific group of microbial communities may be involved in the formation of microbialites (White et al., 2016). The fact that we found this particular shared group of OTUs in our samples supports the hypothesis that a specific combination of microbial communities is involved in the formation of these Mexican microbialites, despite the relatively different environmental conditions. This cluster of OTUs would provide a phylogenetic and metabolic diversity accompanying carbonatogenesis in the microbialites even during environmental anoxia. Whether they are directly responsible for carbonatogenesis or whether they are selected by those environmental conditions remains, however, an open key question. This also suggests that the microbial diversity in microbialites tends to decrease towards the diversity of the microbial core when they are constrained to continuous anoxia conditions. Accordingly, the acclimation/adaptation to anoxia would be mainly achieved by changes in the dominances/activity, *i.e.* the relative organism abundances, within the microbial mats.

Regarding the plankton in the water columns of lakes Alchichica and Atexcac, the depth prokaryotic profiles showed high diversity that was relatively constant with depth. As expected, more pronounced diversity variations with depth were observed here than for microbialite-

associated communities (Fig. 3.2). Differences in microbial diversity have already been observed in several ecosystems (including Alchichica and Atexcac) between microbial mats in general (and in particular associated to microbialites) and plankton (White et al., 2016), consistently with our 16S rRNA gene metabarcoding results. These variations are expected and clearly related to the different lifestyles associated to planktonic vs. benthic organisms. They involve differences in the metabolisms and motility of organisms imposed by benthic sessile conditions and biomineralization metabolic pathways on the one hand (in microbial mats/biofilms associated to microbialites) vs. planktonic environmental conditions on the other hand. Thus, given the relative conservation of phylogenetic diversities over time and over depth transects observed in the microbial communities of the microbialites, the general acclimation of prokaryotes to anoxia is likely to be driven by local variations of relative abundances of different taxa, which would be selected according to the physicochemical environmental fluctuations.

***Variations in the Alchichica and Atexcac microbial community compositions reflect adaptation to anoxia and sulfidic conditions***

*Changes of natural Alchichica and Atexcac microbialite communities as a function of lake sampling period and depth*

The dissolved oxygen depth profiles measured in lakes Alchichica and Atexcac showed that the hypolimnion becomes anoxic at depth from ~April to ~October. Hence, a major environmental selection pressure for the microorganisms in these two lakes may be driven by the development of seasonal anoxia. In addition, we measured a significant difference in dissolved sulfur concentration between Alchichica (~11 mM) and Atexcac (~3 mM) lakes water columns, which also likely constitute a major environmental constraint as part of this sulfur is transformed to sulfide upon anoxia. Microbial communities must therefore adapt to these physico-chemical variations over time and depth. Overall, our 16S rRNA gene metabarcoding analyses for plankton and microbialites sampled in May 2019 and October 2022 suggested that the relative abundances of microbial communities vary (i) depending on the time of sampling and (ii) depending on the depth.

(i) It was already shown that global physico-chemical parameters related to salinity-alkalinity are the main drivers of microbial community structure in Alchichica and Atexcac planktonic fraction, even if the season also play a role (Iniesto et al, 2022). However, in October

2022, Gammaproteobacteria mainly represented by *Burkholderiales* members dominated the planktonic fraction with a relative proportion significantly higher than those previously found for these groups in the water column of Alchichica and Atexcac in January 2012 and May 2014 (Iniesto et al., 2022). This observation could be partly due to a sulfur-oxidizing bacteria bloom occurring during lake stratification, even if the bacterioplankton relative abundance in the water column is often reduced in October (Alcántara-Hernández et al., 2022). Representatives of the *Burkholderiales* are likely to be involved in the sulfur cycle of the lakes via dissimilative sulfate reduction/oxidation processes and the use of thiosulfate (Konrad, 2023). In addition, the fact that their proportion is more pronounced in October 2022 than in May 2014 may reflect a lag time in the growth of sulfur-related bacteria between the start of the stratification (April-May), when nitrogen and phosphorus concentrations in the water column are the highest of the year, and the end of the stratification period when the anoxic zone has been established for six months. Thus, the visible differences in the microbial planktonic community compositions in October 2022 could be partly driven by variations of the availability of different chemical species in the water column following stratification and the occurrences of different blooms over the seasons. In addition, Alphaproteobacteria and specifically anoxygenic photosynthetic *Rhizobiales* as well as Cyanobacteria such as *Pleurocapsales* dominated the prokaryotic communities in microbialites, thus suggesting an involvement of these taxa in carbonatogenesis possibly through oxy- or anoxygenic photosynthesis. Last, the *in situ* prokaryote communities between the start and the end of the lake stratification period were similar in diversity when compared with previous data from Saghaï et al. (2015) and Iniesto et al. (2021).

(ii) The May 2019 and October 2022 16S rRNA gene metabarcoding data also suggest that the *in situ* natural prokaryotic communities adapt to the water column stratification through variations of the relative abundances of taxa. In fact, the oxycline appeared to be a determining depth for the planktonic microbial communities, since a peak of proteobacteria was observed in both lakes at this depth, represented mainly by *Chromatiales* members in the Alchichica water column. Hence, it is possible that the adaptation of microbial communities in rapid transitions from an oxic to an anoxic environment involves a significant and local rise in the abundance of Proteobacteria, particularly anoxygenic phototrophs in the case of Alchichica. Below the critical oxycline depth, the observed increase in the relative proportions of anoxygenic phototrophs and/or sulfate reducers such as the *Rhodocyclaceae*, *Chlorobia* and *Desulfobacterales* members reflects the selection of certain planktonic taxa by anoxia in both lakes (Madigan et al., 1997). In addition, a decrease of oxygenic photosynthesis in anoxic water

column may be pointed out by the decrease of the abundance of planktonic Cyanobacteria members with depth. Similarly, in the *in situ* microbial communities associated with the microbialites, a decrease with depth in the relative abundance of Cyanobacteria was observed to the benefit of Proteobacteria. Interestingly, the highly represented *Pleurocapsales*, contrasting with the low *Synechococcales* abundances in Alchichica and Atexcac deep microbialites support previous observations reporting the increase of *Pleurocapsales* at depth, at the expense of *Nostocales* and filamentous *Synechococcales* (Couradeau et al., 2011; Saghai et al., 2015; Águila et al., 2021).

However, Iniesto et al. (2021) have highlighted the spatial heterogeneity of microbialites, with relative taxon abundances varying at a local scale. This heterogeneity may be due to the sampling of well-developed colonies, or to organisms that are larger than others and therefore relatively less abundant at a local scale. For instance, differences were observed between the *in situ* communities of Alchichica microbialites between 2019 and 2022, with for example much more abundant Cyanobacteria members in 2019 than in 2022 (Fig. 3.2). This could be attributed to local heterogeneities. However, it is also likely that these differences in abundance between the sequenced communities in 2019 and 2022 microbialites at t=0 week are due to the fact that they were not sampled at the same time of the year (*i.e.* beginning *vs.* end of stratification) where, as for the plankton, the long-lasting anoxia could have selected the microbial communities.

In any case, even if spatial heterogeneity was largely observable in our samples and a multitude of factors that are difficult to distinguish intervene, the trends in natural community structures reflected some fluctuations in the relative abundance of lineages depending on the oxygenation of the solution.

#### *Adaptation of microbial communities in Alchichica and Atexcac microbialites to anoxia*

We studied the changes imposed by anoxia to the prokaryotic microbiome of microbialites by exposing shallow (from the oxic water column, Alchichica) and deep (from the anoxic water column in both lakes Alchichica and Atexcac) microbialites to continuous anoxia for almost a year. The obtained data support the previous *in situ* observations, showing that, under anoxia, some microbial communities are favored and increase in relative abundance at the expense of others.

(i) In the case of mesocosms A comparing the microbial composition of oxic microbialites (shallow samples, Alchichica 2012) with microbialites already adapted to seasonal anoxia (deep samples, Alchichica 2019), the variations in response to continuous anoxia mostly consisted in a massive increase of *Chromatiales* over time for the shallow samples, whereas the deep microbial mats tended to favor the growth of Cyanobacteria, with an over-representation of *Leptolyngbyales* in 2019. Interestingly, it has been shown that some members of the *Leptolyngbyales* specifically adapted to sulfidic conditions are not only versatile regarding photosynthesis, but also that their switch from oxygenic to anoxygenic photosynthesis can be regulated by both H<sub>2</sub>S concentrations and irradiance in the medium (Hamilton et al., 2018). Accordingly, it is possible that we favored the use of anoxygenic photosynthesis on H<sub>2</sub>S by members of this order, after transitioning conditions to strict anoxia. This would also be consistent with the subsequent enrichment of these cyanobacteria under continuous anoxia. As for the increase in *Chromatiales* in surface microbial mats, it is possible that their Alchichica representatives have developed preferentially within a microbiome already adapted to oxic conditions in laboratory, perhaps because of the existence of specific anoxic microenvironments in biofilms grown under general oxic conditions and/or also an oxic-anoxic versatility.

(ii) However, the change of microbialite microbiomes seems relatively dependent on the original composition of the microbiomes already present in the starting communities. Apart from local variations in Actinobacteria or Dependientiae which can be linked to spatial heterogeneities, locally related to predation and/or parasitism bursts, the NB1-J group present in Atexcac microbialites at t=0, for example, keeps a significant proportion of the number of reads over time, whereas it is almost entirely absent from Alchichica. Interestingly, it has been suggested that members of the NB1-J group, whose functional capabilities are as yet poorly understood, are involved in, *e.g.*, the degradation of organic matter via metabolic pathways using nitrogen and sometimes in association with algae (Pushpakumara et al., 2023; Voogd et al., 2015). Moreover, the microbial communities composing the biofilms grown on the walls of the mesocosms appeared different from those intrinsically associated with microbialites, with in particular a dominance of Cyanobacteria that had already been observed for Alchichica and Atexcac. In mesocosms A, the colors of the biofilms that formed on the walls and partly on top of the microbialite fragments changed in around six months and the high-throughput sequencing of their 16S rRNA gene amplicons showed a drastic replacement of the original communities by Proteobacteria, with a minor proportion of Cyanobacteria remaining (Fig. A3.4). In

particular, the biofilm of the mesocosm containing the shallow microbialites from 2012 was over 80 % composed of phototrophic Alphaproteobacteria of the order *Rhodobacterales*, which may, for example, explain the observed pink pigmentation (Fig. A3.3; Imhoff et al., 2005). In addition, long-lasting anoxia-exposed microbialites showed a slight increase in Firmicutes members, suggesting a potential role for these heterotrophs in the formation of microbialites at Alchichica, as already observed in lake Las Eras (Spain) where they appeared alkaliphilic and influenced the precipitation of Mg-rich carbonates (Sanz-Montero et al., 2019). Similarly, a common feature of the four mesocosms incubated under anoxia was their non-negligible proportion of reads assigned to the Desulfobacterales potentially linked to an increase in H<sub>2</sub>S-reducing members coupled with an enhanced sulfur cycle of the alkaline environment, such as in Laguna Bacalar, Mexico (Yanez-Montalvo et al., 2020).

(iii) Overall, a stable state may have developed under continuous anoxia, with a relatively higher representation of anoxygenic phototrophic organisms. The general basis of microbial consortia in anoxia-grown microbialites was seemingly carried by Proteobacteria (notably Gammaproteobacteria covering between 20 and 45 % of the total relative abundances), which dominate the prokaryotic fraction of Alchichica and Atexcac microbialites, associated with a group of Desulfobacterales, Acidobacteria, Planctomycetota, Cyanobacteria and Bacteroidota in varying proportions. Following this stabilization of the microbial community structure, the OTUs variability was reduced, approaching the same OTUs diversity as in the core microbialite community found by Iniesto et al. (2021) (Fig. A3.5D).

Overall, considering that metabolic functions can be inferred from taxonomic groups, microbialites thus constitute an ecological niche where microbial structure is adaptable to environmental fluctuations and can be stabilized thanks to a wide diversity of metabolic potentials in the communities. Moreover, these observations support the hypothesis of a microbial adaptation to anoxia through variations of the relative abundance of the community members, sharing a common microbial core with OTUs present both in low and high depths in Alchichica and Atexcac lakes.

***Implications of anoxia-adapted organisms in the carbonatogenesis of deep microbialites from Alchichica and Atexcac***

Among the seven bacterial species cultured from anaerobically growing 40-m-deep Alchichica microbialites, four corresponded to cyanobacteria, including three very closely related to phylotypes already identified in native Alchichica microbialites by past studies (Couradeau et al., 2011). Therefore, despite a major change in environmental conditions including water chemistry and irradiance, but above all a switch to continuous anoxia, these cyanobacteria were able to grow anaerobically, showing that they are facultatively anaerobic organisms. In the case of *Leptolyngbyales*, metabolic versatility between oxygenic and H<sub>2</sub>S-dependent anoxygenic photosynthesis was already hypothesized (Hamilton et al., 2018) based on their presence in Alchichica microbialite samples maintained under continuous anoxia. Here, we enriched the over-represented *Leptolyngbyales* present in mesocosms. In addition, one of the isolates from Alchichica microbialites was phylogenetically close to *Leptolyngbyales* members isolated from microbialites in alkaline and sulfur-rich environment (*Sodaleptolyngbya stromatolitii*, Dziani Dzaha, Mayotte, Cellamare et al., 2018). This suggests a selection of communities in Alchichica microbialites not only based on their ability to live in oxic and anoxia, but also a primary selection by the high alkalinity and relatively high sulfur concentrations in the water column.

The case of *Elainellales* is more complex to interpret since very little information is currently available on this new genus described by Jahodářová et al. (2018). At least, we know that these cyanobacteria can grow under strict anoxic conditions and are phylogenetically very close to other *Leptolyngbyales*. Whether these cyanobacteria perform anoxygenic photosynthesis with H<sub>2</sub>S as electron donor remains difficult to determine. It would also be possible that they are still using H<sub>2</sub>O and, hence, doing oxygenic photosynthesis, but the prevalent anoxic conditions would not allow for O<sub>2</sub> to accumulate and oxidize the atmosphere. However, as the role of Cyanobacteria in carbonatogenesis via alkalization of the environment has been widely emphasized in microbialites in general and in Alchichica microbialites in particular (Couradeau et al., 2012; Saghai et al., 2015; Iniesto et al., 2021), a possibility is that the strains isolated here are also involved in carbonatogenesis in microbialites, and specifically in those found at depth under seasonally anoxic conditions. This would require a better characterization of the carbonatogenic capabilities of the sequenced morphotypes under both oxic and anoxic conditions.

Interestingly, two Alphaproteobacteria species were also enriched in culture. These two isolates have been assigned to the order *Rhizobiales*, phylogenetically very close to *Salinarimonas*. Anoxygenic phototrophs *Salinarimonas* are described as facultatively anaerobic (Liu et al., 2010; Cai et al., 2011). Strikingly, several species phylogenetically very close to the isolates have been described in alkaline and/or saline environments where they can produce biofilms (e.g. the *Beijerinckiaceae* sp. strain comes from tuffs from Greenland and was deposited directly in NCBI by Stougaard, Aarup and Prieme). A hypothesis is that these Alphaproteobacteria may play a role in the formation of microbial mats in the deep biofilms at Alchichica during the stratification period, by alkalinizing the medium through anoxygenic photosynthesis.

The last enriched organism was ascribed to the Acidobacteria, and the nearest neighbors in the phylogenetic tree are unclassified, with a sequence already found in Alchichica ([AF498727.1], Couradeau et al., 2011). It is therefore possible that this organism has not yet been referenced. One of its close neighbors comes from an environment where bacteria are involved in anaerobic ammonium-oxidizing metabolic pathways ([HM769665.1] deposited in NCBI by Sun, Sierra-Alvarez and Field), which could provide a clue to a metabolic interpretation. In any case, this Acidobacteria can grow in continuous anoxia and could participate in the formation of microbialites, for example via photoheterotrophic pathways.

Overall, despite a culture bias of enriched organisms linked to the selected culture media and general physico-chemical conditions differing from their natural environment, the genus of the seven cultured organisms are widespread in the microbialite samples from the mesocosms, as shown by the 16S rDNA metabarcoding analyses (Fig. 3.3). Thus, the isolates obtained from the starting deep microbialites are able to live in an anoxic environment and could participate in the carbonatogenesis of the deep microbialites during periods of lake stratification, notably using anoxygenic photosynthesis.

## **Conclusion**

In the alkaline, monomictic Alchichica and Atexcac lakes (Mexico), the deep water column becomes seasonally anoxic and contains microbialites. High-throughput 16S rRNA gene marker metabarcoding analyses of the microbiomes associated with these deep microbialites have shown that they have prokaryotic community compositions similar as the shallow microbialites developing in the oxic part of the water column. Moreover, through an experimental approach of permanent exposure to anoxia in the laboratory, we have shown that the microbial communities of Alchichica and Atexcac microbialites can adapt over time under anoxic conditions. In particular, anoxygenic phototrophs and anaerobic heterotrophs expand in an early phase, until they reach a state of equilibrium after about four months where Proteobacteria largely dominate in abundance the rest of the community members. Differences in the local abundance of taxa such as the anoxygenic photosynthetic *Chromatiales* or the Cyanobacteria *Leptolyngbyales* reflect probably differences in the composition of the original samples, that grew either at shallow depth under permanent oxic conditions or at depth under seasonal anoxic conditions. In particular, metabolic versatility seems to be favored by deep microbial communities, as suggested by microbial enrichments performed in an anaerobic chamber. Thus, some cyanobacteria seem able to shift from an oxygenic towards an anoxygenic photosynthetic pathway or they continue to do oxygenic photosynthesis but the O<sub>2</sub> is consumed by the reducing environment. The obtained isolates form colonies associated with mineral precipitates. This suggests that these organisms are active in deep, anoxic microbialites, and possibly involved in the carbonatogenesis in anoxic environments. Consequently, this study supports the previously advanced hypothesis of a microbial core involved in the formation of microbialites, containing a shared group of OTUs covering a wide range of metabolic potentials, enabling them not only to live in environments with high alkalinity and variable sulfur concentrations, but also to alternatively adapt to variations in oxygen levels until strict anoxia.

### 3. Données supplémentaires

#### 3.1. Figures et tableaux supplémentaires du texte principal

Les 7 figures et les 2 tableaux supplémentaires du manuscrit sur l'acclimatation des communautés microbiennes des microbialites à l'anoxie sont regroupés en annexes (pages 360 à 369). La partie qui suit porte sur d'autres enrichissements qui ont été faits dans la boîte à gants mais n'ont pas été retenus dans le manuscrit précédent.

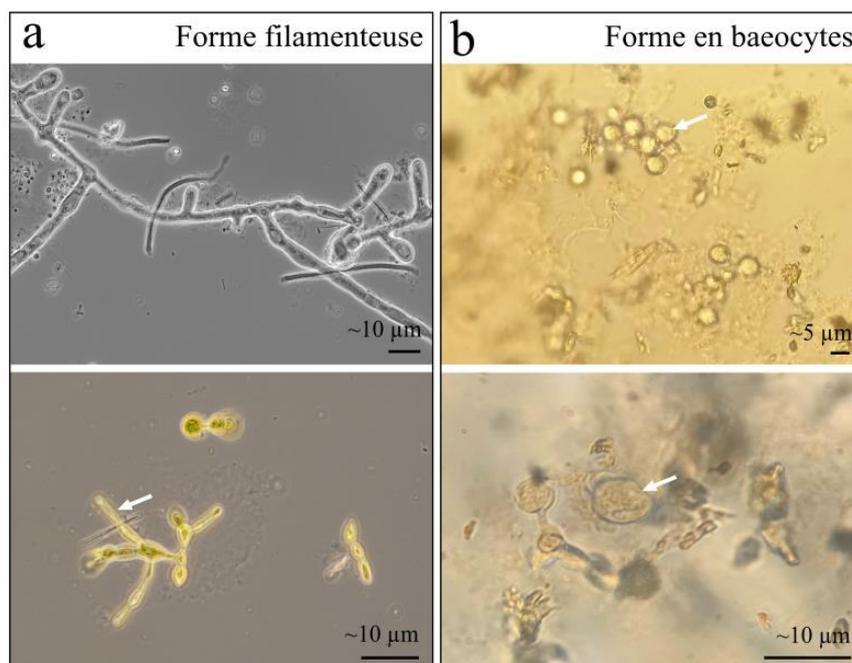
#### *Quatre organismes enrichis en anoxie appartenant à l'ordre des Acinetobacter*

Au cours d'une année environ sur laquelle nous avons voulu isoler des organismes présents dans les tapis microbiens associés aux microbialites de 40 m de profondeur à Alchichica, les croissances de quatre souches que nous n'avons pas citées dans le texte principal ont été observées. Ces colonies se sont formées et ont été repiquées dans des milieux spécifiques aux *Chromatium* et aux *Chloroflexi*. A l'œil nu, elles présentaient une couleur rouge foncé sur les boîtes de Pétri. Les observations au microscope optique ont montré que ces organismes avaient des phénotypes en bacille (Fig. A3.8).

Suite à l'extraction d'ADN de ces isolats et au séquençage des amplicons d'ARNr 16S obtenus par la méthode Sanger (avec les amorces B27 F et 1492 R), nous avons pu replacer les séquences obtenues dans un arbre phylogénétique contenant ses plus proches voisins par blast sur NCBI (Fig. A3.8C). Les organismes correspondant aux quatre isolats ont été assignés à des gammaprotéobactéries du genre *Acinetobacter*. Ces genres étant régulièrement associés à des pathogènes développant des résistances aux antibiotiques dans la littérature, ils ne proviennent probablement pas des tapis microbiens de départ sur lesquels nous voulions effectuer des enrichissements (Perez et al., 2007 ; Peleg et al., 2008 ; Antunes et al., 2014 ; Harding et al., 2018). Cette hypothèse d'une contamination est d'autant plus plausible que la boîte à gants dans laquelle les organismes du tapis microbien de 40 m de profondeur ont été enrichis puis isolés n'est pas un milieu strictement stérile, même s'il peut être maintenu relativement propre à travers la filtration continue de l'air par des filtres à 0.2  $\mu\text{m}$  (mais à un taux de filtration inférieur à celui d'une hotte à flux laminaire). Ces organismes ont donc été attribués à des contaminants potentiels et ont été mis à l'écart des isolats présentés dans le texte principal.

*Perspectives d'enrichissement d'une espèce de Pleurocapsales facultativement anaérobie*

Parmi les organismes enrichis sous anoxie continue pendant environ un an, un isolat repiqué sur du milieu BG11 n'a pas pu être séquencé. A l'œil nu, ces colonies avaient une couleur verte-jaune et sous microscope optique, elles présentaient deux types de cellules différenciées : un type filamenteux et ramifié majoritaire et un type présentant des formes plus rondes pouvant s'apparenter à des baeocytes (Fig. 3.7, Pinevich et al., 2008).



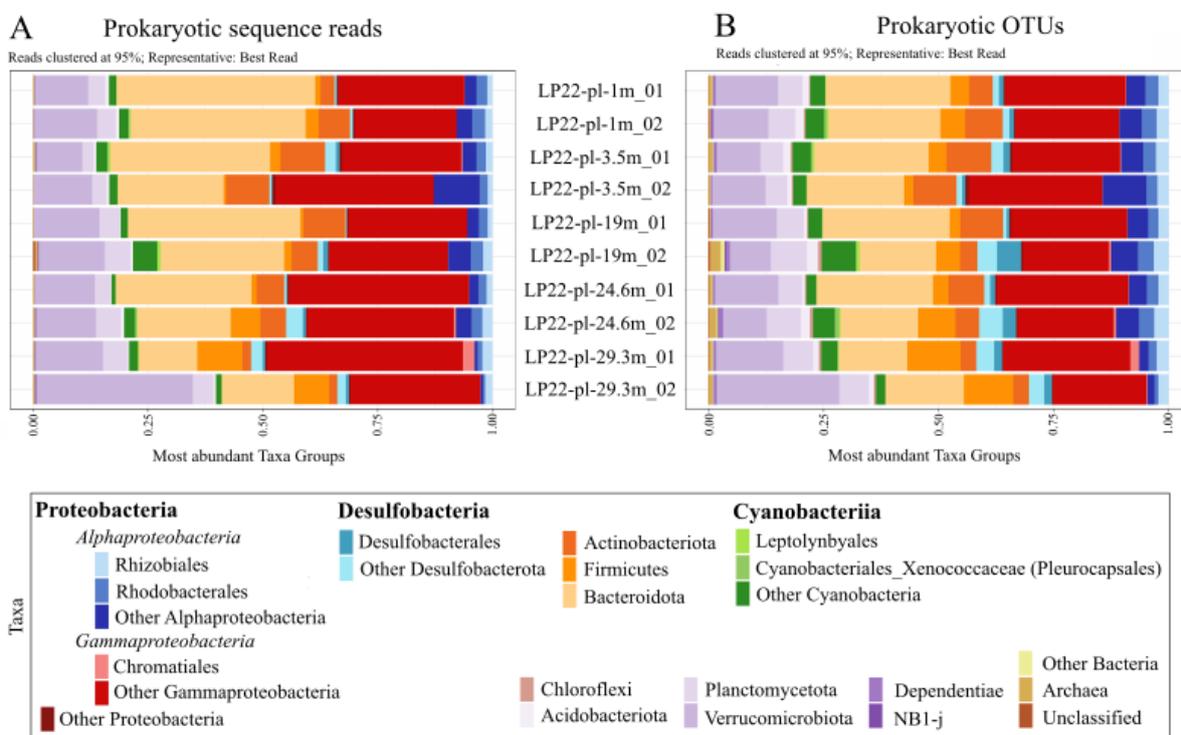
**Figure 3.7.** Comparaison des phénotypes de l'isolat ressemblant à un membre des *Pleurocapsales* obtenu sous anoxie continue. Les échelles n'étaient pas présentes lors de la prise des images et ont été évaluées à partir des échelles des images MEB acquises pour cet organisme. (a) Images en microscopie optique de l'isolat présentant des formes filamenteuses ramifiées (flèche blanche); (b) Images en microscopie optique d'un isolat du même organisme présentant un phénotype plutôt en baeocytes.

Cette différence phénotypique rappelle celle de certaines cyanobactéries de l'ordre des *Pleurocapsales* qui peuvent découpler leurs fonctions métaboliques en étant présentes sous formes de macrocytes (produits d'une fission binaire) ou sous forme de baeocytes (produits d'une fission multiple) (Pinevich et al., 2008 ; LeCampion-Alsumard, 1985), et qui sont a priori plus abondantes en profondeur (Saghāi et al., 2015 ; Couradeau et al., 2011). La résistance à la lyse des cellules des *Pleurocapsales* due à leur capsule épaisse d'EPS pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas pu séquencer cet isolat malgré plusieurs tentatives. Dans ce cas, un protocole approprié serait nécessaire pour obtenir la séquence du gène de l'ARNr 16S de cet organisme (purification de l'ADN, Picopure). En considérant cette similarité phénotypique de l'isolat avec l'ordre des *Pleurocapsales*, il sera intéressant de savoir si cette différenciation

phénotypique des cellules pourrait être corrélée à l'oxygénation du milieu. Une hypothèse serait que, dans le cas d'un tapis microbien, l'enfouissement des cellules vers des couches plus profondes, donc un passage à des conditions d'anoxie, pourrait déclencher un signal aux cellules leur permettant de produire des formes plus motiles comme des baeocytes qui auraient la possibilité de migrer en surface. Pour répondre à cette question, des colonies de cet organisme enrichi ont été inoculées dans deux plaques 96 puits avec différentes dilutions, recouvertes d'un film perméable aux gaz : une laissée dans la boîte à gants sous atmosphère anoxique et l'autre sortie de la boîte à gants et laissée dans les mêmes conditions de lumière et de température, mais dans des conditions oxiques. Quelques observations en microscopie ont été faites au bout deux semaines environ, mais les colonies n'étaient pas assez développées. L'hypothèse d'une différenciation phénotypique en fonction de l'oxygénation du milieu reste ici à l'état d'hypothèse mais méritera d'être testée dans le futur. De plus, la question de quels métabolismes sont utilisés par cette souche se pose, à savoir par exemple si elle utilise la photosynthèse oxygénique (à partir de la molécule d'eau) ou anoxygénique (à partir de soufre par exemple). Un test simple pour savoir si ces organismes font de la photosynthèse oxygénique sera d'ajouter au milieu liquide de la résazurine, un indicateur qui virera au rose en présence d'oxygène. Pour savoir si d'autres donneurs d'électrons sont utilisés tels que le soufre, il faudrait a priori envisager un dosage au cours du temps, ce qui nécessiterait de plus grandes quantités de milieu. De plus, les organismes qui ont été enrichis lors de la mise en anoxie des microbialites de profondeur d'Alchichica mettent longtemps à former des colonies visibles dans ces conditions, ce qui ne permet pas forcément d'en obtenir rapidement et de grandes quantités. Le suivi en oxie/anoxie en milieu liquide de ces souches sur le long terme permettrait de savoir par la suite si les phénotypes changent réellement ou non en fonction de la teneur en oxygène dans leur environnement. De la même manière, une extraction d'ADN appropriée suivie d'un séquençage du gène du 16S de cet isolat pourra confirmer ou non son appartenance à l'ordre des *Pleurocapsales*. Plus généralement, ces expériences d'exposition à long terme en conditions d'oxie ou d'anoxie pourraient également s'imaginer sur les autres organismes enrichis tels que les deux Alphaprotéobactéries. Cela permettrait de savoir dans quelle mesure certains organismes précis qui se sont développés en anoxie et qui sont connus pour leur photoautotrophie anoxygénique comme les *Rhizobiales* s'acclimatent à des conditions oxygénées, ou non.

### 3.2. Perspectives sur d'autres milieux naturels

La fraction planctonique de la colonne d'eau du lac La Preciosa a aussi été échantillonnée pendant la campagne de terrain de 2022 au Mexique. Le lac La Preciosa est un des lacs voisins d'Alchichica et d'Atexcac et contient aussi des microbialites actuelles. Il se trouve à une altitude de 2330 m (19°22'N, 97°23'W), avec un pH environ à 8,8 et est classé comme mésotrophique (Sánchez-Medina et al., 2016). La Preciosa a aussi une colonne d'eau qui se stratifie saisonnièrement, dont la température diminue d'environ 2 °C en profondeur. Globalement, le lac la Preciosa présente donc des caractéristiques similaires en termes de stratification que les lacs Alchichica et Atexcac.



**Figure 3.8.** Prokaryotic community composition in water column of Lake La Preciosa along a depth transect. (A) Histogram of the phylogenetic microbial composition of the planktonic fraction showed by the relative proportions of 16S rRNA gene amplicon sequences. (B) Microbial diversity in the planktonic fraction of the same samples as in A, showed by the relative abundance of OTUs.

Pour ce qui est de la fraction procaryote planctonique du lac, les données de 2022 séquencées par métabarcoding sur le 16S indiquent que, comme pour Alchichica et Atexcac, alors que la diversité des OTUs (dominance de protéobactéries, puis Bacteroidetes et Verrucomicrobiota) est importante et constante le long de la colonne d'eau, la composition de la communauté planctonique (c'est-à-dire ~34 % de protéobactéries, ~28 % de Bacteroidetes et ~12 % de Verrucomicrobiota en moyenne) varie un peu plus (Fig. 3.8). Dans l'ensemble, les

abondances taxonomiques du lac sont largement dominées par les Protéobactéries (40 % environ), par les Bacteroidetes (38 % environ) et par les Verrucomicrobiota dans une moindre mesure (15 % environ). Ces données sont cohérentes avec celles qui avaient été détaillées par Iniesto et al. (2021), malgré une proportion beaucoup plus faible de cyanobactéries dans la colonne d'eau (< 5 %) possiblement expliquée par la date d'échantillonnage en octobre 2022 qui ne correspondait pas à une période d'efflorescence de cyanobactéries. A partir de 24 m de profondeur, les proportions relatives de gammaprotéobactéries et de Firmicutes augmentent. Un seul échantillon (le plus profond) présente une plus forte abondance de *Chromatiales* (~8 %) parmi les gammaprotéobactéries, suggérant l'importance de la photosynthèse anoxygénique à cette profondeur. La répartition des communautés microbiennes planctoniques du lac La Preciosa est donc globalement semblable à celles qui ont été reportées pour les lacs Alchichica et Atexcac à l'échelle des classes/ordres phylogénétiques, à la différence d'une plus faible abondance de *Desulfobacterota* sous l'oxycline (potentiellement en lien avec une plus faible concentration en soufre dans la colonne d'eau).

Malgré des tendances en abondances relatives observables selon le transect en profondeur, il est important de noter l'ampleur des différences (entre ~1 et 10 % des proportions totales de séquences) entre deux échantillons d'eau prélevés au même moment et au même endroit (réplicats présents pour chaque profondeur échantillonnée à La Preciosa).

Dans le futur, il sera intéressant de comparer les compositions microbiennes des microbialites de profondeur. Par exemple, est-ce que les différences de concentrations en soufre plus faibles à La Preciosa (~1,23 +/- 0,06 mM en 2022) influencent la répartition des communautés dans les microbialites ? Est-ce que l'on retrouve également le même groupe commun de communautés microbiennes dans les microbialites plus profondes ? Est-ce qu'en enrichissant les organismes des microbialites de profondeur à La Preciosa et à Atexcac on retrouverait les mêmes organismes que ceux enrichis d'Alchichica ?

Ces questions restent ouvertes et permettront de renforcer ou non les hypothèses faites sur l'acclimatation des procaryotes de la colonne d'eau et des tapis microbiens associés aux microbialites d'Alchichica et d'Atexcac.

### *3.3. Perspectives sur des suivis biogéochimiques en laboratoire*

L'acclimatation et l'adaptation à l'anoxie des communautés microbiennes associées aux microbialites a été testée en laboratoire dans cette thèse. Toutefois, les conditions physico-chimiques des mésocosmes se sont a priori éloignées de celles des colonnes d'eau d'Alchichica et d'Atexcac. Des suivis géochimiques à chaque temps de prélèvement auraient été utiles pour comparer l'évolution des abondances relatives taxonomiques. Néanmoins, des mesures des concentrations en cations majeurs et en éléments traces ont été faites sur les mésocosmes A (Alchichica, 15 m, 2012 et Alchichica, 40 m, 2019) après un an. Les concentrations en calcium et en magnésium ont très légèrement diminué par rapport à la composition de la colonne d'eau du lac (respectivement à 0,18 mM pour 0,22 mM en moyenne dans la colonne d'eau et 18 mM pour 18,4 mM en moyenne dans la colonne d'eau). En revanche, les concentrations en soufre total dissous sont nettement moins élevées que dans la colonne d'eau avec une moyenne de 0,08 mM des mésocosmes pour environ 11 mM dans la colonne d'eau d'Alchichica et 3 mM dans la colonne d'eau d'Atexcac. Les concentrations en DIC n'ont pas été mesurées pour les mésocosmes, ce qui manque également pour estimer l'évolution de l'état de saturation de la solution vis-à-vis des carbonates au cours du temps. Dans l'ensemble, pour les cations majeurs, la chimie des mésocosmes au bout d'un an commence à se stabiliser avec la chimie de la solution qui est ajoutée au fur et à mesure (pour compenser l'effet de l'évaporation dans les mésocosmes à l'intérieur de la boîte à gants), mais l'effet des communautés microbiennes sur la géochimie générale de ces systèmes fermés est resté peu défini. Tous les paramètres qui influencent la disponibilité des espèces chimiques en solution n'ont donc pas été contrôlés. Même si dans le cas de notre expérience la condition d'anoxie continue était le paramètre majeur à contraindre pour évaluer l'acclimatation des communautés microbiennes, d'autres perspectives pour ce type d'expérience sont de mieux contrôler tous les autres paramètres qui pourraient avoir un rôle dans les diversités phylogénétiques et fonctionnelles des communautés microbiennes. Ces paramètres comprennent l'hydrochimie mais aussi, par exemple, la lumière.

## **4. Conclusions et perspectives**

Dans ce chapitre, nous avons cherché à évaluer l'acclimatation/adaptation à l'anoxie de communautés microbiennes associées à des microbialites vivantes provenant de milieux oxygènes et anoxiques au moment de l'échantillonnage. Pour cela, trois approches ont été utilisées : (i) observer l'évolution des communautés microbiennes dans l'environnement naturel selon un transect en profondeur par du métabarcoding du gène de l'ARNr 16S, (ii) évaluer l'acclimatation des communautés microbiennes au cours d'environ un an et demi en laboratoire sous des conditions d'anoxie continue par métabarcoding également et (iii) enrichir des organismes provenant des tapis microbiens associés aux microbialites de profondeur acclimatées à l'anoxie saisonnière et les identifier par séquençage Sanger de leur gène d'ARNr 16S. Les compositions des communautés microbiennes naturelles ont été évaluées pour les communautés associées aux microbialites et à la colonne d'eau, ce qui a permis de faire un suivi dans la continuité des travaux qui avaient déjà été faits sur les diversités planctoniques et benthiques des microbialites (Iniesto et al., 2021 ; Couradeau et al., 2011 ; Saghaï et al., 2015).

Globalement, ces analyses ont montré des variations relativement faibles de la diversité d'OTUs procaryotes (c'est-à-dire quels OTUs sont recensés) entre des microbialites de milieux oxygènes et des microbialites de milieux saisonnièrement anoxiques. En revanche, la composition des communautés, c'est-à-dire la diversité et l'abondance relative des membres des différentes lignées phylogénétiques, varie en fonction de leur exposition à l'anoxie, malgré une large dominance des gammaprotéobactéries dans tous les échantillons. Dans l'ensemble, les proportions de photoautotrophes oxygéniques, *i.e.* des cyanobactéries, diminuent légèrement dans des conditions d'anoxie, au profit de photoautotrophes anoxygéniques comme certaines gammaprotéobactéries et de communautés hétérotrophes anaérobies. De plus, lors d'une exposition continue à l'anoxie en laboratoire, les microbialites d'Alchichica et d'Atexcac conservent eux aussi la même diversité microbienne que les échantillons naturels, diversité qui contient a priori une gamme suffisante de potentiels métaboliques pour s'acclimater à des conditions d'anoxie permanente. Les changements d'oxygénation du milieu (entre autres) ont donc vraisemblablement été accommodés dans les microbialites via une association dynamique de communautés microbiennes dans les tapis microbiens, capables d'attendre (potentiellement en dormance ou simplement en changeant leur métabolisme) l'arrivée de nouvelles conditions oxygènes. Un état stable dominé par les gammaprotéobactéries s'atteint grâce à la prolifération où le déclin de certains groupes de microorganismes. En considérant que l'on peut inférer des

fonctions métaboliques à des groupes taxonomiques, les microorganismes en anoxie ont *a priori* été sélectionnés en fonction de leurs capacités métaboliques telles que les voies de fixation du carbone en conditions anaérobies. Ce travail soutient donc l'hypothèse précédemment avancée d'un noyau microbien partagé par les microbialites des lacs mexicains de la TMVB (Iniesto et al., 2021), contenant un groupe de départ de communautés microbiennes pouvant alternativement s'adapter aux variations des niveaux d'oxygène. En particulier, les communautés microbiennes des microbialites profondes semblent favoriser des métabolismes versatiles, comme le suggèrent la culture et l'isolement de cyanobactéries réalisés en anoxie. Certaines cyanobactéries habituellement phototrophes oxygéniques peuvent s'orienter vers des voies photosynthétiques anoxygéniques. Elles font alternativement de la photosynthèse oxygénique (sans toutefois pouvoir respirer aérobiquement la nuit, et en développant des voies d'obtention d'énergie alternatives telles que la fermentation) mais l'oxygène est éliminé dans les conditions réductrices environnantes. Les isolats obtenus suggèrent que ces organismes sont actifs dans les microbialites profondes, et donc potentiellement impliqués dans la carbonatogenèse dans les environnements anoxiques. Dans l'ensemble, l'étude montre que les microbiomes des microbialites couvrent une large gamme de potentiels métaboliques, ce qui permet aux communautés microbiennes non seulement de vivre dans des environnements présentant une alcalinité élevée et des concentrations variables en soufre, mais aussi de s'accommoder d'une absence continue ou temporaire d'oxygène dans l'environnement.

Dans ce chapitre, l'adaptation des communautés microbiennes aux changements environnementaux a été testée sur l'anoxie, et évaluée en utilisant une technique de séquençage à large échelle ciblant les procaryotes. Toutefois, les eucaryotes peuvent aussi participer à la formation des microbialites, donc contribuer à la composition du microbiome global et modifier leur écosystème local. Des évaluations de la diversité taxonomique eucaryote ont déjà été menées sur les microbialites d'Alchichica et d'Atexcac et ont montré une proportion dominante d'organismes photosynthétiques à hauteur d'environ 80 % de la diversité eucaryotique, notamment des algues vertes et, parfois, des diatomées (Saghai et al., 2015 ; Iniesto et al., 2021). Cependant les procaryotes dominent les communautés, comme le montrent des études métagénomiques (Saghai et al., 2015). Le même type d'expérience pourrait être envisagé sur les communautés eucaryotes des microbialites exposées à l'anoxie continue, possiblement sur les mêmes ADNs. Ici, il a été vu que les abondances relatives des communautés microbiennes varient en fonction de leurs potentiels métaboliques suite à une exposition temporaire ou continue à l'anoxie. Pour autant, il est difficile d'obtenir une distribution précise des

métabolismes utilisés au sein d'un tapis microbien de microbialite dans ces conditions. D'autres méthodes existent pour caractériser les communautés microbiennes et leurs potentiels métaboliques, comme la métagénomique. L'utilisation de ce type de séquençage pourrait permettre dans le futur d'évaluer de manière plus locale et précise les transitions métaboliques qui ont lieu au cours du temps dans le tapis microbien associé aux microbialites sous anoxie continue. La métatranscriptomique pourrait également donner ce type de données en informant sur les gènes exprimés à un moment donné dans les communautés microbiennes, malgré des interprétations plus complexes, et même si en général chez les procaryotes les métabolismes utilisés peuvent être relativement bien corrélés aux séquences des gènes séquencés par métagénomique.

Par ailleurs, les concentrations en soufre du lac Alchichica sont élevées, ce qui a vraisemblablement une influence sur la sélection des communautés microbiennes de la colonne d'eau et des tapis microbiens associés aux microbialites. Dans le futur, les influences de cette condition en particulier sur les microbialites pourraient être intéressantes à tester, par exemple en comparant les communautés microbiennes des microbialites à Alchichica et à Atexcac exposées à différentes concentrations en soufre dissous. Dans le but d'évaluer qui sont les procaryotes actifs dans les tapis microbiens des microbialites de milieux anoxiques, les enrichissements d'organismes provenant de ces milieux permettent de donner accès à leur taxonomie. Pour autant, dans le cas des expériences sur un an et demi environ qui ont été faites sur les microbialites en boîte à gants, certains biais ont influencé les résultats obtenus. Notamment, l'utilisation au départ de milieux de culture spécifiques à certains ordres/classes de phototrophes anoxygéniques comme les cyanobactéries, les *Chromatiales* ou les *Chlorobi* sélectionne les communautés qui se développent et peut aussi influencer les conclusions sur l'utilisation de la photosynthèse anoxygénique dans ce type de systèmes. De nombreux hétérotrophes participent également à la mise en place de la structure microbienne des microbialites via des métabolismes phototrophes ou chimiotrophes. Des voies métaboliques comme la sulfato-réduction, l'oxydation des sulfures, la méthanotrophie, etc, pourraient également être défavorisées dans ce type de milieux, ou au contraire fortement favorisées. Par conséquent, il serait intéressant pour notre cas de tester d'autres types de milieux nutritifs ciblant d'autres organismes/métabolismes. Par exemple, le fer ferreux peut constituer une source d'électrons importante pour certains organismes lors de la photosynthèse anoxygénique, voire leur seul donneur d'électron. Bien que le fer soit sous formes de traces dans les lacs Alchichica et Atexcac, il est possible que certains organismes l'utilisent dans la zone profonde

des lacs pendant la période de stratification. Des milieux comme ceux utilisés par Ehrenreich et Widdel (1994) riches en FeS ou en FeCO<sub>3</sub> qui ciblent ces organismes auraient pu compléter nos enrichissements, ou alors des milieux apportant des sulfures en tant que donneurs d'électrons. De nombreux autres donneurs d'électrons primaires sont susceptibles d'être utilisés dans les environnements anoxiques comme H<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, S<sub>0</sub>, Fe<sup>2+</sup>, CH<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, CH<sub>2</sub>O, lors de voies métaboliques anaérobies telles que les photosynthèses anoxygéniques, la réduction des sulfures, la réduction du fer via H<sub>2</sub>, l'acétogenèse, la disproportionation du soufre, l'oxydation anaérobie du méthane, de l'ammonium, etc (Canfield et al., 2006). Dans l'autre sens, des accepteurs d'électrons primaires tels que CO<sub>2</sub>, CO, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, S<sub>0</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et NO<sub>2</sub><sup>-</sup> peuvent aussi être utilisés en anaérobioses lors de la méthanogenèse, les photosynthèses anoxygéniques, la réduction des sulfates et des sulfures, la dénitrification, la réduction des nitrates, etc (Canfield et al., 2006). Plus spécifiquement par rapport aux phototrophes anoxygéniques, on pourrait aussi imaginer inoculer des biofilms de microbialites provenant des zones saisonnièrement anoxiques d'Alchichica et Atexcac sur des milieux plus spécifiques d'Alphaprotéobactéries comme les *Rhizobiales*, de Firmicutes (*Heliobacterales*), Chloroflexi, *Gemmatimonadetes*, ou Acidobactéries (*Chloracidobacterium*). De plus, malgré des milieux ciblant spécifiquement certains organismes, il est possible que d'autres s'y développent à la place. Dans le cas des milieux spécifiques aux *Chromatiales* que nous avons utilisés, par exemple, ce sont des Alphaprotéobactéries de l'ordre des *Rhizobiales* qui s'y sont développées. Il y a donc probablement une part qui n'a pas été contrôlée dans la croissance des différentes souches que nous avons enrichies. De plus, malgré cela, nous ne pouvons pas être totalement sûrs des métabolismes utilisés par ces organismes, ce qui nécessiterait d'autres types d'analyses encore. Dans le cas des quatre souches de cyanobactéries qui ont été enrichies, nous ne savons particulièrement pas quels sont les donneurs d'électrons utilisés dans leurs photosynthèses anoxygéniques.). De plus, de manière intéressante dans le cas des microbialites d'Alchichica et Atexcac incubées sous anoxie continue, ce sont des cyanobactéries qui ont été le plus enrichies. Potentiellement, ces cyanobactéries sont susceptibles de faire des transitions entre une photosynthèse oxygénique et une photosynthèse anoxygénique. Peut-être qu'en faisant des enrichissements sous anoxie continue sur ce type de système, de nouvelles souches de Cyanobactéries versatiles vis-à-vis de la photosynthèse pourraient être découvertes.

De plus, dans le cas des communautés microbiennes qui ont été séquencées ici, les échantillonnages ont toujours eu lieu le jour. Même si en profondeur ces cycles sont probablement atténués en termes d'intensités lumineuses, on pourrait s'attendre à ce que la

composition des communautés microbiennes soit la même de jour comme de nuit mais avec une variation de l'expression des gènes. Dans ce cas, des analyses en métatranscriptomique pourraient être adaptées, voir en métaprotéomique pour avoir accès aux protéines synthétisées.

Enfin, de manière intéressante, il a été proposé que des Firmicutes associés aux microbialites d'un lac alcalin (Las Eras, Espagne) puissent jouer un rôle dans la précipitation de carbonates riches en magnésium tels que l'hydromagnésite ou la huntite (Sanz-Montero et al., 2019). Une perspective pourrait être d'estimer plus précisément l'influence de certains organismes/métabolismes sur la formation des phases minérales de manière générale dans les microbialites d'Alchichica et d'Atexcac (par exemple avec des suivis MEB/MET) et en particulier les impacts de la classe des Firmicutes sur la formation des carbonates de magnésium, à plus forte raison en ayant observé que les abondances relatives des Firmicutes dans les microbialites augmentent légèrement avec la profondeur pendant la période de stratification des lacs et sous anoxie continue. En parallèle, la présence de huntite, un carbonate de calcium et de magnésium, a été montrée uniquement en profondeur dans les microbialites du lac Alchichica. Il est possible, de manière très spéculative, de faire l'hypothèse d'une corrélation entre la présence croissante avec la profondeur de certains groupes d'organismes comme les Firmicutes dans les microbialites et la présence en profondeur de la huntite. De plus, les cas des microbialites profondes d'Alchichica et d'Atexcac sont non seulement des structures géobiologiques intéressantes du point de vue de l'enregistrement de l'anoxie, entre autres, mais aussi parce qu'elles se forment dans des environnements où l'accès à la lumière pour les organismes est faible. Les conditions de luminosité n'ont pas été testées sur ces échantillons en particulier, mais on peut se demander dans quelle mesure ces conditions ont affecté les communautés microbiennes, quelle que soit l'oxygénation du milieu. Il est possible que leur distribution soit sous-évaluée puisqu'elles sont plus difficiles à échantillonner, ce qui soulève la possibilité d'en chercher dans des lacs déjà connus pour abriter des microbialites actuelles. Par exemple, un critère pour essayer de trouver ce type de microbialites profondes pourrait être la transparence de l'eau, donc plutôt des milieux oligo à méso-oligotrophiques. Par ailleurs, le cœur de communautés microbiennes communs aux microbialites de la TMVB et participant potentiellement à leur formation (Iniesto et al., 2021), constitue une information clairement intéressante à rechercher dans d'autres microbialites actuelles dans le futur, afin d'évaluer si les potentiels métaboliques de départ sont similaires ou non, et ce même dans des environnements chimiquement différents.



**Chapitre IV. Modifications  
diagénétiques des microbialites  
d'Alchichica et d'Atexcac**

## **1. Introduction**

Les microbialites enregistrent les conditions physico-chimiques et biologiques de leur environnement de formation dans les compositions minéralogiques/l'arrangement spatial de leurs phases minérales et dans l'abondance/la nature des communautés microbiennes de leurs biofilms. Des mécanismes biologiques/chimiques peuvent modifier les espèces chimiques présentes dans le milieu juste avant leur enregistrement dans les microbialites : par exemple, il est très probable que les espèces du soufre en solution soient modifiées dans les biofilms des microbialites avant que ceux-ci ne soient encroûtés. Par conséquent, le lien entre les paramètres physico-chimiques et biologiques de la solution de formation et les enregistrements physico-chimiques et biologiques des microbialites à un temps zéro sont complexes et pas forcément directs. Ajoutés à cela, l'enfouissement des microbialites et l'induration des sédiments notamment sont susceptibles de modifier leurs structures organo-minérales. Ces modifications sont regroupées sous le terme de diagenèse, qui englobe tous les processus post-dépôts ayant un impact sur les propriétés chimiques, mécaniques et pétrophysiques des sédiments, ainsi que sur leurs fabriques initiales, leurs assemblages biologiques et leurs enregistrements géochimiques/géochronologiques (Bathurst, 1970). Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la distribution spatiale et la nature des phases minérales en lien avec la diagenèse dans les microbialites du lac Alchichica. Lorsque ces processus interviennent dès le dépôt des sédiments, ils sont regroupés sous le terme de diagenèse précoce. De manière générale, la diagenèse précoce affecte les sédiments des milieux marins et non-marins, via la modification de signatures isotopiques du carbone, de l'oxygène, du magnésium, du calcium entre autres, ou encore via la perte d'indicateurs paléo-rédox comme les anomalies du cérium (Tostevin, 2021). Les mécanismes de la diagenèse sont variés mais globalement les modifications d'une phase primaire en une phase secondaire sont liés par exemple à de la micritisation, du néomorphisme, de la cimentation, de la dissolution, de l'altération mécanique, etc (Martín-García et al., 2009 ; de Boever et al., 2017). La distribution et le degré de l'altération liée à ces processus dépendent notamment de la réactivité des phases minérales initiales analysées dans leurs contextes géochimique et biologique (de Boever et al., 2017).

Dans les microbialites, la diagenèse a été relativement peu documentée. Pourtant, au même titre que les autres dépôts sédimentaires, les microbialites actuelles et fossiles y sont soumises, donc les phases minérales peuvent être transformées, et leurs signatures minéralogiques, biologiques, isotopiques, perdues/modifiées au cours du temps. Ces altérations

post-dépôts sont relativement peu détaillées dans le cas des microbialites actuelles, même si des mécanismes généraux incluant la dolomitisation, la carbonatation ou la silicification ont été rapportés (Planavsky et Ginsburg, 2009 ; Koeshidayatullah et al., 2015 ; Buongiorno et al., 2019 ; Bosence et al., 2015, entre autres). Par exemple, des microbialites actuelles du lac Clifton, en Australie, présentent un encroûtement primaire des cellules par de la stévensite  $((Ca,Na)_xMg_{3-x}(Si_4O_{10})(OH)_2.nH_2O)$  qui préserve bien leurs formes, suivi par un remplacement quasi-total de cette matrice par de l'aragonite (Burne et al., 2014). En l'occurrence, comme la minéralisation aragonitique efface les traces morphologiques primaires biogéniques dans le cas de ces microbialites, les auteurs ont proposé ce mécanisme comme une piste pour expliquer le manque de preuves de biogénicité dans les microbialites carbonatées fossiles (Burne et al., 2014). D'autres microbialites d'environnements modernes subissent une étape de carbonatation qui pourrait être attribuée à une phase précoce de diagenèse. C'est le cas de microbialites actuelles du lac Mono, en Californie, qui présentent une carbonatation diagénétique des biofilms préalablement stabilisés par des silicates de magnésium, mais où cette fois les vestiges des structures biologiques ne sont que partiellement effacées (Souza-Egipsy et al., 2005). Cette séquence a été retrouvée également dans des tapis microbiens minéralisant actuels du Grand Lac Salé aux Etats-Unis, où une étape supplémentaire permettant le remplacement partiel de l'aragonite par de la dolomite a été observée (Pace et al., 2016). A l'inverse, dans le lac Van (Turquie), des biofilms associés à des microbialites actuelles favorisent la précipitation primaire d'aragonite dont les grains sont remplacés rapidement par des silicates authigènes de magnésium-aluminium-fer, interprétés comme le résultat d'une diagenèse précoce (Kremer et al., 2019). Par ailleurs, d'autres cas de diagenèse précoce à tardive ont été documentés dans des microbialites fossiles (souvent dans un cadre industriel pour approximer la qualité du réservoir) mais les étapes de leur mise en place restent floues et ne permettent pas d'estimer précisément dans quelle mesure les signatures primaires ont été conservées/modifiées/effacées (Tan et al., 2018 ; Tang et al., 2022).

Les conséquences de la diagenèse, précoce ou tardive, peuvent donc être majeures après l'encroûtement des biofilms et dans les phases minérales, et sont vraisemblablement des sources de biais dans les interprétations des enregistrements géologiques passés tels que des stromatolites fossiles. Pour mieux comprendre ce que disent vraiment les microbialites, il est nécessaire, en conséquence, de chercher à distinguer les signatures primaires des signatures issues de modifications ultérieures et d'évaluer les différents mécanismes de diagenèse ayant eu lieu dans les microbialites, Dans ce but, nous nous sommes intéressés à la nature et à

l'arrangement spatial des différents carbonates dans les microbialites actuelles d'Alchichica, en comparant de nouveau des microbialites récoltées en surface avec des microbialites récoltées en profondeur. Nous avons mis en évidence la formation massive de huntite, un carbonate double de magnésium et de calcium, dans les microbialites de profondeur. Nous l'avons interprétée comme le résultat d'une diagenèse précoce poussée en profondeur, à l'aide d'analyses par diffraction des rayons X (DRX), spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), microscopies optique, confocale à balayages laser (CLSM), électronique à balayage (SEM) et électronique en transmission (TEM) et de cartographie en fluorescence des rayons X (XRF). Le manuscrit qui a été écrit sur cette partie sera probablement soumis à ACS ou Chemical Geology.

## 2. Manuscrit de l'article, texte principal

### **Huntite [CaMg<sub>3</sub>(CO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>], a rare carbonate phase formed during early diagenesis in modern microbialites**

Jeanne Caumartin<sup>1</sup>, Karim Benzerara<sup>1</sup>, Robin Havas<sup>2</sup>, Christophe Thomazo<sup>2,3</sup>, Laurane Fogret<sup>1</sup>, Vladimir Betancourt<sup>4</sup>, Rosaluz Tavera<sup>4</sup>, Béatrice Doisneau<sup>1</sup>, Didier Jézéquel<sup>5</sup>, Purificación López-García<sup>6</sup>

<sup>1</sup>*Sorbonne Université, Museum National d'Histoire Naturelle, UMR CNRS 7590, Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC), 75005 Paris, France*

<sup>2</sup>*Université de Bourgogne, Biogéosciences, UMR CNRS EPHE 6282, Dijon, France*

<sup>3</sup>*Institut Universitaire de France, Paris, France*

<sup>4</sup>*Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Universidad Nacional Autónoma de México, DF Mexico, Mexico*

<sup>5</sup>*IPGP, CNRS UMR 7154, Université de Paris & UMR CARRTEL, INRAE-USMB, France*

<sup>6</sup>*Unité d'Ecologie Systématique et Evolution, CNRS, Université Paris-Saclay, AgroParisTech, Gif-sur-Yvette, France*

#### **Abstract**

Microbialites are sedimentary rocks formed under the influence of microbial communities and hence, particularly suited to look for traces of life and reconstruct paleoenvironments. However, mineral phases composing them and the signals they carry do not always reflect primary conditions but may result from secondary alteration during, *e.g.*, early diagenesis. Therefore, it is crucial to distinguish between primary and diagenetic phases and assess how primary signals are affected by diagenesis in microbialites. Here, we analyzed early diagenetic transformations in shallow to deep modern microbialites formed in the seasonally stratified lake Alchichica, Mexico. For this purpose, we combined bulk analyses such as X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), with spatially resolved techniques, including petrographic microscopy, confocal laser scanning microscopy (CLSM), X-ray fluorescence mapping (XRF), scanning electron microscopy

(SEM), focused ion beam (FIB) milling and transmission electron microscopy (TEM). We showed the massive diagenetic formation of huntite ( $\text{CaMg}_3(\text{CO}_3)_4$ ), a rare carbonate, in microbialites developing only at depths  $\geq 20$  m in the seasonally stratified water column of Lake Alchichica, Mexico. Huntite replaced aragonite ( $\text{CaCO}_3$ ) and hydromagnesite ( $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), the main primary phases forming Alchichica microbialites. Bulk isotope composition measurements of carbon and oxygen in carbonate phases supported an early diagenetic origin of huntite. We propose that specific conditions restricted to the pore water physicochemistry within the deep microbialites control the destabilization of the primary carbonates and the precipitation of huntite. Moreover, the loss of luminescence in deep microbialites in comparison with shallow microbialites suggests that some signals contained in the primary mineral phases are at least partially erased by the early diagenetic formation of huntite, potentially affecting the preservation of mineralogical and biological signatures of microbialites over time.

## Keywords

Microbialites; early diagenesis; huntite; aragonite; hydromagnesite; luminescence; FIB

## Introduction

Carbonate phases comprise a significant part of terrestrial and marine sediments (Deocampo, 2010; Capezzuoli et al., 2014). They may be derived from bioclast accumulation or precipitate through biologically or purely physico-chemical processes (Scoffin, 1986). Solution saturation states, pH and temperature are key geochemical parameters controlling the formation of authigenic carbonates (Given and Wilkinson, 1985). Moreover, some microorganisms can impact the local solution chemistry (*e.g.*, by alkalization of water through photosynthesis) and/or the energetics of nucleation, or even control carbonate formation intracellularly (Görge et al., 2020). This results in biologically induced, influenced or controlled mineralization, respectively. Thus, the diversity of carbonates in terms of their formation environments and mechanisms, and their preservation over geological time make them prime targets to mine for proxies allowing to reconstruct paleoenvironmental conditions (Johnson et al., 2013; Frisia et al., 2014; Saenger et al., 2014). Specifically, microbially-formed carbonates can preserve traces of their biogenic origin in the form of encrusted fossil cells (Couradeau et al., 2013), stable isotopes ratios and/or nanometer-scale assemblages of organic polymers (*e.g.*, extracellular polymeric substances or EPS) with carbonate crystals (Benzerara

et al., 2006). In addition, they provide paleoclimatic and paleoenvironmental information acquired through the isotopic fractionation of diverse elements (Andrews et al., 1997). In this context, microbialite carbonates have received particular interest for the search of paleobiogeochemical signatures and/or as archives of paleoenvironmental parameters (Chagas et al., 2016). Microbialites are organo-sedimentary deposits formed by benthic microbial communities (Burne and Moore, 1987). They form via trapping/binding of detrital particles by biofilms and/or via biologically influenced/induced carbonate mineralization (Burne and Moore, 1987). They occur abundantly in the fossil record back to 3.43 Ga, existing in a wide range of forms and formation environments, and some are still forming today (Allwood et al., 2007; Bosak et al., 2013, White et al., 2020; Caumartin et al., 2023).

Similarly to other carbonates, the primary features of microbialite carbonates can be altered over time. Diagenesis refers to all post-depositional processes impacting the chemical, mechanical and petrophysical properties of sediments, as well as their initial fabric, biological assemblages, geochemical and geochronological signatures (Bathurst, 1970). For example, some primary isotopic signatures together with some paleo-redox proxies such as cerium anomalies are likely to be lost during diagenesis (Hood et al., 2018; Lau and Hardisty, 2022; Tostevin, 2021). The extent/degree of transformation depends on the initial phase reactivity as well as the physico-chemical conditions of the environment (de Boever et al., 2017; Ahm et al., 2018). Therefore, deciphering the different degrees of primary diagenetic alteration of primary carbonates within their respective sedimentary context seems essential for the proper interpretation of their formation conditions. For example, diagenetic alterations of carbonates in marine sediments are relatively detailed (Tucker and Bathurst, 2009; Godet et al., 2016). Diagenesis also plays a clear role in the arrangement and nature of carbonate assemblages in non-marine sediments (de Boever et al., 2017; Armenteros, 2010). Diagenesis can start immediately after sediment deposition and is then referred to as early diagenesis (Bathurst, 1983). For instance, we recently evidenced early diagenesis transformations occurring in the first centimeters of the sediments deposited at the bottom of Lake Alchichica, Mexico (Muller et al., 2023). These transformations resulted in the replacement of amorphous silica from decaying diatoms and hydromagnesite, a Mg-carbonate phase ( $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), by stevensite, a hydrated Mg-silicate phase. Interestingly, this lake contains also actively growing microbialites (Iniesto et al., 2021). However, the potential occurrence of similar transformations in microbialites, and in particular early diagenetic carbonate transformations, has been more rarely investigated (Zeyen et al., 2021).

Here, we looked for evidence of early diagenesis in modern microbialites in the alkaline Lake Alchichica, Mexico. The mineralogical composition of shallow microbialites in this lake has been thoroughly analyzed before (Zeyen et al., 2017; Kaźmierczak et al., 2011; Zeyen et al., 2019). These microbialites are primarily composed of hydromagnesite, aragonite ( $\text{CaCO}_3$ ) and to a lesser extent pyroaurite ( $\text{Mg(II)}_6\text{Fe(III)}_2(\text{CO}_3)(\text{OH})_{16}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) and/or iowaite ( $\text{Mg(II)}_6\text{Fe(III)}_2\text{Cl}_2(\text{OH})_{16}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), two Fe-Mg layered double hydroxide phases. The primary formation of hydromagnesite has been explained by the high dissolved Mg/Ca ratio of Lake Alchichica (Zeyen et al., 2021), while the formation of aragonite may involve specific lineages of cyanobacteria, notably the Pleurocapsales or Chroococcales (Gerard et al., 2013; Couradeau et al., 2013; Saghāi et al., 2015). In the present work, we report the existence of microbialites down to 40 meters in the lake and showing signs of early diagenesis that we further characterize to understand the involved mechanisms and assess the extent to which it alters the biogeochemical markers in these objects.

## Material and methods

### *Description of the lake and geological context*

Lake Alchichica (19°24'49.45''N et 97°24'11.25''W) is an endorheic crater lake at an altitude of 2,326 m. It is located in the Trans-Mexican volcanic belt (TMVB), a Neogene-Eocene continental volcanic arc in the Serdán-Oriental Basin of central Mexico (Ferrari et al., 2012; Zeyen et al., 2021; Chako-Tchamabé et al., 2020). Lake Alchichica has the highest alkalinity/salinity among a series of Mexican lakes (including Atexcac, Quechulac, La Preciosa, Aljojuca, and Tecuitlapa) that formed by phreato-magmatic eruptions and spread along an alkalinity/salinity gradient (Zeyen et al., 2017). Alchichica is a monomictic lake, seasonally stratified with one mixing event per year, during winter. Its water column becomes anoxic below 30-36 m usually from April to October (Alcocer 2000; Alcocer et al., 2022). It is an oligotrophic alkaline saline lake with a high concentration of dissolved magnesium (17.5 mM), mainly fed by groundwater inflows (Zeyen et al., 2019). The lake chemistry has been analyzed since at least 1941 and shows a slight increase in salinity over time, linked to the gradual drying of the lake (Alcocer et al., 2022). Furthermore, Lake Alchichica is particularly well known for the modern microbialites forming a reef along its shore (*e.g.*, Kaźmierczak et al. 2011; Centeno et al. 2012; Valdespino-Castillo et al. 2018).

### *Rocks and water samples*

#### *Collection of microbialites samples ranging from 0 to 40 meters in depth*

Alchichica microbialites were sampled during field campaigns conducted in May 2019 and October 2022 on the western and northern areas of the lake. Microbialites fragments were sampled from four different depths in 2019 (5, 10, 20 and 40 m) and from five depths in 2022 (3, 10, 20, 30 and 40 m) (Table A4.1, Annexes). The microbialites were collected by divers. The water column of Lake Alchichica was anoxic (*i.e.*, dissolved dioxygen below detection limit) at depths below 20 m in 2019, and below 36 m in 2022. We assume that all analyzed microbialites were active at the time of sampling because the associated microbial communities were brightly pigmented and the pigments changed as a function of depth, with microbialites thriving in anoxic layers being purple-greenish and those in more surficial waters, greener. Likewise, cells from the surface of microbialites under the optical microscope were active and did not show signs of decay. Bulk chemical analyses of three shallow samples collected during

the field campaign in January 2012 (Zeyen et al., 2019) were compared with those of May 2019 and October 2022 to assess trends in mineralogical composition over a larger data set/period.

### *Water samples*

Samples of the water column were collected in May 2019 and October 2022, using a Niskin bottle, from a boat anchored close to the center of the lake (Table A4.2, Annexes). Depth of collection was evaluated based on labels added to the rope every meter starting from the Niskin bottle and using the depth gauge of a dive watch attached to the bottle. Overall, a total of 22 samples were collected at different depths between 0 and 55 m between 2019 and 2022 (Table S2). In parallel, measurements of temperature, pH, O<sub>2</sub> and conductivity depth profiles were carried out *in situ* using an YSI Exo2 multiparameter probe with precisions for these measurements of 0.01 °C, 0.1 pH unit, 0.1 mg.L<sup>-1</sup> and 0.001 mS.cm<sup>-1</sup>, respectively. Water samples were filtered a few hours after collection through 0.2 µm polyethersulfone (PES) filters and kept in sterile tubes for chemical analyses. For each depth, 6 mL of filtered water were acidified with 2% nitric acid for cation analysis. The remainder was not acidified and used for major anion analyses. For dissolved inorganic carbon (DIC) measurements, 12 mL Exetainer tubes were filled with 0.2 µm filtered solutions.

### *Methods*

#### *Chemical bulk analyses of microbialites*

Each microbialite sample was crushed in an agate mortar and between 1.5 and 2 g of powder were analyzed by the Service d'Analyse des Roches et Minéraux (SARM, Centre de Recherches Pétrographiques et Géochimiques, Nancy, France) for major and minor element compositions. Major element analyses were performed using an ICP-AES ICap 6500 (Thermo Fischer) after alkali fusion of rock samples with LiBO<sub>2</sub> followed by dissolution in HNO<sub>3</sub>. The uncertainties were between 2% and 25% on the major element measurements and between 5 and 20% for the minor element measurements, depending on their concentrations (Table A4.3, Annexes). Bulk analyses of organic carbon were carried out after decarbonation with 2% H<sub>2</sub>O+HCl, using SARM's carbon-sulfur elemental analyzer (HORIBA EMIA320V2). Bulk analyses of total carbon were carried out on the same analyzer using a second piece of the sample, but without the decarbonation step.

### *X-ray diffraction (XRD)*

The bulk mineralogical composition of the microbialites was assessed with XRD using one gram of finely ground powder deposited on an aluminum holder. These measurements were conducted using a Panalytical X'Pert Pro MPD diffractometer equipped with a cobalt anode (Co-K $\alpha$ ) at IMPMC. Data acquisitions were performed at 45 kV, 40 mA, in a continuous-scan mode between 5 and 100° (2 $\theta$ ), with steps of 0.008°/s and a total counting time of ~4h30 per sample. Diffractograms for each sample were analyzed using the QualX software, allowing background subtraction, peak finding and matching with XRD patterns of reference mineral phases from the database.

### *Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy analyses*

The mineralogical composition of the microbialites was also assessed by FTIR. KBr pellets were prepared by mixing ~250 mg KBr and 1.5 to 2 mg of the finely ground sample in an agate mortar and pressing the resulting powder mixture twice under 8 tons for 1 minute. The pellets were placed in an oven at 95 °C for 24 h, then pressed again for 1 minute under a pressure of 8 tons. Transmission spectra were recorded between 400 and 4000 cm<sup>-1</sup> with a Nicolet 6700 (ThermoFisher) spectrometer at IMPMC. Spectra were analyzed with the Spectragryph software.

### *Preparation of thin sections and polished thick sections of microbialites*

Light-transparent petrographic thin sections measuring ~30  $\mu$ m in thickness were produced for four microbialite samples collected in 2019 (at 5, 10, 20 and 40 m depth) and five samples collected in 2022 (at 3, 10, 20, 30 and 40 m depth). For this purpose, they were impregnated in LR-white resin at Bourgogne Lithologie in Dijon. Petrographic thin sections of microbialite samples were analyzed using a Leica DM2500P optical microscope with x5 to x40 objectives, in plane polarized mode (PP) and crossed polarized mode (CP). In parallel, thick polished sections were prepared from non-impregnated samples for SEM analyses. Slabs of microbialite samples were cut to achieve a thickness between 5 and 7 mm. These slabs were polished with a mechanical polisher EM TXP using successively 15.3, 9, 3, 2 then 0.5  $\mu$ m abrasive pastes under a stream of milli-Q water. The polished sections were then rinsed in ultrasonic baths with milli-Q water.

### *X-ray fluorescence (XRF) analyses*

Areas of  $\sim 4 \times 2,5 \text{ cm}^2$  chosen within microbialite thin sections were scanned with a Bruker M4 Tornado  $\mu$ XRF spectrometer at Laboratoire Geo-Ocean (IUEM, Plouzané) and Biogéosciences in Dijon. Elemental maps of major and trace elements were obtained for three thin sections of the 2022 samples (AL22\_mb\_10m, AL22\_mb\_40m and AL22\_mb\_40m\_bis) and a thin section slab of the 40 m deep sample collected in 2019 (AL22\_mb\_10m, AL22\_mb\_40m and AL22\_mb\_40m\_bis) and a thin section of the 40 m deep sample collected in 2019 (called AL19\_mb\_40m\_bis). Measurements were achieved under a 20-mbar vacuum, using an X-ray excitation energy of 50 kV and a current of 600 or 270  $\mu\text{A}$  in Brest and Dijon, respectively. Elemental maps were up to 2000 x 1500 pixels and were acquired over up to 4.5 hours, with a spot size of 20 or 25  $\mu\text{m}$  and a dwell time of 5 or 10 ms per pixel in Brest and Dijon, respectively.

### *Scanning electron microscopy (SEM)*

The thick polished non-resin-embedded sections obtained for each microbialite sample were mounted on aluminum stubs using double-sided carbon tape. They were carbon-coated. SEM analyses were conducted using a Zeiss Ultra 55 field emission gun SEM at IMPMC. Backscattered electron images were obtained using an accelerating voltage of 15 keV, a working distance of  $\sim 7.5 \text{ mm}$  an aperture of 60  $\mu\text{m}$ , at high current, and an angle selective backscattered (AsB) detector. Elemental compositions of selected areas of the samples were acquired by energy dispersive X-ray spectrometry (EDXS) using an EDS QUANTAX detector. Several EDXS elemental maps were semi-quantified via the ESPRIT software (Bruker) using the same method as described by Debie et al. (2022).

### *Focused ion beam (FIB) milling*

Two ultrathin foils were cut by FIB milling from a 40-m-deep microbialite sample collected in 2022: one at an aragonite-huntite interface; another one at a hydromagnesite-huntite interface. FIB milling was conducted using a Zeiss Crossbeam Neon40 at IMPMC. The lift-out procedure was followed as described by Debie et al. (2022). A platinum strap (3  $\mu\text{m}$  x 20  $\mu\text{m}$ , 2  $\mu\text{m}$  thickness) was first deposited on the region of interest. Then, a 30 keV  $\text{Ga}^+$  beam operated at ca 5 nA was used for initial milling, resulting in rough excavation on both sides of the thin foil. It was decreased down to 1 nA in a second step. Then, the thick lamella was pre-cut just before being attached to an *in situ* micromanipulator. For the last step, this lamella was welded

to the TEM grid with a deposition of platinum ( $\text{Ga}^+$  beam operated at 20 pA). Further thinning from both sides of the foil was achieved with the  $\text{Ga}^+$  beam operated at a low and decreasing current (from 500 pA to 100 pA), to get the sample thinner, until it was electron transparent ( $\sim 100$  nm in thickness) for TEM analyses.

#### *Transmission electron microscopy (TEM)*

The two 40-m-deep microbialite FIB foils were analysed with a JEOL 2100F transmission electron microscope at IMPMC, operated at 200 kV and equipped with a field emission gun, a STEM device allowing Z-contrast imaging in the high-angle annular dark field (HAADF) mode and a JEOL EDXS detector. The elemental maps acquired by EDXS in the STEM mode were analyzed with the JEOL analysis station software. The mineral phases were identified using selected area electron diffraction (SAED). The SAED patterns were processed using ImageJ.

#### *Confocal laser scanning microscopy (CLSM)*

All petrographic thin sections of microbialites were analysed with a Zeiss LSM 710 at IMPMC using the exact same conditions, *i.e.* a 488 nm wavelength excitation and 15 % of the maximum laser intensity. Emission spectra were collected in the lambda mode in the 400-750 nm wavelength range, with a 34 multi-channel Quasar T-PMT detector. Data were processed with the Zen Blue software (Zeiss).

#### *Raman microspectroscopy*

Petrographic thin sections of the 2019/2022 samples were analyzed with Raman spectroscopy using a Renishaw InVia spectrometer coupled with a Leica DM2500 microscope and using a x50 objective. Samples had low autofluorescence so that Raman spectroscopy could be conducted using a laser diode at 785 nm. Energy calibration was achieved on a silicon wafer. Planar resolution was  $\sim 5 \mu\text{m}^2$ . The signal was analyzed using a RENCAM CCD detector and Renishaw's WIRE 4.1 software.

#### *Chemical analyses of water solutions and speciation modelling*

The water chemistry data for Lake Alchichica used in this study have been acquired over five different field campaigns in Mexico, conducted in January 2012, May 2014, May 2016, May 2019 and October 2022. The data from January 2012 and May 2014 were compiled

using the study by Zeyen et al. (2019). The data for the field campaign conducted in May 2016 have not been published before. Chemical analyses of the May 2019 field campaign were partially published by Muller et al. (2022) and Havas et al. (2023a; 2023b). Data acquired in October 2022 correspond to this study. *In situ* measurements of pressure, temperature and pO<sub>2</sub> as a function of depth are only available for May 2019 and October 2022.

All chemical analyses of Lake Alchichica solutions were carried out at the Institut de Physique du Globe de Paris (Table S4). Concentrations of major and minor cations (Na<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, B<sup>3+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Li<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ti<sup>2+</sup>) were measured with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). Concentrations of major anions (F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> and SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) were measured with ion chromatography. DIC measurements were performed using an analytical Precision 2003 gas chromatography isotope-ratio mass spectrometry (GC-IRM) for the 2019 and 2022 samples, following the protocol described in Assayag et al. (2006).

The activities of chemical species, including CO<sub>2</sub>(aq) activity, as well as the saturation indices (SI) of the solutions with respect to various mineral phases, were calculated using the PHREEQC software (Parkhurst and Appelo, 2013) and the "thermoddem.dat" database (Blanc et al., 2012). Calculations of activities and solubility products were based on the Hückel-Debye method, which takes temperature into account. For all speciation models obtained for Lake Alchichica samples, the electric charge balance was better than 10%. SI was defined as the logarithm of the ratio between the ionic activity product (IAP) and the solubility constant (Ks) (formula (1)):

$$SI = \log (IAP/Ks) \quad (1)$$

When SI>0, solutions are supersaturated with respect to a given mineral phase. Saturation indices of Lake Alchichica water column samples were calculated with respect to aragonite and calcite (Plummer and Busenberg, 1982, logKs = -8.34 and logKs = -8.48, respectively), amorphous calcium carbonates (ACC1 and 2 respectively measured by Kellermeier et al., 2014, at Ks = -7.63 and Brečević and Nielsen, 1989, at Ks = -6.4), amorphous magnesium carbonates (AMC, Fukushi and Matsumiya, 2018, logKs = -5.59) and huntite (Robie and Hemingway, 1973, logKs = -30.16). Mineral solubility diagrams for calcium/magnesium carbonates were produced with the GWB Community software (Act2),

using the physico-chemical parameters of Lake Alchichica and the chemical activities of the dissolved species defined via PHREEQC, as inputs.

### *Isotopic measurements*

Measurements of carbon and oxygen isotopic compositions of carbonates ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{carb}}$ ,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{carb}}$ ) were carried out on bulk powdered microbialites at the GISMO platform (Dijon). Sample aliquots (70-140  $\mu\text{g}$ ) were loaded in glass vials and analyzed using a Kiel IV carbonate preparation device coupled with a ThermoScientific Delta V Plus isotope-ratio mass spectrometer (IRMS, see details in Havas et al., in prep).

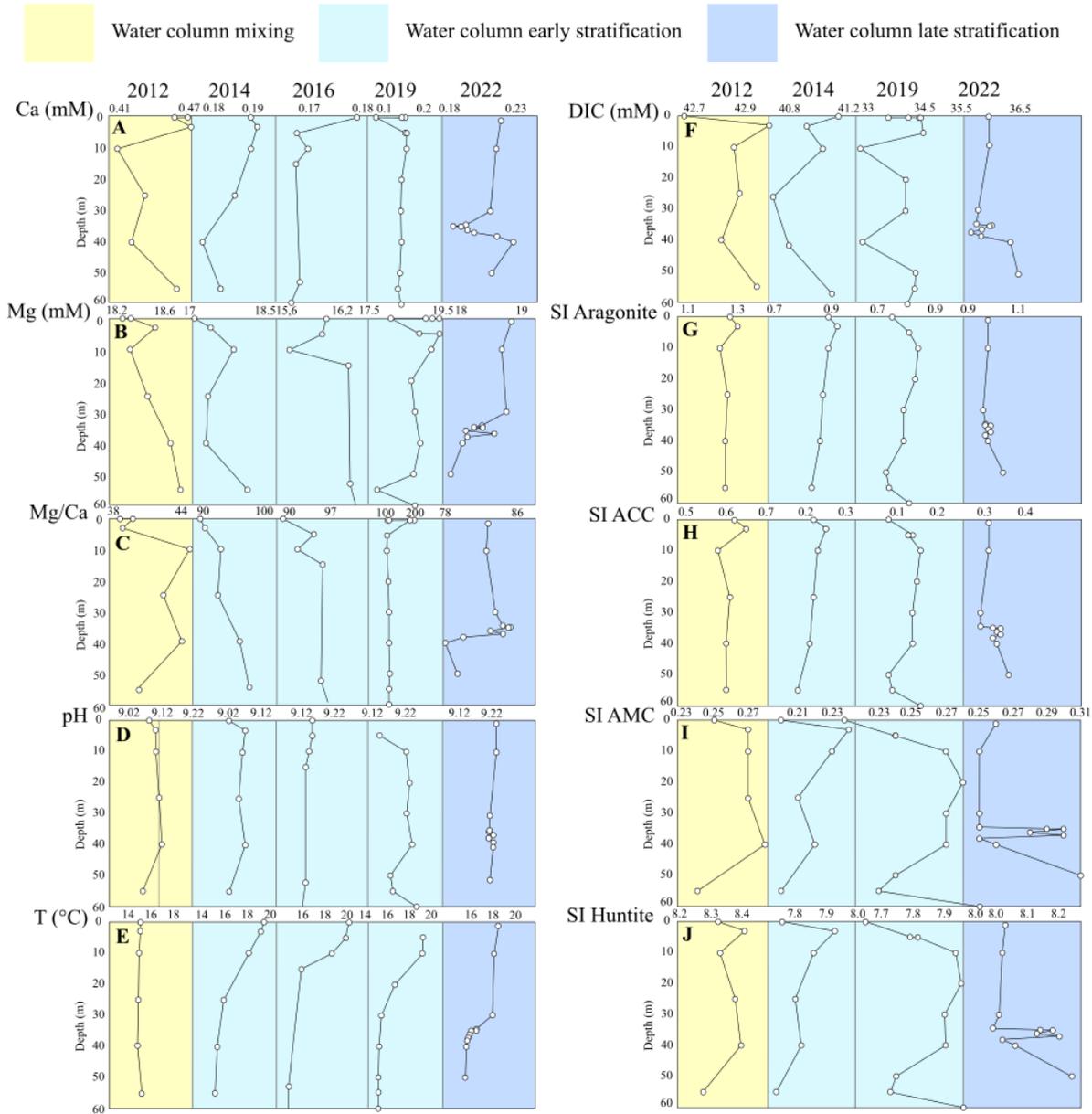
Both  $\delta^{13}\text{C}_{\text{carb}}$  and  $\delta^{18}\text{O}_{\text{carb}}$  are reported relative to the international standard VPDB scale. NBS-19 certified material ( $\delta^{13}\text{C} = +1.95 \text{ ‰}$ ,  $\delta^{18}\text{O} = -2.20 \text{ ‰}$ ) was used for calibration. Reproducibility was better than 0.1 and 0.2 ‰ for  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{18}\text{O}$ , respectively. Bulk sample analyses were at least duplicated and showed average external reproducibility of  $\pm 0.1$  and  $\pm 0.3\text{‰}$ , respectively. The acid-carbonate oxygen isotope fractionations associated with the acid digestion of carbonates were corrected according to mineralogy using  $\alpha_{\text{CO}_2(\text{ACID})\text{-carbonate}}$  values of 1.0087, 1.0091, 1.0099, and 1.0101 for calcite, aragonite, huntite, and hydromagnesite, respectively (Kim et al., 2015 and references therein). The weighted averages were calculated considering the specific carbonate mineralogy of each microbialite sample, a temperature of 71 °C, and assuming that the  $\alpha_{\text{CO}_2(\text{ACID})\text{-carbonate}}$  of dolomite and magnesite are the best approximations of the unknown fractionation of huntite and hydromagnesite fractionations.

The equilibrium isotopic composition of DIC and  $\text{H}_2\text{O}$  ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC-eq}}$  and  $\delta^{18}\text{O}_{\text{H}_2\text{O-eq}}$ ) from which microbialites precipitated were determined considering the specific mineralogy of each sample and assuming equilibrium fractionation between water and carbonate (see Havas et al. in prep for details).

## Results

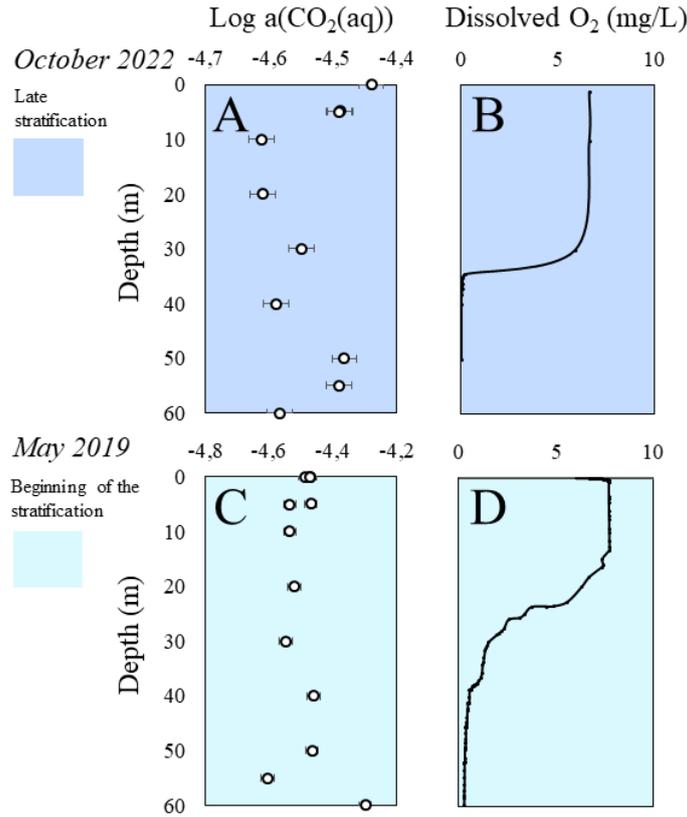
### *Aqueous geochemistry of Lake Alchichica*

Aqueous geochemistry of Lake Alchichica was analyzed multiple times between 2012 and 2022, as a function of depth, and at different times of the year, during the lake stratification or mixing of its water column (Table A4.4, Annexes). Here, we particularly focused on the depth profiles of the water SI with respect to aragonite, ACC, AMC and huntite together with the main parameters controlling SI with respect to these carbonate phases: concentrations of dissolved calcium, magnesium and dissolved inorganic carbon (DIC), pH and temperature (Fig. 4.1). Stratification/mixing of the water column was inferred from the T and pO<sub>2</sub> vertical profiles (Fig. 4.1, 4.2). When the water column was stratified, the temperature was on average two degrees lower at depths between 35 and 60 m compared with the surface, with a yearly average value of 15.8°C. Similarly, during stratification, dissolved oxygen concentration decreased from 7.18 to 0 mg/L from the surface to depths below ~30 m (average between May 2019 and October 2022). The dissolved Mg and DIC concentrations were high (18.1 mM and 36.2 mM on average, respectively), while the mean Ca concentration was 0.22 mM, with higher values reaching 0.4 mM in January 2012 (mixing period) (Fig. 4.1). These concentrations added to a relatively high pH (between 9.02 and 9.22) enabled the solutions to be supersaturated or close to saturation at all times and depths with respect to aragonite, ACC and AMC (average SI = 0.94, 0.28 and 0.05 respectively) (Fig. 4.1, 4.3). Moreover, the lake water was also highly supersaturated with respect to huntite (average SI = 7.92), regardless of whether the water column was stratified or mixed. In October 2022 (late stratification period), an increase of ~0.06 of the SI with amorphous carbonates and huntite was visible at the oxycline; however, this was not seen in January 2012 (mixing period), May 2014 and May 2019 (beginning of the stratified season). Last, pressure rised linearly from atmospheric pressure at the surface of the lake to ~7 bars at depths of 60 m, and the logarithm of the aqueous CO<sub>2</sub> activity averaged -4.54, with no major variations with depth (Fig. 4.2).

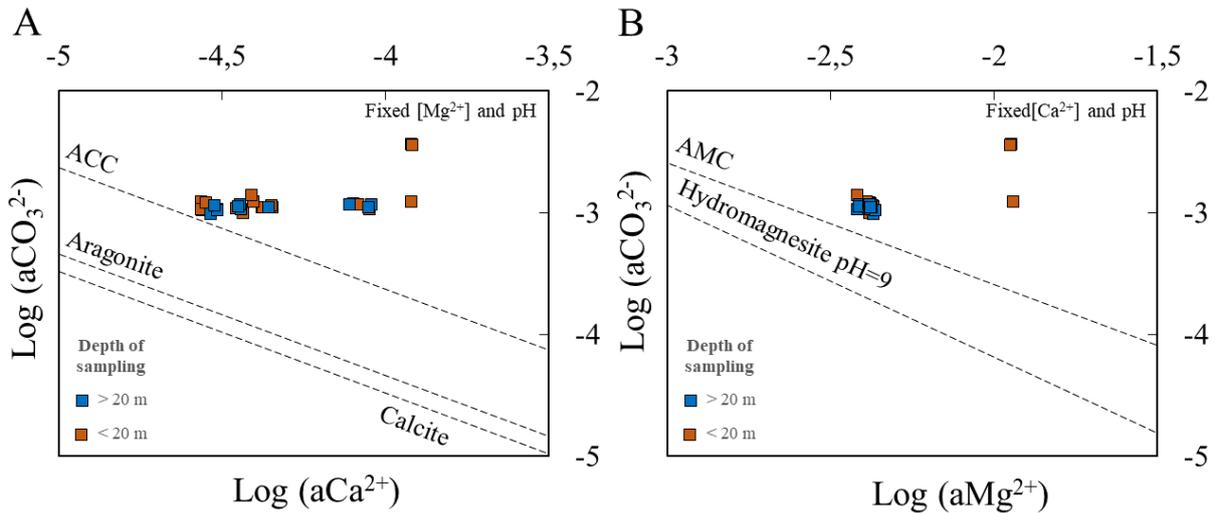


**Figure 4.1.**

**Depth variations of several physico-chemical parameters in Lake Alchichica at five different dates between 2012 and 2022.** These profiles were measured at three different periods: the mixing of the water column (yellow), the beginning of the stratification (light blue) and the late stratification (dark blue). (A to F) Depth profiles of major dissolved chemical species concentrations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , DIC; all in mM), dissolved Mg/Ca ratio, pH and temperature (precision estimated at 5 % for the ionic measurements, 0.1 pH unit for the pH and 0.01 °C for the temperature). (G to J) saturation indices (SI) of water column with diverse carbonate phases: aragonite; amorphous calcium carbonates (ACC; solubility constant of ACC from Kellermeier et al., 2014); amorphous magnesium carbonates (AMC; solubility constant of AMC from Fukushi and Matsumiya, 2018); huntite (solubility constant from Hemingway and Robie, 1973); (G) SI with respect to, (H) SI with respect to; (I) SI with respect to (J) SI with respect to.



**Figure 4.2.** Depth profiles of the logarithm of the  $\text{CO}_2(\text{aq})$  activity (precision at 5 %) and dissolved oxygen (in  $\text{mg.L}^{-1}$ ; precision at  $0.1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) in the water column of Lake Alchichica in October 2022 (A, B) and May 2019 (C, D).

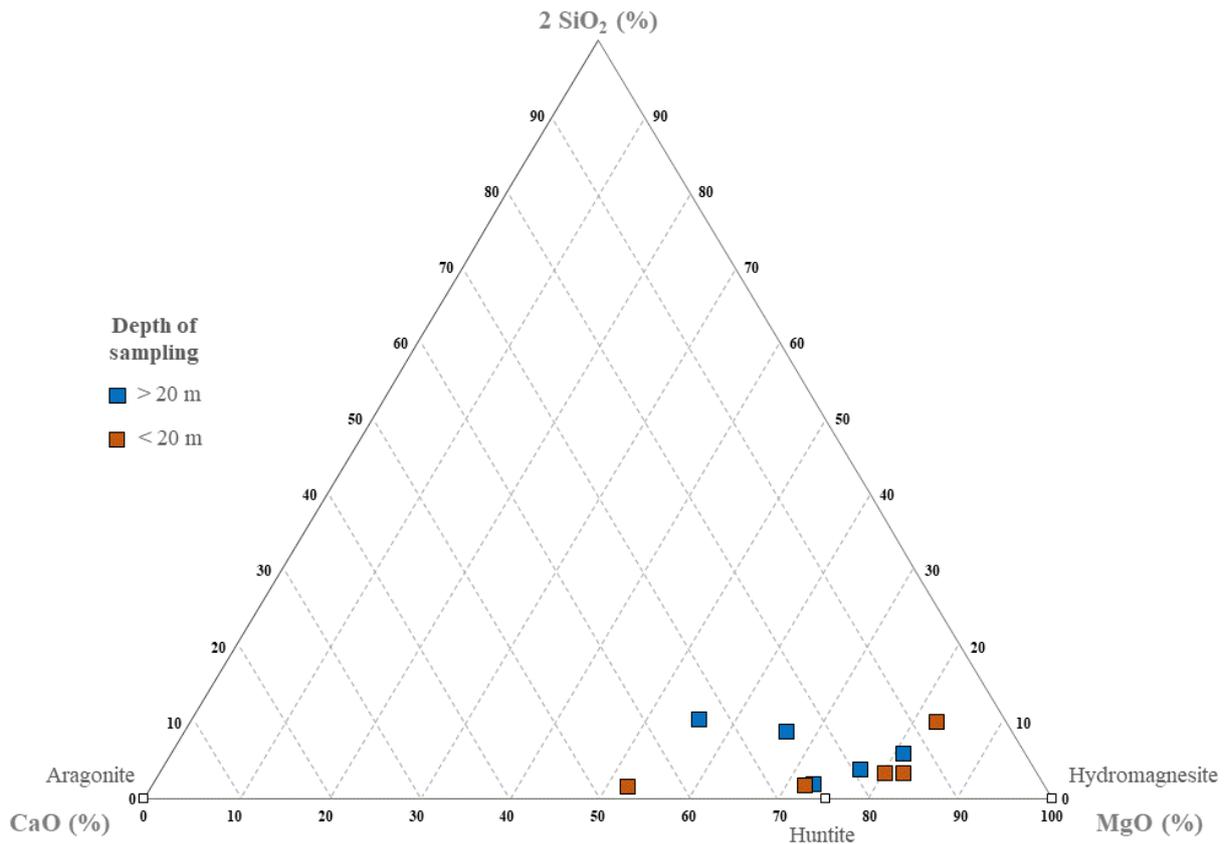


**Figure 4.3.** Solubility diagrams showing the activities of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{CO}_3^{2-}$  in Lake Alchichica (sampled in 2012, 2014, 2019 and 2022) compared with solubilities of diverse carbonate phases. (A) Calcium carbonate solubility diagram showing the shallow (blue squares) and deep (orange squares) solutions. The dotted lines from top to bottom correspond to the solubility lines of amorphous calcium carbonates (ACC), aragonite and calcite. (B) Magnesium carbonate solubility diagram showing the shallow (blue squares) and deep (orange squares) solutions. The dotted lines from top to bottom correspond to the solubility lines of amorphous magnesium carbonate (AMC) and hydromagnesite.

*Detection of huntite in deep ( $\geq 20$  m) Alchichica microbialites*

*Bulk chemical analyses*

The elemental compositions of microbialites sampled in May 2019 and October 2022 were plotted in a CaO-MgO-2SiO<sub>2</sub> (mol%) ternary diagram (Fig. 4.4; Table A4.3, Annexes). No correlation was identified between the depth of microbialites and their bulk chemical composition. As shown by Zeyen et al. (2021) for the shallow microbialites, the chemical compositions of all microbialites mostly distributed along a line between aragonite and hydromagnesite with limited amounts of Si (mol%).



**Figure 4.4.** Plot of the bulk chemical compositions of microbialites sampled in Lake Alchichica between 0 and 40 m in depth in May 2019 and October 2022 in a Mg-Ca-2\*Si ternary diagram. The small empty squares represent the stoichiometries of hydromagnesite, huntite and aragonite. The red squares correspond to the  $\geq 20$  m deep microbialites and the blue squares to the  $< 20$  m deep microbialites.

FTIR analyses

Consistent with bulk chemical analyses, two carbonate phases were detected in all samples: hydromagnesite ( $Mg_5(CO_3)_4(OH)_2 \cdot 4H_2O$ ) and aragonite ( $CaCO_3$ ) (Fig. 4.5, A4.1, Annexes). This agrees with bulk infrared analyses of shallow microbialites performed by Zeyen et al. (2015, 2017). Hydromagnesite was characterized by absorption bands at  $1120\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_1CO_3$ ),  $1420$  and  $1481\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_3CO_3$ ) (stretching vibrations of  $CO_3^{2-}$ ),  $797$ ,  $850$  and  $886\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_2CO_3$ ) (bending vibrations of  $CO_3^{2-}$ ),  $595\text{ cm}^{-1}$  (Mg-O group), and  $3448$ ,  $3515$  and  $3648\text{ cm}^{-1}$  (stretching vibration of the hydroxyl group), based on Farmer (1974), Raade (1970), White (1971) and Zeyen et al. (2015).

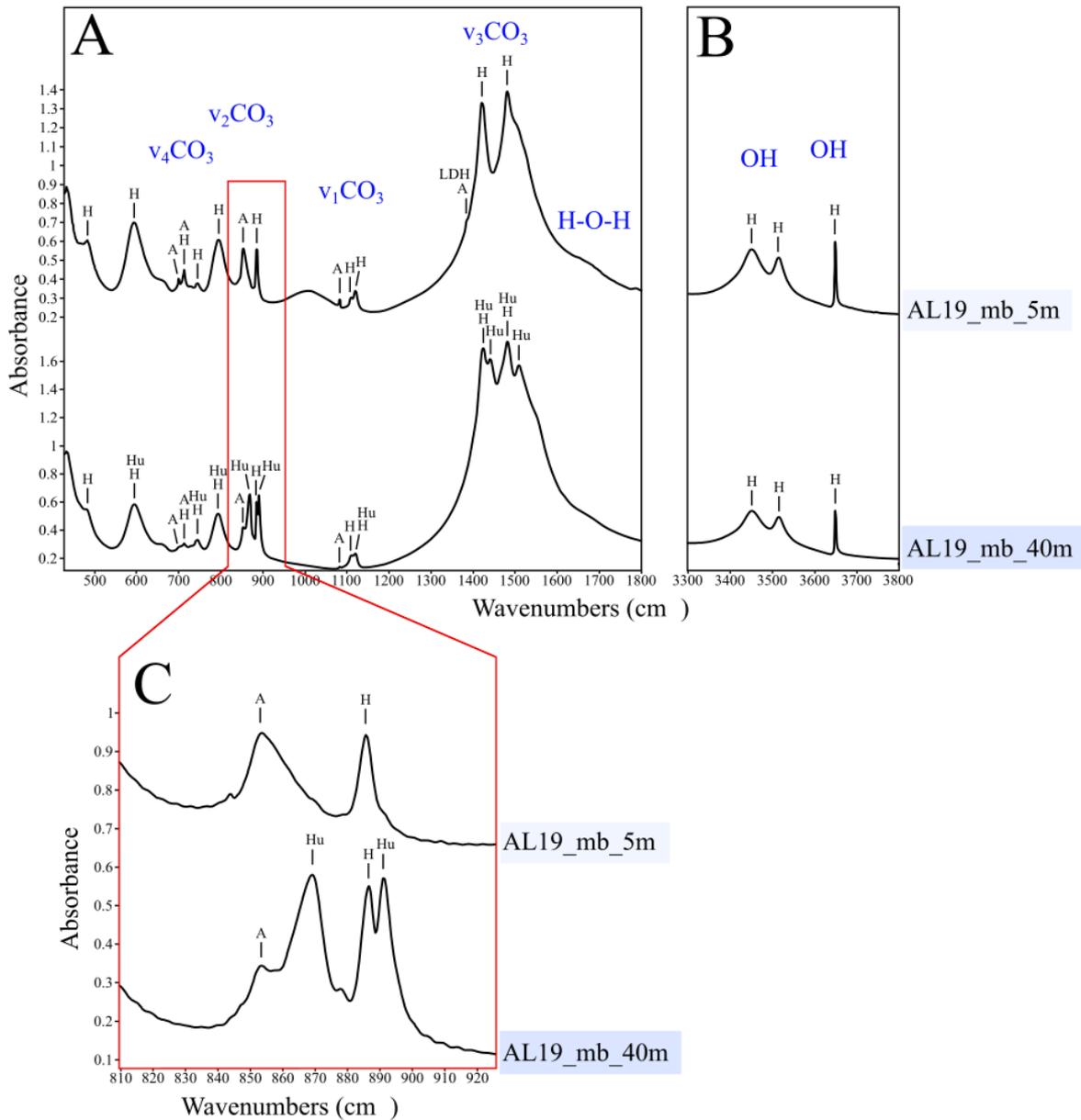


Figure 4.5.

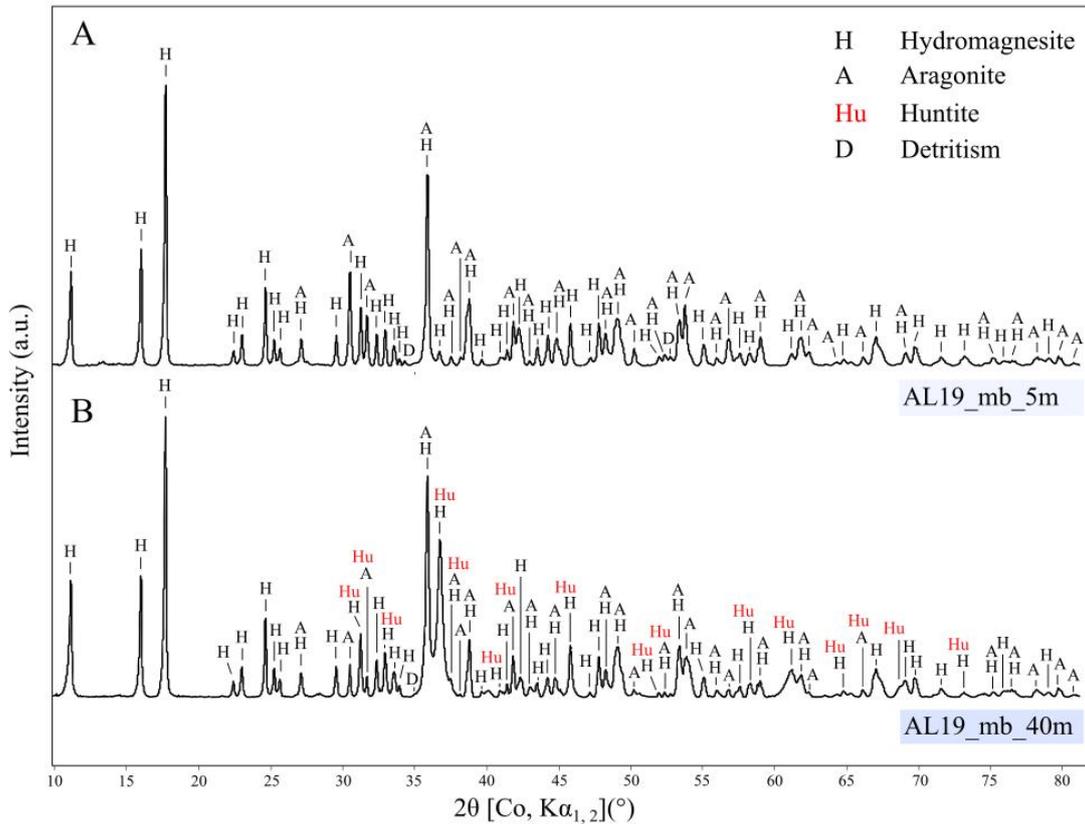
**FTIR spectra of two microbialites sampled in Alchichica in May 2019 (A, B, C).** Depths of collection (5 and 40 m) are indicated in the sample name for each spectrum. Bands are indexed using the following abbreviations: H for hydromagnesite; A for aragonite; Hu for huntite and LDH for layered double hydroxide, *i.e.* pyroaurite and iowaite. (A) Spectra between 400 and 1800  $\text{cm}^{-1}$  of microbialites sampled in 2019 at 5 (top) and 40 (bottom) meter depths; (B) Spectra between 3300 and 3800  $\text{cm}^{-1}$  of the same samples as in (A); (C) Close-up over the 810-920  $\text{cm}^{-1}$  range of the spectra shown in (A) with bands characteristic of huntite.

Aragonite was characterized by absorption bands at 700, 713  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_2\text{CO}_3$ ), 854  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_2\text{CO}_3$ ), and 1084 and 1484  $\text{cm}^{-1}$  (symmetrical and asymmetrical stretching vibrations of carbonate in aragonite, respectively) based on Farmer (1974) and Zeyen et al. (2015). A third phase already detected by Zeyen et al. (2019), *i.e.* a layered double hydroxide (LDH) phase, was observed in microbialites collected in 2019 and 2022 at depths of 5, 10, 20 and 40 m, based on an absorption band at 1484  $\text{cm}^{-1}$ .

In addition to the previously detected phases, we report here an additional carbonate phase that was not evidenced before: huntite ( $\text{CaMg}_3(\text{CO}_3)_4$ ). Huntite was unambiguously evidenced based on absorption bands at 870 and 891  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_2\text{CO}_3$ ), affiliated to Mg- $\text{CO}_3$  bonding as well as shoulders/bands at 1443 and 1510  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_3\text{CO}_3$ ) associated with Ca- $\text{CO}_3$  bonding in huntite (Farmer, 1974; Şen, Madakbaş and Kahraman, 2014; Seki et al., 2013). Huntite was detected in deep microbialites, *i.e.*, those collected at 20 and 40 m in 2019 and 30 and 40 m in 2022 but was absent from the nine surface microbialites (Fig. A4.2, Annexes). The limitation of this phase to deep microbialites explains why it was missed in previous mineralogical studies, which only analysed samples collected down to a maximum depth of 15 m depth (Saghāi et al. 2015).

### *XRD analyses*

Bulk XRD analyses of the 2019 and 2022 microbialites agreed with FTIR, although overlaps between some diffraction peaks made phase distinction more difficult in some cases (Fig. 4.6, A4.3, Annexes). Surface microbialites mainly showed peaks from hydromagnesite and to a lesser extent aragonite. For deep ( $\geq 20$  m) samples, hydromagnesite also predominated. The presence of huntite in deep samples was confirmed by peaks at 3.284 Å ( $31.617^\circ 2\theta$ ), 2.834 Å ( $36.804^\circ 2\theta$ ), 2.376 Å ( $44.238^\circ 2\theta$ ), 1.988 Å ( $53.49^\circ 2\theta$ ), and 1.973 Å ( $53.931^\circ 2\theta$ ) (Barbieri et al., 1974; Seki et al. 2013; Kinsman, 1967; RRUFF ID: R040126; Dollase and Reeder, 1986). The LDH phase previously identified in Zeyen et al. (2019) was detected in the 30-m-deep sample from October 2022 only, with a peak at 3.79 Å ( $27.3^\circ 2\theta$ ).



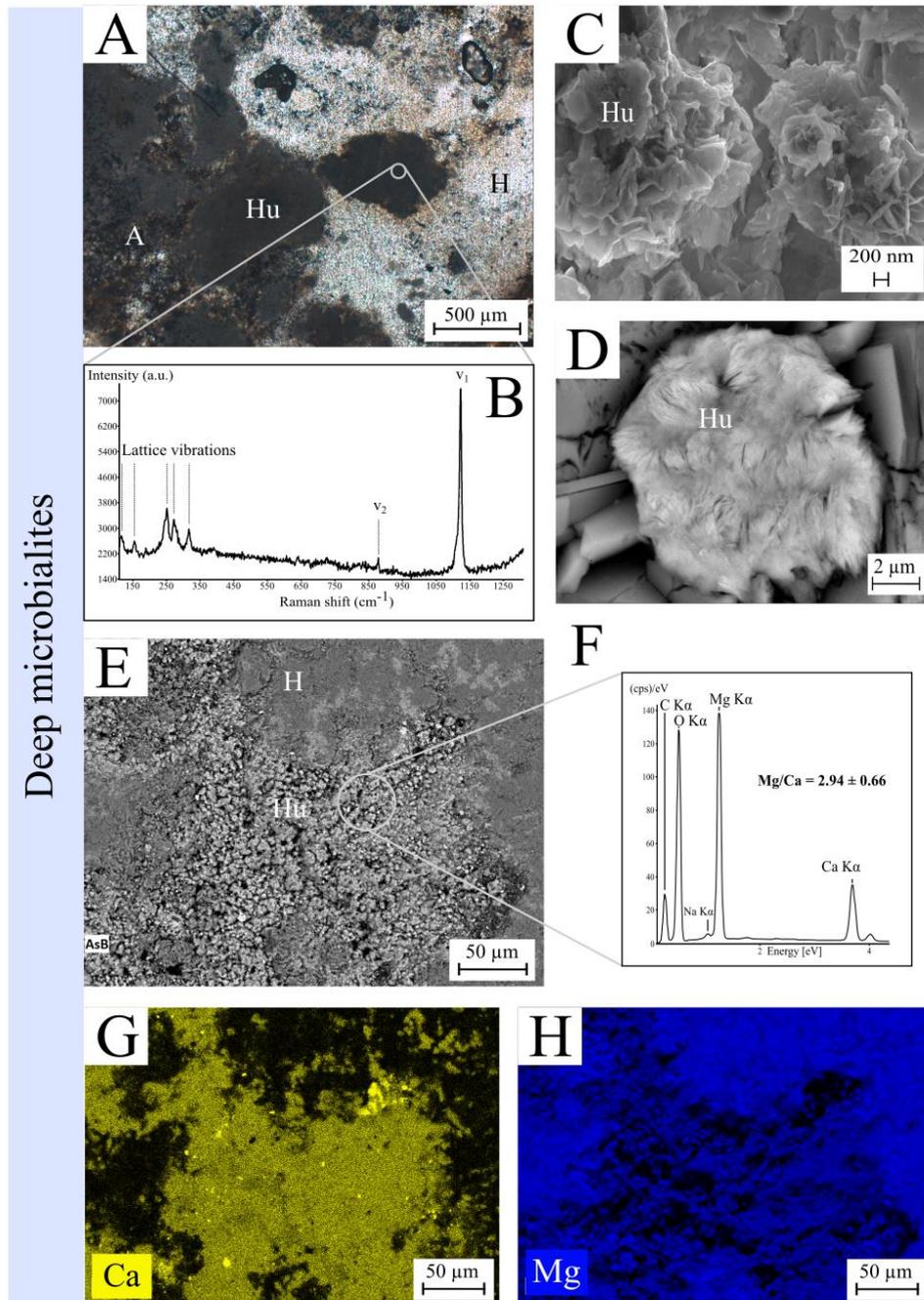
**Figure 4.6.**

**Powder X-ray diffraction patterns of Alchichica microbialite samples.** Hydromagnesite (H), aragonite (A), huntite (Hu), LDH and detrital mineral phases (D) such as albite, anorthite and/or pyroxene were detected in these samples. (A) XRD pattern of a 5-m-deep microbialite sampled in 2019; (B) XRD pattern of 40-m-deep microbialite sampled in 2019.

*Raman microspectroscopy and electron microscopy analyses*

Spatially resolved analyses also confirmed the presence of huntite in deep microbialites (Fig. 4.7). It was unambiguously identified by the  $\nu_1$  internal symmetric stretching band of the C-O bond in the  $\text{CO}_3^{2-}$  group at  $1122.5 \text{ cm}^{-1}$  and by the band at  $878 \text{ cm}^{-1}$  corresponding to the  $\nu_2$  bending mode of the  $\text{CO}_3^{2-}$  group (Edwards et al., 2005; RRUFF ID: R040126; Fig. 4.7A, -B). Moreover, the lattice vibration bands of huntite were observed at 119, 155.7, 252.3, 272 and  $317.4 \text{ cm}^{-1}$  (Edwards et al., 2005, RRUFF ID: R040126). Consistently, SEM-EDXS analyses of the 20, 30 and 40-m-deep microbialites showed areas enriched in both calcium and magnesium with an average Mg/Ca ratio of  $\sim 3$ , consistent with the stoichiometry of huntite (Fig. 4.7E, -F, -G, -H). Huntite appeared dark grey under plane-polarized light microscopy (Fig. 4.7A). It often occurred as aggregates measuring 5 to 6  $\mu\text{m}$  in diameter, forming large porous patches as observed under SEM (Fig. 4.7E, -F, -G, -H). These aggregates were composed of

flat, rectangular and/or rounded crystals measuring 1 to 2  $\mu\text{m}$  (Fig. 4.7C, -D). The texture and grain size of huntite were globally similar in 20 and 40 m deep microbialites.

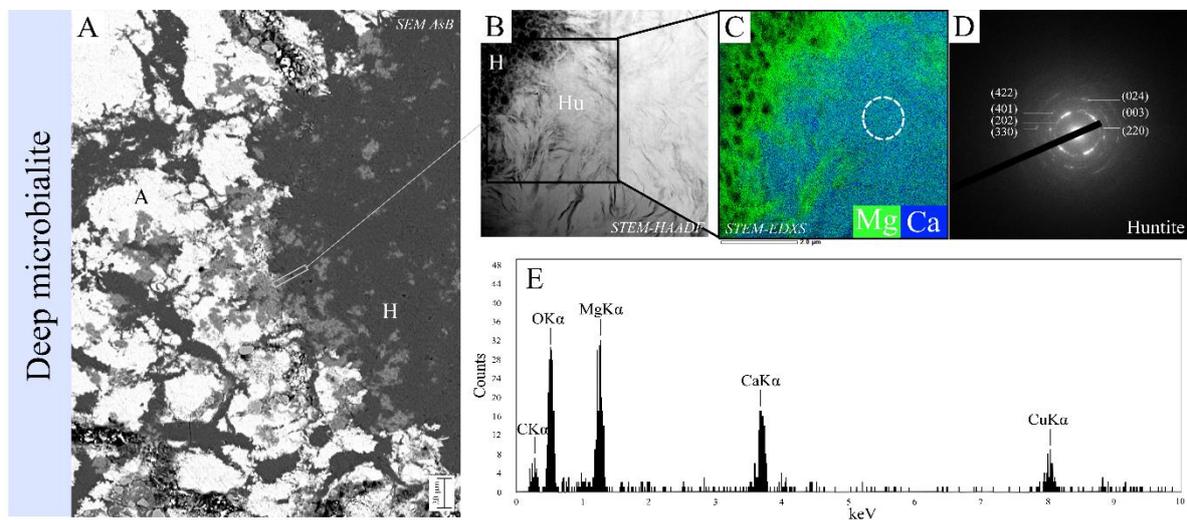


**Figure 4.7.**

**SEM and Raman detection of huntite in deep Alchichica microbialites, sampled in 2022.** (A) Plane polarized optical microscopy image of huntite grains (Hu, dark grey) surrounded by hydromagnesite (H, light phase) and aragonite (A, black phase) in a 40-m-deep sample. (B) Raman spectrum collected on the area outlined in image A (white circle inside huntite grain) showing peaks characteristic of huntite (see text for more information). (C) SEM inLens image of huntite crystals. (D) SEM backscattered electron image of huntite aggregate in a hydromagnesite matrix. (E) SEM backscattered electron image of a 40 m deep sample showing huntite in light grey within a hydromagnesite matrix in dark grey. Dark areas correspond to porosity. (F) EDX spectrum from the area outlined in image E by the white circle.

This spectrum is characteristic of huntite with a Mg/Ca quantified around 3. (G) EDXS map of calcium (yellow) over the area shown in image E. (H) EDXS map of magnesium (blue) over the area shown in image E.

Two FIB foils were cut along hydromagnesite-aragonite interfaces in a 40-m-deep sample (one is shown in figure 8). Huntite appeared particularly abundant at these interfaces (Fig. 4.8A). STEM-EDXS analyses evidenced the presence of one Ca-rich (aragonite), one Mg-rich (hydromagnesite) and one Ca-Mg-rich (huntite) carbonate phases. The selected area electron diffraction (SAED) pattern obtained on the Ca-Mg-rich phase (Fig. 4.8D) was mostly powder patterns displaying diffuse spots and arcs at 2.835 Å, 2.607 Å, 2.376 Å, 1.990 Å, 1.766 Å, 1.584 Å and 1.445 Å, corresponding to the (202), (003), (220), (401), (024), (330) and (422) lattice planes of huntite, respectively.



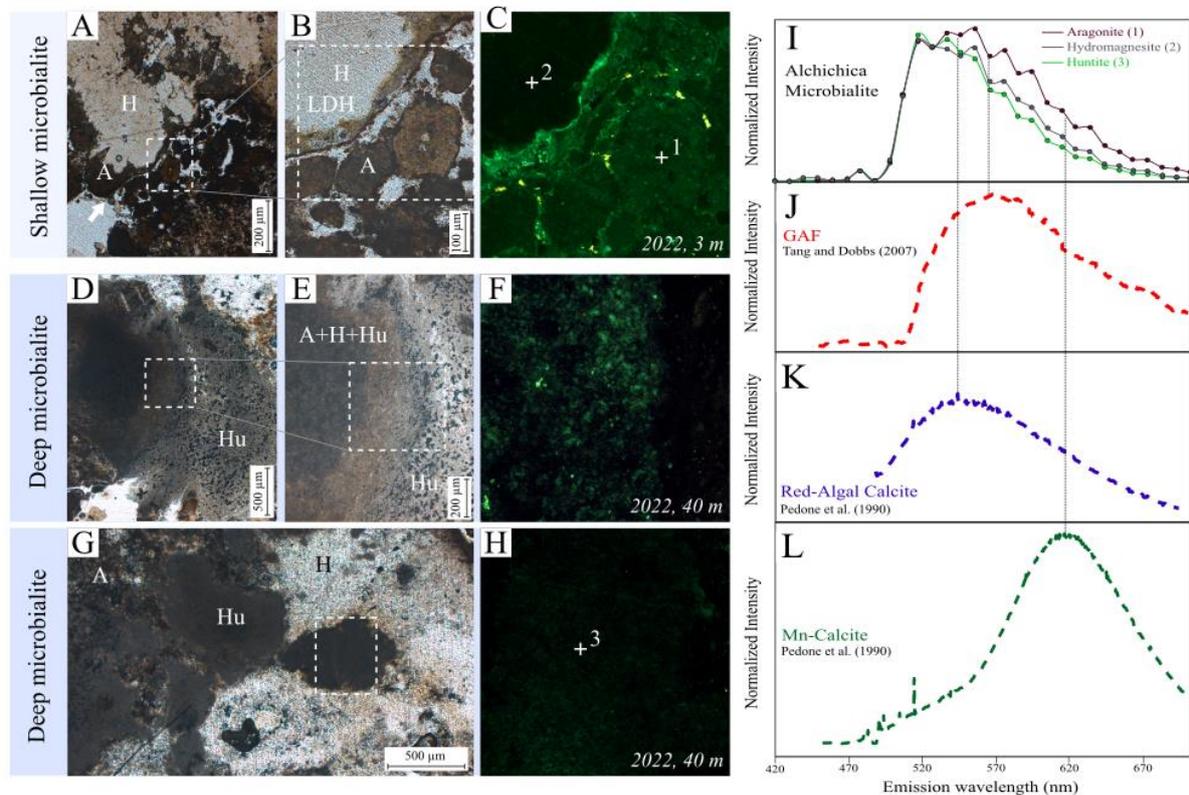
**Figure 4.8.**

**Electron microscopy analyses of a FIB foil cut across an aragonite (A)-hydromagnesite (H) interface, containing huntite (Hu) in a 40-m-deep microbialite, collected in 2022.** (A) SEM image in the backscattered electron mode of the 40-m-deep sample, showing the area where a FIB foil was cut. (B) STEM-HAADF image of huntite at the contact with hydromagnesite. (C) STEM-EDXS map of calcium (blue) and magnesium (green) of the area highlighted by a black rectangle on the image (B). The huntite zone show a mixed color between blue and green; (D) SAED pattern of the circled area corresponding to huntite in the image (C); (E) EDXS spectrum of the area corresponding to huntite, circled in the image (C). The peak at 8.046 keV corresponds to copper, present in the FIB foil holder.

### *Decrease of autofluorescence in deep microbialites*

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) analyses were performed on shallow and deep microbialite thin sections, keeping all excitation and detection settings constant (Fig. 4.9). These two types of microbialite samples displayed a similar luminescence emission spectrum with emission over a broad wavelength range between 480 and 680 nm and a maximum in the

green at around 500-560 nm. The spectrum shape was relatively similar for the different carbonate phases composing Alchichica microbialites and resembled the spectra measured for red-algal calcite by Pedone et al. (1990), and green autofluorescence (GAF) by Tang and Dobbs (2007) (Fig. 4.9I, -J, -K). However, it was significantly different from the luminescence spectrum of Mn<sup>2+</sup>-doped calcite measured by Pedone et al. (1990) (Fig. 4.9I, -L). Strikingly, the luminescence intensity significantly varied depending on the mineral phase and the sampling depth. In shallow microbialites, the fluorescence was pervasive in the aragonite associated with microbial cells and LDH, and with detrital grains (Fig. 4.9A, -B, -C). By contrast, hydromagnesite had a weak fluorescence at all depths. Huntite was almost not fluorescent (Fig. 4.9D, -E, -F, -G, -H). Moreover, the luminescence intensity in all phases within deep microbialites was lower than in shallow microbialites.



**Figure 4.9.**

**Distribution of the fluorescence emission signal in the shallow and deep microbialite thin sections with aragonite (A), hydromagnesite (H), huntite (Hu), layered double hydroxydes (LDH).** All fluorescence maps (shown in C, F and H) were acquired with one single excitation at 488 nm, the same laser intensity, the same settings for the detector (gain) and the same counting time. These maps are overlays of three fluorescence images corresponding to (i) emission between 420 and 507 nm (in blue), (ii) emission between 507 and 605 nm (green) and (iii) emission between 605 and 702 nm (red). (A) Plane polarized optical microscopy image of an aragonite (dark brown) and hydromagnesite (light brown) zone close to the surface of a 3-m-deep microbialite (sampled in 2022); The surface of the microbialite is indicated by a white arrow. (B) Close-up of the contact between detrital aragonite/hydromagnesite grains (bottom right hand corner) and a massive hydromagnesite zone topped

by aragonite and biofilms; (C) Fluorescence map of the zone indicated by a white rectangle in image (B); (D) Plane polarized optical microscopy image of a contact between a mixed aragonite-hydromagnesite-huntite zone (dark brown) and a porous huntite zone from a 40-m-deep microbialite (sampled in 2022); (E) Close-up on the zone outlined by a white rectangle in image (D); (F) Fluorescence map of the zone indicated by a white rectangle in image (E); (G) Plane polarized optical microscopy image of huntite grains (dark grey) surrounded by hydromagnesite (light phase) and aragonite (black phase) from a 40-m-deep microbialite (sampled in 2022). The zone is the same as that shown in figure 7A. (H) Fluorescence map of the zone indicated by a white rectangle on image (G); (I) Fluorescence emission spectra of the 1, 2 and 3 spots indicated in images (C) and (H); (J) Fluorescence emission spectrum of green autofluorescence (GAF) derived from Tang and Dobbs (2007); (K) Fluorescence emission spectrum of calcite containing organic matter (Red-algal biogenic calcite) derived from Pedone et al. (1990); (L) Fluorescence emission spectra of synthetic calcite containing manganese activators (Mn-calcite) derived from Pedone et al. (1990).

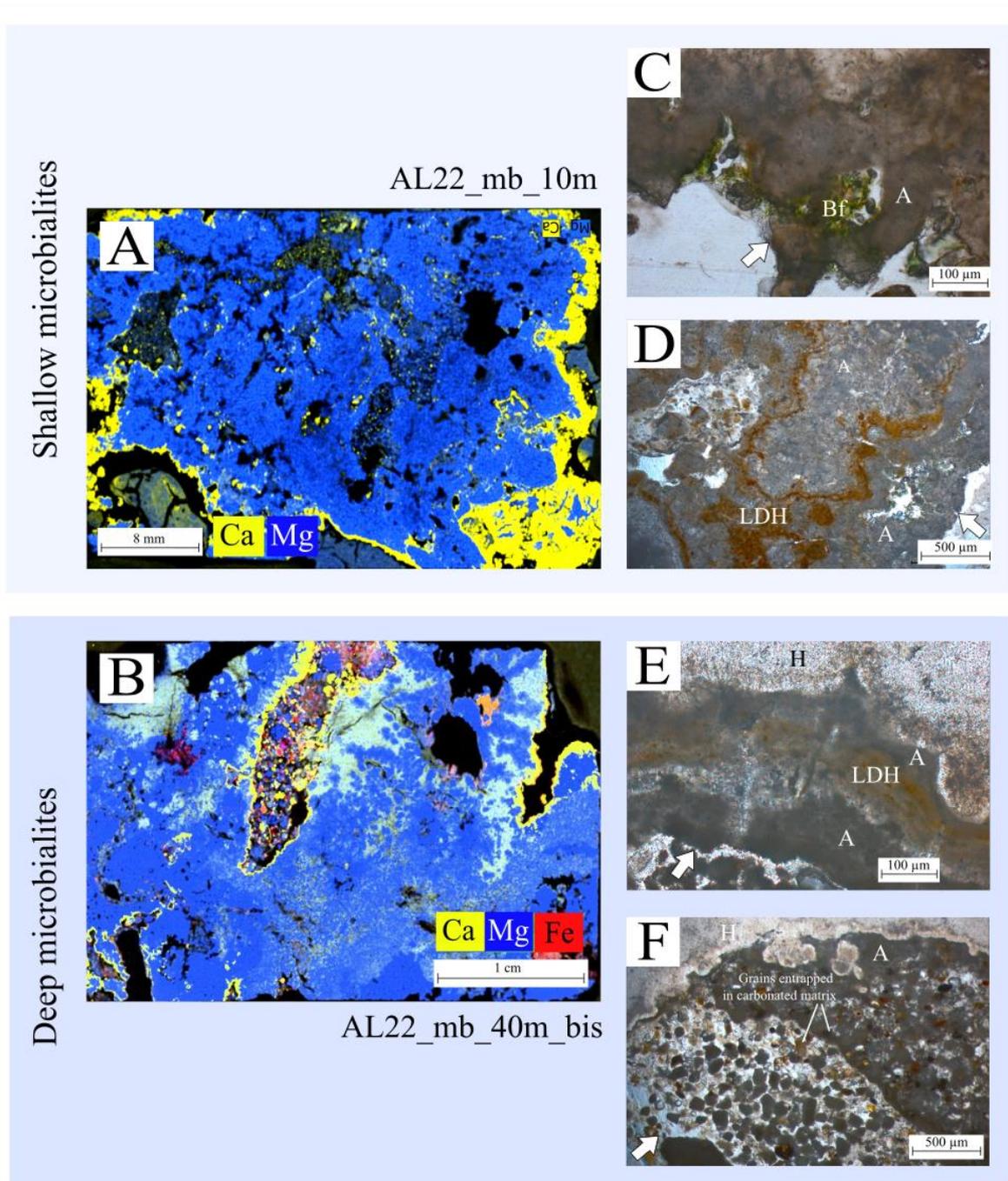
### *Microscopy analyses of mineral textures/distribution*

Petrographic thin sections of deep microbialites were systematically observed using XRF (Fig. 4.10A, -B). The XRF maps underlined features consistent with thin sections observations (Fig. 4.10). Overall, we observed that:

(i) areas located at the external rim of the microbialites mostly comprised aragonite (Fig. 4.10A, -B), organized in different relatively dark layers, sometimes in association with the microbial biofilm intermixed with the microbialite surface (Fig. 4.10C). In general, the surface of microbialites was formed by an alternation between these aragonitic layers and detrital layers, the latter being composed of carbonate grains trapped in a micritic matrix (Fig. 4.10F). These features were observed at all depths.

(ii) hydromagnesite was the dominant phase (estimated at ~70% as surface coverage) below the surface of the samples in many areas (Figure 4.10A, -B). Iron-bearing, brown laminae appeared at the interfaces between aragonite and hydromagnesite, in both shallow and deep microbialites (Fig. 4.10D, -E). These iron rich laminae are consistent with the presence of pyroaurite and iowaite (both LDH phases), as shown by Zeyen et al. (2019). Iron-rich detrital grains infilling cavities were also found (red in Fig. 4.10B).

(iii) some areas contained both Mg and Ca (Fig. 4.10B). They sometimes corresponded to aragonite-hydromagnesite mixtures but most often they corresponded to huntite in the form of diffuse patches, as suggested by SEM-EDXS and Raman microspectroscopy analyses. Over large scales, broad masses/patches of huntite seem to pervade from the surface of the microbialites and/or fractures toward the interior of the microbialites, forming some sort of reaction front (*e.g.*, Fig. 4.10B).

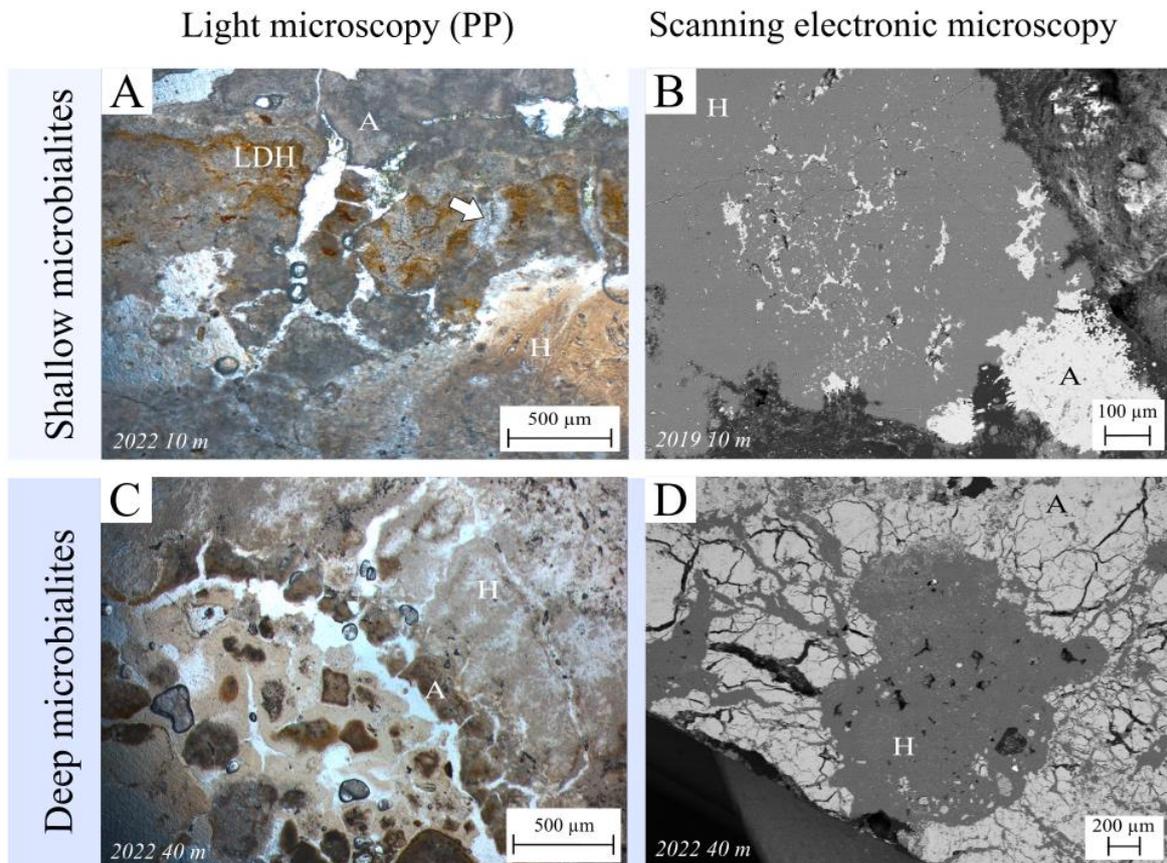


**Figure 4.10.**

**Comparison of the spatial distribution of the main phases composing shallow and deep Lake Alchichica microbialites.** The surfaces of the microbialites are indicated by a white arrow on light microscopy images. XRF maps of petrographic thin section from (A): a 10-m-deep microbialite sampled in October 2022 (AL22\_mb\_10m) and (B): a 40-m-deep microbialite sampled in October 2022 (AL22\_mb\_40m\_bis). Magnesium is shown in blue (pronounced blue highlighting hydromagnesite zones), calcium in yellow (highlighting the aragonite zones on the edges of the microbialite) and iron in red for AL22\_mb\_40m\_bis. Huntite appears in turquoise, where the color is intermediate between blue and yellow. (C) Plane polarized optical microscopy image showing biofilms (Bf) associated to aragonite on the top of a 10-m-deep microbialite; (D) Plane polarized optical microscopy image showing different aragonitic layers on the top of a 10-m-deep microbialite. The brownish layers correspond to the LDH; (E) Plane-polarized optical microscopy image showing different surface layers of aragonite intercalated

with LDH layers (in brown) on the top of a 40-m-deep microbialite, and a deeper hydromagnesite zone (light grey). Note that no huntite is visible in/close to the LDH layers; (F) Plane-polarized optical microscopy image showing several carbonate detrital layers joined by a micritic phase, visible at the surface of a 40-m-deep microbialite.

More specifically, several petrological and textural modifications affecting Alchichica microbialites were observed by combined analyses with light microscopy, XRF and SEM-EDXS. (i) First, under optical microscopy and SEM, fracturing of microbialites at the millimeter-scale was observed at all depths, but was particularly pronounced in deeper microbialites (Fig. 4.11).



**Figure 4.11.**

**Fracturation patterns in shallow and deep microbialites.** (A) Plane-polarized optical microscopy image of fractures visible in aragonite (A) (with cementation highlighted by the white arrow) and LDH layers on the top of a 10-m-deep microbialite (sampled in 2022); (B) SEM image in the backscattered electron mode of a section of a 10-m-deep microbialite (sampled in 2019). The white area correspond to aragonite and the dark area to hydromagnesite (H); (C) Plane-polarized optical microscopy image of fracturation visible in a 40-m-deep microbialites (sampled in 2022). The lighter phase corresponds to hydromagnesite and the darker brown phase on the edge of the microbialite to the aragonite; (D) SEM image in the backscattered electron mode of a section of a 40-m-deep microbialite (sampled in 2022). The white areas correspond to aragonite and are highly fractured, while the dark grey areas correspond to hydromagnesite.

These fractures affected preferentially the aragonite at the surface of the microbialites. (ii) Patterns resulting from mechanical compaction were observed at all depths. They appeared in the form of interpenetrated/interspersed grains as a result of pressure-dissolution (Fig. 4.12A, -B).

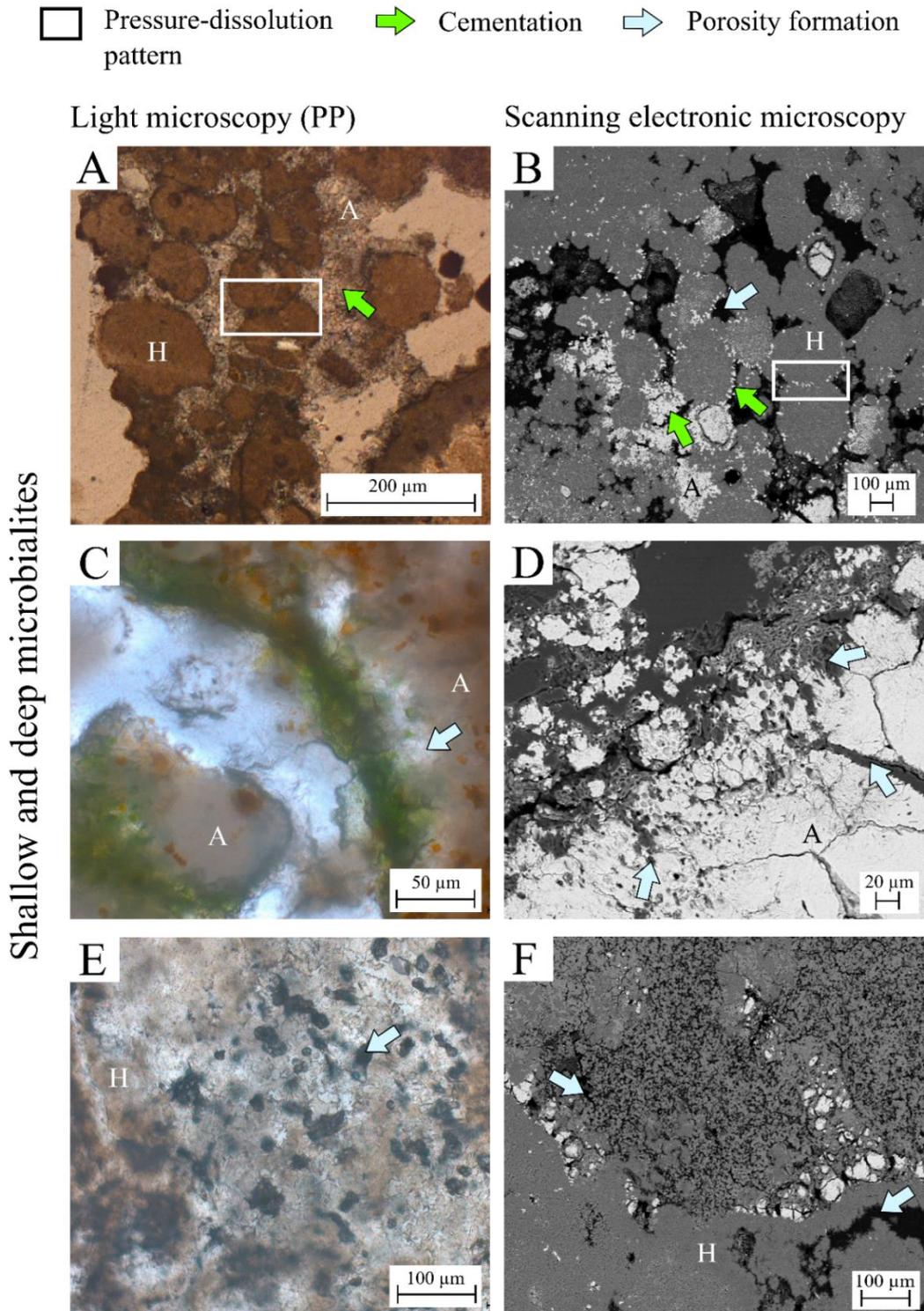


Figure 4.12.

**Petrological and textural modifications in Alchichica microbialites at all depths.** (A) Plane-polarized optical microscopy image of carbonate grains encrusted in sparitic aragonite (noted A in the image) cement (green arrow) in a 5-m-deep microbialite (collected in 2019). The intricated grains show compaction-dissolution patterns (white dashed rectangle); (B) SEM image in the backscattered electron mode of compacted hydromagnesite (H) grains (pressure-dissolution figures framed by the white dashed rectangle) in a 40-m-deep microbialite, sampled in 2019. The dark grey areas correspond to hydromagnesite and the white grains to aragonite. The green arrow points to early cementation of hydromagnesite grains by fibrous aragonite crystals. (C) Plane -polarized optical microscopy image of an aragonite-encrusted biofilm on the top of a 20-m-deep microbialite (sampled in 2022). The blue arrows point to the secondary porosity formed at the base of the biofilm. (D) SEM image in the backscattered electron mode of fractures cross-cutting the aragonitic cementation and biofilm encrustment at the surface of a 40-m-deep microbialite (sampled in 2022). The blue arrows point to the secondary porosity formed at the aragonitic surface layer of the microbialite. (E) Plane-polarized optical microscopy image of intragranular secondary porosity formed in some hydromagnesite-huntite patches (blue arrow) in a 40-m-deep microbialite (sampled in 2022). (F) SEM image in the backscattered electron mode of secondary porosity formed by the huntite aggregates close to the aragonite-hydromagnesite interface in a 40-m-deep microbialite (sampled in 2019).

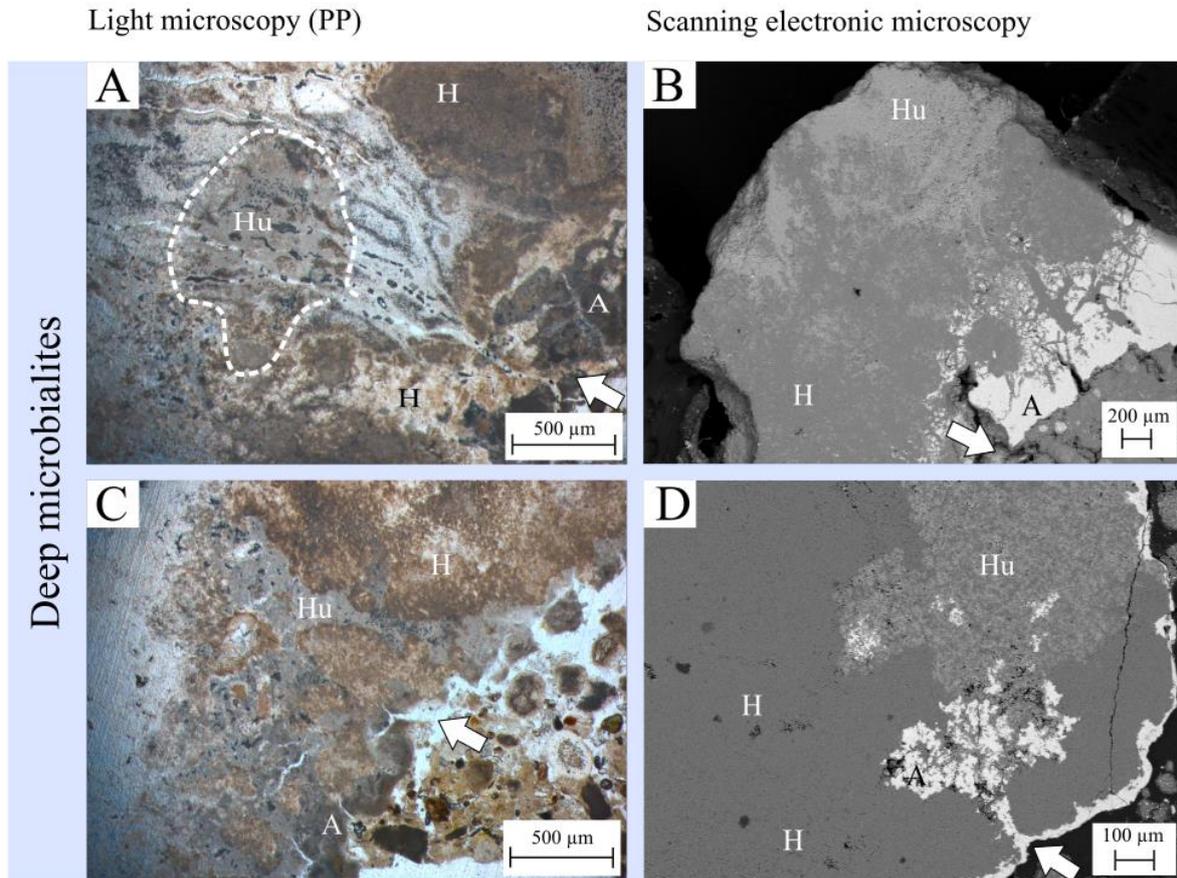
(iii) Additionally, an aragonite and hydromagnesite cementation sealed the intergranular porosity, showing several stages of growth (Fig. 4.12A, -B). The aragonitic cement was either sparitic, forming large patches between the detrital aragonite and hydromagnesite grains, or fibrous, occurring at grain contacts. The cementation was also highly developed in the fractures crosscutting aragonite at the surface of microbialites (Fig. 4.11A, Fig. 4.12A, -B).

(iv) Last, different stages of porosity formation/infilling were notable (Fig. 4.12C, -D, -E, -F). For example, numerous dissolution-precipitation features were visible at all depths (*e.g.* in the aragonitic cements) as well as a secondary intragranular porosity formed by the dissolution of the matrix (usually hydromagnesite). A secondary porosity was also formed by the fracturation of aragonite pervading into the deeper parts of the microbialites (Fig. 4.11, Fig. 4.12D, -F). Moreover, hydromagnesite was partially dissolved in several deep zones of the microbialites, often in association with fractures, forming large porous patches (Fig. 4.12E). Interestingly, huntite was regularly observed at the bottom and along the edges of these fractures, in deep microbialites only (Fig. 4.10B, Fig. 4.13). No dissolution-precipitation pattern was clearly detected in the huntite phase at depth.

We systematically scrutinized the interfaces between aragonite and hydromagnesite at the surface of microbialites in both shallow (< 20 m) and deep ( $\geq$  20 m) microbialites (Fig. 4.14). While these interfaces did not show any apparent trace of huntite in shallow microbialites (Fig. 4.14A, -B, -C), huntite steadily replaced aragonite and hydromagnesite in deep microbialites according to the SEM-EDXS analyses (Fig. 4.14D, E, -F, -G). Sometimes, cracks

filled with hydromagnesite cut across the huntite patches. Moreover, pyroaurite and iowaite, which are found in these aragonite-hydromagnesite interfaces as well, were observed in locations distinct from huntite (Fig. 4.10E).

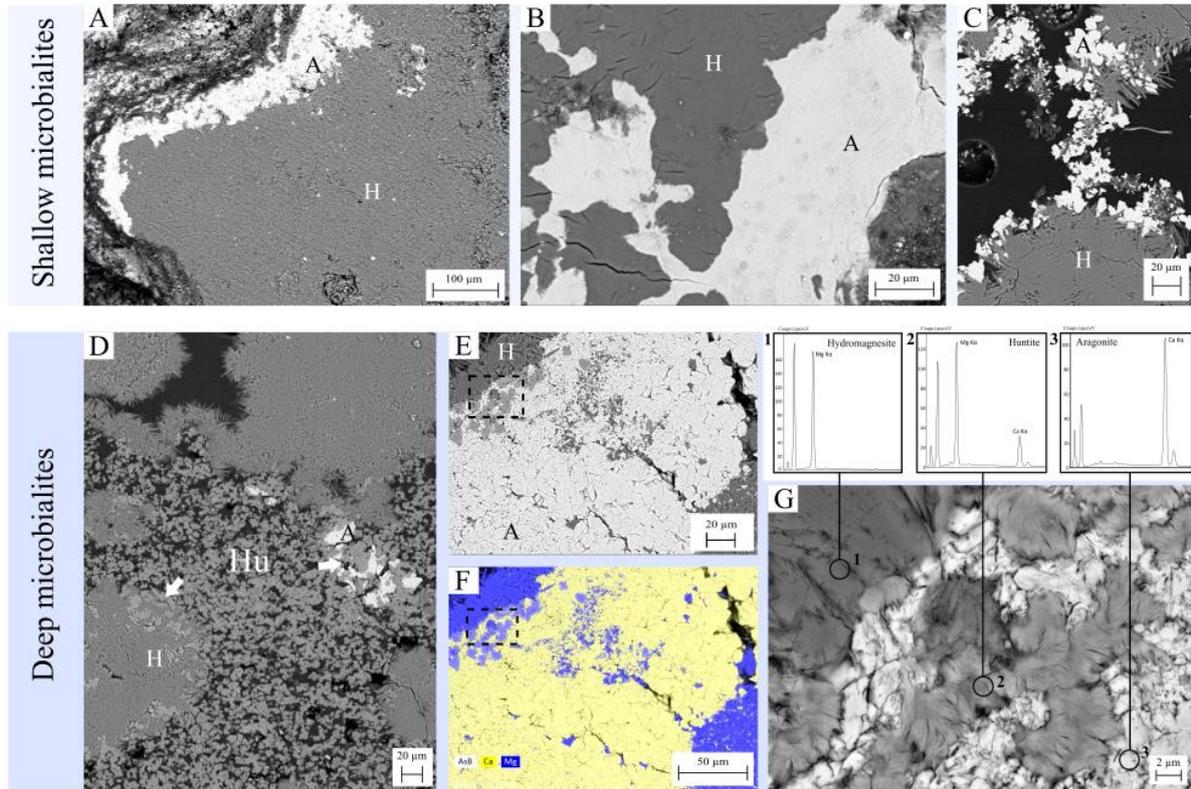
### Huntite close to the fractures



**Figure 4.13.**

**Huntite at the bottom and along the edges of the fractures in deep microbialites.** The top of the microbialites are indicated by a white arrow. (A) Plane-polarized optical microscopy image of an aragonite (A)-to-hydromagnesite (H) fracture from the top of a 40-m-deep microbialite (sampled in 2022). Huntite (Hu) is present at the bottom of the fracture (light grey area highlighted by dashed white line). (B) SEM image in the backscattered electron mode of a section of a 40-m-deep microbialite (sampled in 2022). The white areas correspond to aragonite, the dark areas correspond to hydromagnesite and the light grey areas correspond to huntite. (C) Plane-polarized optical microscopy image of fracture network filled by huntite (grey area) in an aragonite-to-hydromagnesite zone from the top of a 40-m-deep microbialite (sampled in 2022). (D) SEM image in the backscattered electron mode of aragonite infiltration pattern (white) into hydromagnesite (dark grey) from a 40-m-deep microbialite (sampled in 2022). Huntite is visible at the end of this aragonite infiltration (light grey). (E) Plane-polarized optical microscopy image of an aragonite-to-hydromagnesite fracture from the top of a 40-m-deep microbialite (sampled in 2022). Huntite is visible as nodules of around 6  $\mu\text{m}$  that accumulate at the end of the fracture and form more massive dark aggregates on either side. (F) SEM image in the backscattered electron mode of a section of a 40-m-deep microbialite (sampled in 2022) showing huntite aggregates formed at the bottom of a fracture in a hydromagnesite patch.

Aragonite-Hydromagnesite interfaces

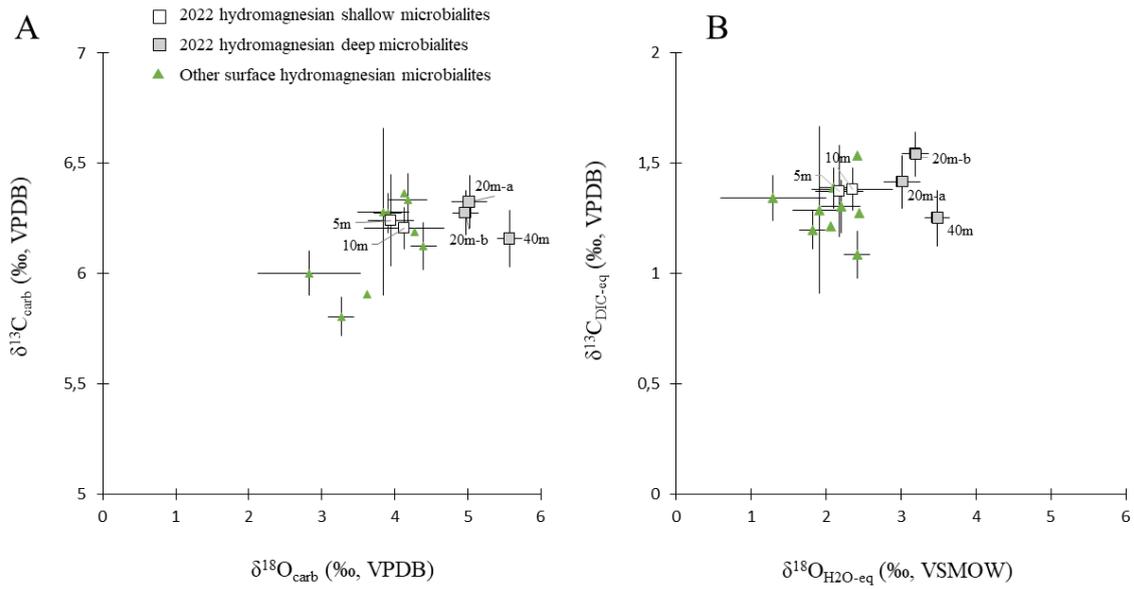


**Figure 4.14.**

**Comparison of hydromagnesite (H)-aragonite (A) interfaces in shallow and deep Alchichica microbialites.** (A, B, C) SEM images in the backscattered electron mode of a 10-m-deep microbialites (sampled in 2019 for images A and C, and 2022 for the image B). The aragonite (A)-hydromagnesite (H) interface shows no huntite (Hu). (D) SEM image in the backscattered electron mode of a huntite area between hydromagnesite and aragonite patches in a 40-m-deep microbialite (sampled in 2019). (E) SEM image in the backscattered electron mode of huntite at a hydromagnesite-aragonite interface in a 40-m-deep microbialite (sampled in 2022). (F) EDXS map of the same zone as in image E, showing the Ca-rich zone (yellow, aragonite) vs the Mg-rich zones (blue, hydromagnesite). The intermediate light blue color indicate the presence of huntite; (G) SEM image in the backscattered electron mode of close-up of the images E and F on huntite aggregates (2) at the aragonite (3)-hydromagnesite (1) interface in a 40-m-deep microbialite sampled in 2022. (1) EDXS spectrum of hydromagnesite from image G, (2) EDX spectrum of huntite from image G, (3) EDXS spectrum of aragonite from image G.

*Carbon and oxygen stable isotope signatures of huntite-bearing microbialites*

Microbialite  $\delta^{13}\text{C}_{\text{carb}}$  measured at a bulk scale showed values relatively constant with depth, from 5 to 40 m, averaging  $6.2 \pm 0.1$  ‰. By contrast,  $\delta^{18}\text{O}_{\text{carb}}$  increased markedly from 4.0 to 5.6 ‰ in microbialites collected from above 20 m (without huntite) to below 20 m in depth (with huntite) (Fig. 4.15; Table A4.5, Annexes).



**Figure 4.15.**

**Microbialites bulk carbonate carbon and oxygen isotope compositions (A) and recalculated dissolved inorganic carbon (DIC) and water oxygen isotope compositions at equilibrium with the microbialites (B), modified from Havas et al., in prep.** Green triangles represent the isotopic compositions of shallow microbialites from lake Alchichica composed mainly by hydromagnesite (sampled in 2019). White squares represent the isotopic signatures of shallow microbialites sampled in October 2022 from Lake Alchichica. Grey squares represent the isotopic signatures of deep microbialites sampled in October 2022 from Lake Alchichica. Error bars correspond to standard deviations from a minimum of two replicate analyses.

## Discussion

### *1. Evidence of huntite, a rare carbonate phase, in Lake Alchichica deep microbialites*

Here we unambiguously show the presence of huntite ( $\text{CaMg}_3(\text{CO}_3)_4$ ) in deep ( $\geq 20$  m) microbialites of Lake Alchichica. This is supported by XRD, FTIR, Raman, SEM/STEM-EDXS and TEM-SAED analyses. FTIR was instrumental for evidencing huntite based on diagnostic bands at 870, 891 and  $1502\text{ cm}^{-1}$ . By contrast, because of interferences with other mineral phases, huntite was detected with more difficulty by XRD. Raman microspectroscopy also provided unambiguous evidence for the presence of huntite and allowed to localize it in microbialites at the micrometer-scale. However, the pervasive intense autofluorescence of most modern microbialites due to organics and/or some trace elements prevents the meaningful application of Raman spectroscopy to analyze these structures (Sanchez-Beristain et al., 2010), autofluorescence being often higher than Raman signals. Here, the low autofluorescence of deep microbialites and especially huntite, allowed the unambiguous detection of Raman spectra. Last, SEM-EDXS also provided pieces of diagnostic information for huntite, by evidencing a distinct phase with a Mg/Ca consistent with the stoichiometry of huntite. However, this again requires a fine and at least semi-quantification of chemical analyses. Overall, this suggests that FTIR and Raman spectroscopies are privileged methods for detecting minute amounts of huntite in complex carbonate assemblages and that its presence may be overlooked by incomplete analyses of microbialites.

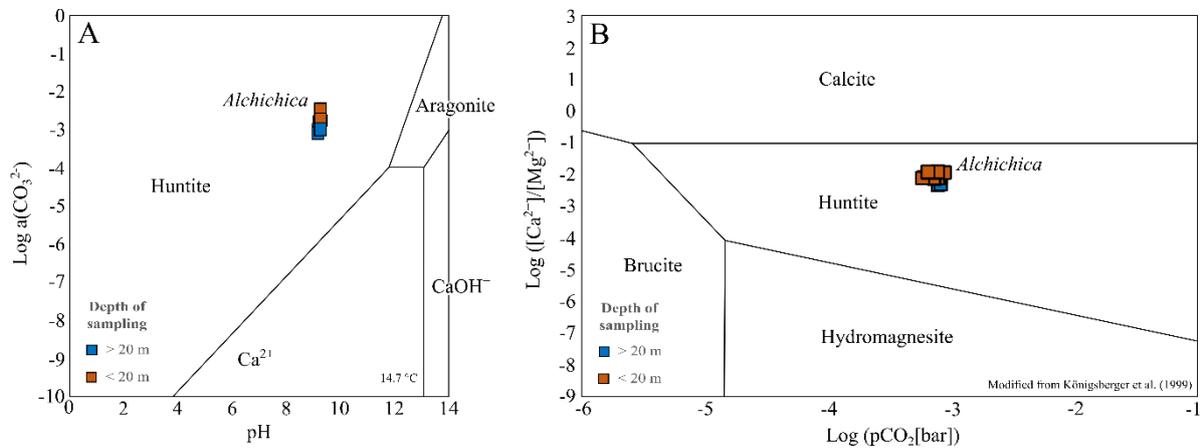
Huntite has been abundantly found in Lake Alchichica microbialites at depths of more than 20 m, although it is an uncommon mineral phase, or at least not well documented. Huntite is a double and ordered carbonate which has been reported mainly in three types of paragenesis (Kinsman, 1967; Faust, 1953; Dollase and Reeder, 1986; Graf and Bradley, 1962): (i) as a near-surface alteration product in magnesium-rich outcrops (*e.g.* in serpentinites and/or dolomites), in which huntite is unlikely to be preserved in the long term because of its presence within the weathering front where late alteration carbonate phases within fractures/porosities can occur after meteoric water percolation (Faust, 1953; Vitaliano and Beck, 1963; Skinner, 1958; Golovanov, 1958, Carpenter, 1961; Andrews et al., 2018; Stanger and Neal, 1994; Zachman, 1989, Bashir et al., 2009). For example, huntite was evidenced in volcanic tuffs associated with magnesite and dolomite resulting from the previous passage of a hydrothermal fluid (Faust, 1953) at Currant Creek, Nevada, and interpreted as a late product of conversion of magnesite within fractures. This is also the case at Gabbs, Nevada, where dolomite and brucite are

converted into huntite after an intermediate precipitation of hydromagnesite (Vitaliano and Beck, 1963); (ii) huntite was also reported as a diagenetic phase in lacustrine sediments sometimes in an evaporative context (Kinsman, 1967; Kuscu et al., 2018). For example, Kinsman (1967) described the presence of huntite at Trucial Coast in the Persian Gulf, in recent supratidal sediments where part of the primary aragonite has been dolomitized. The interstitial solution becomes progressively enriched in salts through evaporation, and huntite is found in contact with halite, anhydrite and gypsum. In this case, huntite is the product of an early diagenesis phase allowing a better preservation over time (Kinsman, 1967); (iii) Last, huntite appears as an authigenic phase in some caves, directly precipitating from a Mg-rich solution (for instance provided by surrounding carbonated rocks) at the surface of an aragonite precursor (Alonso-Zarza and Martin-Perez, 2008; Baron et al., 1959; Thrailkill, 1971). Additionally, huntite has also been shown to precipitate in the laboratory, in contact with bacteria such as *Chromohalobacter marismortui* (Rivadeneira et al., 2006, Davies et al., 1977). The few occurrences of huntite reported so far are thus mainly interpreted as the result of carbonate alteration (early or late stages of diagenesis), or as an authigenic precipitation from a Mg-rich solution. The formation of huntite in microbialites, such as in the deep microbialites from Lake Alchichica, adds to this list. Whether there are only few reports of this phase because of the difficulty to detect and identify it, and/or because it requires unusual environmental conditions to be precipitated remains to be determined.

## 2. Formation mechanisms and conditions of huntite formation in Lake Alchichica deep microbialites

### 2.1 Primary formation of aragonite and hydromagnesite in Lake Alchichica microbialites is likely kinetically controlled

In order to assess the stability of the different mineral phases present in the Alchichica microbialites, the solutions of the lake Alchichica water column were plotted in two stability diagrams: one representing the activity of  $\text{CO}_3^{2-}$  anions (in Log) as a function of pH and the second one the  $\text{Log}([\text{Ca}^{2+}]/[\text{Mg}^{2+}])$  as a function of  $\text{Log}(p\text{CO}_2[\text{bar}])$  (modified from Königsberger et al., 1999) (Fig. 4.16).

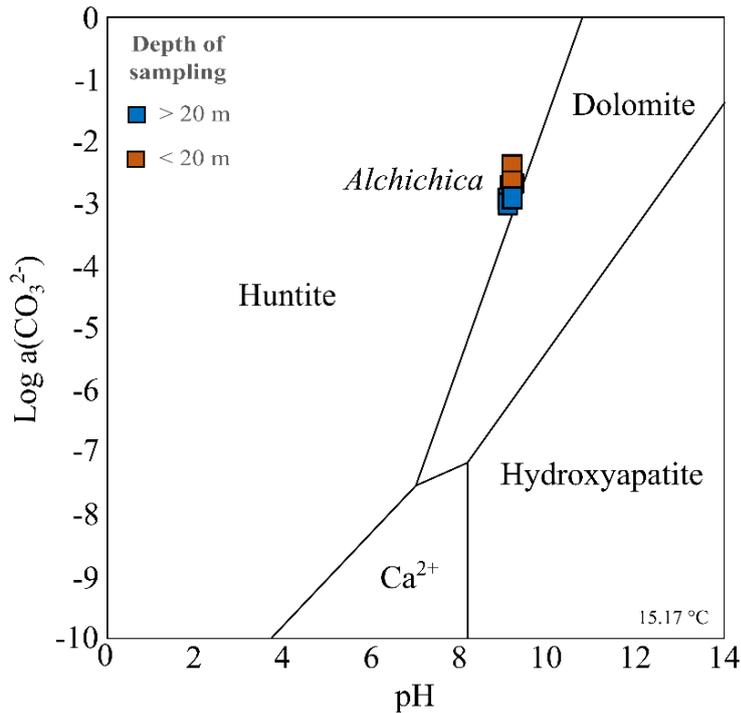


**Figure 4.16.**

**Stability diagrams for Lake Alchichica solutions sampled in 2019 and 2022 (respectively beginning and late water column stratification).** (A) Stability diagram of mineral phases as a function of pH vs. logarithm of carbonate ion activity, produced with the GWB Community software. Note that the solutions from the shallow water column of Lake Alchichica are represented by the blue squares and the deeper solutions are represented by the orange squares. All samples from the water column are distributed within the huntite stability range. (B) Stability diagram of mineral phases as a function of the logarithm of  $p\text{CO}_2$  (bar) vs. the logarithm of the Ca/Mg ratio. This diagram is modified from figure 5.b. of Königsberger et al. (1999).

All the solutions appeared inside the huntite stability range versus aragonite, calcite and hydromagnesite stability ranges. Additionally, we also noticed that huntite is more likely to be formed than dolomite under these thermodynamic conditions, even if Lake Alchichica solutions are close to the huntite-dolomite boundary (Fig. 4.17). Therefore, under the thermodynamic conditions prevailing in Lake Alchichica, primary huntite should precipitate in microbialites, at all depths. However, a metastable aragonite-hydromagnesite assemblage is observed in all microbialites instead (Kaźmierczak et al., 2011; Gérard et al., 2013; Zeyen et al., 2021). This suggests that other parameters affect the kinetics of carbonate precipitation in the microbialites,

preventing the precipitation of a more stable phase, similarly to what has been shown for dolomite for example (Rhada et al., 2012). Conversely, it was proposed that aragonite precipitation in the Alchichica microbialites may be favored by the presence of specific members of microbial communities, namely *Pleurocapsa*-like cyanobacteria, which would be able to favor extracellular aragonite precipitation or act as nucleation centers in specific local environmental conditions (Gérard et al., 2013; Couradeau et al., 2013).



**Figure 4.17.**

**Stability diagram of mineral phases as a function of pH vs. logarithm of carbonate ion activity, produced with the GWB Community software.** This diagram shows the stability range of dolomite instead of aragonite. Note that the solutions from the shallow water column of Lake Alchichica are represented by the blue squares and the deeper solutions are represented by the orange squares. All samples from the water column are distributed within the huntite stability range.

## 2.2 Huntite forms secondarily through aragonite and hydromagnesite destabilization

Textural observations in Lake Alchichica deep microbialites suggest that early diagenesis transformations result in the formation of huntite through the destabilization of aragonite and hydromagnesite (Fig. 4.10B, 4.13D, 4.14D). This is especially shown by the preferential distribution of huntite in reactive fronts progressing from aragonite layers within hydromagnesite patches, in association with fractures. While huntite was only found in deep microbialites, fracturing, pressure-dissolution patterns, cementation and secondary porosity were observed in all the studied shallow and deep microbialites. These features may favor the

transformation of the hydromagnesite-aragonite assemblages at depth. For example, mechanical alterations, such as the fracturing of primary deposits, increase the water/rock ratio inside the microbialite by accelerating the infiltration of water into the carbonates (de Boever et al., 2017). It is also possible that increasing pressure at depth can influence the size and abundance of fractures, and thus further increase the water/rock ratio. Coupled or not with this mechanical alteration, the dissolution of primary carbonates can either enlarge the pore network or enable the re-precipitation of another carbonate in contact with a local fluid. This is the case for the aragonitic cements visible inside/near the fractures at all depths in the microbialites. This shows that if these mechanical transformations are necessary for huntite formation to occur, they are not sufficient and that early diagenesis can occur differentially in microbialites, depending on their depth.

We also note that some huntite patches were crosscut by cracks filled by hydromagnesite (Fig. A4.4, Annexes). Two hypotheses can be proposed: (i) some huntite was primary. However, no occurrence of primary huntite has been observed in other microbialites, including very young ones from the surface (2-year-old), grown on incubated substrates for two years, and which were composed of hydromagnesite and aragonite (Iniesto et al., 2021). Moreover, the distribution of huntite as reactive fronts between hydromagnesite and aragonite and/or close to fractures suggests that at least some of it is secondary. (ii) An alternative hypothesis is that once formed, secondary huntite can also be affected by ongoing fracturing and resulting fractures get filled by hydromagnesite which spontaneously precipitates from the water solution.

### 2.3 Conditions favoring the formation of huntite in deep microbialites

Based on the coexistence of aragonite, hydromagnesite and huntite in deep microbialites at Alchichica, we propose that aragonite and hydromagnesite are the direct precursors of huntite during early diagenesis as shown by reaction (1):



Specific conditions may favor this reaction going towards huntite formation since it is observed in deep microbialites only.

Based on reaction (1), acidification of the solution may favor aragonite-hydromagnesite destabilization. However, no significant decrease of the pH was observed with depth, at least at

the water column scale. Similarly, based on reaction (1) an increase in  $[\text{HCO}_3^-]$  should favor huntite formation. Again, no such variation was observed at the scale of the water column, at least at the time when it was sampled. This is consistent with the fact that Lake Alchichica has a high pH-buffer capacity due to high DIC concentrations (Havas et al., 2023a). Alternatively, Müller, Irion and Förstner (1972) showed that the identity of the carbonate phase primarily formed in lakes depends on the Mg/Ca ratio of the solution from which it precipitates. In the case of huntite precipitation, they propose that a Mg/Ca ratio higher than ~40 is necessary. However, this condition is again met over the entire water column of Alchichica (Mg/Ca ratio= 78-100) and is therefore insufficient to explain the precipitation of huntite at depths  $\geq 20$  m only.

Solution samples at all depths were distributed close to the amorphous calcium and magnesium carbonates solubility lines and therefore the whole Lake Alchichica water column was supersaturated with respect to both aragonite and hydromagnesite (Fig. 4.3). Only the solutions sampled at the oxycline in October 2022 (late stratification of the water column) underwent a drastic rise of the SI with respect to huntite (Fig. 4.1). One hypothesis is that this increase may favor huntite formation at these depths and at specific periods according to the progress of the seasonal stratification. However, the reproducibility of these measurements over the years as well as the vertical movement of this SI front during the establishment of the stratification need to be verified, since these conditions have only been observed over a single period.

Overall, since the formation of huntite may not be explained by global chemical changes at the scale of the water column, more local chemical fluctuations might be involved. Here, we propose that the transformation of aragonite and hydromagnesite into huntite depends mainly on conditions achieved within the microbialite porosity. In other words, ion activities and/or pH in the vicinity and/or inside the microbialites could be different compared with the global chemical parameters measured in the water column. These conditions may be impacted by the microbial communities thriving at the surface of microbialites and differences in the functioning of these communities between shallow (oxic conditions) and deep (seasonally anoxic conditions) microbialites may overall trigger the achievement of different chemical conditions (*e.g.*, pH decrease and/or a  $[\text{HCO}_3^-]$  increase), favoring huntite formation at depth. This speculative scenario will require more detailed analyses of the microbial-mineral phase interactions in the deep microbialites.

### *3. Implications for the preservation of primary carbonate signatures in Lake Alchichica deep microbialites*

Shallow microbialites show a relatively strong green luminescence. Tang and Dobbs (2007) observed a similar green luminescence, referred to as a non-specific green autofluorescence (GAF) that they attributed to variably degraded photosynthetic pigments. Similarly, the luminescence of Alchichica microbialites share the same spectral properties as those of the biogenic calcite characterized by Pedone et al. (1990), which was also attributed to the presence of organic matter (Fig. 4.9J, -K, -L). By contrast, the observed luminescence is significantly different from that activated by trace elements such as  $Mn^{2+}$  in calcite. Overall, this suggests that luminescence in Alchichica microbialites results from some organic components. This could explain the higher intensity of this green luminescence in aragonite, since it has been shown that this phase is associated with Pleurocapsales biofilms in Alchichica microbialites and the luminescence could therefore be related with degrading cell pigments. We have observed that the luminescence signal in Alchichica microbialites drastically decreased with depth, especially after the formation of huntite that showed no intense autofluorescence. Overall, this suggests that the diagenetic replacement of aragonite by huntite may be accompanied by a loss and/or transformation of the organic matter (at least degraded/different pigments) originally fossilized within aragonite-rich patches. Similarly, the absence of autofluorescence in the recrystallized aragonitic cement sealing the volumes between detrital grains and the fractures, and the decrease of autofluorescence intensity in hydromagnesite with depth may also concur to a global loss of luminescence during early diagenesis.

Isotopic compositions of carbonates are another feature often used to infer paleoenvironmental conditions. Therefore, it is important to question their evolution upon the transformation of primary carbonates into huntite. On a  $\delta^{13}C_{carb}-\delta^{18}O_{carb}$  diagram, the huntite-bearing microbialites plot separately from the non-huntite-bearing ones (Fig. 4.15A). The isotopic compositions of waters from which microbialite carbonates precipitated ( $\delta^{13}C_{DIC-eq}$  and  $\delta^{18}O_{H_2O-eq}$ ) can be calculated based on the assumption of isotopic equilibrium, known solution-solid fractionation factors and temperature at which this occurs. These  $\delta^{13}C_{DIC-eq}$  and  $\delta^{18}O_{H_2O-eq}$  also differ between microbialites above and below 20 m (Fig. 4.15B). A difference of  $\sim 6$  °C in temperature between surface and bottom lake waters would be required to explain such a  $\delta^{18}O_{carb}$  offset observed from microbialites at 5 to 40 m in depth. This is not consistent with the observed  $\sim 2$  °C temperature difference between surface and bottom lake waters. Moreover, the measured water oxygen isotope composition in the stratified water column did not evolve with

depth (Havas et al., in prep). This suggests that differences in the microbialites  $\delta^{18}\text{O}_{\text{carb}}$  are not related to isotopic variations of the lake water reservoir but may trace local processes/fluids instead.

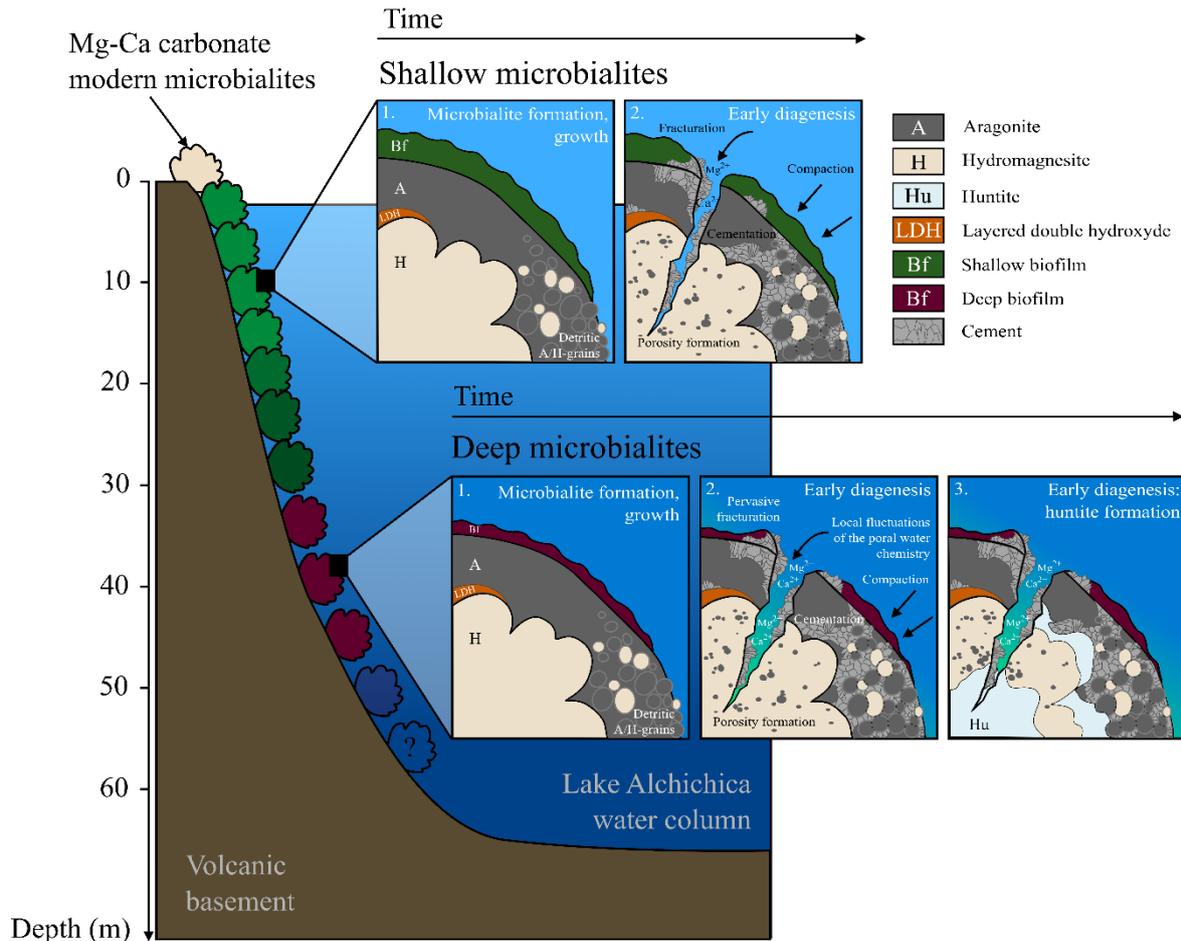
Several hypotheses may explain the local  $^{18}\text{O}$ -enrichment of huntite-bearing microbialites. The O and C isotopic fractionation factors induced by huntite precipitation have not been determined yet and may be different than those for aragonite and hydromagnesite. Considering the stoichiometry of equation (1), the C atoms of huntite are mostly from aragonite and hydromagnesite (with a small addition of dissolved bicarbonate) explaining why C isotopes may remain conservative upon huntite formation and huntite-bearing microbialites have bulk  $\delta^{13}\text{C}_{\text{carb}}$  values indistinguishable from other microbialites. By contrast, O in huntite is only a fraction of O in the different functional groups ( $-\text{CO}_3$ ,  $-\text{OH}$  and  $-\text{H}_2\text{O}$ ) composing hydromagnesite and the remaining fraction distributes separately into  $\text{OH}^-$ , and  $\text{H}_2\text{O}$  molecules (equation 1). This may generate isotopic fractionation and exchanges of O isotopes in the microbialites porosity upon hydromagnesite-aragonite transformation into huntite, explaining why huntite-bearing microbialites harbor slightly different  $\delta^{18}\text{O}_{\text{carb}}$  compared with other microbialites (Fig. 4.15). Overall, the C isotope composition may be preserved upon huntite formation but not the O isotope composition, calling for great care when interpreting the oxygen isotope signal of huntite.

## **Conclusion**

Deep microbialites in the seasonally stratified lake Alchichica contain huntite, a rare carbonate phase. This rare phase was unambiguously detected with several techniques including FTIR, XRD, Raman, SEM-EDXS and TEM. Huntite is mainly distributed at the interface between aragonite and hydromagnesite, as well as alongside fractures. These observations suggest an early diagenetic replacement of aragonite/hydromagnesite by huntite. However, the presence of huntite only in deep microbialites imply that microbialites of the Lake Alchichica undergo a differential early diagenesis depending on their depth.

Like for dolomite, the conditions affecting the kinetics of huntite precipitation at low-temperature are not well understood. For example, it is not clear why huntite forms solely at depth since only slight global variations of the chemistry are observed across the water column. Alternatively, conditions favoring the formation of huntite may be restricted to the interstitial water within deep microbialites, possibly in connection with the metabolic activity of their associated microbial communities.

Based on textural observations achieved in this study, the following sequence of events resulting in the formation of huntite in the deep microbialites can be suggested (Fig. 4.18): (i) Slight compaction of the microbialites, involving pressure-dissolution processes, inter-/intragranular aragonitic cementation and secondary porosity formation; (ii) Fracturing of the aragonite at the surface of the microbialites, allowing infiltration of magnesium-rich pore water into the microbialites; (iii) Alteration of fractured aragonite and hydromagnesite by the pore water, which is more intensive in deep microbialites. Through these alterations, the pore solution is enriched in calcium and magnesium ions; (iv) Precipitation of huntite which replaces the initial aragonite and hydromagnesite, increasing the total porosity. Given the cyclicity of the mixing/stratification periods in Lake Alchichica that influence the lake chemistry and the variety of early diagenetic processes in microbialites, it is likely that several steps described in the proposed sequence occur simultaneously and/or repeat seasonally.



**Figure 4.18.**

**Summarizing sketch of the early diagenesis sequence occurring in shallow and deep Lake Alchichica microbialites.** All microbialites (shallow and deep) undergo early diagenesis processes such as fracturation, compaction, cementation and secondary porosity formation (step noted 2.). In the deep microbialites ( $\geq 20$  m depth), the formation of huntite occurs by replacing the two main carbonate phases aragonite and hydromagnesite alongside the fractures and at their interfaces (step noted 3.).

Currently, the oldest huntite has been found in sediments dated to the Upper Cretaceous, but it is unclear whether it formed during the deposition of these sediments or later on, during a secondary alteration stage (Calvo, Stamatakis and Magganas, 1995; Wolberg et al., 1989; Bellis and Wolberg, 1989). Whether huntite could be preserved over geological timescales, conserving traces of such early diagenetic transformations in ancient microbialites remains an open question. Moreover, documenting more cases where huntite may replace primary carbonates in modern microbialites would be necessary to better assess the rarity/distribution of this phase for example as a function of oxygenation conditions, evaluate the probability to find it in ancient rocks and provide further guidelines to look for it.

## **Acknowledgments**

This project received financial support from the CNRS through the ANR Microbialites and the MITI interdisciplinary programs. We would like to thank Olivier Beyssac for the Raman data acquisition, Christophe Durllet and Laurane Fogret for the XRF map acquisitions. We also thank the IMPMC analytical platforms that allowed the data acquisitions: Ludovic Delbes for the XRD, Maxime Guillaumet for the FTIR, Béatrice Doisneau, Stéphanie Delbrel and Imène Estève for the FIB/SEM support, Béatrice Doisneau and Jean-Michel Guigner for the TEM, and the CLSM platform. JC is funded by a grant from the Interface pour le vivant doctorate programme at Sorbonne Université.

### 3. Données supplémentaires : comparaison avec les microbialites d'Atexcac

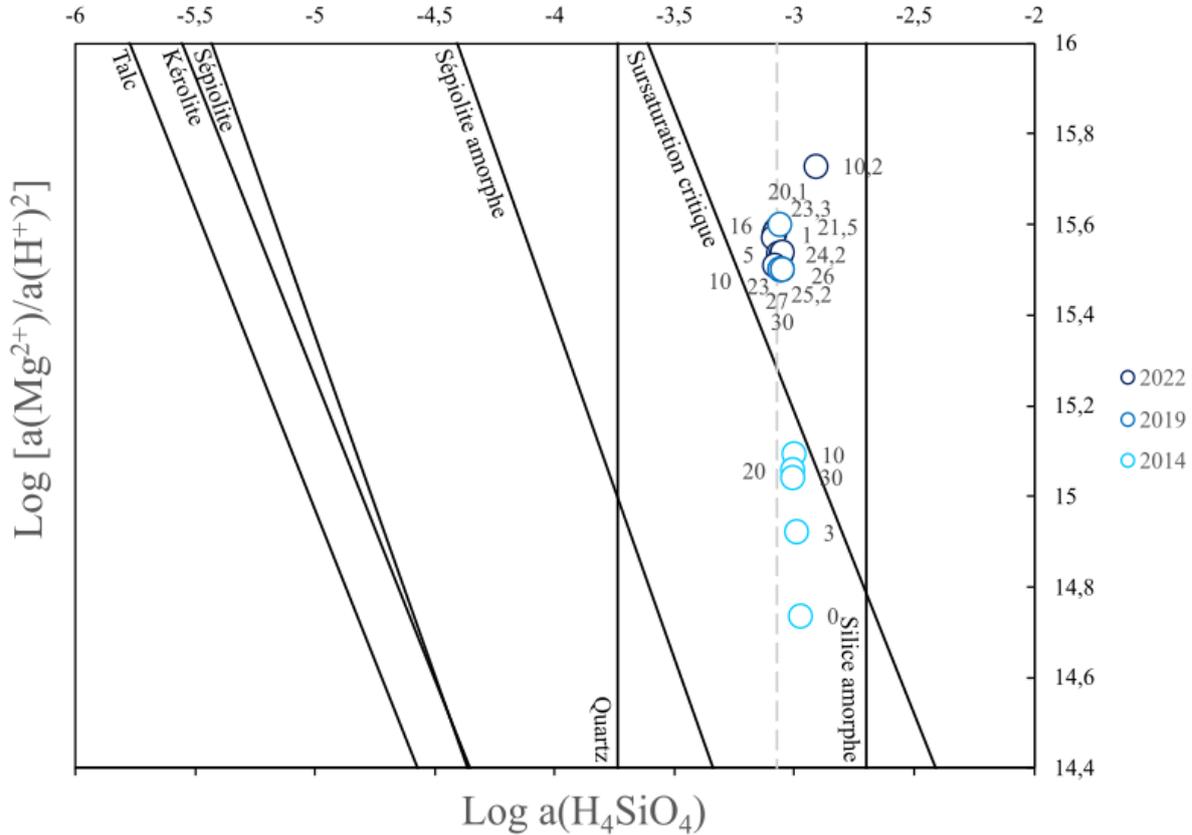
A Atexcac, les structures minéralogiques des microbialites de surface et peu profondes ont déjà été étudiées. Des analyses en FTIR, DRX, SEM-EDXS et STXM avaient attesté de la dominance d'aragonite et de silicates de magnésium hydratés peu cristallisés (Zeyen et al., 2015). Notamment, les auteurs avaient montré la préservation remarquable des microfossiles par les silicates de magnésium quasi-systématiquement en association avec du carbone organique (Zeyen et al., 2015). Cette étude allait également dans le sens d'un modèle de remplacement des silicates de magnésium par l'aragonite sur la base d'observations en microscopie (Zeyen et al., 2015), comme cela a aussi été proposé pour d'autres cas (Lac Clifton, en Australie, Burne et al., 2014). Toutefois, les produits d'altération des phases minérales dans les microbialites, apparentés à la diagenèse précoce par exemple, n'avaient pas encore été beaucoup documentés pour le lac Atexcac.

#### 3.1 Biogéochimie de la colonne d'eau

Les caractéristiques géochimiques de la colonne d'eau du lac Atexcac par rapport à la silice ont été très brièvement reprises dans cette partie. La colonne d'eau du lac étant riche en acide orthosilicique, les solutions de formation des microbialites à toutes les profondeurs sont sursaturées non seulement par rapport à la sépiolite amorphe, mais dépassent également le seuil de nucléation homogène des silicates de magnésium dit « supercritique » pour les échantillons de 2019 et de 2022 (Tosca et al., 2011) (Fig. 4.19). De manière frappante, les échantillons d'eau se distribuent selon une ligne verticale dans le diagramme de solubilité des silicates, entre les lignes de solubilité du quartz et de la silice amorphe et indépendamment de leur profondeur.

En parallèle, des efflorescences de diatomées ont été observées annuellement dans la colonne d'eau à la fin de la période de mélange du lac et en début de période de stratification, au moment où la température commence à augmenter (Alcocer et al., 1998). Spécifiquement, des analyses en métabarcoding sur les communautés procaryotes et eucaryotes planctoniques du lac Atexcac ont montré que les diatomées pouvaient représenter 80 % du total des séquences assignées, au moins à 3 m de profondeur (Iniesto et al., 2022). Par conséquent, une possibilité est que la présence et les cycles de vie des diatomées dans le lac Atexcac puissent influencer la géochimie de sa colonne d'eau (et peut-être celle des sédiments aussi). En particulier, il est envisageable que la valeur du logarithme de l'activité de  $H_4SiO_4$  sur laquelle sont alignés les

échantillons d'eau observés sur la figure 4.19 correspond à la solubilité moyenne des frustules des diatomées du lac. Dans ce cas, une hypothèse pourrait être que, au moins pendant une partie de l'année, la précipitation/dissolution de la silice des frustules de diatomées contrôle la concentration en acide orthosilicique de la solution de formation des microbialites à Atexcac. Le pH et/ou l'activité du  $Mg^{2+}$  en revanche varient au cours du temps.



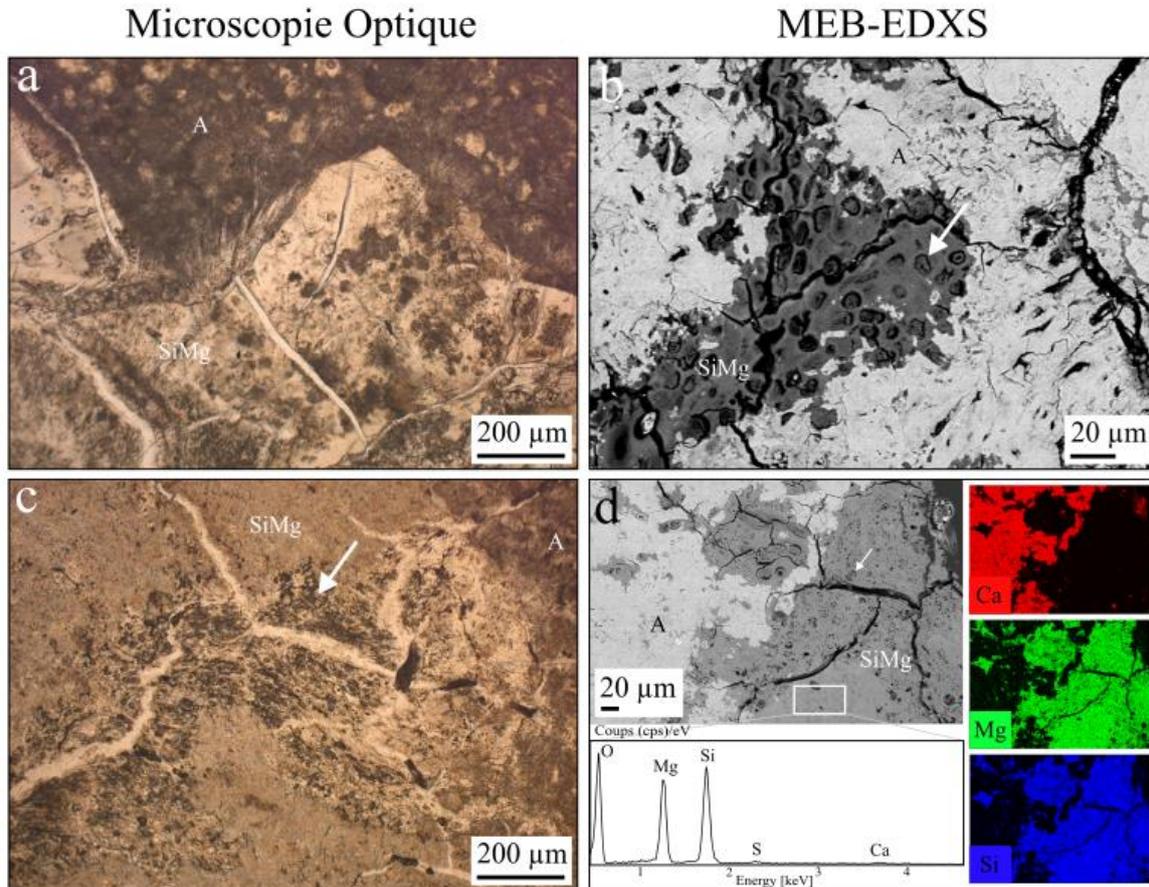
**Figure 4.19.** Diagramme de solubilité des silicates dans lequel sont distribués les échantillons de la colonne d'eau d'Atexcac. Chaque ligne pleine noire représente la solubilité d'une phase. Les échantillons de la colonne d'eau (cercles bleus) sont représentés pour 2014, 2019 et 2022 par leur logarithme de l'activité du magnésium sur l'activité des protons au carré en fonction de leur logarithme de l'activité de l'acide orthosilicique. La profondeur de chaque échantillon est affichée à côté du point. La ligne verticale grise en pointillée représente une solubilité théorique sur laquelle les échantillons sont alignés.

### 3.2 Altérations/modifications des phases minérales dans les microbialites d'Atexcac

#### Fracturation

Comme pour les microbialites du lac Alchichica, les microbialites à Atexcac présentent des signes d'altérations des phases minérales comme de la fracturation (Fig. 4.20). Dans les échantillons observés, les fractures affectent très majoritairement les silicates de magnésium, avec une présence plus répandue en surface des microbialites. En parallèle, des structures biogéniques sont visibles sur les bordures de zones fracturées. Notamment, plus on s'enfonce à

l'intérieur des microbialites, plus les biofilms présentent un encroûtement prononcé par les silicates de magnésium puis l'aragonite. De plus, des microfossiles de cyanobactéries et de diatomées sont particulièrement abondants sur les bords des fractures (Fig. 4.20).



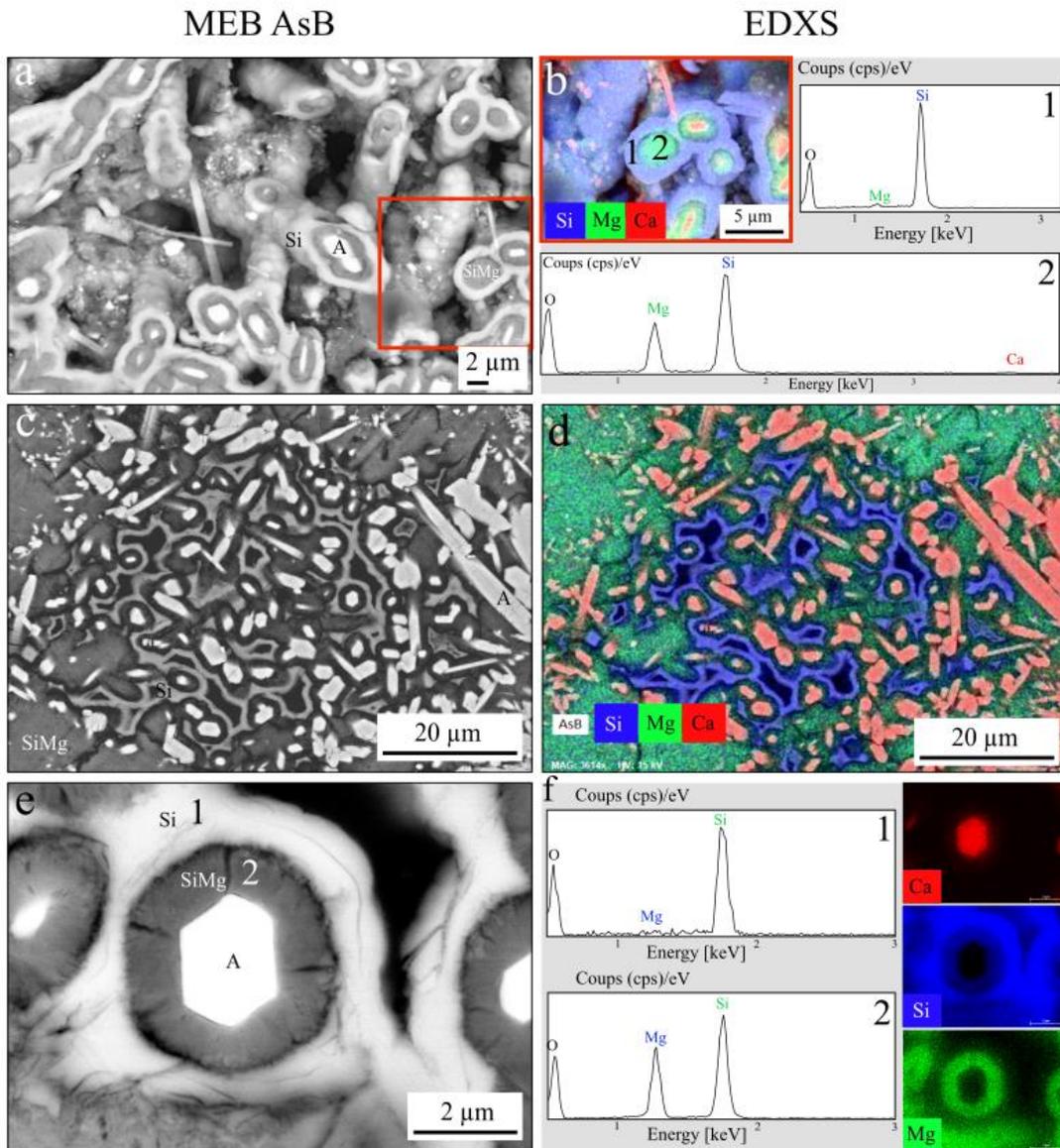
**Figure 4.20.**

**Fracturation et microfossiles sur les bordures des fractures dans les microbialites d'Atexcac composée de silicates de magnésium (SiMg) et d'aragonite (A).** (a) Image en microscopie optique d'un échantillon de 15 m de profondeur montrant une zone fracturée de silicates de magnésium à côté d'une zone sombre aragonitique ; (b) Image MEB en électrons rétrodiffusés de silicates de magnésium (phase en gris foncé) enrichis en microfossiles (flèche blanche) sur les bords d'une fracture, entourés par de l'aragonite (phase en blanc) dans un échantillon de 20 m de profondeur ; (c) Image zen microscopie optique d'une zone fracturée dans les silicates de magnésium enrichie en microfossiles (flèche blanche) dans un échantillon de 20 m de profondeur ; (d) Image MEB en électrons rétrodiffusés d'une zone fracturée de silicates de magnésium avec des microfossiles (flèche blanche) à côté d'une zone peu fracturée d'aragonite. A droite se trouvent les cartographies élémentaires associées en EDXS du calcium (rouge), magnésium (vert) et silice (bleu). En-dessous se trouve le spectre EDXS acquis sur la zone entourée par un rectangle blanc dans l'image en électrons rétrodiffusés.

### *Silicification*

De manière intéressante, l'échantillon de 15 m de profondeur prélevé en 2019 présente un encroûtement des structures minérales déjà formées dans les microbialites par une phase siliceuse sans magnésium, venant recouvrir les silicates de magnésium (Fig. 4.21). Par endroits,

cette silicification secondaire recouvre des structures tubulaires (de 10 à 20  $\mu\text{m}$  de longueur) formées par des fibres d'aragonite entourées de silicates de magnésium (Fig 4.21a, -b).

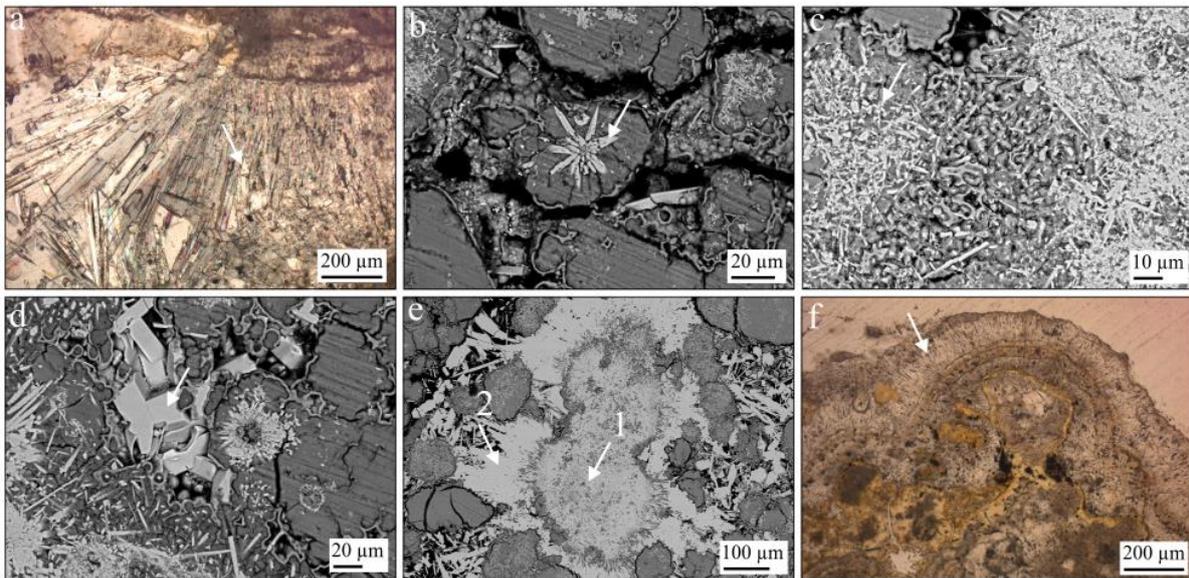


**Figure 4.21.**

**Précipitation de silice sans magnésium (Si) dans un échantillon de microbialite d'Atexcac prélevé à 15 m de profondeur présentant des silicates de magnésium (SiMg) et de l'aragonite (A).** (a) Image MEB en électrons rétrodiffusés d'aiguilles d'aragonite entourées par des silicates de magnésium eux-mêmes encroûtés dans une phase de silice sans magnésium ; (b) Cartographie élémentaire en MEB-EDXS sur la zone entourée par un rectangle rouge dans l'image a avec les spectres 1 et 2 associés respectivement à la silice (1 sur la cartographie EDXS) et aux silicates de magnésium (2 sur la cartographie EDXS) ; (c) Image MEB en électrons rétrodiffusés d'une zone présentant des silicates de magnésium et des aiguilles d'aragonite entourés par une phase de silice sans magnésium ; (d) Cartographie élémentaire MEB-EDXS de la zone correspondant à l'image a avec le calcium en rouge, la silice en bleu et le magnésium en vert ; (e) Image MEB en électrons rétrodiffusés d'un zoom sur un cristal d'aragonite entouré par une phase de silicates de magnésium puis par une phase de silice ; (f) Spectres et cartographies élémentaires du calcium, de la silice et du magnésium en EDXS de la zone de l'image e. Le spectre 1 correspond à la silice numérotée 1 sur l'image e. Le spectre 2 correspond aux silicates de magnésium notés 2 sur l'image e.

*Cimentations/précipitations aragonitiques*

Les microbialites d'Atexcac présentent de plus une proportion non négligeable de cimentation par l'aragonite (Fig. 4.22). Plusieurs types de précipitations ont été observés : (i) de l'aragonite fibreuse précipitant dans les fractures recoupant les silicates de magnésium, notamment sur les bords des microbialites, mais aussi en surface des biofilms (Fig. 4.22a, -f). En microscopie optique, cette cimentation n'apparaissait pas sombre comme pouvait l'être l'aragonite précédemment observée, mais elle était biréfringente. (ii) De l'aragonite fibreuse également formée dans une matrice de silicates de magnésium avec des fibres rayonnant à partir d'un centre de nucléation (Fig. 4.22b). (iii) Des aiguilles très fines d'aragonite pouvant mesurer plus de 25  $\mu\text{m}$  de long, distribuées dans les échantillons parfois en les recoupant et parfois en étant encroûtées par les silicates de magnésium notamment dans les échantillons de 15 m de profondeur (Fig. 4.22c). (iv) De l'aragonite sparitique colmatant la porosité des microbialites avec des cristaux d'environ 15  $\mu\text{m}$  de long, dont la forme peut s'adapter aux formes arrondies des silicates de magnésium (Fig. 4.22d). (v) Enfin, des nodules d'aragonite inférieurs à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre, formés dans des grains de silicates de magnésium, sans structure particulière visible (Fig. 4.22e).



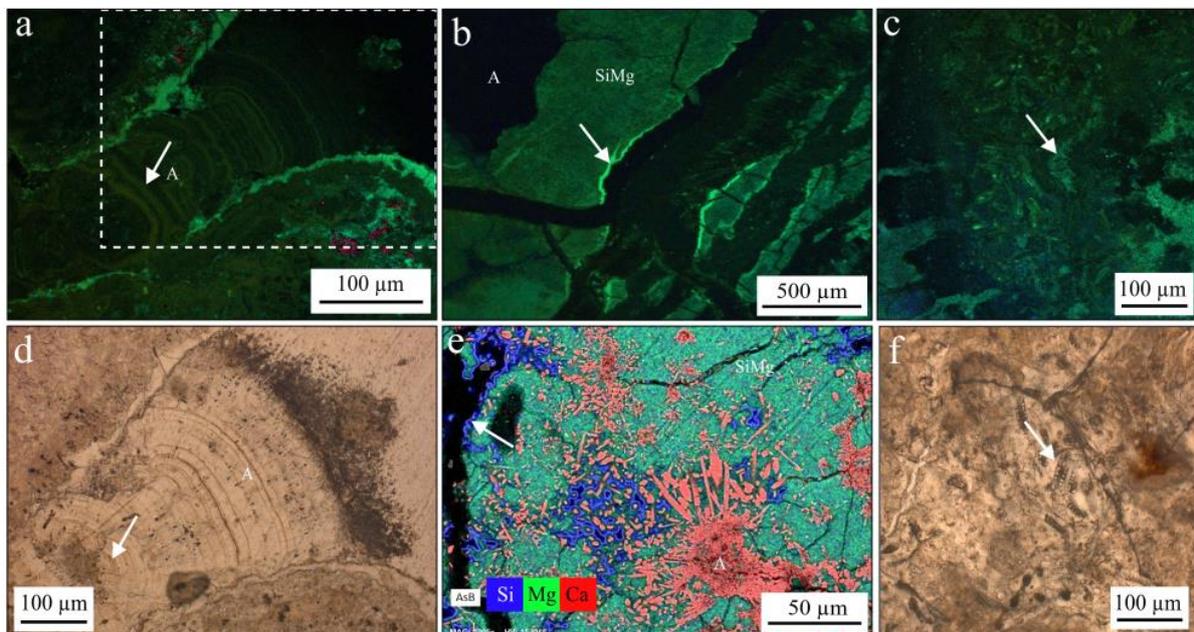
**Figure 4.22.**

**Différents types de cimentations aragonitiques dans les microbialites d'Atexcac de 15 et 20 m de profondeur.** (a) Image en microscopie optique d'une cimentation fibreuse (flèche blanche) d'aragonite à l'intérieur d'une fracture dans des silicates de magnésium ; (b) Image MEB en électrons rétrodiffusés d'une précipitation d'aiguilles d'aragonite concentriques (flèche blanche) à l'intérieur d'une matrice de silicates de magnésium ; (c) Image MEB en électrons rétrodiffusés de précipitations d'aiguilles d'aragonite sans orientation préférentielle dans des phases minérales siliceuses ; (d) Image MEB en électrons rétrodiffusés montrant (flèche blanche) des cristaux d'aragonite sparitique formant un ciment dans une porosité, entre autres précipitations aragonitiques ; (e) Image MEB en électrons rétrodiffusés de précipitations de plages d'aragonite au sein d'un grain de silicate de magnésium (flèche blanche

numéro 1) et de précipitations fibreuses d'aragonite autour de ce grain (flèche blanche numéro 2) ; (f) Image en microscopie optique d'aragonite fibreuse précipitant au-dessus des reste d'un biofilm à la surface de l'échantillon.

### 3.3. Conservation des signatures bio/minéralogiques après/au cours de la diagenèse

Quelques images ont été produites en confocal sur les microbialites de 15 et 20 m de profondeur à Atexcac (Fig. 4.23). Les échantillons présentent une émission sur une gamme de fluorescence entre 480 et 680 nm environ comme pour ceux d'Alchichica, avec un pic de fluorescence dans le vert autour de 530 nm. La fluorescence paraît significativement plus élevée dans les silicates de magnésium et certaines phases d'aragonite. Spécifiquement, la figure 4.23a-d montre une plus forte fluorescence dans des lamines aragonitiques sur une zone de surface d'un échantillon de 20 m de profondeur. Par ailleurs, ce sont les bordures des échantillons contenant une abondance de microorganismes encroûtés qui atteignaient le maximum de fluorescence (Fig. 4.23b). Ces bordures pouvaient soit correspondre à de l'aragonite soit par exemple à la phase siliceuse sans magnésium. De plus, des grossissements sur des zones contenant des microfossiles de diatomées montraient une préservation d'une partie de la fluorescence dans leurs structures (Fig. 4.23). A l'inverse, les phases recristallisées comme le ciment aragonitique présent dans les fractures n'a pas, ou très peu, d'autofluorescence.



**Figure 4.23.**

**Autofluorescence des échantillons de microbialites d'Atexcac provenant de 15 et 20 m de profondeur et présentant des phases de silicates de magnésium (SiMg) et d'aragonite (A) notamment.** (a) Image en confocal de la fluorescence d'une zone de surface d'un échantillon de 20 m de profondeur présentant un cône de précipitation aragonitique. La flèche blanche montre des lamines potentiellement enrichies en matière organique où la fluorescence est plus intense. Les bordures de

l'échantillon présentent également une forte fluorescence et certains microfossiles de cyanobactéries en bas à droite présentent une émission de fluorescence dans le rouge ; (b) Image en confocal de la fluorescence d'une zone provenant d'un échantillon de 15 m de profondeur. Les bordures d'une zone fluorescente de silicates de magnésium fracturés présentent une fluorescence plus intense (flèche blanche) ; (c) Image en confocal de la fluorescence d'une zone riche en microfossiles provenant d'un échantillon de 20 m de profondeur. La fluorescence est plus marquée sur les contours des microfossiles de diatomées (flèche blanche) ; (d) Image en microscopie optique de la zone entourée par un rectangle blanc en pointillé dans l'image a ; (e) Cartographie MEB-EDXS d'une zone provenant d'un échantillon de 15 m de profondeur dans laquelle des phases contenant uniquement de la silice sont présentes à la surface de la microbialite (flèche blanche). Cette image ne correspond pas à la zone de l'image b, elle a été mise pour comparaison avec la bordure riche en silice ; (f) Image en microscopie optique de la zone correspondant à celle de l'image c.

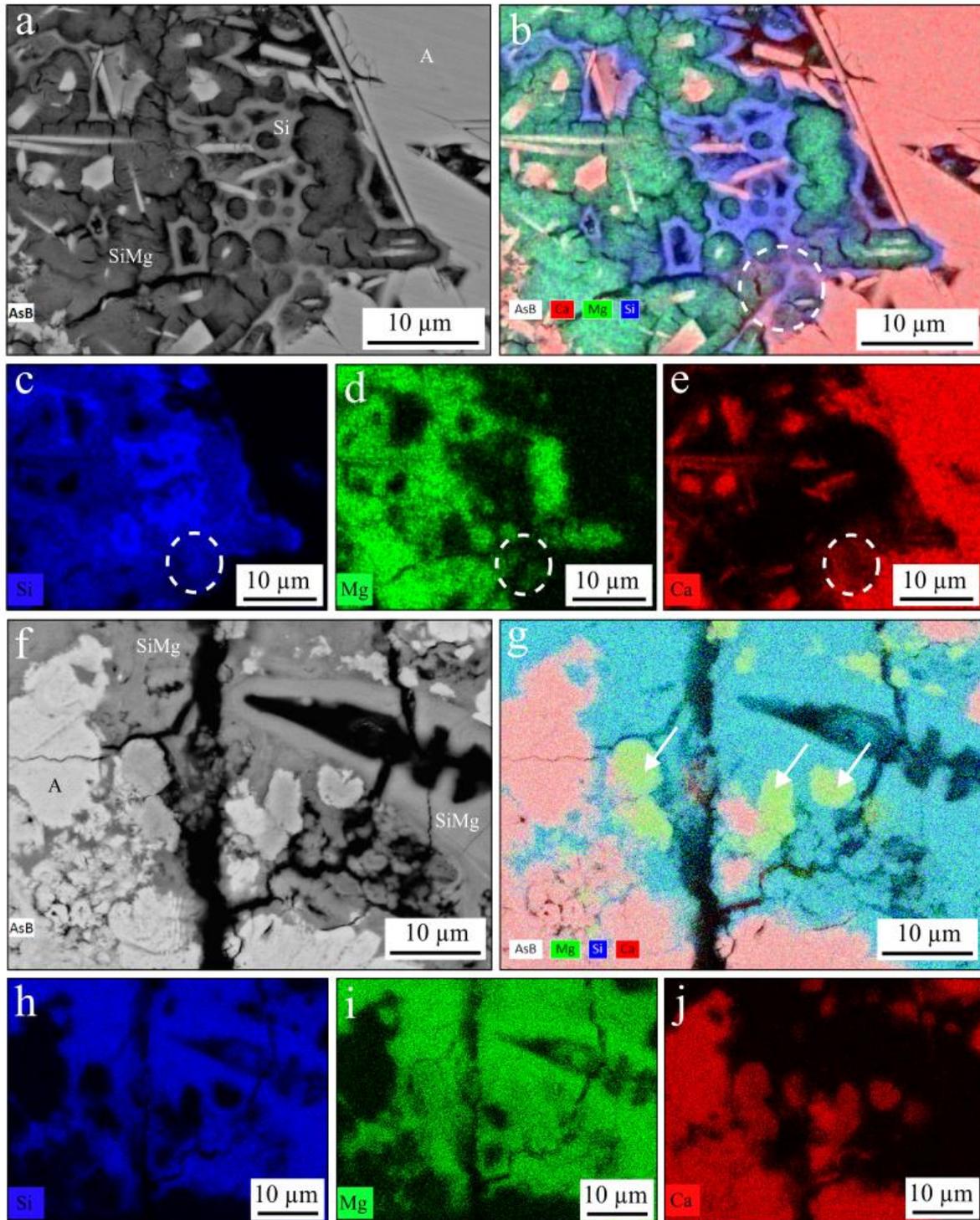
### *3.4. Hypothèses sur les étapes de diagenèse*

D'après les observations en microscopies optique et électronique de quelques échantillons de microbialites d'Atexcac, il semble que l'aragonite soit moins affectée par la fracturation que les silicates de magnésium (alors qu'à Alchichica, l'aragonite était plus fracturée que les autres carbonates de magnésium/calcium). Une partie de cette observation pourrait être expliquée par le colmatage secondaire des fissures par du ciment sparitique ou micritique dans les zones riches en aragonite, ce qui visuellement rendrait moins dense la fracturation visible dans ces zones. Toutefois, certaines des fractures observées en MEB-EDXS sont liées à la préparation de l'échantillon et non à l'altération des phases minérales des microbialites. Dans tous les cas, la fracturation fait partie des nombreux processus regroupés sous le terme de diagenèse précoce qui affecte vraisemblablement aussi les microbialites d'Atexcac.

De plus, une phase de silice sans magnésium a été observée dans l'échantillon de 15 m de profondeur, autour des grains et des autres structures minérales présente dans l'échantillon, ce qui n'avait pas été reporté avant, à notre connaissance. Probablement, à un moment lors de la formation de cette microbialite, la saturation de la solution dans/au voisinage des microbialites a atteint le seuil de solubilité de la silice amorphe. Ceci peut être en lien avec l'équilibre de dissolution/précipitation des frustules de diatomées. De plus, on peut imaginer que, à la mort des diatomées qui font des efflorescences en surface, les frustules sédimentent dans la colonne d'eau et se déposent sur les microbialites, ou alors que les tapis microbiens à 15 m de profondeur contiennent plus de diatomées qu'à d'autres profondeurs par exemple. D'un autre côté, il est possible que cette caractéristique soit également présente à d'autres profondeurs où les silicates de magnésium se font remplacer par l'aragonite. Dans ce sens, nous avons observé dans des cartographies en MEB-EDXS de l'échantillon de 15 m de profondeur des endroits où un gradient entre la silice et l'aragonite est visible, illustré par un mélange du

calcium et de la silice sur les cartographies élémentaires en EDXS (Fig. 4.24a, -b, -c, -d, -e). Mais peu d'échantillons ont été analysés pour Atexcac, donc il sera pertinent de vérifier si cet encroûtement par de la silice sans magnésium se retrouve à d'autres profondeurs dans les microbialites d'Atexcac. De plus, les silicates de magnésium sont peu cristallisés (Zeyen et al., 2015). Des diffractions en SAED au MET sur cette phase permettraient d'évaluer si par exemple la silice est amorphe. Dans quelle mesure cette silicification peut être considérée comme de la diagenèse précoce reste une question ouverte, mais il est probable en tout cas que les mécanismes permettant sa formation soient encore une fois, comme pour les microbialites d'Alchichica, dus à des changements locaux de la chimie de la solution après la précipitation des phases minérales primaires.

En parallèle, plusieurs types de cristallisations/recristallisations aragonitiques ont été observés dans les échantillons d'Atexcac. Ces différences reflètent a priori des différences de conditions de précipitation. En considérant le remplacement des silicates par l'aragonite déjà évoqué par Zeyen et al. (2015) et le fait qu'une grande part des cristaux d'aragonite recoupe les phases silicatées, il est vraisemblable que la majeure partie de l'aragonite précipite secondairement dans les microbialites d'Atexcac. Par exemple, les ciments fibreux et sparitiques de l'aragonite dans les fractures sont arrivés après la formation de ces fractures qui elles-mêmes affectent les silicates de magnésium. De même, dans et autour des grains micrométriques à 15 m de profondeur, les aiguilles d'aragonite recoupe non seulement les silicates de magnésium mais aussi la phase de silice (Fig. 4.24-a). De plus, dans certains endroits localisés en bordure des microbialites et au voisinage de microfossiles, des grains arrondis présentent un appauvrissement ponctuel en magnésium et surtout en silice, et sont enrichis en calcium (Fig. 4.24f, -g, -h, -i, -j). Il est possible que l'image en MEB-EDXS de la figure 4.24f illustre une première étape de remplacement des silicates de magnésium par de l'aragonite ; il sera utile d'obtenir sur ces zones des cartographies élémentaires avec un temps de comptage plus conséquent. Cela permettrait de les quantifier afin d'obtenir des ratios élémentaires et d'essayer de définir la nature précise de la phase minérale permettant la transition.

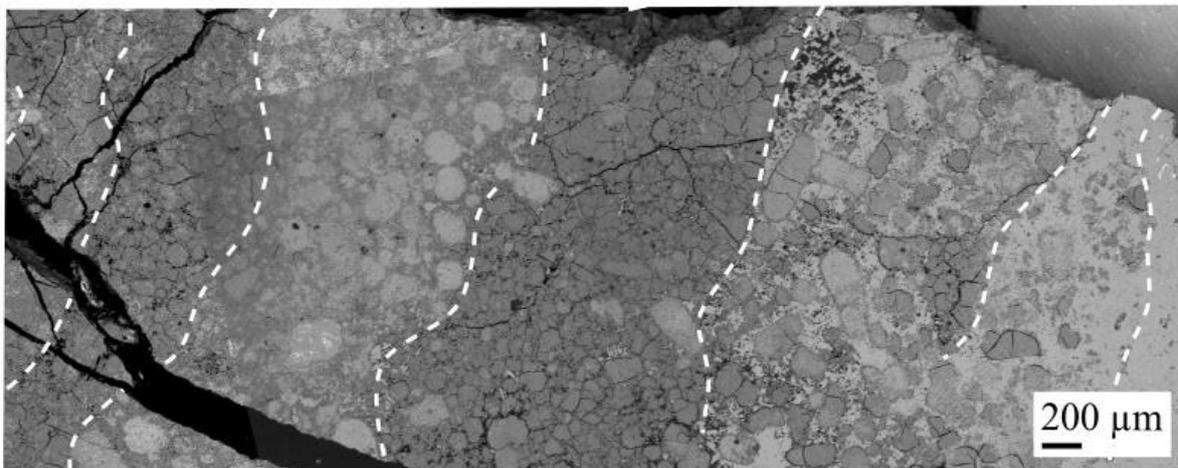


**Figure 4.24.**

**Modifications des phases siliceuses/carbonatées dans des microbialites d'Atexcac.** (a) Image MEB en électrons rétrodiffusés sur un échantillon de 15 m de profondeur. La zone présente trois phases distinctes : de l'aragonite (A, blanc), des silicates de magnésium (SiMg, gris foncé) et la phase siliceuse (Si, gris clair). Des aiguilles d'aragonite recoupent toutes les autres phases ; (b) Cartographie en MEB-EDXS élémentaire de la zone de l'image a avec le calcium en rouge, le magnésium en vert et la silice en bleu. La zone entourée par un cercle blanc en pointillés montre un mélange entre la silice de la phase siliceuse et le calcium de l'aragonite ; (c) Cartographie élémentaire en EDXS pour la silice de la zone présentée dans l'image a ; (d) Cartographie élémentaire en EDXS pour le magnésium de la zone présentée dans l'image a ; (e) Cartographie élémentaire en EDXS pour le calcium de la zone présentée dans l'image a ; (f) Image MEB en électrons rétrodiffusés sur un échantillon de 20 m de profondeur. La zone présente trois phases distinctes : de l'aragonite (A, blanc), des silicates de magnésium (SiMg, gris foncé) et la phase siliceuse (Si, gris clair). Des aiguilles d'aragonite recoupent toutes les autres phases ; (g) Cartographie en MEB-EDXS élémentaire de la zone de l'image f avec le calcium en rouge, le magnésium en vert et la silice en bleu. Les zones entourées par des triangles blancs en pointillés montrent un mélange entre la silice de la phase siliceuse et le calcium de l'aragonite ; (h) Cartographie élémentaire en EDXS pour la silice de la zone présentée dans l'image f ; (i) Cartographie élémentaire en EDXS pour le magnésium de la zone présentée dans l'image f ; (j) Cartographie élémentaire en EDXS pour le calcium de la zone présentée dans l'image f ;

zone présente une phase de silicates de magnésium (SiMg, gris foncé) ayant remplacé la silice d'une frustule de diatomée (en haut à droite) et de l'aragonite (blanc) ; (g) Cartographie en MEB-EDXS élémentaire de la zone de l'image f avec le calcium en rouge, le magnésium en vert et la silice en bleu. Des grains arrondis de 2 à 4 µm de diamètre dans les silicates de magnésium ne contiennent pas/peu de silice, présentent un appauvrissement en magnésium et sont enrichis en calcium (flèches blanches) ; (h) Cartographie élémentaire en EDXS pour la silice de la zone présentée dans l'image f ; (i) Cartographie élémentaire en EDXS pour le magnésium de la zone présentée dans l'image f ; (j) Cartographie élémentaire en EDXS pour le calcium de la zone présentée dans l'image f.

D'un autre côté, toujours dans l'échantillon de 15 m de profondeur, des aiguilles sont entourées de silicates de magnésium, elles-mêmes entourées par la phase de silice (Fig. 4.21). Ces observations pourraient aussi aller dans le sens d'une précipitation primaire par endroit d'aragonite, puis d'un encroûtement par des silicates de magnésium, puis par la phase de silice. Par conséquent, il est possible que, comme à Alchichica, des phases successives et/ou simultanées de remplacement des minéraux aient lieu dans les microbialites d'Atexcac, en lien avec des variations de cinétiques de précipitation. Ajoutée à cela, une succession de lamines millimétriques entre des zones riches en silicates de magnésium et des zones riches en aragonite ont été observées dans l'échantillon de 15 m de profondeur (Fig. 4.25). Il est donc possible que les changements biogéochimiques locaux suivent des cycles répétitifs dans le temps, en alternant entre des phases favorisant la précipitation de silicates de magnésium et des phases favorisant la précipitation d'aragonite.



**Figure 4.25.**

**Image MEB en électrons rétrodiffusés d'un échantillon de microbialites d'Atexcac provenant de 15 m de profondeur.** Les lamines visibles sont délimitées par des lignes en pointillés blancs. Les lamines sont soit composées de grains de silicates de magnésium avec peu de cimentation aragonitique (zones gris foncé) soit composées de grains de silicates de magnésium avec une forte cimentation aragonitique (zone gris clair/blanches), soit composées presque intégralement d'aragonite (zones blanches, à droite de l'image).

Pourtant, dans l'ensemble, nous ne pouvons pas être sûrs d'une chronologie de précipitation uniquement sur la base de ces observations et des interprétations pétrologiques visuelles que l'on en fait. Cela appelle par exemple à d'autres analyses peut être en laboratoire où l'on pourrait mimer ces environnements et suivre de manière plus quantitative l'évolution des processus de diagenèse précoce dans les microbialites. D'autres phases comme la calcite et l'hydromagnésite avaient également été détectées dans les microbialites d'Atexcac et il serait intéressant un jour de savoir où elles se localisent précisément et dans quelle étape de la précipitation/modification diagénétique des phases minérales elles se situent à Atexcac.

Enfin, bien que les images en confocal pour Atexcac n'aient pas été produites dans les mêmes conditions exactement que pour celles d'Alchichica (par exemple au niveau du gain), l'hypothèse d'une fluorescence des phases minérales induite par leur contenu en matière organique reste possible pour ces microbialites aussi. Dans ce cas, comme à Alchichica, les phases minérales recristallisées qui apparaissent moins fluorescentes, et notamment l'aragonite remplaçant a priori les silicates de magnésium, effacent vraisemblablement certaines des signatures organiques des microbialites (par exemple les restes de pigments photosynthétiques). Pour autant, il sera pertinent de réellement comparer des échantillons de microbialites peu profondes avec des échantillons de microbialites profondes avec les mêmes paramètres, comme pour Alchichica, afin d'évaluer les différences entre la surface et la profondeur.

## 4. Conclusions et perspectives

Les phases minérales des microbialites subissent des modifications au cours de la diagenèse. Dans les microbialites du lac Alchichica, des caractéristiques nombreuses attribuées à de la diagenèse précoce sont visibles au-dessus et en-dessous de l'oxycline. Par exemple, des figures de dissolution-reprécipitation des phases minérales ont été observées dans les couches les plus en surfaces des microbialites, notamment au niveau de grains carbonatés détritiques qui fusionnent. Vraisemblablement, la distribution et l'arrangement spatial des combinaisons entre les différentes phases minérales dans les microbialites est donc le résultat d'un équilibre entre des processus de dissolution (formation d'une porosité secondaire intra-/intergranulaire, fracturation, etc) et de précipitation (formation d'un ciment d'aragonite ou d'hydromagnésite autour des phases déjà formées ou dans les fractures par exemple). De plus, la diagenèse s'exprime vraisemblablement de manière différentielle entre la surface et la profondeur dans le lac puisque de la huntite a été observée massivement uniquement dans les microbialites à des profondeurs supérieures ou égales à 20 m. Cette huntite a été interprétée comme une phase diagénétique. Ce carbonate double contenant trois magnésium pour un calcium se distribue préférentiellement aux interfaces entre l'aragonite et l'hydromagnésite et au niveau des fissures (dedans, sur les bords et/ou au fond). Par conséquent, il a été proposé que la huntite remplace les deux carbonates primaires métastables des microbialites d'Alchichica. Ce phénomène de diagenèse précoce implique les déstabilisations de l'aragonite et de l'hydromagnésite à un certain moment, au bénéfice de la huntite, potentiellement plus stable localement. Pour autant, les analyses en bulk de la chimie des solutions du lac Alchichica à toutes les profondeurs ne mettent en avant aucune différence notable pouvant expliquer la différence de stabilité des carbonates entre la surface et la profondeur. Il a donc été proposé que des modifications de la chimie de la solution atteinte dans la porosité et/ou très localement autour des microbialites de profondeur expliquent la présence de huntite. Dans ce cas il sera intéressant dans le futur d'analyser la chimie de la solution interstitielle dans les microbialites. Or, contrairement aux sédiments qui ne sont pas indurés dans les premiers centimètres et qui permettent l'utilisation de rhizons pour récupérer l'eau porale (*cf* Muller et al., 2023), les microbialites sont indurées. Plusieurs options sont imaginables pour extraire l'eau interstitielle. Par exemple, il serait possible de plonger l'échantillon de microbialite juste après sa remontée de la colonne d'eau dans un bain d'eau déminéralisée en respectant un ratio eau/roche cohérent avec la porosité évaluée dans l'échantillon. Après avoir attendu que la solution se mette à l'équilibre avec la solution porale de l'échantillon, des analyses par ICP-AES/MS pourraient théoriquement

refléter une partie de la chimie de la solution interstitielle. Cette méthode implique toutefois que la porosité de l'échantillon soit assez conséquente pour permettre la présence d'eau libre (c'est-à-dire qui ne soit pas de l'eau adsorbée/capillaire autour des grains). De plus, même dans ce cas, elle ne donnerait accès qu'à la chimie de l'eau de la porosité ouverte des échantillons. D'autres techniques de récupération de la solution porale sont utilisées dans l'industrie d'extraction de l'eau des aquifères. Par exemple, suivant le même principe que la méthode proposée juste avant, il est possible de soumettre l'échantillon à une pression par injection de gaz inerte (Hassler Cell, Khadra et al., 2017) et de récupérer l'eau interstitielle du réseau poral ouvert. L'efficacité de cette méthode est dépendante des concentrations ioniques de la solution de l'échantillon et dure plusieurs jours. Une autre technique, destructive cette fois, consiste à placer un échantillon dans une cellule d'extraction où il est comprimé par une presse mécanique (Longuet et al., 1973). L'eau porale est récupérée et contient a priori la solution présente dans les porosités ouverte et fermée puisque l'échantillon est réduit en fragments. Globalement, une fois l'eau porale des microbialites de surface et de profondeur récupérée, l'analyse de sa chimie permettra de mieux comprendre les variations locales permettant ou non la formation de la huntite. Dans le même sens, il pourrait être imaginé d'utiliser cette approche de manière encore plus précise sur différentes parties d'un échantillon de microbialite : par exemple sur la surface près des biofilms en comparaison d'une zone plus profonde dans l'hydromagnésite. Cela permettrait en théorie d'évaluer la chimie localement dans plusieurs zones où les conditions environnementales (par exemple la présence de biofilm) diffèrent.

En parallèle, les observations en microscopies optique et électronique qui ont été faites sur des lames et sections de microbialites du lac Atexcac à différentes profondeurs montrent comme pour celles d'Alchichica des modifications post-dépôt de leur fabrique sédimentaire. Notamment, des ciments d'aragonite sparitique ou fibreuse ont été observés dans de nombreuses fractures et espaces poreux. Des analyses des isotopes du carbone et de l'oxygène dans ces différentes phases recristallisées pourraient donner une idée de leurs séquences de précipitations relatives, par exemple. Vraisemblablement, la diagenèse précoce ne se manifeste pas de la même manière dans les microbialites en fonction de leurs combinaisons de phases minérales (cimentation des espaces poreux avec d'autres phases minérales, étendues et distributions des fractures différentes, etc). Par exemple, il serait intéressant de savoir dans quelle mesure et sous quelles formes les silicates de magnésium qui dominent leur composition minéralogique avec l'aragonite sont affectés par la diagenèse, et si d'autres phases minérales remplacent les deux dominantes en profondeur, comme à Alchichica (même si a priori aucune

observation en microscopie faite ici ne va dans ce sens). Des images en CLSM montrent des différences dans les couleurs de fluorescence émises par les échantillons de microbialites d'Atexcac lorsqu'ils sont excités dans le spectre du visible. De plus, comme pour Alchichica, cette fluorescence est perdue/appauvrie lorsque les phases minérales sont recristallisées (e.g. dans les ciments aragonitiques). Si, comme proposé par Debrie et al. (2024, in prep.) dans le cas de stromatolites de Sardaigne, la fluorescence des échantillons est due à la présence de pigments photosynthétiques plus ou moins dégradés contenus dans les différentes phases minérales, alors ce signal organique est susceptible d'être modifié au cours de la diagenèse. A Alchichica, les ciments sparitiques d'aragonite et d'hydromagnésite ainsi que la huntite sont très peu à pas du tout fluorescents, ce qui laisse penser que le remplacement des phases minérales primaires efface dans le temps les signatures organiques soulignées par la fluorescence en profondeur. A Atexcac, les ciments qui colmatent les différentes porosités ne présentent pas non plus de fluorescence. Pour autant, il n'a pas été mis en évidence le remplacement massif des phases primaires par une phases secondaire comme à Alchichica en profondeur, ce qui suggère que, même si les différentes recristallisations observées changent la fabrique générale des microbialites, certaines signatures organiques (par exemple la fluorescence si on la considère comme telle) pourraient être mieux préservées dans le temps qu'à Alchichica. De plus, les microorganismes sont encroûtés par des silicates de magnésium dans les microbialites d'Atexcac et une hypothèse est qu'ils se font remplacer par de l'aragonite lorsque l'on s'enfonce dans les microbialites (Zeyen et al., 2015). De façon intéressante, il a été montré que les silicates de magnésium permettent la fossilisation précoce des cellules dans les biofilms et préservent bien les formes initiales en comparaison avec l'aragonite par exemple (Zeyen et al., 2015 ; Iniesto et al., 2015). Dans le cas des microbialites d'Alchichica, des microorganismes des biofilms de surface présentent une forte concentration en magnésium avant d'être encroûtés par l'aragonite directement (la concentration de l'acide orthosilicique en solution ne permet pas la précipitation de silicates de magnésium dans ce lac). Même si l'aragonite ne préserve les formes que partiellement, les microfossiles restent quand même visibles dans cette phase en surface et en profondeur). A l'inverse, aucun microfossile n'a été observé dans la huntite des microbialites profondes. Cela suggère que, si la huntite remplace bien l'aragonite et l'hydromagnésite dans les microbialites profondes à Alchichica, alors les formes des microfossiles encroûtés par l'aragonite seront effacées par la diagenèse, à terme. Une question ici serait par exemple de savoir au bout de combien de temps ces signatures biologiques seraient complètement effacées, *i.e.* au bout de combien de temps la huntite aurait remplacé toute l'aragonite primaire.

Enfin, et pour donner suite aux perspectives déjà soulevées par la thèse de Nina Zeyen, cette partie ouvre une question plus générale sur le devenir des microbialites au cours de la diagenèse tardive. A l'avenir, il sera intéressant de comprendre dans quelle mesure les processus d'enfouissement et d'induration des sédiments modifient les phases minérales et les microorganismes encroûtés dans les microbialites d'Alchichica. Par exemple, est-ce que la huntite présente en profondeur est susceptible d'être préservée au cours du temps ? Il existe des méthodes qui miment la diagenèse en laboratoire. Les échantillons peuvent être confinés dans des cellules dans lesquelles il est possible de reproduire la solution d'origine et sur lesquelles des pressions et des températures croissantes peuvent simuler des processus plus ou moins longs de diagenèse. Soumettre des échantillons de microbialites de surface et de profondeur à de telles variations de pression et de température permettra d'évaluer non seulement la stabilité des phases minérales présentes dans les microbialites et leurs éventuelles modifications mais aussi la préservation des microfossiles encroûtés dans les phases carbonatées calciques et magnésiennes au cours du temps.

En conclusion, ce chapitre a mis en évidence la présence de modifications pétrologiques et texturales caractéristiques de la diagenèse précoce dans les microbialites d'Alchichica surtout et un peu d'Atexcac. A Alchichica, la diagenèse se manifeste différemment en fonction de la profondeur des microbialites dans la colonne d'eau. En profondeur, un remplacement massif des carbonates dominants des microbialites, l'hydromagnésite et l'aragonite, a été observé dans les microbialites et questionne sur la préservation des signaux organiques, isotopiques, minéralogiques, de fluorescence, etc, au cours du temps.



# **Conclusions, perspectives**

## **Conclusions principales**

Dans ce travail de thèse, nous avons étudié des déterminants environnementaux de la formation des microbialites actuelles, et caractérisé en particulier des microbialites de lacs alcalins du Mexique, saisonnièrement anoxiques. Plusieurs questions générales ont initié cette étude. Notamment, existe-t-il des conditions physico-bio-géochimiques nécessaires et/ou suffisantes à la formation des microbialites ? Sachant que les plus anciennes microbialites se sont formées dans des conditions d'anoxie il y a environ 3,43 Ga, comment ces mêmes conditions d'anoxie influencent-elles la formation des microbialites actuelles ? L'anoxie, même saisonnière, est-elle enregistrée et si oui sous quelles formes par les phases minérales et les communautés microbiennes qui composent les microbialites actuelles ? Et enfin, dans un contexte où l'on utilise régulièrement les microbialites actuelles en tant qu'analogues des microbialites anciennes, dans quelle mesure la diagenèse affecte-t-elle les signatures environnementales enregistrées lors de leur formation ? Des éléments de réponse à ces questions générales ont été recherchés en s'appuyant d'abord sur des données géochimiques d'environnements de formation de microbialites actuelles trouvées dans la littérature. Puis, et principalement, les objets d'études étaient des microbialites provenant des zones profondes saisonnièrement anoxiques des lacs redox-stratifiés Alchichica et Atexcac (dans une moindre mesure), au Mexique.

En résumé, nous avons proposé dans cette thèse l'idée selon laquelle il faut qu'une solution soit saturée vis-à-vis des ACC et/ou de la monohydrocalcite afin que des microbialites carbonatées se forment dans des environnements actuels. Puis, en nous intéressant à des microbialites prélevées dans des zones saisonnièrement anoxiques du lac Alchichica, nous montrons un enregistrement des états redox de la colonne d'eau non seulement par la minéralogie des microbialites profondes via des signatures du soufre, mais aussi par les tapis microbiens via des fluctuations d'abondances taxonomiques relatives. Enfin, nous avons montré que les microbialites actuelles du lac Alchichica sont soumises à de la diagenèse précoce qui peut affecter les signatures organiques et inorganiques, notamment en profondeur où de la huntite remplace les carbonates primaires. Ces points sont légèrement détaillés ci-dessous.

*Conditions géochimiques de formation des microbialites actuelles*

L'étude globale sur la physico-chimie des eaux dans lesquelles se forment des microbialites actuelles a mis en avant leur saturation quasi-systématique vis-à-vis des carbonates de calcium amorphes (ACC) et de la monohydrocalcite. Ces observations nous ont permis de généraliser l'hypothèse qu'une (sur)saturation des eaux vis-à-vis des ACC est une condition nécessaire pour la formation des microbialites actuelles. La variabilité de ces milieux est principalement expliquée par la salinité et par l'alcalinité, comme plusieurs études l'avaient déjà reporté. De plus, la comparaison de la chimie des environnements contenant des microbialites actuelles avec celle de différents milieux aqueux dans le monde (surtout des données d'Amérique du Nord et d'Europe dans les bases de données utilisées) a permis de définir une liste non-exhaustive de lacs dans lesquels des microbialites sont susceptibles d'être présentes, puisque leurs solutions sont saturées par rapport aux ACC. Cette suggestion de conditions nécessaires pour la formation des microbialites a plusieurs implications. Si ces milieux aqueux sont saturés par rapport aux ACC et/ou la monohydrocalcite, cela suggère que la précipitation de ces phases pourrait contrôler la chimie de ces eaux (en tous cas les paramètres chimiques impliqués dans la saturation, à savoir les activités en ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{CO}_3^{2-}$ ) et sont donc potentiellement des phases précurseurs de la formation des microbialites. Ensuite, la biologie compte dans la formation des microbialites, mais elle ne permet la formation des microbialites a priori que dans certaines conditions environnementales (ici des eaux saturées par rapport aux ACC). Les variations d'abondance des microbialites au cours des temps géologiques pourraient être dues à des variations de l'indice de saturation des eaux par rapport aux ACC/la monohydrocalcite. Par ailleurs, des questions restent ouvertes : par exemple, la question de savoir si la saturation du milieu vis-à-vis des ACC est non seulement nécessaire mais aussi suffisante ou non à la formation des microbialites actuelles. De plus, nous avons proposé un seuil de saturation vis-à-vis des carbonates de calcium nécessaire à leur formation, mais les limites supérieures de sursaturation, si elles existent, ne sont pas définies. Enfin, cela interroge sur les mécanismes qui permettent d'avoir des eaux très sursaturées. En effet, on devrait s'attendre à ce qu'à une certaine saturation, les carbonates précipitent spontanément, ce qui contraindrait la composition chimique des eaux à un équilibre avec les phases précipitant. Les ACC/la monohydrocalcite étant des phases connues pour avoir une cinétique de précipitation rapide, comment peut-on atteindre des états de saturation plus élevés que leur solubilité ? On peut alors se demander qui sont les éventuelles espèces chimiques, et leurs concentrations, qui

pourraient inhiber la précipitation des phases carbonatées dans de tels environnements sursaturés comme des phosphates ou des espèces magnésiennes.

### *Enregistrements de l'euxinie dans les microbialites du lac Alchichica*

Après avoir défini la diversité et l'unicité des conditions de formation des microbialites actuelles, nous nous sommes intéressés à la formation des microbialites actuelles dans des conditions saisonnières d'anoxie. Particulièrement, nous avons analysé leur contenu en soufre et la spéciation de cet élément sensible au redox dans les microbialites d'Alchichica. Pour cela, nous avons comparé celles qui se sont formées dans des zones peu profondes oxygénées en permanence à celles qui se sont formées dans des zones profondes saisonnièrement anoxiques, et sulfidiques. Ces analyses ont d'abord mis en évidence la présence de soufre dans toutes ces microbialites actuelles. Le soufre y est principalement présent sous la forme de sulfates. Nous avons proposé qu'une partie pourrait être incorporée structurellement dans les minéraux carbonatés, notamment l'aragonite, constituant donc des sulfates associés aux carbonates (CAS). Une autre fraction pourrait être sous la forme de sulfate organique, vestige des biofilms qui ont formés ces microbialites. De plus, bien que dans le cas du lac Alchichica l'anoxie ne soit pas continue dans la colonne d'eau profonde, les observations des échantillons ont montré des signatures du soufre différentes entre la surface et la profondeur, avec notamment un enrichissement en espèces réduites dans les microbialites profondes. Une partie de ce soufre réduit est sous la forme de pyrite, une autre sous la forme de soufre élémentaire et une autre encore sous forme de fonctions thiols et sulfoxides, a priori. Nous avons proposé l'hypothèse que cette différence puisse être due aux variations des états redox de l'environnement. La spéciation du soufre dans ces microbialites pourrait donc constituer un indicateur des conditions d'oxygénation environnementales au moment de leur formation. Pour autant, dans quelle mesure les microbialites que nous avons étudiées se forment pendant les périodes de stratification du lac ou pendant les périodes de mélange, ou les deux, reste à définir. L'omniprésence des sulfates dans les phases minérales des microbialites d'Alchichica soulève également des questionnements sur leur origine et leur éventuelle substitution avec les ions carbonates dans les phases minérales carbonatées. De plus, comme les microbialites profondes et peu profondes du lac Alchichica ont montré un enrichissement en soufre dans les couches aragonitiques souvent trouvées à la surface des microbialites, et spécifiquement sur les contours de structures biogéniques, le rôle des microorganismes sur le cycle du soufre dans les microbialites reste un point à explorer.

*Acclimatation des communautés microbiennes des microbialites d'Alchichica et Atexcac à l'anoxie*

Sur les mêmes microbialites actuelles provenant de milieux saisonnièrement anoxiques à Alchichica et à Atexcac, des analyses en métabarcoding ont permis d'inférer leurs diversités phylogénétique et fonctionnelle. Notamment, cette partie de la thèse a montré une forte diversité taxonomique des tapis microbiens associés aux microbialites le long d'un transect en profondeur. De manière intéressante, l'acclimatation des communautés microbiennes à l'anoxie saisonnière imposée par la stratification de la colonne d'eau dans ces écosystèmes spécifiques se manifeste au niveau des abondances relatives des différents organismes plutôt qu'au niveau de leur diversité phylogénétique. L'hypothèse proposée ici est qu'un groupe de communautés microbiennes englobant une large gamme de potentiels métaboliques est conservé dans toutes les microbialites testées, leur permettant de s'acclimater aux changements saisonniers environnementaux rapidement. En accord avec ces observations, des expériences en laboratoire ont montré que, sous anoxie continue, la diversité phylogénétique microbienne associée aux microbialites de surface comme de profondeur est maintenue, alors que les proportions relatives taxonomiques varient. Par exemple, il est possible que des organismes phototrophes anoxygéniques comme des alphaprotéobactéries du genre *Rhizobiales* soient actifs dans les tapis microbiens de profondeur, comme le suggèrent des enrichissements sous anoxie continue faits à partir des microbialites profondes d'Alchichica. Le rôle de ces organismes en particulier dans la précipitation des carbonates des microbialites, c'est-à-dire dans leur formation, est une question qui se pose en perspective. Notamment, dans quelle mesure les précipitations influencées/induites/contrôlées par les communautés microbiennes associées aux microbialites de profondeur diffèrent de celles des communautés microbiennes associées aux microbialites de surface reste une question ouverte. Par ailleurs, les microorganismes les plus abondants en profondeur sont aussi susceptibles d'influencer le cycle du soufre local et donc l'enregistrement de cet élément dans les phases minérales des microbialites.

*Modifications diagénétiques des microbialites d'Alchichica*

Enfin, nous nous sommes intéressés dans cette thèse à la modification secondaire des phases minérales dans les microbialites d'Alchichica, toujours en comparant des échantillons prélevés dans des zones peu profondes oxygénées avec des échantillons prélevés dans des zones profondes saisonnièrement anoxiques. Si les microbialites de profondeur conservent bien l'agencement entre des couches d'aragonite sur la surface, au-dessus de couches d'hydromagnésite plus profondes (qui est quasiment tout le temps observé dans les microbialites de surface), elles contiennent également un autre carbonate : la huntite, constitué à la fois de calcium et de magnésium. Nous avons proposé que la huntite soit le produit d'une réaction entre l'aragonite et l'hydromagnésite dans l'espace poral des microbialites de profondeur, via un processus de diagenèse précoce. Nous avons également montré que les produits de processus de diagenèse précoce comme de la fracturation, de la cimentation et/ou la formation d'une porosité secondaire sont visibles dans les microbialites de toutes les profondeurs à Alchichica. De plus, il semble que des signatures de fluorescence, potentiellement d'origine organique soient effacées dans les microbialites de profondeur à Alchichica, plus affectées par la diagenèse précoce et en lien avec la précipitation de la huntite. Dans tous les cas, pour cette partie, il reste clairement à comprendre quels sont les mécanismes qui permettent une modification différentielle des carbonates en fonction de la profondeur dans les microbialites d'Alchichica, c'est-à-dire à expliquer la présence de huntite uniquement en profondeur. Par exemple, dans quelle mesure l'oxygénation du milieu et/ou la présence de sulfates peuvent influencer les déstabilisations de l'aragonite et de l'hydromagnésite et la précipitation de la huntite, reste un questionnement important dans ce contexte. De même, la préservation d'autres enregistrements comme ceux laissés par les variations des conditions redox dans les microbialites est un point qui méritera probablement d'être approfondi par la suite.

## Perspectives générales

Dans un contexte plus général que les questions à court/moyen terme soulevées par chaque partie, plusieurs perspectives pourraient être envisagées dans la continuité de ce travail.

### *1. Etude intégrative des systèmes contenant des microbialites actuelles*

#### *Les systèmes naturels d'Alchichica et d'Atexcac*

La compréhension des mécanismes de formation des microbialites nécessite de caractériser au mieux leurs milieux naturels. Pour cela, les analyses sur le terrain sont essentielles. Dans les cas des lacs mexicains étudiés ici, un objectif pourrait être de mieux définir la distribution spatiale des microbialites. De nombreux travaux ont décrit géographiquement l'emplacement des lieux d'échantillonnage et la nature des microbialites associées. Cependant, peu de campagnes de terrain ont collecté des microbialites en profondeur (c'est-à-dire à plus de 20 m à Alchichica et à plus de 15 m à Atexcac) pour l'instant. Nous ne savons pas encore non plus précisément dans quelle mesure les microbialites recouvrent toutes les parois des lacs autres qu'Alchichica et Atexcac, ni jusqu'à quelles profondeurs. De plus, y a-t-il des microbialites en-dessous de 40 m de profondeur à Alchichica (sachant que déjà à cette profondeur l'accès à la lumière pour les microorganismes est faible) ? Les microbialites deviennent-elles de moins en moins abondantes vers le fond du lac ? L'évaporation des colonnes d'eau cause l'émersion des microbialites de surface au cours du temps, et dévoile a priori une ceinture de microbialites sur les pourtours des lacs Alchichica et Atexcac, mais ces observations permettent difficilement d'estimer si la répartition est homogène ou hétérogène sous le niveau d'eau. C'est pourquoi un scan de la bathymétrie du lac avec une haute précision permettrait probablement de localiser les endroits où se trouvent les microbialites. Il serait utile également de systématiser la prise d'images des fonds/parois des lacs par les plongeurs lors de la récupération des échantillons, à partir de la surface. Une meilleure caractérisation des fonds de lacs à Alchichica et à Atexcac permettrait donc potentiellement d'évaluer les zones de croissance préférentielles des microbialites. Une autre technique pour cela pourrait être d'évaluer la répartition des microbialites dans des lacs similaires récemment asséchés (où les microbialites ne seraient pas trop dégradées) tels que Rincon de Parangueo (Sánchez- Sánchez et al., 2023). De plus, ce type d'approche visant à caractériser les parois des lacs pourrait être intéressante également avec d'autres types de mesures dans le but de savoir où se trouvent les

résurgences d'eaux/gaz souterrains dans les lacs (par exemple des résurgences riches en fer à l'ouest du lac dont l'hypothèse a été proposée par Zeyen et al., 2019).

Par ailleurs, la caractérisation des milieux naturels de formation des microbialites actuelles passe par l'analyse de plusieurs composants autres que les microbialites, comme la colonne d'eau et les sédiments. Dans le cas d'Alchichica, il a été montré que la silice amorphe des diatomées se transforme en silicates de magnésium dans les premiers centimètres des sédiments (Muller et al., 2023). A Atexcac où la concentration en acide orthosilicique est beaucoup plus élevée et se traduit par une précipitation de silicates de magnésium dans les microbialites, il sera également intéressant de caractériser une carotte de sédiments prélevée en fond de lac, de même que pour le lac La Preciosa.

Hormis des caractérisations spatiales géographiques et en fonction de la profondeur, le suivi temporel des colonnes d'eau des lacs Alchichica et Atexcac est également important pour évaluer leurs variations physico-chimiques et planctoniques au cours des saisons. Ces suivis sont déjà largement commencés, à Alchichica en particulier. Mais du métabarcoding sur les communautés microbiennes planctoniques procaryotes et eucaryotes au cours d'une année (avec un pas au moins mensuel), et sur des transects de profondeur, resterait utile pour continuer à modéliser l'évolution des efflorescences (de cyanobactéries, bactéries oxydantes du soufre, diatomées par exemple) entre les périodes de mélange et de stratification des lacs selon la profondeur. Notamment, à Alchichica, la profondeur de la zone euphotique dans la colonne d'eau augmente légèrement pendant la période de stratification en lien avec la présence de phytoplancton (Alcocer et al., 2022), comme pour la profondeur de l'oxycline, ce qu'il serait intéressant de comparer avec Atexcac. Par la suite, cela pourrait permettre de mieux intégrer ces variations biogéochimiques de la colonne d'eau aux variations microbiennes des biofilms associés aux microbialites. Au final, cette liste non-exhaustive d'analyses préciserait notre compréhension globale des systèmes Alchichica et Atexcac.

#### *Modélisation des systèmes de formation des microbialites en laboratoire*

Dans la première partie de cette thèse, nous avons proposé l'hypothèse qu'une saturation des eaux par rapport à l'ACC/monohydrocalcite était nécessaire pour la formation des microbialites actuelles. Nous nous sommes focalisés sur le système des carbonates car il est le plus couramment retrouvé dans les microbialites actuelles qui ont été répertoriées. Toutefois, il a été fait mention de l'importance de silicates authigènes comme phases formant les

microbialites. La précipitation de phases minérales dans un système plutôt que dans un autre dépend bien sûr de la thermodynamique mais peut aussi dépendre de considérations cinétiques. Par conséquent, il est compliqué d'évaluer localement à partir d'une solution quelle phase va se former à un moment donné, à plus forte raison si l'on prend en compte l'influence des microorganismes. Dans l'ensemble, les carbonates et les silicates peuvent largement coexister au sein d'une même microbialite et des échanges de cations peuvent avoir lieu entre ces deux familles minérales. C'est le cas dans les microbialites d'Atexcac où on retrouve à la fois de l'aragonite et des silicates de magnésium par exemple (dans ce cas en revanche, il n'y a pas d'échange de cations). Aussi, dans le but de mieux comprendre les paramètres géochimiques locaux qui conditionnent la précipitation de carbonates ou de silicates (ou de phosphates) dans les microbialites, des expériences en laboratoire peuvent être menées. Dans certains cas, les microbialites sont ramenées du terrain et mises dans des solutions dont on peut choisir la chimie au départ, ou alors on les laisse évoluer en système fermé dans leur solution d'origine. Par exemple, des échantillons de microbialites de 40 m de profondeur d'Alchichica ont été ramenés en 2022 et conservés dans la solution dans laquelle elles ont été prélevées. Les solutions ont probablement atteint un état d'équilibre et il serait intéressant de caractériser la chimie de la solution, les microorganismes et les phases minérales de ces échantillons après un an et demi dans un système fermé. Par ailleurs, toujours dans ces échantillons en système fermé, il est possible que l'oxygène ait été complètement consommé par les organismes aérobies et que les communautés phototrophes anoxygéniques dominent les tapis microbiens, ce qu'il serait également important de vérifier.

Malgré cela, les expériences en laboratoire sur les microbialites sont souvent faites dans des systèmes fermés, ce qui ne permet pas de rester hors équilibre sur le long terme. Dans le cas de cette thèse par exemple, les mésocosmes utilisés pour tester l'acclimatation des communautés microbiennes à l'anoxie étaient des systèmes fermés. Comme les résultats du chapitre 1 suggèrent qu'il faut se mettre dans des conditions de forte sursaturation avec la calcite pour produire des structures géobiologiques carbonatées calcifiantes, il faudrait imposer ces conditions de départ aux microbialites en laboratoire. Or, cette sursaturation s'atteint et se maintient en ajoutant continuellement des espèces chimiques dans la solution où se trouvent les microbialites, car ces espèces précipitent vite et l'on tendrait vers un état d'équilibre si le système restait fermé. Dans le cas inverse où la solution de départ dans laquelle on met les microbialites est sous-saturée avec les phases minérales de l'échantillon, et en considérant uniquement des processus chimiques, celui-ci se dissout en théorie. Ainsi, dans le but

d'identifier les paramètres clés de la calcification selon la géochimie imposée au départ, il sera intéressant à terme de produire des systèmes ouverts en laboratoire dans lesquels les apports des espèces chimiques correspondant aux systèmes que l'on veut tester (par exemple  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{CO}_3^{2-}$  pour les carbonates de calcium, ou  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{H}_4\text{SiO}_4$  pour les silicates de magnésium) seront constants, afin de maintenir la sursaturation souhaitée. Ces systèmes ouverts ont commencé à être mis en place pendant la thèse à l'aide d'une pompe péristaltique et des tests ont débuté sur les étapes d'encroûtements de biofilms par des silicates de magnésium notamment au cours d'un stage de master que j'ai encadré.

## *2. Etude à plus fine échelle des microbialites actuelles*

Une perspective importante à plus long terme mise en avant par ce travail de thèse est de pouvoir analyser les microbialites à beaucoup plus fine échelle. En particulier, il n'a pas été possible d'expliquer de manière sûre, aux échelles avec lesquelles nous avons travaillé, la formation de huntite dans les microbialites profondes d'Alchichica. L'hypothèse proposée était une modification de la saturation des eaux porales potentiellement reliée à des différences de métabolismes entre les tapis microbiens de surface et de profondeur. De manière spéculative, il est possible que la dégradation de la matière organique dans les couches les plus profondes des tapis microbiens qui s'encroûtent produisent localement une certaine acidité susceptible d'influencer les déstabilisations de l'aragonite et de l'hydromagnésite et que ceci soit plus prononcé dans les microbialites profondes. Pour mieux évaluer ces mécanismes, des analyses précises de la chimie de la solution contenue dans les microbialites et/ou dans leur voisinage très proche seraient nécessaires, par exemple pour savoir si cette acidité possible serait directement tamponnée par le pH ambiant ou non. De même, les analyses des concentrations dans l'eau porale d'espèces chimiques traces ou majeures comme le strontium, le barium, les phosphates, les sulfates, permettraient peut-être de mieux évaluer les inhibiteurs de la précipitation d'aragonite ou d'hydromagnésite au bénéfice de la formation de huntite, et inversement.

Pour des analyses plus détaillées des phases minérales, des techniques comme le micro-drill peuvent aider à cibler les prélèvements faits dans les microbialites, et par exemple à analyser séparément les différentes phases minérales. Par ailleurs, au cours de la thèse de Juliette Debrie, une approche de quantification de « mega »-cartographies MEB-EDXS a été utilisée sur des microbialites actuelles et a notamment montré, en couplage avec d'autres techniques analytiques comme le MET, une variété de phases minérales différentes qui

n'auraient pas pu être détectées par les analyses plus classiques et moins pointues des données EDXS et/ou par des approches « bulk » (Debrie et al., 2022). Cette approche, même si coûteuse en temps, permettrait d'acquérir des informations minéralogiques à très fine échelle sur les échantillons de microbialites de surface et de profondeur d'Alchichica et/ou d'Atexcac, et par exemple d'identifier d'autres phases minérales. Un autre avantage à utiliser des méthodes de cartographie à haute résolution sur les microbialites profondes d'Alchichica et d'Atexcac, par exemple via la technique utilisée par Debrie et al. (2022), mais aussi via du rayonnement synchrotron, serait de pouvoir quantifier précisément les ratios élémentaires et décrire les différentes phases minérales en mélange afin d'évaluer plus précisément les différences entre les microbialites profondes et peu profondes. Dans le cas des microbialites profondes d'Alchichica, la méthode Rietveld avait été utilisée sur les diffractogrammes afin de quantifier les proportions relatives entre l'aragonite, l'hydromagnésite et la huntite, mais de nombreux pics entre ces carbonates se superposaient, ce qui pouvait biaiser l'ajustement des paramètres. Cette méthode n'a donc pas été évoquée même si elle reste intéressante à creuser.

Enfin, une question qui reste ouverte après cette thèse est l'évaluation de la croissance des microbialites profondes d'Alchichica, ce qui a peu été évoqué dans ce manuscrit. La croissance des microbialites de surface a déjà été évaluée à Alchichica sur une période allant de janvier 2012 à mai 2014, sur du nylon recouvrant des tubes Falcon, et les microbialites avaient montré un taux d'accrétion d'environ  $0,6 \text{ mm.an}^{-1}$  (Iniesto et al., 2022). Ces installations *in situ* ont été reconduites en mai 2019 et des échantillons ont été récupérés en octobre 2022, montrant eux aussi des encroûtements. Pour autant, nous ne savons pas si cette précipitation peut avoir lieu aussi au milieu du lac, c'est-à-dire dans des systèmes plus ouverts que des tubes Falcon par exemple, ce qui justifie d'autant plus une approche de précipitation de microbialites en laboratoire. Nous avons également postulé au vu des conditions chimiques favorables et de la présence de biofilms pigmentés que les microbialites de profondeur étaient vivantes. Malgré cela, nous n'avons pas de preuve directe attestant de cette croissance, en particulier pour les microbialites prélevées en 2022 dont l'aspect était différent de celles de 2019. Dans ce contexte, il sera probablement pertinent d'évaluer les périodes préférentielles de formation des microbialites profondes, s'il y en a, en se basant par exemple sur des datations et/ou sur leur vitesse de croissance sur un substrat donné. Dans ce but, des échantillonnages plus précis suivis d'une datation, notamment en prélevant de la matière sur quelques millimètres, pourraient être utilisées. Cela permettrait de savoir (i) si les microbialites profondes d'Alchichica et d'Atexcac se forment en continu ou non, (ii) si les microbialites de surface et de profondeur se forment

pendant les mêmes périodes (on pourrait supposer des influences différentes des communautés microbiennes sur les précipitations minérales en fonction de leur activité métabolique au cours d'une année, par exemple), (iii) si des zones spécifiques au sein des microbialites profondes favorisent la croissance ou non comme en surface.

Ainsi, de manière générale, une perspective serait d'intégrer des techniques d'analyses de précisions à celles effectuées en bulk dans l'exploration des mécanismes de formation des microbialites profondes d'Alchichica, notamment.

### *3. Etude à plus large échelle des microbialites actuelles*

D'autres perspectives à plus long terme sur les microbialites actuelles consisteraient à évaluer plus systématiquement leurs caractéristiques structurales, biologiques, environnementales, etc, afin de constituer des données représentatives statistiquement. Par exemple, le chapitre 1 a montré que des corrélations existent entre les géochimies de leur milieu de formation, malgré une diversité apparente. De nombreux lacs présentant des caractéristiques géochimiques favorables à la formation des microbialites ont été décrits et des nouveaux cas de microbialites actuelles sont régulièrement découverts, par exemple en Patagonie. Aussi, dans un contexte plus spécifique d'étude des conditions d'anoxie/euxinie sur la formation des microbialites actuelles qui a été abordé dans cette thèse, il pourrait être intéressant de trouver d'autres cas d'étude de microbialites se formant en anoxie/euxinie saisonnière/continue afin de généraliser ou non les observations faites sur les microbialites profondes d'Alchichica. Par exemple, dans le lac Dziani Dzaha, à Mayotte, des conditions euxiniques sont atteintes (Sala et al., 2022), mais a priori les microbialites n'ont pas été échantillonnées dans ces zones. De tels endroits sont des pistes probables où il serait intéressant de chercher des signatures minéralogiques/biologiques de l'anoxie dans les microbialites, par exemple avec le même type d'approche synchrotron. Pour ce qui est des traces de la diagenèse précoce dans les microbialites, il pourra être intéressant à l'avenir de les rechercher plus systématiquement et d'évaluer quelles sont les phases minérales secondaires, notamment dans les carbonates, qui remplacent les phases minérales primaires, en plus de tester des conditions de diagenèse imposées en laboratoire. Dans l'ensemble, il est possible que chercher à plus grande échelle des microbialites actuelles qui se forment dans les conditions que l'on veut étudier, donc ici en anoxie et/ou euxinie par exemple, soit une perspective pertinente afin d'avoir une approche plus représentative statistiquement, entre autres.

#### 4. Choix des analogues aux microbialites anciennes

Dans cette thèse, aucune microbialite fossile n'a été étudiée. Pourtant, des approches comparatives intégrant la caractérisation de microbialites actuelles par analogie avec des microbialites anciennes sont souvent utilisées avec l'objectif d'interpréter les structures géobiologiques anciennes à la lumière des actuelles, et de reconstruire leurs environnements de formation. Ici, les microbialites d'Alchichica et d'Atexcac formées dans des conditions d'anoxie saisonnière sont susceptibles de représenter des analogues aux microbialites formées pendant des périodes d'anoxie/euxinie durant l'histoire géologique terrestre, donc potentiellement des analogues aux microbialites Précambriennes. Et, de manière intéressante, les indicateurs redox usuels ont été peu convaincants dans leur caractérisation en partie à cause de leur concentration trop faible dans le milieu de formation. Pour autant, les spectres XANES au seuil K du soufre acquis sur ces microbialites ont quand même suggéré une signature de l'anoxie en conditions sulfidiques par le soufre. Il serait donc probablement pertinent de rechercher le même type de profil spectral pour le soufre dans des microbialites anciennes datées de périodes qu'on interprète comme anoxiques et sulfidiques. Le terme d'analogue étant assez vague et englobant une large gamme de paramètres et de périodes de temps géologiques qui ne sont pas forcément toujours pris en compte, il reste important d'interpréter avec précautions ce type d'analogies et probablement de restreindre les conditions étudiées. En l'occurrence, dans le cas des microbialites profondes d'Alchichica et d'Atexcac, il s'agit de milieux lacustres dont l'oxygénation varie en fonction des saisons. De plus, les processus de diagenèse précoce et tardive ont modifié les microbialites fossiles, donc potentiellement modifié aussi les indicateurs que l'on trouve aujourd'hui dans des microbialites qui ont moins subi la diagenèse. Il restera donc intéressant de rechercher des signatures d'environnements euxiniques par XANES dans des microbialites fossiles et de les comparer avec précaution à celles qui ont été suggérées dans les microbialites d'Alchichica étudiées dans cette thèse.



## Références

- Abed, R.M.M., Golubic, S., Garcia-Pichel, F., Camoin, G.F., Sprachta, S. (2003) Characterization of microbialite-forming cyanobacteria in a tropical lagoon: Tikehau Atoll, Tuamotu, French Polynesia. *Journal of Phycology* 39, 862–873. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2003.02180.x>
- Águila, B., Alcántara-Hernández, R.J., Montejano, G., López-Martínez, R., Falcón, L.I., Becerra-Absalón, I. (2021) Cyanobacteria in microbialites of Alchichica Crater Lake: a polyphasic characterization. *European Journal of Phycology*. Taylor & Francis 56, 428–443.
- Ahm, A.-S.C., Bjerrum, C.J., Blättler, C.L., Swart, P.K., Higgins, J.A., 2018. Quantifying early marine diagenesis in shallow-water carbonate sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta, Chemistry of oceans past and present: A Special Issue in tribute to Harry Elderfield* 236, 140–159. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2018.02.042>
- Ahmed, E., Holmström, S.J.M. (2015) Microbe–mineral interactions: The impact of surface attachment on mineral weathering and element selectivity by microorganisms. *Chemical Geology* 403, 13–23.
- Aiken, G., McKnight, D., Harnish, R., Wershaw, R. (1996) Geochemistry of aquatic humic substances in the Lake Fryxell Basin, Antarctica. *Biogeochemistry* 34, 157–188. <https://doi.org/10.1007/BF00000900>
- Airo Farulla, A., Lowe, D.R., Dunbar, R.B., Payne, J., Trent, J.D. (2010) *Biotic and abiotic controls on the morphological and textural development of modern microbialites at Lago Sarmiento, Chile*. Ph.D. thesis, Stanford University, California, 112 p. <https://searchworks.stanford.edu/view/8652428>
- Albarracín, V.H., Gärtner, W., Farias, M.E. (2016) Forged Under the Sun: Life and Art of Extremophiles from Andean Lakes. *Photochemistry and Photobiology* 92, 14–28. <https://doi.org/10.1111/php.12555>
- Alcántara-Hernández, Rocío J., et al. "Bacterioplankton." *Lake Alchichica Limnology: The Uniqueness of a Tropical Maar Lake*. Cham: Springer International Publishing, 2022. 183-196.
- Alcocer, J., Escobar, E., Lugo, A., Peralta, L. (1998) Littoral benthos of the saline crater lakes of the basin of Oriental, Mexico. *International Journal of Salt Lake Research* 7, 87–108.
- Alcocer, J., Lugo, A., Escobar, E., Sánchez, M. D. R., & Vilaclara, G. (2000). Water column stratification and its implications in the tropical warm monomictic Lake Alchichica, Puebla, Mexico. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, 27(5), 3166-3169. <https://doi.org/10.1080/03680770.1998.11898262>
- Alcocer, J., Oseguera, L. A., Cuevas-Lara, D., Guadarrama-Hernández, S., & Quiroz-Martínez, B. (2022). Lake Metabolism. In *Lake Alchichica Limnology: The Uniqueness of a Tropical Maar Lake* (pp. 299-318). Cham: Springer International Publishing.
- Alcocer, Javier, et al. "Physicochemical Characteristics." *Lake Alchichica Limnology: The Uniqueness of a Tropical Maar Lake*. Cham: Springer International Publishing, 2022. 101-142.
- Allwood, A.C., Walter, M.R., Kamber, B.S., Marshall, C.P., Burch, I.W. (2006) Stromatolite reef from the Early Archaean era of Australia. *Nature*. Nature Publishing Group 441, 714–718.
- Allwood, A.C., Walter, M.R., Burch, I.W., Kamber, B.S. (2007) 3.43 billion-year-old stromatolite reef from the Pilbara Craton of Western Australia: Ecosystem-scale insights to early life on Earth. *Precambrian Research* 158, 198–227.
- Aloisi, G. (2008) The calcium carbonate saturation state in cyanobacterial mats throughout Earth's history. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 6037–6060. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2008.10.007>
- Alonso-Zarza, A.M., Martín-Pérez, A., 2008. Dolomite in caves: Recent dolomite formation in oxic, non-sulfate environments. Castañar Cave, Spain. *Sedimentary Geology* 205, 160–164. <https://doi.org/10.1016/j.sedgeo.2008.02.006>
- Altermann, W., Kazmierczak, J., Oren, A., Wright, D.T. (2006) Cyanobacterial calcification and its rock-building potential during 3.5 billion years of Earth history. *Geobiology* 4, 147–166.
- An, S., Gardner, W.S. (2002) Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) as a nitrogen link, versus denitrification as a sink in a shallow estuary (Laguna Madre/Baffin Bay, Texas). *Marine Ecology Progress Series* 237, 41–50. <https://doi.org/10.3354/meps237041>
- Andersen, D.T., Sumner, D.Y., Hawes, I., Webster-Brown, J., McKay, C.P. (2011) Discovery of large

- conical stromatolites in Lake Untersee, Antarctica. *Geobiology* 9, 280–293. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2011.00279.x>
- Andrews, J.E., Riding, R., Dennis, P.F. (1997) The stable isotope record of environmental and climatic signals in modern terrestrial microbial carbonates from Europe. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 129, 171–189. [https://doi.org/10.1016/S0031-0182\(96\)00120-4](https://doi.org/10.1016/S0031-0182(96)00120-4)
- Andrews, J.E., Pedley, M., Dennis, P.F. (2000) Palaeoenvironmental records in Holocene Spanish tufas: a stable isotope approach in search of reliable climatic archives. *Sedimentology* 47, 961–978. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3091.2000.00333.x>
- Angino, E.E., Armitage, K.B., Tash, J.C. (1962) Chemical Stratification in Lake Fryxell, Victoria Land, Antarctica. *Science* 138, 34–36. <https://doi.org/10.1126/science.138.3536.34>
- Antunes, L.C.S., Visca, P., Towner, K.J. (2014) *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathogens and Disease* 71, 292–301.
- Armenteros, I. (2010) Chapter 2 Diagenesis of Carbonates in Continental Settings. In: Alonso-Zarza, A.M., Tanner, L.H. (eds) *Developments in Sedimentology*. Elsevier, 61–151. [https://doi.org/10.1016/S0070-4571\(09\)06202-5](https://doi.org/10.1016/S0070-4571(09)06202-5)
- Armienta, M.A., Vilaclara, G., De la Cruz-Reyna, S., Ramos, S., Cenicerros, N., Cruz, O., Aguayo, A., Arcega-Cabrera, F. (2008) Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 178, 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2008.06.019>
- Arp, G., Hofmann, J., Reitner, J. (1998) Microbial fabric formation in spring mounds (“microbialites”) of alkaline salt lakes in the Badain Jaran Sand Sea, PR China. *PALAIOS* 13, 581–592. <https://doi.org/10.2307/3515349>
- Asha, P.S., Selvaraj, M., Diwakar, K. (2011) Environment degradation by chemical effluents along the Kayalpatinam coast of Gulf of Mannar with special reference to mercury. *Journal of the Marine Biological Association of India* 53, 75–80. <http://eprints.cmfri.org.in/8707/1/75--80--P. S. Asha.pdf>
- Assayag, N., Rivé, K., Ader, M., Jézéquel, D., Agrinier, P. (2006) Improved method for isotopic and quantitative analysis of dissolved inorganic carbon in natural water samples. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20, 2243–2251.
- Awramik, S.M. (1971) Precambrian Columnar Stromatolite Diversity: Reflection of Metazoan Appearance. *Science* 174, 825–827.
- Awramik, S.M., Schopf, J.W., Walter, M.R. (1983) Filamentous Fossil Bacteria from the Archean of Western Australia. In: Nagy, B., Weber, R., Guerrero, J.C., Schidlowski, M. (eds) *Developments in Precambrian Geology*. Elsevier, 249–266.
- Awramik, S.M. (1991) Archean and Proterozoic Stromatolites. In: Riding, R. (ed.) *Calcareous Algae and Stromatolites*. Springer, Berlin, Heidelberg, 289–304.
- Awramik, S. M., & Sprinkle, J. (1999). Proterozoic stromatolites: the first marine evolutionary biota. *Historical Biology*, 13(4), 241-253.
- Azzaro, E., Badalamenti, F., Dongarrà, G., Hauser, S. (1983) Geochemical and mineralogical studies of Lake Specchio di Venere, Pantelleria Island, Italy. *Chemical Geology* 40, 149–165. [https://doi.org/10.1016/0009-2541\(83\)90096-7](https://doi.org/10.1016/0009-2541(83)90096-7)
- Bahniuk, A., McKenzie, J.A., Perri, E., Bontognali, T.R.R., Vögeli, N., Rezende, C.E., Rangel, T.P., Vasconcelos, C. (2015) Characterization of environmental conditions during microbial Mg-carbonate precipitation and early diagenetic dolomite crust formation: Brejo do Espinho, Rio de Janeiro, Brazil. In: Bosence, D.W.J., Gibbons, K.A., Le Heron, D.P., Morgan, W.A., Pritchard, T., Vining, B.A. (Eds.) *Microbial Carbonates in Space and Time: Implications for Global Exploration and Production*. Geological Society, London, Special Publications, 418, 243–259. <https://doi.org/10.1144/SP418.11>
- Balan, E., Aufort, J., Pouillé, S., Dabos, M., Blanchard, M., Lazzeri, M., Rollion-Bard, C., Blamart, D. (2017). Infrared spectroscopic study of sulfate-bearing calcite from deep-sea bamboo coral. *European Journal of Mineralogy*, 29(3), 397-408.
- Baldock, J.A. (2001) Interactions of organic materials and microorganisms with minerals in the stabilization of soil structure. *Interactions between soil particles and microorganisms: impact*

- on the terrestrial ecosystem. John Wiley & Sons Ltd 85–131.
- Ball, J.W., McCleskey, R.B., Nordstrom, D.K., Holloway, J.M., Verplanck, P.L., Sturtevant, S.A. (2002) *Water-chemistry data for selected springs, geysers, and streams in Yellowstone National Park, Wyoming, 1999-2000*. USGS Open-File Report 2002-382, U.S. Geological Survey, Reston, VA. <https://doi.org/10.3133/ofr02382>
- Banfield, J.F., Barker, W.W., Welch, S.A., Taunton, A. (1999) Biological impact on mineral dissolution: Application of the lichen model to understanding mineral weathering in the rhizosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 3404–3411.
- Barbieri, M., Calderoni, G., Cortesi, C., Fornaseri, M. (1974) Huntite, a Mineral Used in Antiquity. *Archaeometry* 16, 211–220. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.1974.tb00106.x>
- Barker, P. (1992) Differential diatom dissolution in Late Quaternary sediments from Lake Manyara, Tanzania: an experimental approach. *Journal of Paleolimnology* 7, 235–251. <https://doi.org/10.1007/BF00181716>
- Baron, G., Caillère, S., Lagrange, R., Pobeguïn, T. (1959) Étude du Mondmilch de la grotte de la Clamouse et de quelques carbonates et hydrocarbonates alcalino-terreux. *Bulletin de Minéralogie* 82, 150–158. <https://doi.org/10.3406/bulmi.1959.5321>
- Bar-On, Y.M., Milo, R. (2019) Towards a quantitative view of the global ubiquity of biofilms. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group 17, 199–200.
- Barrett, E. L., & Clark, M. A. (1987). Tetrathionate reduction and production of hydrogen sulfide from thiosulfate. *Microbiological reviews*, 51(2), 192-205.
- Bathurst, R.G.C. (1970) Problems of lithification in carbonate muds. *Proceedings of the Geologists' Association* 81, 429–440.
- Bathurst, R.G.C., (1983) Early Diagenesis of Carbonate Sediments, in: Parker, A., Sellwood, B.W. (Eds.), *Sediment Diagenesis*, NATO ASI Series. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 349–377. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-7259-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-94-009-7259-9_7)
- Battin, T.J., Kaplan, L.A., Denis Newbold, J., Hansen, C.M.E. (2003) Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. *Nature*. Nature Publishing Group 426, 439–442.
- Baumgartner, L.K., Reid, R.P., Dupraz, C., Decho, A.W., Buckley, D.H., Spear, J.R., Przekop, K.M., Visscher, P.T. (2006) Sulfate reducing bacteria in microbial mats: Changing paradigms, new discoveries. *Sedimentary Geology* 185, 131–145.
- Bautista-Reyes, F., Macek, M. (2012) Ciliate food vacuole content and bacterial community composition in the warm-monomictic crater Lake Alchichica, México. *FEMS Microbiology Ecology* 79, 85–97.
- Baxter, R.M., Golobitsh, D.L. (1970) A Note on the Limnology of Lake Hayq, Ethiopia. *Limnology and Oceanography* 15, 144–149. <https://doi.org/10.4319/lo.1970.15.1.0144>
- Beeler, S.R., Gomez, F.J., Bradley, A.S. (2020) Controls of extreme isotopic enrichment in modern microbialites and associated abiogenic carbonates. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 269, 136–149. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2019.10.022>
- Bellanger, M., Visscher, P., White, R.A. (2023) Viral enumeration using cost-effective wet-mount epifluorescence microscopy for aquatic ecosystems and modern microbialites. *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology 89, e01744-23.
- Beltrones, David Alfaro Siqueiros. "Perspective Chapter: Remarks on the Relationship of Mangrove Recruitment and Thrombolithic Development in Coastal Lagoons." *Mangrove Biology, Ecosystem, and Conservation*. IntechOpen, 2022.
- Bengtsson-Palme, J. et al. (2018) Metaxa2 Database Builder: enabling taxonomic identification from metagenomic or metabarcoding data using any genetic marker. *Bioinformatics* 34, 4027–4033.
- Benning, L.G., Waychunas, G.A. (2008) Nucleation, Growth, and Aggregation of Mineral Phases: Mechanisms and Kinetic Controls. In: Brantley, S.L., Kubicki, J.D., White, A.F. (eds) *Kinetics of Water-Rock Interaction*. Springer, New York, NY, 259–333.
- Benson, L., White, L.D., Rye, R. (1996) Carbonate deposition, Pyramid Lake Subbasin, Nevada: 4. Comparison of the stable isotope values of carbonate deposits (tufas) and the Lahontan lake-level record. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 122, 45–76.

- [https://doi.org/10.1016/0031-0182\(95\)00099-2](https://doi.org/10.1016/0031-0182(95)00099-2)
- Benzerara, K., Menguy, N., López-García, P., Yoon, T.-H., Kazmierczak, J., Tyliszczak, T., Guyot, F., Brown, G.E., (2006) Nanoscale detection of organic signatures in carbonate microbialites. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 9440–9445. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603255103>
- Benzerara, K., Miot, J., Morin, G., Ona-Nguema, G., Skouri-Panet, F., Férard, C. (2011) Significance, mechanisms and environmental implications of microbial biomineralization. *Comptes Rendus. Géoscience* 343, 160–167.
- Benzerara, K. *et al.* (2014) Intracellular Ca-carbonate biomineralization is widespread in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 10933–10938.
- Benzerara, K., Bolzoni, R., Monteil, C., Beyssac, O., Forni, O., Alonso, B., Asta, M.P., Lefevre, C. (2021) The gammaproteobacterium *Achromatium* forms intracellular amorphous calcium carbonate and not (crystalline) calcite. *Geobiology* 19, 199–213.
- Benzerara, K. *et al.* (2022) A New Gene Family Diagnostic for Intracellular Biomineralization of Amorphous Ca Carbonates by Cyanobacteria. *Genome Biology and Evolution* 14, evac026.
- Bernal, J. D. (1949) The physical basis of life. *Proc. Phys. Soc. (Lond.)* A62, 537–558.
- Berner, R.A., Raiswell, R. (1983) Burial of organic carbon and pyrite sulfur in sediments over phanerozoic time: a new theory. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 47, 855–862.
- Berzas Nevado, J.J., García Bermejo, L.F., Martín-Álvarez, P.J., Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C. (2004) Quality Assessment and Chemometric Evaluation of a Fluvio-Lacustrine System: Ruidera Pools Natural Park (Spain). *Water, Air, and Soil Pollution* 155, 269–289. <https://doi.org/10.1023/B:WATE.0000026532.72630.10>
- Birgel, D., Meister, P., Lundberg, R., Horath, T.D., Bontognali, T.R.R., Bahniuk, A.M., de Rezende, C.E., Vasconcelos, C., McKenzie, J.A. (2015) Methanogenesis produces strong <sup>13</sup>C enrichment in stromatolites of Lagoa Salgada, Brazil: a modern analogue for Palaeo-/Neoproterozoic stromatolites? *Geobiology* 13, 245–266. <https://doi.org/10.1111/gbi.12130>
- Bischoff, J.L., Herbst, D.B., Rosenbauer, R.J. (1991) Gaylussite formation at Mono Lake, California. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 55, 1743–1747. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(91\)90144-T](https://doi.org/10.1016/0016-7037(91)90144-T)
- Bischoff, J.L., Israde-Alcántara, I., Garduño-Monroy, V.H., Shanks III, W.C. (2004) The springs of Lake Pátzcuaro: chemistry, salt-balance, and implications for the water balance of the lake. *Applied Geochemistry* 19, 1827–1835. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2004.04.003>
- Bischoff, K., Sirantoine, E., Wilson, M.E.J., George, A.D., Mendes Monteiro, J., Saunders, M. (2020) Spherulitic microbialites from modern hypersaline lakes, Rottneest Island, Western Australia. *Geobiology* 18, 725–741. <https://doi.org/10.1111/gbi.12400>
- Blanc, Ph., Lassin, A., Piantone, P., Azaroual, M., Jacquemet, N., Fabbri, A., Gaucher, E.C. (2012) Thermoddem: A geochemical database focused on low temperature water/rock interactions and waste materials. *Applied Geochemistry* 27, 2107–2116. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2012.06.002>
- Blaxter, M., Mann, J., Chapman, T., Thomas, F., Whitton, C., Floyd, R., Abebe, E. (2005) Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society 360, 1935–1943.
- Blue, C.R., Dove, P.M. (2015) Chemical controls on the magnesium content of amorphous calcium carbonate. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 148, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2014.08.003>
- Boden, R., Scott, K.M., Williams, J., Russel, S., Antonen, K., Rae, A.W., Hutt, L.P. (2017) An evaluation of *Thiomicrospira*, *Hydrogenovibrio* and *Thioalkalimicrobium*: reclassification of four species of *Thiomicrospira* to each *Thiomicrospira* gen. nov. and *Hydrogenovibrio*, and reclassification of all four species of *Thioalkalimicrobium* to *Thiomicrospira*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Microbiology Society, 67, 1140–1151.
- Boehrer, B., Schultze, M. (2008) Stratification of lakes. *Reviews of Geophysics* 46.
- Bontognali, T.R.R., Sessions, A.L., Allwood, A.C., Fischer, W.W., Grotzinger, J.P., Summons, R.E., Eiler, J.M. (2012) Sulfur isotopes of organic matter preserved in 3.45-billion-year-old

- stromatolites reveal microbial metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Proceedings of the National Academy of Sciences 109, 15146–15151.
- Boros, E., Kolpakova, M. (2018) A review of the defining chemical properties of soda lakes and pans: An assessment on a large geographic scale of Eurasian inland saline surface waters. *PLOS ONE* 13, e0202205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202205>
- Bourillot, R. *et al.* (2020) The Record of Environmental and Microbial Signatures in Ancient Microbialites: The Terminal Carbonate Complex from the Neogene Basins of Southeastern Spain. *Minerals*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute 10, 276.
- Bosak, T., Greene, S.E., Newman, D.K. (2007) A likely role for anoxygenic photosynthetic microbes in the formation of ancient stromatolites. *Geobiology* 5, 119–126.
- Bosak, T., Liang, B., Wu, T.-D., Templer, S.P., Evans, A., *et al.* (2012) Cyanobacterial diversity and activity in modern conical microbialites. *Geobiology* 10, 384–401. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2012.00334.x>
- Bosak, T., Knoll, A.H., Petroff, A.P., (2013) The Meaning of Stromatolites. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 41, 21–44. <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-042711-105327>
- Boschetti, T., Cortecchi, G., Barbieri, M., Mussi, M. (2007) New and past geochemical data on fresh to brine waters of the Salar de Atacama and Andean Altiplano, northern Chile. *Geofluids* 7, 33–50. <https://doi.org/10.1111/j.1468-8123.2006.00159.x>
- Bosence, D., Gibbons, K., Le Heron, D.P., Morgan, W.A., Pritchard, T., Vining, B.A. (2015) Microbial carbonates in space and time: introduction. *Geological Society, London, Special Publications*. The Geological Society of London 418, 1–15.
- Bougeault, C., Vennin, E., Durllet, C., Muller, E., Mercuzot, M., *et al.* (2019) Biotic–Abiotic Influences on Modern Ca–Si-Rich Hydrothermal Spring Mounds of the Pastos Grandes Volcanic Caldera (Bolivia). *Minerals* 9, 380. <https://doi.org/10.3390/min9060380>
- Bouton, A., Vennin, E., Amiotte-Suchet, P., Thomazo, C., Sizun, J.-P., Virgone, A., Gaucher, E.C., Visscher, P.T. (2020) Prediction of the calcium carbonate budget in a sedimentary basin: A “source-to-sink” approach applied to Great Salt Lake, Utah, USA. *Basin Research* 32, 1005–1034. <https://doi.org/10.1111/bre.12412>
- Brack, A. (2013) Chapter 10.4 - Clay Minerals and the Origin of Life. In: Bergaya, F., Lagaly, G. (eds) *Developments in Clay Science*. Elsevier, 507–521.
- Braithwaite, C.J.R., Zedef, V. (1996) Hydromagnesite stromatolites, sediments in an alkaline lake, Salda Gölü, Turkey. *Journal of Sedimentary Research* 66, 991–1002. <https://doi.org/10.1306/D426845F-2B26-11D7-8648000102C1865D>
- Braithwaite, C.J.R., Casanova, J., Frevert, T., Whitton, B.A. (1989) Recent stromatolites in landlocked pools on Aldabra, Western Indian ocean. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 69, 145–165. [https://doi.org/10.1016/0031-0182\(89\)90162-4](https://doi.org/10.1016/0031-0182(89)90162-4)
- Brand, A., Bruderer, H., Oswald, K., Guggenheim, C., Schubert, C.J., Wehrli, B. (2016) Oxygenic primary production below the oxycline and its importance for redox dynamics. *Aquatic Sciences* 78, 727–741.
- Brasier, M.D., Green, O.R., Lindsay, J.F., McLoughlin, N., Steele, A., Stoakes, C. (2005) Critical testing of Earth’s oldest putative fossil assemblage from the ~3.5 Ga Apex chert, Chinaman Creek, Western Australia. *Precambrian Research* 140, 55–102.
- Brečević, L., Nielsen, A.E. (1989) Solubility of amorphous calcium carbonate. *Journal of Crystal Growth* 98, 504–510. [https://doi.org/10.1016/0022-0248\(89\)90168-1](https://doi.org/10.1016/0022-0248(89)90168-1)
- Brigmon, R.L., Morris, P., Smith, G. (2008) Evaporite Microbial Films, Mats, Microbialites and Stromatolites. In: Dilek, Y., Furnes, H., Muehlenbachs, K. (Eds.) *Links Between Geological Processes, Microbial Activities & Evolution of Life: Microbes and Geology*. Modern Approaches in Solid Earth Sciences, v. 4, Springer, Dordrecht, 197–235. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8306-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8306-8_7)
- Brocks, J.J. (2018) The transition from a cyanobacterial to algal world and the emergence of animals. *Emerging Topics in Life Sciences* 2, 181–190.
- Brunberg, A.K., Blomqvist, P. (1999) *Characteristics and ontogeny of oligotrophic hardwater lakes in the Forsmark area, central Sweden*. Report SKB-R--99-68, Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co., Stockholm, Sweden, 48 p.

- [https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig\\_q=RN:31025613](https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:31025613)
- Brunskill, G.J., Ludlam, S.D. (1969) Fayetteville Green Lake, New York. I. Physical and chemical limnology, *Limnology and Oceanography* 14, 817–829. <https://doi.org/10.4319/lo.1969.14.6.0817>
- Buick, R. (2008) When did oxygenic photosynthesis evolve? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society 363, 2731–2743.
- Bundeleva, I.A., Shirokova, L.S., Bénézech, P., Pokrovsky, O.S., Kompantseva, E.I., Balor, S. (2012) Calcium carbonate precipitation by anoxygenic phototrophic bacteria. *Chemical Geology* 291, 116–131.
- Buongiorno, J., Gomez, F.J., Fike, D.A., Kah, L.C. (2019) Mineralized microbialites as archives of environmental evolution, Laguna Negra, Catamarca Province, Argentina. *Geobiology* 17, 199–222.
- Burne, R.V., Moore, L.S. (1987) Microbialites: Organosedimentary Deposits of Benthic Microbial Communities. *PALAIOS* 2, 241–254.
- Burne, R.V., Moore, L.S., Christy, A.G., Troitzsch, U., King, P.L., Carnerup, A.M., Hamilton, P.J. (2014) Stevensite in the modern thrombolites of Lake Clifton, Western Australia: A missing link in microbialite mineralization? *Geology* 42, 575–578.
- Buss, H. L., Lüttge, A., & Brantley, S. L. (2007). Etch pit formation on iron silicate surfaces during siderophore-promoted dissolution. *Chemical Geology*, 240(3-4), 326-342.
- Butterfield, N.J. (2015) The Neoproterozoic. *Current Biology* 25, R859–R863.
- Büttner, S.H., Isemonger, E.W., Isaacs, M., van Niekerk, D., Sipler, R.E., Dorrington, R.A. (2021) Living phosphatic stromatolites in a low-phosphorus environment: Implications for the use of phosphorus as a proxy for phosphate levels in paleo-systems. *Geobiology* 19, 35–47.
- Caesar, K.H., Kyle, J.R., Lyons, T.W., Tripathi, A., Loyd, S.J. (2019) Carbonate formation in salt dome cap rocks by microbial anaerobic oxidation of methane. *Nature Communications*. Nature Publishing Group 10, 808.
- Cahill, A.E. *et al.* (2018) A comparative analysis of metabarcoding and morphology-based identification of benthic communities across different regional seas. *Ecology and Evolution* 8, 8908–8920.
- Cai, M., Wang, L., Cai, H., Li, Y., Wang, Y.-N., Tang, Y.-Q., Wu, X.-L. (2011) *Salinarimonas ramus* sp. nov. and *Tessaracoccus oleiagri* sp. nov., isolated from a crude oil-contaminated saline soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Microbiology Society, 61, 1767–1775.
- Calvert, S. E., & Pedersen, T. F. (1996). Sedimentary geochemistry of manganese; implications for the environment of formation of manganiferous black shales. *Economic Geology*, 91(1), 36-47.
- Calvo, J.P., Stamatakis, M.G., Magganas, A. (1995) Clastic huntite in upper Neogene formations of the Kozani Basin, Macedonia, northern Greece. *Journal of Sedimentary Research* 65, 627–632.
- Camoin, G.F., Gautret, P. (2006) Microbialites and microbial communities: Biological diversity, biogeochemical functioning, diagenetic processes, tracers of environmental changes. *Sedimentary Geology* 185, 127–130.
- Campos, H., Soto, D., Parra, O., Steffen, W., Aguero, G. (1995) Limnological studies of Amarga Lagoon, Chile: A saline lake in Patagonian South America. *International Journal of Salt Lake Research* 4, 301–314. <https://doi.org/10.1007/BF01999114>
- Canet, C., Prol-Ledesma, R.M., Torres-Alvarado, I., Gilg, H.A., Villanueva, R.E., Cruz, R.L.-S. (2005) Silica-carbonate stromatolites related to coastal hydrothermal venting in Bahía Concepción, Baja California Sur, Mexico. *Sedimentary Geology* 174, 97–113. <https://doi.org/10.1016/j.sedgeo.2004.12.001>
- Canfield, D.E., Green, W.J. (1985) The cycling of nutrients in a closed-basin antarctic lake: Lake Vanda. *Biogeochemistry* 1, 233–256. <https://doi.org/10.1007/BF02187201>
- Canfield, D. E., Lyons, T. W., & Raiswell, R. (1996). A model for iron deposition to euxinic Black Sea sediments. *American Journal of Science*, 296(7), 818-834.
- Canfield, D.E. (1998) A new model for Proterozoic ocean chemistry. *Nature*. Nature Publishing Group 396, 450–453.
- Canfield, D.E., Erik Kristensen, Bo Thamdrup (2005) The Sulfur Cycle. In: Canfield, D.E., Kristensen, E., Thamdrup, B. (eds) *Advances in Marine Biology*. Academic Press, 313–381.

- Canfield, D.E., Rosing, M.T., Bjerrum, C. (2006) Early anaerobic metabolisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society 361, 1819–1836.
- Canfield, D.E., Poulton, S.W., Knoll, A.H., Narbonne, G.M., Ross, G., Goldberg, T., Strauss, H. (2008) Ferruginous Conditions Dominated Later Neoproterozoic Deep-Water Chemistry. *Science*. American Association for the Advancement of Science 321, 949–952.
- Canfield, D.E., Thamdrup, B. (2009) Towards a consistent classification scheme for geochemical environments, or, why we wish the term ‘suboxic’ would go away. *Geobiology* 7, 385–392.
- Cangemi, M., Bellanca, A., Borin, S., Hopkinson, L., Mapelli, F., Neri, R. (2010) The genesis of actively growing siliceous stromatolites: Evidence from Lake *Specchio di Venere*, Pantelleria Island, Italy. *Chemical Geology* 276, 318–330. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2010.06.017>
- Cangemi, M., Censi, P., Reimer, A., D’Alessandro, W., Hause-Reitner, D., Madonia, P., Oliveri, Y., Pecoraino, G., Reitner, J. (2016) Carbonate precipitation in the alkaline lake *Specchio di Venere* (Pantelleria Island, Italy) and the possible role of microbial mats. *Applied Geochemistry* 67, 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2016.02.012>
- Cardona, T., Sánchez-Baracaldo, P., Rutherford, A.W., Larkum, A.W. (2019) Early Archean origin of Photosystem II. *Geobiology* 17, 127–150.
- Carrasco-Núñez, G., Chako-Tchamabé, B. (2022) Geological Evolution of the Alchichica Crater. In: Alcocer, J. (ed.) *Lake Alchichica Limnology: The Uniqueness of a Tropical Maar Lake*. Springer International Publishing, Cham, 15–32.
- Carrasco-Núñez, G., Ort, M., Riggs, N., Zimmer, B., De León-Barragán, L., Rojas, M. (2014) *Contrasting eruptive styles of late Pleistocene-to-Holocene monogenetic volcanism from maars to domes in the Serdán-Oriental basin, eastern Mexican Volcanic Belt*.
- Carrasco-Núñez, G., Ort, M.H., Romero, C. (2007) Evolution and hydrological conditions of a maar volcano (Atexcac crater, Eastern Mexico). *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 159, 179–197.
- Casanova, J., Hillaire-Marcel, C. (1992) Chronology and paleohydrology of late Quaternary high lake levels in the Manyara basin (Tanzania) from isotopic data ( $^{18}\text{O}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ , Th/U) on fossil stromatolites. *Quaternary Research* 38, 205–226. [https://doi.org/10.1016/0033-5894\(92\)90057-P](https://doi.org/10.1016/0033-5894(92)90057-P)
- Castro-Contreras, S.I., Gingras, M.K., Pecoits, E., Aubet, N.R., Petrash, D., Castro-Contreras, S.M., Dick, G., Planavsky, N., Konhauser, K.O. (2014) Textural and geochemical features of freshwater microbialites from Laguna Bacalar, Quintana Roo, Mexico. *PALAIOS* 29, 192–209. <https://doi.org/10.2110/palo.2013.063>
- Catling, D.C., Zahnle, K.J. (2020) The Archean atmosphere. *Science Advances*. American Association for the Advancement of Science 6, eaax1420.
- Caumartin, J., Benzerara, K., Havas, R., Thomazo, C., Lòpez-García, P., Duprat, E. (2023) The chemical conditions necessary for the formation of microbialites. *Geochemical Perspectives Letters* 25, 30–35.
- Cejudo, E., Acosta-González, G., Ortega-Camacho, D., Tun-Rosado, G.E. (2020) Changes in the hydrochemistry of a karstic lake in Yucatan, Mexico. *Environmental Earth Sciences* 79, 98. <https://doi.org/10.1007/s12665-020-8838-3>
- Cellamare, M., Duval, C., Drelin, Y., Djediat, C., Touibi, N., Agogué, H., Leboulanger, C., Ader, M., Bernard, C. (2018) Characterization of phototrophic microorganisms and description of new cyanobacteria isolated from the saline-alkaline crater-lake Dziani Dzaha (Mayotte, Indian Ocean). *FEMS Microbiology Ecology* 94, fyy108.
- Centeno, C.M., Legendre, P., Beltrán, Y., Alcántara-Hernández, R.J., Lidström, U.E., Ashby, M.N., Falcón, L.I. (2012) Microbialite genetic diversity and composition relate to environmental variables. *FEMS Microbiology Ecology* 82, 724–735.
- Chagas, A.A.P., Webb, G.E., Burne, R.V., Southam, G. (2016) Modern lacustrine microbialites: Towards a synthesis of aqueous and carbonate geochemistry and mineralogy. *Earth-Science Reviews* 162, 338–363. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2016.09.012>
- Chako-Tchamabé, B., Carrasco-Núñez, G., Gountié Dedzo, M., Kshirsagar, P., Asaah, A.N.E. (2020) Geochemical characterization of alchichica maar volcano, Serdán-oriental Basin, eastern Trans-Mexican Volcanic Belt: Insights on polymagmatic evolution at monogenetic volcanic clusters.

- Journal of South American Earth Sciences* 104, 102889.
- Cloern, J.E., Cole, B.E., Oremland, R.S. (1983) Seasonal changes in the chemistry and biology of a meromictic lake (Big Soda Lake, Nevada, USA). *Hydrobiologia* 105, 195–206. <https://doi.org/10.1007/BF00025188>
- Cockell, C.S. (2010) Geomicrobiology beyond Earth: microbe–mineral interactions in space exploration and settlement. *Trends in Microbiology*. Elsevier 18, 308–314.
- Cohen, A.S., Thouin, C. (1987) Nearshore carbonate deposits in Lake Tanganyika. *Geology* 15, 414–418. [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(1987\)15<414:NCDILT>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(1987)15<414:NCDILT>2.0.CO;2)
- Cohuo-Durán, S., Pérez, L., Karanovic, I. (2014) On *Limnocytherina axalapasco*, a new freshwater ostracod (Podocopida: Limnocytheridae) from Mexican crater lakes. *Revista de Biología Tropical* 62, 15–32. <https://doi.org/10.15517/rbt.v62i1.11796>
- Coman, C., Chiriac, C.M., Robeson, M.S., Ionescu, C., Dragos, N., *et al.* (2015) Structure, mineralogy, and microbial diversity of geothermal spring microbialites associated with a deep oil drilling in Romania. *Frontiers in Microbiology* 6, 253. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00253>
- Corbett, M.K., Eksteen, J.J., Niu, X.-Z., Croue, J.-P., Watkin, E.L.J. (2017) Interactions of phosphate solubilising microorganisms with natural rare-earth phosphate minerals: a study utilizing Western Australian monazite. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 40, 929–942.
- Core, R. Team. "R: A language and environment for statistical computing." (*No Title*) (2019).
- Coshell, L., Rosen, M.R., McNamara, K.J. (1998) Hydromagnesite replacement of biomineralized aragonite in a new location of Holocene stromatolites, Lake Walyungup, Western Australia. *Sedimentology* 45, 1005–1018. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3091.1998.00187.x>
- Cosmidis, J., Benzerara, K. (2022) Why do microbes make minerals? *Comptes Rendus. Géoscience* 354, 1–39.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M. (1995) Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology* 49, 711–745.
- Couradeau, E., Benzerara, K., Moreira, D., Gérard, E., Kaźmierczak, J., Tavera, R., López-García, P. (2011) Prokaryotic and Eukaryotic Community Structure in Field and Cultured Microbialites from the Alkaline Lake Alchichica (Mexico). *PLOS ONE*. Public Library of Science 6, e28767.
- Couradeau, E., Benzerara, K., Gérard, E., Moreira, D., Bernard, S., Brown, G.E., López-García, P. (2012) An Early-Branching Microbialite Cyanobacterium Forms Intracellular Carbonates. *Science*. American Association for the Advancement of Science 336, 459–462.
- Couradeau, E., Benzerara, K., Gérard, E., Estève, I., Moreira, D., Tavera, R., López-García, P. (2013) Cyanobacterial calcification in modern microbialites at the submicrometer scale. *Biogeosciences* 10, 5255–5266. <https://doi.org/10.5194/bg-10-5255-2013>
- Couradeau, E., Benzerara, K., Moreira, D., López-García, P. (2017) Protocols for the Study of Microbe–Mineral Interactions in Modern Microbialites. In: McGenity, T.J., Timmis, K.N., Nogales, B. (eds) *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols: Field Studies*. Springer, Berlin, Heidelberg, 319–341.
- Craddock, P.R., Dauphas, N. (2011) Iron and carbon isotope evidence for microbial iron respiration throughout the Archean. *Earth and Planetary Science Letters* 303, 121–132.
- Crowe, S., Ding, A., Zhao, G. (2023) Photoferrotrophy, BIF deposition, and iron-free oxygen oases in the Archean surface ocean.
- Cuadros, J. (2017) Clay minerals interaction with microorganisms: a review. *Clay Minerals* 52, 235–261.
- Dalrymple, D.W. (1964) *Recent sedimentary facies of Baffin Bay, Texas*. Ph.D. thesis, Rice University, Houston, Texas, 192 p. <https://hdl.handle.net/1911/14155>
- Davraz, A., Varol, S., Sener, E., Sener, S., Aksever, F., Kırkan, B., Tokgözlü, A. (2019) Assessment of water quality and hydrogeochemical processes of Salda alkaline lake (Burdur, Turkey). *Environmental Monitoring and Assessment* 191, 701. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7889-y>
- Davies, P.J., Bubela, B., Ferguson, J. (1977) Simulation of carbonate diagenetic processes: formation of dolomite, huntite and monohydrocalcite by the reactions between nesquehonite and brine. *Chemical Geology* 19, 187–214.
- De Boever, E., Brasier, A.T., Foubert, A., Kele, S. (2017) What do we really know about early diagenesis

- of non-marine carbonates? *Sedimentary Geology* 361, 25–51.
- Debrie, J., Prêt, D., Menguy, N., Estève, I., Sans-Jofre, P., Saint Martin, J.-P., Benzerara, K. (2022) Mapping mineralogical heterogeneities at the nm-scale by scanning electron microscopy in modern Sardinian stromatolites: Deciphering the origin of their laminations. *Chemical Geology* 609, 121059.
- De los Ríos, P., Soto, D. (2009) Estudios limnológicos en lagos y lagunas del Parque Nacional Torres del Paine (51° S, Chile). *Anales del Instituto de la Patagonia* 37, 63–71. <https://doi.org/10.4067/S0718-686X2009000100006>
- De Voogd, N.J., Cleary, D.F.R., Polónia, A.R.M., Gomes, N.C.M. (2015) Bacterial community composition and predicted functional ecology of sponges, sediment and seawater from the thousand islands reef complex, West Java, Indonesia. *FEMS Microbiology Ecology* 91, fiv019.
- Deelman, J. C. "Low-temperature nucleation of magnesite and dolomite." *Neues Jahrbuch Fur Mineralogie Monatshefte* (1999): 289-302.
- Des Marais, D.J. (2000) When Did Photosynthesis Emerge on Earth? *Science* 289, 1703–1705.
- Degens, E.T., Von Herzen, R.P., Wong, H.-K. (1971) Lake Tanganyika: Water chemistry, sediments, geological structure. *Naturwissenschaften* 58, 229–241. <https://doi.org/10.1007/BF00602986>
- Della Porta, G. (2015) Carbonate build-ups in lacustrine, hydrothermal and fluvial settings: comparing depositional geometry, fabric types and geochemical signature. In: Bosence, D.W.J., Gibbons, K.A., Le Heron, D.P., Morgan, W.A., Pritchard, T., Vining, B.A. (Eds.) *Microbial Carbonates in Space and Time: Implications for Global Exploration and Production*. Geological Society, London, Special Publications, 418, 17–68. <https://doi.org/10.1144/SP418.4>
- Demergasso, C., Escudero, L., Casamayor, E.O., Chong, G., Balagué, V., Pedrós-Alió, C. (2008) Novelty and spatio-temporal heterogeneity in the bacterial diversity of hypersaline Lake Tebenquiche (Salar de Atacama). *Extremophiles* 12, 491–504. <https://doi.org/10.1007/s00792-008-0153-y>
- Demlie, M., Ayenew, T., Wohnlich, S. (2007) Comprehensive hydrological and hydrogeological study of topographically closed lakes in highland Ethiopia: The case of Hayq and Ardibo. *Journal of Hydrology* 339, 145–158. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2007.03.012>
- Deocampo, D.M. (2010) Chapter 1 The Geochemistry of Continental Carbonates. In: Alonso-Zarza, A.M., Tanner, L.H. (eds) *Developments in Sedimentology*. Elsevier, 1–59.
- Deocampo, D.M., Jones, B.F. (2014) 7.13 - Geochemistry of Saline Lakes. In: Holland, H.D., Turekian, K.K. (Eds.) *Treatise on Geochemistry*. Second Edition, Elsevier, Amsterdam, 437–469. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-095975-7.00515-5>
- Dettman, D.L., Palacios-Fest, M.R., Nkotagu, H.H., Cohen, A.S. (2005) Paleolimnological investigations of anthropogenic environmental change in Lake Tanganyika: VII. Carbonate isotope geochemistry as a record of riverine runoff. *Journal of Paleolimnology* 34, 93–105. <https://doi.org/10.1007/s10933-005-2400-x>
- De Visscher, A., Vanderdeelen, J. (2003) Estimation of the Solubility Constant of Calcite, Aragonite, and Vaterite at 25°C Based on Primary Data Using the Pitzer Ion Interaction Approach. *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly* 134, 769–775. <https://doi.org/10.1007/s00706-002-0587-3>
- Díaz-Palma, P., Stegen, S., Queirolo, F., Arias, D., Araya, S. (2012) Biochemical profile of halophilous microalgae strains from high-andean extreme ecosystems (NE-Chile) using methodological validation approaches. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 113, 730–736. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.01.015>
- Dick, G.J., Grim, S.L., Klatt, J.M. (2018) Controls on O<sub>2</sub> Production in Cyanobacterial Mats and Implications for Earth's Oxygenation. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*. Annual Reviews 46, 123–147.
- Dickson, A.G. (1981) An exact definition of total alkalinity and a procedure for the estimation of alkalinity and total inorganic carbon from titration data. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers* 28, 609–623. [https://doi.org/10.1016/0198-0149\(81\)90121-7](https://doi.org/10.1016/0198-0149(81)90121-7)
- Dillon, J.G., Carlin, M., Gutierrez, A., Nguyen, V., McLain, N. (2013) Patterns of microbial diversity along a salinity gradient in the Guerrero Negro solar saltern, Baja CA Sur, Mexico. *Frontiers*

- in Microbiology* 4, 399. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00399>
- Dinger, E.C., Cohen, A.E., Hendrickson, D.A., Marks, J.C. (2005) Aquatic invertebrates of Cuatro Ciénegas, Coahuila, México: Natives and exotics. *The Southwestern Naturalist* 50, 237–246. [https://doi.org/10.1894/0038-4909\(2005\)050\[0237:AIOCCC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1894/0038-4909(2005)050[0237:AIOCCC]2.0.CO;2)
- Dollase, W.A., Reeder, R.J. (1986) Crystal structure refinement of huntite,  $\text{CaMg}_3(\text{CO}_3)_4$ , with X-ray powder data. *American Mineralogist* 71, 163–166.
- Dodd, C., Anderson, C.R., Perissinotto, R., du Plooy, S.J., Rishworth, G.M. (2018) Hydrochemistry of peritidal stromatolite pools and associated freshwater inlets along the Eastern Cape coast, South Africa. *Sedimentary Geology* 373, 163–179. <https://doi.org/10.1016/j.sedgeo.2018.06.002>
- Donaldson, A., Whitton, B.A. (1977) Chemistry of Freshwater Pools on Aldabra. *Atoll Research Bulletin* 213, 1–25. <https://doi.org/10.5479/si.00775630.213.1>
- Dong, H. *et al.* (2022) A critical review of mineral–microbe interaction and co-evolution: mechanisms and applications. *National Science Review* 9, nwac128.
- Dong, H., Lu, A. (2012) Mineral–Microbe Interactions and Implications for Remediation. *Elements* 8, 95–100.
- Duda, J.-P., Kranendonk, M.J.V., Thiel, V., Ionescu, D., Strauss, H., Schäfer, N., Reitner, J. (2016) A Rare Glimpse of Paleoarchean Life: Geobiology of an Exceptionally Preserved Microbial Mat Facies from the 3.4 Ga Strelley Pool Formation, Western Australia. *PLOS ONE*. Public Library of Science 11, e0147629.
- Dupraz, C., Visscher, P.T., Baumgartner, L.K., Reid, R.P. (2004) Microbe–mineral interactions: early carbonate precipitation in a hypersaline lake (Eleuthera Island, Bahamas). *Sedimentology* 51, 745–765.
- Dupraz, C., Visscher, P.T. (2005) Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats. *Trends in Microbiology*. Elsevier 13, 429–438.
- Dupraz, C., Reid, R., Braissant, O., Decho, A., Norman, R., Visscher, P. (2009) Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth-Science Reviews* 96, 141–162.
- Dupraz, C., Reid, R., Visscher, P. (2011) Microbialites, Modern. *Encyclopedia of Earth Sciences Series*, 617–635.
- Duverger, A., Berg, J.S., Busigny, V., Guyot, F., Bernard, S., Miot, J. (2020) Mechanisms of Pyrite Formation Promoted by Sulfate-Reducing Bacteria in Pure Culture. *Frontiers in Earth Science*. Frontiers 8.
- Dwyer, R., Bruckard, W.J., Rea, S., Holmes, R.J. (2012) Bioflotation and bioflocculation review: microorganisms relevant for mineral beneficiation. *Mineral Processing and Extractive Metallurgy*. Taylor & Francis 121, 65–71.
- Eckert, T., Brunner, B., Edwards, E. A., & Wortmann, U. G. (2011). Microbially mediated re-oxidation of sulfide during dissimilatory sulfate reduction by *Desulfobacter latus*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(12), 3469-3485.
- Edgcomb, V.P., Bernhard, J.M., Summons, R.E., Orsi, W., Beaudoin, D., Visscher, P.T. (2014) Active eukaryotes in microbialites from Highborne Cay, Bahamas, and Hamelin Pool (Shark Bay), Australia. *The ISME Journal* 8, 418–429. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.130>
- Edmond, J.M., Stallard, R.F., Craig, H., Craig, V., Weiss, R.F., Coulter, G.W. (1993) Nutrient chemistry of the water column of Lake Tanganyika. *Limnology and Oceanography* 38, 725–738. <https://doi.org/10.4319/lo.1993.38.4.0725>
- Edwards, H.G.M., Villar, S.E.J., Jehlicka, J., Munshi, T. (2005) FT–Raman spectroscopic study of calcium-rich and magnesium-rich carbonate minerals. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 61, 2273–2280.
- Edwards, K.J., Bach, W., McCollom, T.M. (2005) Geomicrobiology in oceanography: microbe–mineral interactions at and below the seafloor. *Trends in Microbiology*. Elsevier 13, 449–456.
- Edwardson, C.F., Hollibaugh, J.T. (2018) Composition and Activity of Microbial Communities along the Redox Gradient of an Alkaline, Hypersaline, Lake. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers 9.
- Ehrenreich, A., Widdel, F. (1994) Anaerobic oxidation of ferrous iron by purple bacteria, a new type of phototrophic metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology 60, 4517–4526.
- Ehrlich, H.L. (2001) Interactions between microorganisms and minerals under anaerobic conditions.

- Interactions between soil particles and microorganisms: impact on the terrestrial ecosystem.* John Wiley & Sons Ltd 459–494.
- Einsiedl, F., Schäfer, T., Northrup, P. (2007) Combined sulfur K-edge XANES spectroscopy and stable isotope analyses of fulvic acids and groundwater sulfate identify sulfur cycling in a karstic catchment area. *Chemical Geology* 238, 268–276.
- Emmings, J.F., Poulton, S.W., Walsh, J., Leeming, K.A., Ross, I., Peters, S.E. (2022) Pyrite meganalysis reveals modes of anoxia through geological time. *Science Advances*. American Association for the Advancement of Science 8, eabj5687.
- English, V., Blyth, J., Goodale, A., Goodale, B., Moore, L., et al. (2003) *Thrombolite community of coastal freshwater lakes (lake Richmond)*. Department of Conservation and Land Management, Western Australian Threatened Species and Communities Unit, Wanneroo, Australia, Interim Recovery Plan No. 122. [https://www.dpaw.wa.gov.au/images/documents/plants-animals/threatened-species/recovery\\_plans/Approved\\_interim\\_recovery\\_plans\\_/communities/lakerichmond\\_irp\\_122.pdf](https://www.dpaw.wa.gov.au/images/documents/plants-animals/threatened-species/recovery_plans/Approved_interim_recovery_plans_/communities/lakerichmond_irp_122.pdf)
- Ercilla Herrero, O. (2019) Origen and evolution of gypsum stromatolites in salars of the Andes highlands, northern Chile. *Andean Geology* 46, 211–222. <https://doi.org/10.5027/andgeoV46n1-3029>
- Escudero, C., del Campo, A., Ares, J.R., Sánchez, C., Martínez, J.M., Gómez, F., Amils, R. (2020) Visualizing Microorganism-Mineral Interaction in the Iberian Pyrite Belt Subsurface: The Acidovorax Case. *Frontiers in Microbiology* 11.
- Eugster, H.P. (1980) Chapter 15 Lake Magadi, Kenya, and Its Precursors. In: Nissenbaum, A. (Ed.) *Hypersaline Brines and Evaporitic Environments*. Developments in Sedimentology 28, Elsevier, Amsterdam, 195–232. [https://doi.org/10.1016/S0070-4571\(08\)70239-5](https://doi.org/10.1016/S0070-4571(08)70239-5)
- Eymard, I., Álvarez, M.d.P., Bilmes, A., Vasconcelos, C., Thomas, C., Ariztegui, D. (2021) Evolving controls on mineralization in Patagonian microbial mats as inferred by water chemistry, microscopy and DNA signatures. *Latin American journal of sedimentology and basin analysis* 28, 133–151. <https://lajsba.sedimentologia.org.ar/index.php/lajsba/article/view/28-2-4>
- Fairchild, I. J. (1991). Origins of carbonate in Neoproterozoic stromatolites and the identification of modern analogues. *Precambrian Research*, 53(3-4), 281-299.
- Fakhræe, M., Crowe, S.A., Katsev, S. (2018) Sedimentary sulfur isotopes and Neoproterozoic ocean oxygenation. *Science Advances*. American Association for the Advancement of Science 4, e1701835.
- Farquhar, J., Zerkle, A.L., Bekker, A. (2011) Geological constraints on the origin of oxygenic photosynthesis. *Photosynthesis Research* 107, 11–36.
- Fariás, M.E., Contreras, M., Rasuk, M.C., Kurth, D., Flores, M.R., Poiré, D.G., Novoa, F., Visscher, P.T. (2014) Characterization of bacterial diversity associated with microbial mats, gypsum evaporites and carbonate microbialites in thalassic wetlands: Tebenquiche and La Brava, Salar de Atacama, Chile. *Extremophiles* 18, 311–329. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0617-6>
- Fariás, M.E., Rasuk, M.C., Gallagher, K.L., Contreras, M., Kurth, D., Fernandez, A.B., Poiré, D., Novoa, F., Visscher, P.T. (2017) Prokaryotic diversity and biogeochemical characteristics of benthic microbial ecosystems at La Brava, a hypersaline lake at Salar de Atacama, Chile. *PLOS ONE* 12, e0186867. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186867>
- Fariás, M.E., Villafañe, P.G., Lencina, A.I. (2020) Integral Prospecction of Andean Microbial Ecosystem Project. In: Fariás, M.E. (Ed.) *Microbial Ecosystems in Central Andes Extreme Environments*. Springer, Cham, 245–260. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-36192-1\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-030-36192-1_17)
- Farmer, V.C. (1974). *The Infrared Spectra of Minerals*. London: The Mineralogical Society.
- Faust, G.T. (1953) Huntite, Mg<sub>3</sub>Ca(CO<sub>3</sub>)<sub>4</sub> A new mineral\*. *American Mineralogist* 38, 4–24.
- Felstead, N.J., Leng, M.J., Metcalfe, S.E., Gonzalez, S. (2015) Understanding the hydrogeology and surface flow in the Cuatrociénegas Basin (NE Mexico) using stable isotopes. *Journal of Arid Environments* 121, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2015.05.009>
- Ferrari, L., Orozco-Esquivel, T., Manea, V., Manea, M. (2012) The dynamic history of the Trans-Mexican Volcanic Belt and the Mexico subduction zone. *Tectonophysics* 522–523, 122–149.
- Filonov, Anatoliy, et al. "Meteorological regime, local climate, and hydrodynamics of Lake

- Alchichica." *Lake Alchichica Limnology: The Uniqueness of a Tropical Maar Lake*. Cham: Springer International Publishing, 2022. 75-99.
- Fischer, A.G. (1965) Fossils, early life, and atmospheric history. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 53, 1205–1215. <https://doi.org/10.1073/pnas.53.6.1205-a>
- Fischer, W.W., Hemp, J., Johnson, J.E. (2016) Evolution of Oxygenic Photosynthesis. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*. Annual Reviews 44, 647–683.
- Flannery, D.T., Walter, M.R. (2012) Archean tufted microbial mats and the Great Oxidation Event: new insights into an ancient problem. *Australian Journal of Earth Sciences*. Taylor & Francis 59, 1–11.
- Fleet, M.E. (2005) Xanes spectroscopy of sulfur in Earth materials. *The Canadian Mineralogist* 43, 1811–1838.
- Floquet, N., Vielzeuf, D., Ferry, D., Ricolleau, A., Heresanu, V., Perrin, J., Laporte, D., Fitch, A.N. (2015): Thermally induced modifications and phase transformations of red coral Mg-calcite skeletons from infrared spectroscopy and high resolution synchrotron powder diffraction analyses. *Cryst. Growth Des.*, 15, 3690-3706.
- Fomina, M., Skorochod, I. (2020) Microbial Interaction with Clay Minerals and Its Environmental and Biotechnological Implications. *Minerals*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute 10, 861.
- Force, E. R., & Cannon, W. F. (1988). Depositional model for shallow-marine manganese deposits around black shale basins. *Economic Geology*, 83(1), 93-117.
- Foster, J.S., Green, S.J. (2011) Microbial Diversity in Modern Stromatolites. In: Tewari, V., Seckbach, J. (eds) *STROMATOLITES: Interaction of Microbes with Sediments*. Springer Netherlands, Dordrecht, 383–405.
- Fournier, R.O., Weltman, U., Counce, D., White, L.D., Janik, C.J. (2002) *Results Of Weekly Chemical And Isotopic Monitoring Of Selected Springs In Norris Geyser Basin, Yellowstone National Park During June-September, 1995*. USGS Open-File Report 02-344, U.S. Geological Survey, Reston, VA, 49 p. <https://pubs.usgs.gov/of/2002/0344/>
- Fournier, G.P., Moore, K.R., Rangel, L.T., Payette, J.G., Momper, L., Bosak, T. (2021) The Archean origin of oxygenic photosynthesis and extant cyanobacterial lineages. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society 288, 20210675.
- Frankel, R.B., Bazylinski, D.A. (2003) Biologically Induced Mineralization by Bacteria. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 54, 95–114.
- Frei, R., Gaucher, C., Poulton, S.W., Canfield, D.E. (2009) Fluctuations in Precambrian atmospheric oxygenation recorded by chromium isotopes. *Nature*. Nature Publishing Group 461, 250–253.
- Frei, R., Gaucher, C., Døssing, L.N., Sial, A.N. (2011) Chromium isotopes in carbonates — A tracer for climate change and for reconstructing the redox state of ancient seawater. *Earth and Planetary Science Letters* 312, 114–125.
- Friedman, I., Rafter, A., Smith, G.I. (1983) An isotopic and chemical study of Lake Vanda and Don Juan Pond, Antarctica. *US Geological Survey Polar Research Symposium – Abstracts with Program*, 12–14 October 1983, USGS Circular 911, U.S. Geological Survey, Alexandria, VA, 17–18. <https://pubs.er.usgs.gov/publication/cir911>
- Frisia, S., Borsato, A., Hellstrom, J. (2018) High spatial resolution investigation of nucleation, growth and early diagenesis in speleothems as exemplar for sedimentary carbonates. *Earth-Science Reviews* 178, 68–91.
- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., & Li, W. (2012). CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 28(23), 3150-3152.
- Fuentes, N., Gajardo, G. (2017) A glimpse to Laguna de los Cisnes, a field laboratory and natural monument in the Chilean Patagonia. *Latin American Journal of Aquatic Research* 45, 491–495. [https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-560X2017000200024](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-560X2017000200024)
- Fukushi, K., Matsumiya, H. (2018) Control of Water Chemistry in Alkaline Lakes: Solubility of Monohydrocalcite and Amorphous Magnesium Carbonate in CaCl<sub>2</sub>–MgCl<sub>2</sub>–Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Solutions. *ACS Earth and Space Chemistry* 2, 735–744.
- Fukushi, K., Imai, E., Sekine, Y., Kitajima, T., Gankhurel, B., Davaasuren, D., Hasebe, N. (2020) In Situ Formation of Monohydrocalcite in Alkaline Saline Lakes of the Valley of Gobi Lakes: Prediction for Mg, Ca, and Total Dissolved Carbonate Concentrations in Enceladus' Ocean and Alkaline-Carbonate Ocean Worlds. *Minerals* 10, 669. <https://doi.org/10.3390/min10080669>

- Gaëtan, J. *et al.* (2023) Widespread formation of intracellular calcium carbonates by the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis*. *Environmental Microbiology* 25, 751–765.
- Gaillard, F., Scaillet, B., Arndt, N.T. (2011) Atmospheric oxygenation caused by a change in volcanic degassing pressure. *Nature* 478, 229–232.
- Garrels, R.M., Mackenzie, F.T. (1967) Origin of the Chemical Compositions of Some Springs and Lakes. In: Stumm, W. (Ed.) *Equilibrium Concepts in Natural Water Systems*, Advances in Chemistry 67, American Chemical Society, Washington, D.C., 222–242. <https://doi.org/10.1021/ba-1967-0067.ch010>
- Garrett, P. (1970) Phanerozoic Stromatolites: Noncompetitive Ecologic Restriction by Grazing and Burrowing Animals. *Science* 169, 171–173.
- Garrison, P.J., Pillsbury, R. (2009) *Paleoecological Study of Lake Ripley, Jefferson County*. Wisconsin Department of Natural Resources, Madison, WI, PUB-SS-1062 2009, 18 p.
- Garvin, J., Buick, R., Anbar, A.D., Arnold, G.L., Kaufman, A.J. (2009) Isotopic Evidence for an Aerobic Nitrogen Cycle in the Latest Archean. *Science*. American Association for the Advancement of Science 323, 1045–1048.
- Gautret, P., Camoin, G., Golubic, S., Sprachta, S. (2004) Biochemical Control of Calcium Carbonate Precipitation in Modern Lagoonal Microbialites, Tikehau Atoll, French Polynesia. *Journal of Sedimentary Research* 74, 462–478. <https://doi.org/10.1306/012304740462>
- Gérard, E., Ménez, B., Couradeau, E., Moreira, D., Benzerara, K., Tavera, R., López-García, P. (2013) Specific carbonate–microbe interactions in the modern microbialites of Lake Alchichica (Mexico). *The ISME Journal*. Nature Publishing Group 7, 1997–2009.
- Gérard, E., De Goeyse, S., Hugoni, M., Agogué, H., Richard, L., *et al.* (2018) Key Role of Alphaproteobacteria and Cyanobacteria in the Formation of Stromatolites of Lake Dziani Dzaha (Mayotte, Western Indian Ocean). *Frontiers in Microbiology* 9, 796. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00796>
- Gill, B.C., Lyons, T.W., Young, S.A., Kump, L.R., Knoll, A.H., Saltzman, M.R. (2011) Geochemical evidence for widespread euxinia in the Later Cambrian ocean. *Nature* 469, 80–83.
- Gischler, E., Golubic, S., Gibson, M.A., Oschmann, W., Hudson, J.H. (2011) Microbial mats and microbialites in the freshwater Laguna Bacalar, Yucatan Peninsula, Mexico. In: Reitner, J., Quéric, N.-V., Arp, G. (Eds.) *Advances in Stromatolite Geobiology*, Lecture Notes in Earth Sciences 131, Springer Berlin, Heidelberg, 187–205. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-10415-2>
- Giuffrè, A.J., Hamm, L.M., Han, N., De Yoreo, J.J., Dove, P.M. (2013) Polysaccharide chemistry regulates kinetics of calcite nucleation through competition of interfacial energies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Proceedings of the National Academy of Sciences 110, 9261–9266.
- Given, R.K., Wilkinson, B.H. (1985) Kinetic control of morphology, composition, and mineralogy of abiotic sedimentary carbonates. *Journal of Sedimentary Research* 55, 109–119.
- Gleeson, D.B., Wacey, D., Waite, I., O'Donnell, A.G., Kilburn, M.R. (2016) Biodiversity of Living, Non-marine, Thrombolites of Lake Clifton, Western Australia. *Geomicrobiology Journal* 33, 850–859. <https://doi.org/10.1080/01490451.2015.1118168>
- Glöckner, F.O. *et al.* (2017) 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. *Journal of Biotechnology* 261, 169–176.
- Glunk, C., Dupraz, C., Braissant, O., Gallagher, K.L., Verrecchia, E.P., Visscher, P.T. (2011) Microbially mediated carbonate precipitation in a hypersaline lake, Big Pond (Eleuthera, Bahamas). *Sedimentology* 58, 720–736. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3091.2010.01180.x>
- Godet, A., Durllet, C., Spangenberg, J.E., Föllmi, K.B. (2016) Estimating the impact of early diagenesis on isotope records in shallow-marine carbonates: A case study from the Urgonian Platform in western Swiss Jura. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 454, 125–138.
- Gomez, F.J., Kah, L.C., Bartley, J.K., Astini, R.A. (2014) Microbialites in a high-altitude Andean lake: multiple controls on carbonate precipitation and lamina accretion. *PALAIOS* 29, 233–249. <https://doi.org/10.2110/palo.2013.049>
- Gómez-Tuena, A., LaGatta, A.B., Langmuir, C.H., Goldstein, S.L., Ortega-Gutiérrez, F., Carrasco-Núñez, G. (2003) Temporal control of subduction magmatism in the eastern Trans-Mexican

- Volcanic Belt: Mantle sources, slab contributions, and crustal contamination. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* 4.
- Görge, S., Benzerara, K., Skouri-Panet, F., Gugger, M., Chauvat, F., Cassier-Chauvat, C. (2020) The diversity of molecular mechanisms of carbonate biomineralization by bacteria. *Discover Materials* 1, 2.
- Gouramanis, C., Wilkins, D., De Deckker, P. (2010) 6000 years of environmental changes recorded in Blue Lake, South Australia, based on ostracod ecology and valve chemistry. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 297, 223–237. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2010.08.005>
- Graham, L.E., Knack, J.J., Piotrowski, M.J., Wilcox, L.W., Cook, M.E., Wellman, C.H., Taylor, W., Lewis, L.A., Arancibia-Avila, P. (2014) Lacustrine Nostoc (Nostocales) and associated microbiome generate a new type of modern clotted microbialite. *Journal of Phycology* 50, 280–291. <https://doi.org/10.1111/jpy.12152>
- Granato, E.T., Meiller-Legrand, T.A., Foster, K.R. (2019) The Evolution and Ecology of Bacterial Warfare. *Current Biology* 29, R521–R537.
- Green, W.J., Canfield, D.E. (1984) Geochemistry of the Onyx River (Wright Valley, Antarctica) and its role in the chemical evolution of Lake Vanda. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 48, 2457–2467. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(84\)90297-7](https://doi.org/10.1016/0016-7037(84)90297-7)
- Green, W.J., Canfield, D.E., Lee, G.F., Jones, R.A. (1986) Mn, Fe, Cu and Cd distributions and residence times in closed basin Lake Vanda (Wright Valley, Antarctica). *Hydrobiologia* 134, 237–248. <https://doi.org/10.1007/BF00008492>
- Green, W.J., Angle, M.P., Chave, K.E. (1988) The geochemistry of antarctic streams and their role in the evolution of four lakes of the McMurdo dry valleys. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 52, 1265–1274. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(88\)90280-3](https://doi.org/10.1016/0016-7037(88)90280-3)
- Grey, K., Awramik, S. (2020) *Handbook for the study and description of microbialites*. Geological Survey of Western Australia Bulletin 147, Department of Mines, Industry Regulation and Safety, Perth, Australia. <https://www.dmp.wa.gov.au/Geological-Survey/Handbook-for-the-study-and-26950.aspx>
- Grey, K., Moore, L.S., Burne, R.V., Pierson, B.K., Bauld, J. (1990) Lake Thetis, Western Australia: an example of Saline Lake Sedimentation dominated by Benthic Microbial Processes. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 41, 275–300. <https://doi.org/10.1071/MF9900275>
- Grotzinger, J.P., Rothman, D.H. (1996) An abiotic model for stromatolite morphogenesis. *Nature*. Nature Publishing Group 383, 423–425.
- Grotzinger, J.P., Knoll, A.H. (1999) Stromatolites in Precambrian Carbonates: Evolutionary Mileposts or Environmental Dipsticks? *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*. Annual Reviews 27, 313–358.
- Gueriau, P., Mocuta, C., Bertrand, L. (2015) Cerium Anomaly at Microscale in Fossils. *Analytical Chemistry*. American Chemical Society 87, 8827–8836.
- Guido, A., Rosso, A., Sanfilippo, R., Miriello, D., Belmonte, G. (2022) Skeletal vs microbialite geobiological role in bioconstructions of confined marine environments. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 593, 110920.
- Guilbaud, R., Poulton, S.W., Butterfield, N.J., Zhu, M., Shields-Zhou, G.A. (2015) A global transition to ferruginous conditions in the early Neoproterozoic oceans. *Nature Geoscience* 8, 466–470.
- Gunatilaka, A. (1975) Some aspects of the biology and sedimentology of laminated algal mats from mannar lagoon, Northwest Ceylon. *Sedimentary Geology* 14, 275–300. [https://doi.org/10.1016/0037-0738\(75\)90003-2](https://doi.org/10.1016/0037-0738(75)90003-2)
- Gunes, Y., Sekerci, F., Avcı, B., Ettema, T.J.G., Balci, N. (2023) Morphological and microbial diversity of hydromagnesite microbialites in Lake Salda, A Ma8rs Analog Alkaline Lake. bioRxiv, 2023.09.06.556485.
- Gutiérrez-Preciado, A., Saghai, A., Moreira, D., Zivanovic, Y., Deschamps, P., López-García, P. (2018) Functional shifts in microbial mats recapitulate early Earth metabolic transitions. *Nature Ecology & Evolution*. Nature Publishing Group 2, 1700–1708.
- Guyomar, C., & Lemaitre, C. (2022). Metagenomics and Metatranscriptomics. *From Sequences to*

- Graphs: Discrete Methods and Structures for Bioinformatics*, 147.
- Habicht, K.S., Gade, M., Thamdrup, B., Berg, P., Canfield, D.E. (2002) Calibration of Sulfate Levels in the Archean Ocean. *Science*. American Association for the Advancement of Science 298, 2372–2374.
- Haglund, A.-L., Törnblom, E., Boström, B., Tranvik, L. (2002) Large Differences in the Fraction of Active Bacteria in Plankton, Sediments, and Biofilm. *Microbial Ecology*. Springer 43, 232–241.
- Hailemichael, M., Aronson, J.L., Savin, S., Tevesz, M.J.S., Carter, J.G. (2002)  $\delta^{18}\text{O}$  in mollusk shells from Pliocene Lake Hadar and modern Ethiopian lakes: implications for history of the Ethiopian monsoon. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 186, 81–99. [https://doi.org/10.1016/S0031-0182\(02\)00445-5](https://doi.org/10.1016/S0031-0182(02)00445-5)
- Hamilton, T.L., Klatt, J.M., de Beer, D., Macalady, J.L. (2018) Cyanobacterial photosynthesis under sulfidic conditions: insights from the isolate *Leptolyngbya* sp. strain hensonii. *The ISME Journal*. Nature Publishing Group 12, 568–584.
- Hardie, L.W.A., Eugster, H.P. (n.d.) The evolution of closed-basin brines.
- Harding, C.M., Hennon, S.W., Feldman, M.F. (2018) Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group 16, 91–102.
- Harrison, J. (2017) *Shoreline Carbonate Structures in West Reflex Lake, Alberta-Saskatchewan*. M.Sc. thesis, University of Manitoba, Winnipeg, Canada, 132 p. [https://mspace.lib.umanitoba.ca/bitstream/handle/1993/32181/harrison\\_jemma.pdf?sequence=1](https://mspace.lib.umanitoba.ca/bitstream/handle/1993/32181/harrison_jemma.pdf?sequence=1)
- Havas, R. *et al.* (2023) Biogeochemical processes captured by carbon isotopes in redox-stratified water columns: a comparative study of four modern stratified lakes along an alkalinity gradient. *Biogeosciences*. Copernicus GmbH 20, 2347–2367.
- Havas, R. *et al.* (2023) The hidden role of dissolved organic carbon in the biogeochemical cycle of carbon in modern redox-stratified lakes. *Biogeosciences*. Copernicus GmbH 20, 2405–2424.
- Havig, J.R., McCormick, M.L., Hamilton, T.L., Kump, L.R. (2015) The behavior of biologically important trace elements across the oxic/euxinic transition of meromictic Fayetteville Green Lake, New York, USA. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 165, 389–406. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2015.06.024>
- Havig, J.R., Hamilton, T.L. (2019) Hypolithic Photosynthesis in Hydrothermal Areas and Implications for Cryptic Oxygen Oases on Archean Continental Surfaces. *Frontiers in Earth Science*. Frontiers 7.
- Hazen, R.M., Ferry, J.M. (2010) Mineral Evolution: Mineralogy in the Fourth Dimension. *Elements* 6, 9–12.
- Hazen, R.M., Morrison, S.M. (2022) On the paragenetic modes of minerals: A mineral evolution perspective. *American Mineralogist*. De Gruyter 107, 1262–1287.
- Hazen, R.M., Papineau, D., Bleeker, W., Downs, R.T., Ferry, J.M., McCoy, T.J., Sverjensky, D.A., Yang, H. (2008) Mineral evolution. *American Mineralogist* 93, 1693–1720.
- Herndon, E.M., Havig, J.R., Singer, D.M., McCormick, M.L., Kump, L.R. (2018) Manganese and iron geochemistry in sediments underlying the redox-stratified Fayetteville Green Lake. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 231, 50–63.
- Hedlund, B.P. *et al.* (2022) SeqCode: a nomenclatural code for prokaryotes described from sequence data. *Nature Microbiology*. Nature Publishing Group 7, 1702–1708.
- Herczeg, A.L., Smith, A.K., Dighton, J.C. (2001) A 120 year record of changes in nitrogen and carbon cycling in Lake Alexandrina, South Australia: C:N,  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  in sediments. *Applied Geochemistry* 16, 73–84. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(00\)00016-0](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(00)00016-0)
- Hermichen, W.-D., Kowski, P., Wand, U. (1985) Lake Untersee, a first isotope study of the largest freshwater lake in the interior of East Antarctica. *Nature* 315, 131–133. <https://doi.org/10.1038/315131a0>
- Himmler, T., Smrzka, D., Zwicker, J., Kasten, S., Shapiro, R.S., Bohrmann, G., Peckmann, J. (2018) Stromatolites below the photic zone in the northern Arabian Sea formed by calcifying chemotrophic microbial mats. *Geology* 46, 339–342.
- Hodgskiss, M.S.W., Crockford, P.W., Turchyn, A.V. (2023) Deconstructing the Lomagundi-Jatuli Carbon Isotope Excursion. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 51, 301–330.
- Holland, H.D. (2006) The oxygenation of the atmosphere and oceans. *Philosophical Transactions of the*

- Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society 361, 903–915.
- Hood, A.V.S., Wallace, M.W. (2014) Marine cements reveal the structure of an anoxic, ferruginous Neoproterozoic ocean. *Journal of the Geological Society* 171, 741–744.
- Hood, A. v. S., Planavsky, N.J., Wallace, M.W., Wang, X. (2018) The effects of diagenesis on geochemical paleoredox proxies in sedimentary carbonates. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 232, 265–287.
- Houghton, J., Fike, D., Druschel, G., Orphan, V., Hoehler, T.M., Des Marais, D.J. (2014) Spatial variability in photosynthetic and heterotrophic activity drives localized  $\delta^{13}\text{C}_{\text{org}}$  fluctuations and carbonate precipitation in hypersaline microbial mats. *Geobiology* 12, 557–574. <https://doi.org/10.1111/gbi.12113>
- Howard, A.G. (2010) On the challenge of quantifying man-made nanoparticles in the aquatic environment. *Journal of Environmental Monitoring* 12, 135–142.
- Huang, P. M. (2004). Soil mineral-organic matter-microorganism interactions: fundamentals and impacts. *Advances in agronomy*, 82, 393–472.
- Hull, H., Turnbull, A.G., (1973) A thermodynamical study of monohydrocalcite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 37, 685–694. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(73\)90227-5](https://doi.org/10.1016/0016-7037(73)90227-5)
- Hummer, D.R. *et al.* (2022) Evidence for the oxidation of Earth's crust from the evolution of manganese minerals. *Nature Communications*. Nature Publishing Group 13, 960.
- Hug, L. A., Baker, B. J., Anantharaman, K., Brown, C. T., Probst, A. J., Castelle, C. J., Butterfield, C. N., HERNSDORF, A. W., Amano, Y., Ise, K., Suzuki, Y., Dudek, N., Relman, D.A., Finstad, K. M., Amundson, R., Thomas, B.C., Banfield, J. F. (2016). A new view of the tree of life. *Nature microbiology*, 1(5), 1–6.
- Iespa, A.A.C., Iespa, C.M.D. (2009) Cyanobacterial and sedimentary composition in polygonal microbial mats from Pernambuco lagoon, Rio de Janeiro, Brazil. *Gaea - Journal of Geoscience* 5, 35–41. <https://doi.org/10.4013/gaea.2009.51.04>
- Imhoff, J.F., Rahn, T., Künzel, S., Neulinger, S.C. (2019) Phylogeny of Anoxygenic Photosynthesis Based on Sequences of Photosynthetic Reaction Center Proteins and a Key Enzyme in Bacteriochlorophyll Biosynthesis, the Chlorophyllide Reductase. *Microorganisms*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute 7, 576.
- Iniesto, M., Zeyen, N., López-Archilla, A.I., Bernard, S., Buscalioni, Á.D., Guerrero, M.C., Benzerara, K. (2015) Preservation in microbial mats: mineralization by a talc-like phase of a fish embedded in a microbial sarcophagus. *Frontiers in Earth Science*. Frontiers 3.
- Iniesto, M., Buscalioni, Á.D., Carmen Guerrero, M., Benzerara, K., Moreira, D., López-Archilla, A.I. (2016) Involvement of microbial mats in early fossilization by decay delay and formation of impressions and replicas of vertebrates and invertebrates. *Scientific Reports*. Nature Publishing Group 6, 25716.
- Iniesto, M., Moreira, D., Reboul, G., Deschamps, P., Benzerara, K., Bertolino, P., Saghäi, A., Tavera, R., López-García, P. (2021) Core microbial communities of lacustrine microbialites sampled along an alkalinity gradient. *Environmental Microbiology* 23, 51–68. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15252>
- Iniesto, M., Moreira, D., Benzerara, K., Muller, E., Bertolino, P., Tavera, R., López-García, P. "Rapid formation of mature microbialites in Lake Alchichica, Mexico." *Environmental Microbiology Reports* 13.5 (2021): 600–605.
- Iniesto, M., Moreira, D., Benzerara, K., Reboul, G., Bertolino, P., Tavera, R., López-García, P. (2022) Planktonic microbial communities from microbialite-bearing lakes sampled along a salinity-alkalinity gradient. *Limnology and Oceanography* 67, 2718–2733.
- Ionescu, D., Spitzer, S., Reimer, A., Schneider, D., Daniel, R., Reitner, J., de Beer, D., Arp, G. (2015) Calcium dynamics in microbialite-forming exopolymer-rich mats on the atoll of Kiritimati, Republic of Kiribati, Central Pacific. *Geobiology* 13, 170–180. <https://doi.org/10.1111/gbi.12120>
- Ittekkot, V. (1993) The abiotically driven biological pump in the ocean and short-term fluctuations in atmospheric  $\text{CO}_2$  contents. *Global and Planetary Change* 8, 17–25. [https://doi.org/10.1016/0921-8181\(93\)90060-2](https://doi.org/10.1016/0921-8181(93)90060-2)

- Jahodářová, E., Dvořák, P., Hašler, P., Holušová, K., Pouličková, A. (2018) Elainella gen. nov.: a new tropical cyanobacterium characterized using a complex genomic approach. *European Journal of Phycology*. Taylor & Francis 53, 39–51.
- Jain, S., Fang, C., Achal, V. (2021) A critical review on microbial carbonate precipitation via denitrification process in building materials. *Bioengineered*. Taylor & Francis 12, 7529–7551.
- Javor, B.J., Castenholz, R.W. (1981) Laminated microbial mats, laguna Guerrero Negro, Mexico. *Geomicrobiology Journal* 2, 237–273. <https://doi.org/10.1080/01490458109377766>
- Jayaraman, R. (1954) Seasonal variations in salinity, dissolved oxygen and nutrients salts in the inshore waters of the Gulf of Mannar and Palk Bay near Mandapam (S. India). *Indian Journal of Fisheries* 1, 345–364. <http://eprints.cmfri.org.in/id/eprint/1636>
- Jehl, J.R., Jr. (1988) The Beached-bird Assemblage of a Highly Saline Lake and Its Relevance for Reconstructing Paleoenvironments. *The Auk* 105, 97–101. <https://doi.org/10.1093/auk/105.1.97>
- Jenkyns, H.C. (2010) Geochemistry of oceanic anoxic events. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* 11.
- Jézéquel, R., Merlin, F.-X., Lee, K. (1999) The Influence of Microorganisms On Oil-Mineral Fine Interactions In Low-Energy Coastal Environment. *International Oil Spill Conference Proceedings* 1999, 771–775.
- Jirsa, F., Gruber, M., Stojanovic, A., Omondi, S.O., Mader, D., Körner, W., Schagerl, M. (2013) Major and trace element geochemistry of Lake Bogoria and Lake Nakuru, Kenya, during extreme draught. *Chemie Der Erde* 73, 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.chemer.2012.09.001>
- Johannesson, K.H., Cortés, A., Kilroy, K.C. (2004) Reconnaissance isotopic and hydrochemical study of Cuatro Ciénegas groundwater, Coahuila, México. *Journal of South American Earth Sciences* 17, 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2004.01.002>
- Johnson, J.E., Webb, S.M., Thomas, K., Ono, S., Kirschvink, J.L., Fischer, W.W. (2013) Manganese-oxidizing photosynthesis before the rise of cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 11238–11243.
- Johnson, J.E., Gerpheide, A., Lamb, M.P., Fischer, W.W. (2014) O<sub>2</sub> constraints from Paleoproterozoic detrital pyrite and uraninite. *GSA Bulletin* 126, 813–830.
- Johnson, J.E. (2019) From minerals to metabolisms: Evidence for life before oxygen from the geological record. *Free Radical Biology and Medicine* 140, 126–137.
- Jones, B.F., Eugster, H.P., Rettig, S.L. (1977) Hydrochemistry of the Lake Magadi basin, Kenya. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 41, 53–72. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(77\)90186-7](https://doi.org/10.1016/0016-7037(77)90186-7)
- Jones, L.M., Faure, G. (1967–1968) Origin of the salts in Lake Vanda, Wright Valley, Southern Victoria Land, Antarctica. *Earth and Planetary Science Letters* 3, 101–106. [https://doi.org/10.1016/0012-821X\(67\)90019-2](https://doi.org/10.1016/0012-821X(67)90019-2)
- Jones, B.F., Deocampo, D.M. (2003) Geochemistry of Saline Lakes. *Treatise on Geochemistry* 5, 605.
- Jørgensen, B.B., Cohen, Y., Revsbech, N.P. (1986) Transition from Anoxygenic to Oxygenic Photosynthesis in a Microcoleus chthonoplastes Cyanobacterial Mat. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 408–417.
- Josse, J., Husson, F. (2016) missMDA: A Package for Handling Missing Values in Multivariate Data Analysis. *Journal of Statistical Software* 70, 1–31. <https://doi.org/10.18637/jss.v070.i01>
- Kaiser, J., Ön, B., Arz, H.W., Akçer-Ön, S. (2016) Sedimentary lipid biomarkers in the magnesium rich and highly alkaline Lake Salda (south-western Anatolia). *Journal of Limnology* 75, 581–596. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2016.1337>
- Kajitani, I., Koike, M., Nakada, R., Tanabe, G., Usui, T., Matsu'ura, F., Fukushi, K., Yokoyama, T. (2023) Identification of carbonate-associated sulfate (CAS) in a Noachian Martian meteorite Allan Hills 84001. *Earth and Planetary Science Letters* 620, 118345.
- Kalabin, G.V. (2019) Procedure of Macroecological Rough-Drought Mapping of Mining and Processing Industry Zones in Russia. *Journal of Mining Science* 55, 339–346.
- Kappler, A., Pasquero, C., Konhauser, K.O., Newman, D.K. (2005) Deposition of banded iron formations by anoxygenic phototrophic Fe(II)-oxidizing bacteria. *Geology* 33, 865–868.
- Kanik, M. et al. (2020) Unexpected Abundance and Diversity of Phototrophs in Mats from

- Morphologically Variable Microbialites in Great Salt Lake, Utah. *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology 86, e00165-20.
- Katoh, Kazutaka, John Rozewicki, and Kazunori D. Yamada. "MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization." *Briefings in bioinformatics* 20.4 (2019): 1160-1166.
- Kaźmierczak, J., Kempe, S., Kremer, B., López-García, P., Moreira, D., Tavera, R. (2011) Hydrochemistry and microbialites of the alkaline crater lake Alchichica, Mexico. *Facies* 57, 543–570. <https://doi.org/10.1007/s10347-010-0255-8>
- Kellermeier, M., Picker, A., Kempter, A., Cölfen, H., Gebauer, D. (2014) A Straightforward Treatment of Activity in Aqueous CaCO<sub>3</sub> Solutions and the Consequences for Nucleation Theory. *Advanced Materials* 26, 752–757. <https://doi.org/10.1002/adma.201303643>
- Kemp, W.M., Testa, J.M., Conley, D.J., Gilbert, D., Hagy, J.D. (2009) Temporal responses of coastal hypoxia to nutrient loading and physical controls. *Biogeosciences*. Copernicus GmbH 6, 2985–3008.
- Kempe, S., Kaźmierczak, J. (1989) Chemistry and stromatolites of the sea-linked Satonda Crater Lake, Indonesia: A recent model for the Precambrian sea? *Chemical Geology* 81, 299–310. [https://doi.org/10.1016/0009-2541\(90\)90052-9](https://doi.org/10.1016/0009-2541(90)90052-9)
- Kempe, S., Kaźmierczak, J. (1993) Satonda Crater Lake, Indonesia: Hydrogeochemistry and biocarbonates. *Facies* 28, 1–31. <https://doi.org/10.1007/BF02539726>
- Kempe, S., Kaźmierczak, J. (1994) The role of alkalinity in the evolution of ocean chemistry, organization of living systems, and biocalcification processes. In: Doumenge, F. (Ed.) *Past and Present Biomineralization Processes. Considerations about the Carbonate Cycle*. IUCN – COE Workshop, 15–16 November 1993, Monaco. Bulletin de l'Institut océanographique, Monaco, numéro special 13, 61–117.
- Kempe, S., Kaźmierczak, J. (2012) Terrestrial Analogues for Early Planetary Oceans: NIUAFO'OU CALDERA LAKES (Tonga) and Their Geology, Water Chemistry, and Stromatolites. In: Hanslmeier, A., Kempe, S., Seckbach, J. (Eds.) *Life on Earth and other Planetary Bodies*. Springer, Dordrecht, 195–234. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-4966-5\\_13](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4966-5_13)
- Kendall, B., Gordon, G.W., Poulton, S.W., Anbar, A.D. (2011) Molybdenum isotope constraints on the extent of late Paleoproterozoic ocean euxinia. *Earth and Planetary Science Letters* 307, 450–460.
- Kendall, B., Reinhard, C.T., Lyons, T.W., Kaufman, A.J., Poulton, S.W., Anbar, A.D. (2010) Pervasive oxygenation along late Archaean ocean margins. *Nature Geoscience* 3, 647–652.
- Khadra, M., Rougelot, T., Carlier, J.-P., Burlion, N. (2017) Etude de la solution interstitielle des pâtes de ciment : extraction par injection de gaz et calcul de la conductivité électrique. In: Mécanique, A.F. de (ed.) *CFM 2017 - 23ème Congrès Français de Mécanique*. AFM, Maison de la Mécanique, 39/41 rue Louis Blanc - 92400 Courbevoie, Lille, France.
- Kiessling, W. (2002). Secular variations in the Phanerozoic reef ecosystem.
- Kinsman, D.J.J. (1967) Huntite from a carbonate-evaporite environment. *American Mineralogist* 52, 1332–1340.
- Klatt, J.M., Al-Najjar, M.A.A., Yilmaz, P., Lavik, G., de Beer, D., Polerecky, L. (2015) Anoxygenic Photosynthesis Controls Oxygenic Photosynthesis in a Cyanobacterium from a Sulfidic Spring. *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology 81, 2025–2031.
- Klein, C. (2005) Some Precambrian banded iron-formations (BIFs) from around the world: Their age, geologic setting, mineralogy, metamorphism, geochemistry, and origins. *American Mineralogist* 90, 1473–1499.
- Knoll, A.H. (2003) Biomineralization and Evolutionary History. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 54, 329–356.
- Knoll, A.H., Bergmann, K.D., Strauss, J.V. (2016) Life: the first two billion years. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society 371, 20150493.
- Knoll, A.H., Lahr, D.J.G. (2016) Fossils, Feeding, and the Evolution of Complex Multicellularity.
- Knoll, A.H., Nowak, M.A. (2017) The timetable of evolution. *Science Advances*. American Association for the Advancement of Science 3, e1603076.
- Koeshidayatullah, A., Al-Ramadan, K., Hughes, G.W. (2016) Facies mosaic and diagenetic patterns of the early Devonian (Late Pragian–Early Emsian) microbialite-dominated carbonate sequences,

- Qasr Member, Jauf Formation, Saudi Arabia. *Geological Journal* 51, 704–721.
- Königsberger, E., Königsberger, L.-C., Gamsjäger, H. (1999) Low-temperature thermodynamic model for the system  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{--MgCO}_3\text{--CaCO}_3\text{--H}_2\text{O}$ . *Geochimica et Cosmochimica Acta* 63, 3105–3119.
- Konrad, R., Vergara-Barros, P., Alcorta, J., Alcamán-Arias, M.E., Levicán, G., Ridley, C., Díez, B. (2023) Distribution and Activity of Sulfur-Metabolizing Bacteria along the Temperature Gradient in Phototrophic Mats of the Chilean Hot Spring Porcelana. *Microorganisms*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute 11, 1803.
- Krause, S., Liebetrau, V., Löscher, C.R., Böhm, F., Gorb, S., Eisenhauer, A., Treude, T. (2018) Marine ammonification and carbonic anhydrase activity induce rapid calcium carbonate precipitation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 243, 116–132.
- Kremer, B., Kaźmierczak, J., Łukomska-Kowalczyk, M., Kempe, S. (2012) Calcification and Silicification: Fossilization Potential of Cyanobacteria from Stromatolites of Niuafu‘ou’s Caldera Lakes (Tonga) and Implications for the Early Fossil Record. *Astrobiology* 12, 535–548. <https://doi.org/10.1089/ast.2011.0742>
- Kremer, B., Kaźmierczak, J., Kempe, S. (2019) Authigenic replacement of cyanobacterially precipitated calcium carbonate by aluminium-silicates in giant microbialites of Lake Van (Turkey). *Sedimentology* 66, 285–304.
- Kshirsagar, P., Siebe, C., Guilbaud, M.N., Salinas, S., Layer, P.W. (2015) Late Pleistocene Alberca de Guadalupe maar volcano (Zacapu basin, Michoacán): Stratigraphy, tectonic setting, and paleo-hydrogeological environment. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 304, 214–236. <https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2015.09.003>
- Kuscu, M., Cengiz, O., Kahya, A. (2018) Mineralogy and Geochemistry of Sedimentary Huntite Deposits in the Egirdir-Hoyran Lake Basin of Southern Turkey. *Journal of the Geological Society of India* 91, 496–504.
- Labuhn, I., Tell, F., von Grafenstein, U., Hammarlund, D., Kuhnert, H., Minster, B. (2022) A modern snapshot of the isotopic composition of lacustrine biogenic carbonates – records of seasonal water temperature variability. *Biogeosciences* 19, 2759–2777. <https://doi.org/10.5194/bg-19-2759-2022>
- Lagomasino, D., Price, R.M., Herrera-Silveira, J., Miralles-Wilhelm, F., Merediz-Alonso, G., Gomez-Hernandez, Y. (2015) Connecting Groundwater and Surface Water Sources in Groundwater Dependent Coastal Wetlands and Estuaries: Sian Ka’an Biosphere Reserve, Quintana Roo, Mexico. *Estuaries and Coasts* 38, 1744–1763. <https://doi.org/10.1007/s12237-014-9892-4>
- Lamb, H.F., Leng, M.J., Telford, R.J., Ayenew, T., Umer, M. (2007) Oxygen and carbon isotope composition of authigenic carbonate from an Ethiopian lake: a climate record of the last 2000 years. *The Holocene* 17, 517–526. <https://doi.org/10.1177/0959683607076452>
- Lamb, P.D., Hunter, E., Pinnegar, J.K., Creer, S., Davies, R.G., Taylor, M.I. (2019) How quantitative is metabarcoding: A meta-analytical approach. *Molecular Ecology* 28, 420–430.
- Lamers, L.P.M., Falla, S.-J., Samborska, E.M., Dulken, I.A.R. van, Hengstum, G. van, Roelofs, J.G.M. (2002) Factors controlling the extent of eutrophication and toxicity in sulfate-polluted freshwater wetlands. *Limnology and Oceanography* 47, 585–593.
- Lappin-Scott, H., Bass, C. (2001) Biofilm formation: Attachment, growth, and detachment of microbes from surfaces \*. *American journal of infection control* 29, 250–1.
- Large, R., Mukherjee, I., Danyushevsky, L., Gregory, D., Steadman, J., Corkrey, R. (2022) Sedimentary pyrite proxy for atmospheric oxygen: evaluation of strengths and limitations. *Earth-Science Reviews* 227, 103941.
- Large, R.R. et al. (2014) Trace element content of sedimentary pyrite as a new proxy for deep-time ocean–atmosphere evolution. *Earth and Planetary Science Letters* 389, 209–220.
- Laslandes, B. (1979) *Reconstitution de la variabilité climatique du littoral fluminense (Rio de Janeiro, Brésil) au cours de l’holocène par l’étude de bio-indicateurs (diatomées, coccolithophoridés)*. Ph.D. thesis, Université d’Angers, Angers, France, 253 p. [https://theses.hal.science/file/index/docid/345840/filename/these\\_LASLANDES.pdf](https://theses.hal.science/file/index/docid/345840/filename/these_LASLANDES.pdf)
- Last, F.M., Last, W.M., Halden, N.M. (2010) Carbonate microbialites and hardgrounds from Manito Lake, an alkaline, hypersaline lake in the northern Great Plains of Canada. *Sedimentary Geology*

- 225, 34–49. <https://doi.org/10.1016/j.sedgeo.2010.01.006>
- Lau, K.V., Hardisty, D.S. (2022) Modeling the impacts of diagenesis on carbonate paleoredox proxies. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 337, 123–139.
- Laumets, L., Kalm, V., Poska, A., Kele, S., Lasberg, K., Amon, L. (2014) Palaeoclimate inferred from  $\delta^{18}\text{O}$  and palaeobotanical indicators in freshwater tufa of Lake Äntu Sinijärv, Estonia. *Journal of Paleolimnology* 51, 99–111. <https://doi.org/10.1007/s10933-013-9758-y>
- Lê, S., Josse, J., Husson, F. (2008) FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software* 25, 1–18. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>
- Lebedeva (Verba), M.P., Lopukhina, O.V., Kalinina, N.V. (2008) Specificity of the chemical and mineralogical composition of salts in solonchak playas and lakes of the Kulunda steppe. *Eurasian Soil Science* 41, 416–428. <https://doi.org/10.1134/S106422930804008X>
- LeCampion-Alsumard, T. (1985). *Hyella caespitosa* BonEr et FLAAUr and *Hyella balani* LEHMAN (Pleurocapsales, Cyanophyta): a comparative study.
- Lencina, A.I., Soria, M. N., Gomez, F.J., Gérard, E., Farias, M.E. (2021) Composite microbialites: Thrombolite, dendrolite, and stromatolite associations in a modern environment, Pozo Bravo lake, Salar de Antofalla, Catamarca Puna, Argentina. *Journal of Sedimentary Research* 91, 1305–1330. <https://doi.org/10.2110/jsr.2020.166>
- Léveillé, R.J., Fyfe, W.S., Longstaffe, F.J. (2000) Geomicrobiology of carbonate–silicate microbialites from Hawaiian basaltic sea caves. *Chemical Geology* 169, 339–355. [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(00\)00213-8](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(00)00213-8)
- Léveillé, R.J., Longstaffe, F.J., Fyfe, W.S. (2007) An isotopic and geochemical study of carbonate-clay mineralization in basaltic caves: abiotic versus microbial processes. *Geobiology* 5, 235–249. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2007.00109.x>
- Levish, M. (2019) *Bacteria Associated with Microbialites at Pisa Pond, Death Valley National Park, California*. M.Sc. thesis, California State University, Long Beach, California, 103 p. <https://www.proquest.com/openview/a0abe138864a4453b1ba2348810fb7c5/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y>
- Li, S., Bush, R.T., Ward, N.J., Sullivan, L.A., Dong, F. (2016) Air–water  $\text{CO}_2$  outgassing in the Lower Lakes (Alexandrina and Albert, Australia) following a millennium drought. *Science of The Total Environment* 542, 453–468. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.070>
- Li, G.L., Zhou, C.H., Fiore, S., Yu, W.H. (2019) Interactions between microorganisms and clay minerals: New insights and broader applications. *Applied Clay Science* 177, 91–113.
- Lim, D.S.S., Laval, B.E., Slater, G., Antoniadis, D., Forrest, A.L., et al. (2009) Limnology of Pavilion Lake, B. C., Canada - Characterization of a microbialite forming environment. *Fundamental and Applied Limnology / Archiv für Hydrobiologie* 173, 329–351. <https://doi.org/10.1127/1863-9135/2009/0173-0329>
- Lingappa, U.F., Monteverde, D.R., Magyar, J.S., Valentine, J.S., Fischer, W.W. (2019) How manganese empowered life with dioxygen (and vice versa). *Free Radical Biology and Medicine* 140, 113–125.
- Liu, J.-H., Wang, Y.-X., Zhang, X.-X., Wang, Z.-G., Chen, Y.-G., Wen, M.-L., Xu, L.-H., Peng, Q., Cui, X.-L. (2010) *Salinarimonas rosea* gen. nov., sp. nov., a new member of the  $\alpha$ -2 subgroup of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Microbiology Society, 60, 55–60.
- Long D.T., Gudramovics, R. (1983) Major-element geochemistry of brines from the Wind tidal flat area, Laguna Madre, Texas. *Journal of Sedimentary Research* 53, 797–810. <https://doi.org/10.1306/212F82C4-2B24-11D7-8648000102C1865D>
- López, D.L., Bundschuh, J., Soto, G.J., Fernández, J.F., Alvarado, G.E. (2006) Chemical evolution of thermal springs at Arenal Volcano, Costa Rica: Effect of volcanic activity, precipitation, seismic activity, and Earth tides. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 157, 166–181. <https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2006.03.049>
- López-García, P., Moreira, D. (2008) Tracking microbial biodiversity through molecular and genomic ecology. *Research in Microbiology* 159, 67–73.
- López-García, P., Eme, L., Moreira, D. (2017) Symbiosis in eukaryotic evolution. *Journal of theoretical biology* 434, 20–33. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.02.031>

- Love, F.G., Simmons, G.M., Jr., Parker, B.C., Wharton, R.A., Jr., Seaburg, K.G. (1983) Modern conophyton-like microbial mats discovered in Lake Vanda, Antarctica. *Geomicrobiology Journal* 3, 33–48. <https://doi.org/10.1080/01490458309377782>
- Lu, A., Li, Y., Liu, F., Liu, Y., Ye, H., Zhuang, Z., Yanzhang, L., Ding, H., Wang, C. (2021). The photogeochemical cycle of Mn oxides on the Earth's surface. *Mineralogical Magazine*, 85(1), 22–38.
- Luo, G., Richoz, S., van de Schootbrugge, B., Algeo, T.J., Xie, S., Ono, S., Summons, R.E. (2018) Multiple sulfur-isotopic evidence for a shallowly stratified ocean following the Triassic-Jurassic boundary mass extinction. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 231, 73–87.
- Lugo, A., Alcocer, J., del Rosario Sanchez, Ma., Escobar, E. (1998) Littoral protozoan assemblages from two Mexican hyposaline lakes. *Hydrobiologia* 381, 9–13.
- Luther III, G.W., Church, T.M., Giblin, A.E., Howarth, R.W. (1986) Speciation of Dissolved Sulfur in Salt Marshes by Polarographic Methods. *Organic Marine Geochemistry* 20, 340–355. <https://doi.org/10.1021/bk-1986-0305.ch020>
- Luther, I., George W., Glazer, B., Ma, S., Trouwborst, R., Shultz, B.R., Druschel, G., Kraiyya, C. (2003) Iron and Sulfur Chemistry in a Stratified Lake: Evidence for Iron-Rich Sulfide Complexes. *Aquatic Geochemistry* 9, 87–110.
- Lyons, T.W., Anbar, A.D., Severmann, S., Scott, C., Gill, B.C. (2009) Tracking Euxinia in the Ancient Ocean: A Multiproxy Perspective and Proterozoic Case Study. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 37, 507–534.
- Lyons, T.W., Diamond, C.W., Konhauser, K.O. (2020) Shedding light on manganese cycling in the early oceans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Proceedings of the National Academy of Sciences 117, 25960–25962.
- Lyons, T.W., Gill, B.C. (2010) Ancient Sulfur Cycling and Oxygenation of the Early Biosphere. *Elements* 6, 93–99.
- Lyons, T.W., Reinhard, C.T., Planavsky, N.J. (2014) The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere. *Nature* 506, 307–315.
- Ma, Y., Yang, Y., Fan, R., Gao, X., Zheng, L., Chen, M. (2021) Chalcopyrite leaching in ammonium chloride solutions under ambient conditions: Insight into the dissolution mechanism by XANES, Raman spectroscopy and electrochemical studies. *Minerals Engineering* 170, 107063.
- Macdonald, D. D., & Hyne, J. B. (1979). *The thermodynamics of the iron/sulphur/water system* (No. AECL--5811). Atomic Energy of Canada Ltd.
- Mackey, T.J., Sumner, D.Y., Hawes, I., Jungblut, A.D., Andersen, D.T. (2015) Growth of modern branched columnar stromatolites in Lake Joyce, Antarctica. *Geobiology* 13, 373–390. <https://doi.org/10.1111/gbi.12138>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (1997). *Brock biology of microorganisms* (Vol. 11). Upper Saddle River, NJ: Prentice hall.
- Madigan, M.T., Madigan, M.T., Brock, T.D. (eds) (2009) *Brock biology of microorganisms*. Pearson/Benjamin Cummings, San Francisco, CA.
- Manceau, A., Nagy, K.L. (2012) Quantitative analysis of sulfur functional groups in natural organic matter by XANES spectroscopy. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 99, 206–223.
- Mann, C.J., Nelson, W.M. (1989) Microbialitic structures in Storr's Lake, San Salvador Island, Bahama Islands. *PALAIOS* 4, 287–293. <https://doi.org/10.2307/3514777>
- Mansour, M., Xu, J. (2020) Benefits at the nanoscale: a review of nanoparticle-enabled processes favouring microbial growth and functionality. *Environmental Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd 22, 3633–3649.
- Mansour, Rawia, and Ali Mohamed Elshafei. "Influence of Microorganisms on Corrosion Induction and Protection." *Advances and Trends in Biotechnology and Genetics* 50 (2019).
- Maki, J. S. (2013). Bacterial intracellular sulfur globules: structure and function. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 23(4-5), 270-280.
- Marin-Carbonne, J. et al. (2022) Early precipitated micropyrrite in microbialites: a time capsule of microbial sulfur cycling. *Geochemical Perspectives Letters* 21, 7.
- Martín-García, R., Alonso-Zarza, A.M., Martín-Pérez, A. (2009) Loss of primary texture and geochemical signatures in speleothems due to diagenesis: Evidences from Castañar Cave, Spain. *Sedimentary Geology* 221, 141–149.

- McMahon, S., Cosmidis, J. (2022) False biosignatures on Mars: anticipating ambiguity. *Journal of the Geological Society*. The Geological Society of London 179, jgs2021-050.
- Meister, P. *et al.* (2018) Anaerobic methane oxidation inducing carbonate precipitation at abiogenic methane seeps in the Tuscan archipelago (Italy). *PLOS ONE*. Public Library of Science 13, e0207305.
- Mergelsberg, S.T., De Yoreo, J.J., Miller, Q.R.S., Michel, F.M., Ulrich, R.N., Dove, P.M. (2020) Metastable solubility and local structure of amorphous calcium carbonate (ACC). *Geochimica et Cosmochimica Acta* 289, 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2020.06.030>
- Mettraux, M., Homewood, P., Al Balushi, S., Erthal, M.M., Matsuda, N.S. (2014) Neoproterozoic microbialites in outcrops of the Qarn Alam salt dome, central Oman. *GeoArabia* 19, 17–79.
- Meyer, K.M., Kump, L.R. (2008) Oceanic Euxinia in Earth History: Causes and Consequences. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 36, 251–288.
- Mitchell, A.C., Lafrenière, M.J., Skidmore, M.L., Boyd, E.S. (2013) Influence of bedrock mineral composition on microbial diversity in a subglacial environment. *Geology* 41, 855–858.
- Montañez, I.P. (2002) Biological skeletal carbonate records changes in major-ion chemistry of paleo-oceans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Proceedings of the National Academy of Sciences 99, 15852–15854.
- Monteil, C. L., Benzerara, K., Menguy, N., Bidaud, C. C., Michot-Achdjian, E., Bolzoni, R., ... & Lefevre, C. T. (2021). Intracellular amorphous Ca-carbonate and magnetite biomineralization by a magnetotactic bacterium affiliated to the Alphaproteobacteria. *The ISME Journal*, 15(1), 1-18.
- Monty, C.L.V. (1972) Recent algal stromatolitic deposits, Andros Island, Bahamas. Preliminary report. *Geologische Rundschau* 61, 742–783. <https://doi.org/10.1007/BF01896344>
- Moreira, N.F., Walter, L.M., Vasconcelos, C., McKenzie, J.A., McCall, P.J. (2004) Role of sulfide oxidation in dolomitization: Sediment and pore-water geochemistry of a modern hypersaline lagoon system. *Geology* 32, 701–704. <https://doi.org/10.1130/G20353.1>
- Moreira, D. *et al.* (2017) Description of *Gloeomargarita lithophora* gen. nov., sp. nov., a thylakoid-bearing basal-branching cyanobacterium with intracellular carbonates, and proposal for *Gloeomargaritales* ord. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 67, 653–658.
- Mosley, L.M., Zammit, B., Leyden, E., Heneker, T.M., Hipsey, M.R., Skinner, D., Aldridge, K.T. (2012) The Impact of Extreme Low Flows on the Water Quality of the Lower Murray River and Lakes (South Australia). *Water Resources Management* 26, 3923–3946. <https://doi.org/10.1007/s11269-012-0113-2>
- Mueller, B. (2015) Experimental Interactions Between Clay Minerals and Bacteria: A Review. *Pedosphere* 25, 799–810.
- Müller, G., Irion, G., Förstner, U. (1972) Formation and Diagenesis of Inorganic Ca-Mg Carbonates in the Lacustrine Environment. *Naturwissenschaften* 59, 158–164.
- Muller, E., Gaucher, E.C., Durllet, C., Moquet, J.S., Moreira, M., *et al.* (2020) The origin of continental carbonates in Andean salars: A multi-tracer geochemical approach in Laguna Pastos Grandes (Bolivia). *Geochimica et Cosmochimica Acta* 279, 220–237. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2020.03.020>
- Muller, E., Ader, M., Aloisi, G., Bougeault, C., Durllet, C., *et al.* (2022) Successive Modes of Carbonate Precipitation in Microbialites along the Hydrothermal Spring of La Salsa in Laguna Pastos Grandes (Bolivian Altiplano). *Geosciences* 12, 88. <https://doi.org/10.3390/geosciences12020088>
- Muller, E. *et al.* (2023) Diagenetic formation of stevensite by replacement of diatom frustules in the sediments of the alkaline Lake Alchichica (Mexico). *Sedimentology* 70, 1013–1038.
- Muyzer, G., Ramsing, N.B. (1995) Molecular methods to study the organization of microbial communities. *Water Science and Technology* 32, 1–9.
- Nakai, N., Wada, H., Kiyosu, Y., Takimoto, M. (1975) Stable isotope of water and studies on the origin and geological history salts in the Lake Vanda area, Antarctica. *Geochemical Journal* 9, 7–24. <https://doi.org/10.2343/geochemj.9.7>
- Neumeier, U. (1998) *Le rôle de l'activité microbienne dans la cimentation précoce des beachrocks*

- (*sédiments intertidaux*). Ph.D. thesis, University of Geneva, Switzerland, 183 p. <https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:704>
- Ng, D.H.P., Kumar, A., Cao, B. (2016) Microorganisms meet solid minerals: interactions and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 6935–6946.
- Nguyen, S.T.T., Vardeh, D.P., Nelson, T.M., Pearson, L.A., Kinsela, A.S., Neilan, B.A. (2022) Bacterial community structure and metabolic potential in microbialite-forming mats from South Australian saline lakes. *Geobiology* 20, 546–559. <https://doi.org/10.1111/gbi.12489>
- Nonga, H.E., Mdegela, R.H., Lie, E., Sandvik, M., Skaare, J.U. (2011) Assessment of farming practices and uses of agrochemicals in Lake Manyara basin, Tanzania. *African Journal of Agricultural Research* 6, 2216–2230. <https://academicjournals.org/journal/AJAR/article-abstract/A7108E639205>
- Nutman, Allen P., et al. "Rapid emergence of life shown by discovery of 3,700-million-year-old microbial structures." *Nature* 537.7621 (2016): 535-538.
- Och, L.M., Shields-Zhou, G.A. (2012) The Neoproterozoic oxygenation event: Environmental perturbations and biogeochemical cycling. *Earth-Science Reviews* 110, 26–57.
- Odada, E.O. (2001) Stable isotopic composition of East African lake waters. *International Atomic Energy Agency (IAEA) TECDOC* 1206. <https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/Public/32/018/32018310.pdf>
- Oehlert, A.M., Suosaari, E.P., Kong, T., Piggot, A.M., Maizel, D., Lascu, I., Demergasso, C., Chong Díaz, G., Reid, R.P. (2022) Physical, chemical, and microbial feedbacks controlling brine geochemistry and lake morphology in polyextreme salar environments. *Science of The Total Environment* 836, 155378. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155378>
- Orthous-Daunay, F.-R., Quirico, E., Lemelle, L., Beck, P., deAndrade, V., Simionovici, A., Derenne, S. (2010) Speciation of sulfur in the insoluble organic matter from carbonaceous chondrites by XANES spectroscopy. *Earth and Planetary Science Letters* 300, 321–328.
- Olejarz, J., Iwasa, Y., Knoll, A.H., Nowak, M.A. (2021) The Great Oxygenation Event as a consequence of ecological dynamics modulated by planetary change. *Nature Communications*. Nature Publishing Group 12, 3985.
- Olson, J.M. (2006) Photosynthesis in the Archean Era. *Photosynthesis Research* 88, 109–117.
- Olson, S.L., Kump, L.R., Kasting, J.F. (2013) Quantifying the areal extent and dissolved oxygen concentrations of Archean oxygen oases. *Chemical Geology* 362, 35–43.
- Osborne, R.H., Licari, G.R., Link, M.H. (1982) Modern lacustrine stromatolites, Walker Lake, Nevada. *Sedimentary Geology* 32, 39–61. [https://doi.org/10.1016/0037-0738\(82\)90013-6](https://doi.org/10.1016/0037-0738(82)90013-6)
- Osman, J.R., Viedma, P., Mendoza, J., Fernandes, G., DuBow, M.S., Cotoras, D. (2021) Prokaryotic diversity and biogeochemical characteristics of field living and laboratory cultured stromatolites from the hypersaline Laguna Interna, Salar de Atacama (Chile). *Extremophiles* 25, 327–342. <https://doi.org/10.1007/s00792-021-01232-1>
- Owens, J.D., Gill, B.C., Jenkyns, H.C., Bates, S.M., Severmann, S., Kuypers, M.M.M., Woodfine, R.G., Lyons, T.W. (2013) Sulfur isotopes track the global extent and dynamics of euxinia during Cretaceous Oceanic Anoxic Event 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Proceedings of the National Academy of Sciences 110, 18407–18412.
- Ozaki, K., Tajima, S., Tajika, E. (2011) Conditions required for oceanic anoxia/euxinia: Constraints from a one-dimensional ocean biogeochemical cycle model. *Earth and Planetary Science Letters* 304, 270–279.
- Pace, A. et al. (2016) Microbial and diagenetic steps leading to the mineralisation of Great Salt Lake microbialites. *Scientific Reports*. Nature Publishing Group 6, 31495.
- Pache, M., Arp, G., Reimer, A. (2018) *Investigations on stromatolitic carbonates from Western Australian Lakes*. Research report CALM Licence No. SF002571. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.24948.45442>
- Pacton, M., Hunger, G., Martinuzzi, V., Cusminsky, G., Burdin, B., Barmettler, K., Vasconcelos, C., Ariztegui, D. (2015) Organomineralization processes in freshwater stromatolites: a living example from eastern Patagonia. *The Depositional Record* 1, 130–146. <https://doi.org/10.1002/dep2.7>
- Parker, B.C., Simmons, G.M., Jr., Love, F.G., Wharton, R.A., Jr., Seaburg, K.G. (1981) Modern

- Stromatolites in Antarctic Dry Valley Lakes. *BioScience* 31, 656–661. <https://doi.org/10.2307/1308639>
- Parkhurst, D.L., Appelo, C.A.J. (2013) *Description of input and examples for PHREEQC version 3: a computer program for speciation, batch-reaction, one-dimensional transport, and inverse geochemical calculations*. USGS Techniques and Methods 6-A43, U.S. Geological Survey, Reston, VA, 497 p. <https://doi.org/10.3133/tm6A43>
- Parks, D.H., Chuvochina, M., Rinke, C., Mussig, A.J., Chaumeil, P.-A., Hugenholtz, P. (2022) GTDB: an ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy. *Nucleic Acids Research* 50, D785–D794.
- Passey, B.H., Levin, N.E. (2021) Triple Oxygen Isotopes in Meteoric Waters, Carbonates, and Biological Apatites: Implications for Continental Paleoclimate Reconstruction. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 86, 429–462.
- Paul, V.G., Wronkiewicz, D.J., Mormile, M.R., Foster, J.S. (2016) Mineralogy and Microbial Diversity of the Microbialites in the Hypersaline Storr’s Lake, the Bahamas. *Astrobiology* 16, 282–300. <https://doi.org/10.1089/ast.2015.1326>
- Paull, C.K., Neumann, A.C., Bebout, B., Zabielski, V., Showers, W. (1992) Growth rate and stable isotopic character of modern stromatolites from San Salvador, Bahamas. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 95, 335–344. [https://doi.org/10.1016/0031-0182\(92\)90149-Y](https://doi.org/10.1016/0031-0182(92)90149-Y)
- Pecoraino, G., D’Alessandro, W., Inguaggiato, S. (2015) The Other Side of the Coin: Geochemistry of Alkaline Lakes in Volcanic Areas. In: Rouwet, D., Christenson, B., Tassi, F., Vandemeulebrouck, J. (Eds.) *Volcanic Lakes*. Advances in Volcanology, Springer, Berlin, Heidelberg, 219–237. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-36833-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-642-36833-2_9)
- Pedone, V.A., Cercone, K.R., Burruss, R.C. (1990) Activators of photoluminescence in calcite: evidence from high-resolution, laser-excited luminescence spectroscopy. *Chemical Geology* 88, 183–190.
- Pedone, V.A., Folk, R.L. (1996) Formation of aragonite cement by nannobacteria in the Great Salt Lake, Utah. *Geology* 24, 763–765. [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(1996\)024<0763:FOACBN>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(1996)024<0763:FOACBN>2.3.CO;2)
- Peleg, A.Y., Seifert, H., Paterson, D.L. (2008) *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology 21, 538–582.
- Pentecost, A., Viles, H. (1994) A Review and Reassessment of Travertine Classification. *Géographie physique et Quaternaire* 48, 305–314. <https://doi.org/10.7202/033011ar>
- Pentecost, A. (2005) *Travertine*. Springer Science & Business Media.
- Perez, F., Hujer, A.M., Hujer, K.M., Decker, B.K., Rather, P.N., Bonomo, R.A. (2007) Global Challenge of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology 51, 3471–3484.
- Pérez-Cobas, A.E., Gomez-Valero, L., Buchrieser, C. (2020) Metagenomic approaches in microbial ecology: an update on whole-genome and marker gene sequencing analyses. *Microbial Genomics*. Microbiology Society, 6, e000409.
- Perry, E., Velazquez-Oliman, G., Marin, L. (2002) The Hydrogeochemistry of the Karst Aquifer System of the Northern Yucatan Peninsula, Mexico. *International Geology Review* 44, 191–221. <https://doi.org/10.2747/0020-6814.44.3.191>
- Peters, S.E., Husson, J.M., Wilcots, J. (2017) The rise and fall of stromatolites in shallow marine environments. *Geology* 45, 487–490. <https://doi.org/10.1130/G38931.1>
- Petrash, D.A. (2010) *Metal-enrichment in microbial carbonates: the role of carboxylated biomacromolecules*. M.Sc. thesis, University of Alberta, Edmonton, Canada, 128 p. <https://doi.org/10.7939/R3SP4D>
- Petrash, D.A. (2016) *The trace metal content of modern and ancient peritidal and shallow subtidal dolomites: significance and systematics*. ERA.
- Philippot, P. et al. (2018) Globally asynchronous sulphur isotope signals require re-definition of the Great Oxidation Event. *Nature Communications*. Nature Publishing Group 9, 2245.
- Phoenix, V. R., & Konhauser, K. O. (2008). Benefits of bacterial biomineralization. *Geobiology*, 6(3).

- Pietzsch, R., Tosca, N.J., Gomes, J.P., Roest-Ellis, S., Sartorato, A.C.L., Tonietto, S.N. (2022) The role of phosphate on non-skeletal carbonate production in a Cretaceous alkaline lake. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 317, 365–394.
- Pinder, A.M., Quinlan, K., Cale, D.J., Leung, A.E. (2012) Aquatic invertebrates of the Hutt River and Hutt Lagoon catchments, Western Australia. *Journal of the Royal Society of Western Australia* 95, 29–51. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20123345930>
- Pinevich, A.V., Averina, S.G., Gavrilo, O.V., Migunova, A.V. (2008) Baeocytes in the cyanobacterium *Pleurocapsa* sp.: Characterization of the differentiated cells produced by multiple fission. *Microbiology* 77, 62–68.
- Pingitore, N.E., Meitzner, G., Love, K.M. (1995) Identification of sulfate in natural carbonates by x-ray absorption spectroscopy. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59, 2477–2483.
- Planavsky, N., Ginsburg, R.N. (2009) Taphonomy of modern marine Bahamian microbialites. *PALAIOS* 24, 5–17.
- Planavsky, N., Bekker, A., Rouxel, O.J., Kamber, B., Hofmann, A., Knudsen, A., Lyons, T.W. (2010) Rare Earth Element and yttrium compositions of Archean and Paleoproterozoic Fe formations revisited: New perspectives on the significance and mechanisms of deposition. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74, 6387–6405.
- Plée, K., Pacton, M., Ariztegui, D. (2010) Discriminating the Role of Photosynthetic and Heterotrophic Microbes Triggering Low-Mg Calcite Precipitation in Freshwater Biofilms (Lake Geneva, Switzerland). *Geomicrobiology Journal*. Taylor & Francis 27, 391–399.
- Plummer, L.N., Busenberg, E. (1982) The solubilities of calcite, aragonite and vaterite in CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O solutions between 0 and 90°C, and an evaluation of the aqueous model for the system CaCO<sub>3</sub>-CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 46, 1011–1040. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(82\)90056-4](https://doi.org/10.1016/0016-7037(82)90056-4)
- Pohl, A., Ridgwell, A., Stockey, R.G., Thomazo, C., Keane, A., Vennin, E., Scotese, C.R. (2022) Continental configuration controls ocean oxygenation during the Phanerozoic. *Nature*. Nature Publishing Group 608, 523–527.
- Pouchou, J.-L., Pichoir, F. (1991) Quantitative Analysis of Homogeneous or Stratified Microvolumes Applying the Model “PAP.” In: Heinrich, K.F.J., Newbury, D.E. (eds) *Electron Probe Quantitation*. Springer US, Boston, MA, 31–75.
- Poulton, S.W., Canfield, D.E. (2011) Ferruginous Conditions: A Dominant Feature of the Ocean through Earth’s History. *Elements* 7, 107–112.
- Post, F.J., Youssef, N.N. (1977) A procaryotic intracellular symbiont of the Great Salt Lake brine shrimp *Artemia salina* (L.). *Canadian Journal of Microbiology* 23, 1232–1236. <https://doi.org/10.1139/m77-184>
- Power, I.M., Wilson, S.A., Dipple, G.M., Southam, G. (2011) Modern carbonate microbialites from an asbestos open pit pond, Yukon, Canada. *Geobiology* 9, 180–195. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2010.00265.x>
- Price, Morgan N., Paramvir S. Dehal, and Adam P. Arkin. "FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix." *Molecular biology and evolution* 26.7 (2009): 1641-1650.
- Prol-Ledesma, R.M., Canet, C., Torres-Vera, M.A., Forrest, M.J., Armienta, M.A. (2004) Vent fluid chemistry in Bahía Concepción coastal submarine hydrothermal system, Baja California Sur, Mexico. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 137, 311–328. <https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2004.06.003>
- Pulido-Villena, E., Reche, I., Morales-Baquero, R. (2006) Significance of atmospheric inputs of calcium over the southwestern Mediterranean region: High mountain lakes as tools for detection. *Global Biogeochemical Cycles* 20, GB2012. <https://doi.org/10.1029/2005GB002662>
- Pushpakumara, B.L.D.U., Tandon, K., Willis, A., Verbruggen, H. (2023) Unravelling microalgal-bacterial interactions in aquatic ecosystems through 16S rRNA gene-based co-occurrence networks. *Scientific Reports*. Nature Publishing Group 13, 2743.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41(D1), D590-D596.

- Raade, G. (1970) Dypingite, a new hydrous basic carbonate of magnesium, from Norway. *American Mineralogist* 55, 1457–1465.
- Radha, A.V., Fernandez-Martinez, A., Hu, Y., Jun, Y.-S., Waychunas, G.A., Navrotsky, A. (2012) Energetic and structural studies of amorphous  $\text{Ca}_{1-x}\text{Mg}_x\text{CO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  ( $0 \leq x \leq 1$ ). *Geochimica et Cosmochimica Acta* 90, 83–95.
- Raiswell, R., Canfield, D.E. (1998) Sources of iron for pyrite formation in marine sediments. *American Journal of Science* 298, 219–245.
- Raiswell, R., Canfield, D.E. (2012) The Iron Biogeochemical Cycle Past and Present. *Geochemical Perspectives* 1, 1–220.
- Raiswell, R., Newton, R., & Wignall, P. B. (2001). An indicator of water-column anoxia: resolution of biofacies variations in the Kimmeridge Clay (Upper Jurassic, UK). *Journal of Sedimentary Research*, 71(2), 286-294.
- Rascovan, N., Maldonado, J., Vazquez, M.P., Farias, M.E. (2016) Metagenomic study of red biofilms from Diamante Lake reveals ancient arsenic bioenergetics in haloarchaea. *The ISME Journal* 10, 299–309. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.109>
- Rasmussen, K.A., Macintyre, I.G., Prufert, L. (1993) Modern stromatolite reefs fringing a brackish coastline, Chetumal Bay, Belize. *Geology* 21, 199–202. [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(1993\)021<0199:MSRFAB>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(1993)021<0199:MSRFAB>2.3.CO;2)
- Raudsepp, M.J., Wilson, S.A., Morgan, B., Patel, A., Johnston, S.G., Gagen, E.J., Fallon, S.J. (2022) Non-classical crystallization of very high magnesium calcite and magnesite in the Coorong Lakes, Australia. *Sedimentology* 69, 2246–2266. <https://doi.org/10.1111/sed.12991>
- Reddy, M.M., Hoch, A. (2012) Calcium Carbonate Nucleation in an Alkaline Lake Surface Water, Pyramid Lake, Nevada, USA. *Aquatic Geochemistry* 18, 95–113. <https://doi.org/10.1007/s10498-011-9150-3>
- Reheis, M.C., Miller, D.M. (2010) Environments of nearshore lacustrine deposition in the Pleistocene Lake Manix basin, south-central California. In: Reynolds, R.E., Miller, D.M. (Eds.) *Overboard in the Mojave: 20 Million Years of Lakes and Wetlands*. Desert Studies Consortium, California State University, Fullerton, April 2010, 24–37. <http://biology.fullerton.edu/dsc/pdf/2010Overboard.pdf>
- Reimer, J.J., Huerta-Diaz, M.A. (2011) Phosphorus Speciation and Sedimentary Fluxes in Hypersaline Sediments of the Guerrero Negro Salt Evaporation Area, Baja California Sur, Mexico. *Estuaries and Coasts* 34, 514–528. <https://doi.org/10.1007/s12237-010-9308-z>
- Reitner, J., Quéric, N.-V., Arp, G. (2011) *Advances in Stromatolite Geobiology*. Lecture Notes in Earth Sciences 131, Springer Berlin, Heidelberg, 560 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-10415-2>
- Renaut, R.W., Tiercelin, J.J., Owen, R.B. (1986) Mineral precipitation and diagenesis in the sediments of the Lake Bogoria basin, Kenya Rift Valley. *Geological Society, London, Special Publications* 25, 159–175. <https://doi.org/10.1144/GSL.SP.1986.025.01.14>
- Richert, L., Golubic, S., Le guédès, R., Hervé, A., Payri, C. (2006) Cyanobacterial populations that build ‘kopara’ microbial mats in Rangiroa, Tuamotu Archipelago, French Polynesia. *European Journal of Phycology* 41, 259–279. <https://doi.org/10.1080/09670260600804868>
- Rickard, D. (2012) Chapter 5 - Metastable Sedimentary Iron Sulfides. In: Rickard, D. (ed.) *Developments in Sedimentology*. Elsevier, 195–231.
- Riding, R. (1991) Classification of Microbial Carbonates. In: Riding, R. (ed.) *Calcareous Algae and Stromatolites*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 21–51.
- Riding, R. (2000) Microbial carbonates: the geological record of calcified bacterial–algal mats and biofilms. *Sedimentology* 47, 179–214.
- Riding, R. (2005) "Phanerozoic reefal microbial carbonate abundance: comparisons with metazoan diversity, mass extinction events, and seawater saturation state." *Revista Española de Micropaleontología* 37.1: 23-39.
- Riding, R. (2006) Microbial carbonate abundance compared with fluctuations in metazoan diversity over geological time. *Sedimentary Geology* 185, 229–238.
- Rishworth, G.M., van Elden, S., Perissinotto, R., Miranda, N.A.F., Steyn, P.-P., Bornman, T.G. (2016)

- Environmental influences on living marine stromatolites: insights from benthic microalgal communities. *Environmental Microbiology* 18, 503–513. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13116>
- Rishworth, G.M. *et al.* (2020) Modern supratidal microbialites fed by groundwater: functional drivers, value and trajectories. *Earth-Science Reviews* 210, 103364.
- Rivadeneira, M.A., Martín-Algarra, A., Sánchez-Navas, A., Martín-Ramos, D. (2006) Carbonate and Phosphate Precipitation by Chromohalobacter marismortui. *Geomicrobiology Journal* 23, 89–101.
- Robbins, L. J., Fakhraee, M., Smith, A. J., Bishop, B. A., Swanner, E. D., Peacock, C. L., Wang, C., Planavsky, N. J., Reinhard, C. T., Crowe, S. A., Lyons, T. W. (2023). Manganese oxides, Earth surface oxygenation, and the rise of oxygenic photosynthesis. *Earth-Science Reviews*, 239, 104368.
- Robin, N., Bernard, S., Miot, J., Blanc-Valleron, M. M., Charbonnier, S., & Petit, G. (2015). Calcification and diagenesis of bacterial colonies. *Minerals*, 5(3), 488-506.
- Roche, A., Vennin, E., Bundeleva, I., Bouton, A., Payandi-Rolland, D., Amiotte-Suchet, P., Gaucher, E.C., Courvoisier, H., Visscher, P.T. (2019) The Role of the Substrate on the Mineralization Potential of Microbial Mats in A Modern Freshwater River (Paris Basin, France). *Minerals* 9, 359. <https://doi.org/10.3390/min9060359>
- Rougerie, F. (1995) Nature et fonctionnement des atolls des Tuamotu (Polynésie Française). *Oceanologica Acta* 18, 61–78. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00097/20857/>
- Roy, S. (1997). Genetic diversity of manganese deposition in the terrestrial geological record. *Geological Society, London, Special Publications*, 119(1), 5-27.
- Rumbelsperger, A.M.B. (2013) *Coupling organic and inorganic methods to study growth and diagenesis of modern microbial carbonates, Rio de Janeiro State, Brazil: Implications for interpreting ancient microbialite facies development*. Ph.D. thesis, ETH Zurich, Switzerland, 161 p. <https://doi.org/10.3929/ethz-a-009785302>
- Saenger, C., Wang, Z. (2014) Magnesium isotope fractionation in biogenic and abiogenic carbonates: implications for paleoenvironmental proxies. *Quaternary Science Reviews* 90, 1–21.
- Saghäi, A. *et al.* (2015) Metagenome-based diversity analyses suggest a significant contribution of non-cyanobacterial lineages to carbonate precipitation in modern microbialites. *Frontiers in Microbiology* 6.
- Sahoo, S.K., Gilleaudeau, G.J., Wilson, K., Hart, B., Barnes, B.D., Faison, T., Bowman, A.R., Larson, T.E., Kaufman, A.J. (2023) Basin-scale reconstruction of euxinia and Late Devonian mass extinctions. *Nature*. Nature Publishing Group 615, 640–645.
- Saijo, Y., Mitamura, O., Tanaka, M. (1995) A note on the chemical composition of lake water in the Laguna Amarga, a saline lake in Patagonia, Chile. *International Journal of Salt Lake Research* 4, 165–167. <https://doi.org/10.1007/BF01990801>
- Saint Martin, J.-P., Saint Martin, S. (2015) Discovery of calcareous microbialites in coastal ponds of western Sardinia (Italy). *Geo-Eco-Marina* 21, 35–53. [https://journal.geocomar.ro/geo-ecomarina/article/view/03\\_2015](https://journal.geocomar.ro/geo-ecomarina/article/view/03_2015)
- Sala, D., Grossi, V., Agogué, H., Leboulanger, C., Jézéquel, D., Sarazin, G., Antheaume, I., Bernard, C., Ader, M., Hugoni, M. (2022). Influence of aphotic haloclines and euxinia on organic biomarkers and microbial communities in a thalassohaline and alkaline volcanic crater lake. *Geobiology*, 20(2), 292-309.
- Salas, J., Guimera, J., Cornellà, O., Aravena, R., Guzmán, E., Tore, C., von Igel, W., Moreno, R. (2010) Hydrogeology of the lacustrine system of the eastern margin of the Salar the Atacama (Chile). *Boletín Geológico y Minero* 121, 357–372.
- Salman, V., Yang, T., Berben, T., Klein, F., Angert, E., Teske, A. (2015) Calcite-accumulating large sulfur bacteria of the genus *Achromatium* in Sippewissett Salt Marsh. *The ISME Journal* 9, 2503–2514. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.62>
- Samylina, O.S., Zaytseva, L.V. (2019) Characterization of modern dolomite stromatolites from hypersaline Petukhovskoe Soda Lake, Russia. *Lethaia* 52, 1–13. <https://doi.org/10.1111/let.12286>
- Sánchez-Baracaldo, P., Ridgwell, A., Raven, J.A. (2014) A Neoproterozoic Transition in the Marine

- Nitrogen Cycle. *Current Biology* 24, 652–657.
- Sánchez-Baracaldo, P., Cardona, T. (2020) On the origin of oxygenic photosynthesis and Cyanobacteria. *New Phytologist* 225, 1440–1446.
- Sánchez-Baracaldo, P., Bianchini, G., Wilson, J.D., Knoll, A.H. (2022) Cyanobacteria and biogeochemical cycles through Earth history. *Trends in Microbiology*. Elsevier 30, 143–157.
- Sanchez-Beristain, F., Schäfer, N., Simon, K., Reitner, J. (2011) New Geochemical Method to Characterise Microbialites from the St. Cassian Formation, Dolomites, Northeastern Italy. Springer.
- Sánchez-Medina, X., Macek, M., Bautista-Reyes, F., Perz, A., Bonilla Lemus, P., Chávez Arteaga, M. (2016) Inter-annual ciliate distribution variation within the late stratification oxycline in a monomictic lake, Lake Alchichica (Mexico). *Journal of Limnology*. PAGEpress 75.
- Sanz-Montero, M.E., Cabestrero, Ó., Sánchez-Román, M. (2019) Microbial Mg-rich Carbonates in an Extreme Alkaline Lake (Las Eras, Central Spain). *Frontiers in Microbiology*. Frontiers 10.
- Sánchez-Sánchez, J., Cerca, M., Moguel, B. B., Muñoz-Velasco, I., Alcántara-Hernández, R. J., Carreón-Freyre, D., & Levrèse, G. (2023). Geomicrobiology of the Rincon de Parangueo maar crater: Exploring the link between an evolving extreme environment and its potential metabolic diversity. *Freshwater Biology*, 68(11), 1818-1838.
- Sancho-Tomás, M., Somogyi, A., Medjoubi, K., Bergamaschi, A., Visscher, P.T., *et al.* (2018) Distribution, redox state and (bio)geochemical implications of arsenic in present day microbialites of Laguna Brava, Salar de Atacama. *Chemical Geology* 490, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2018.04.029>
- Santos, F., Peña, A., Nogales, B., Soria-Soria, E., García del Cura, M.Á., González-Martín, J.A., Antón, J. (2010) Bacterial diversity in dry modern freshwater stromatolites from Ruidera Pools Natural Park, Spain. *Systematic and Applied Microbiology* 33, 209–221. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.02.006>
- Sanz-Montero, M.E., Arroyo, X., Cabestrero, Ó., Calvo, J.P., Fernández-Escalante, E., *et al.* (2013) Procesos de sedimentación y biomineralización en la laguna alcalina de las Eras (Humedal Coca-Olmedo). *Geogaceta* 53, 97–100. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4242828>
- Sanz-Montero, M.E., Cabestrero, Ó., Sánchez-Román, M. (2019) Microbial Mg-rich Carbonates in an Extreme Alkaline Lake (Las Eras, Central Spain). *Frontiers in Microbiology* 10, 148. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00148>
- Satkoski, A.M., Beukes, N.J., Li, W., Beard, B.L., Johnson, C.M. (2015) A redox-stratified ocean 3.2 billion years ago. *Earth and Planetary Science Letters* 430, 43–53.
- Schäfer, A., Stapf, K.R.G. (1978) Permian Saar-Nahe Basin and Recent Lake Constance (Germany): Two Environments of Lacustrine Algal Carbonates. In: Matter, A., Tucker, M.E. (Eds.) *Modern and Ancient Lake Sediments*. Blackwell Scientific, Oxford, 83–107. <https://doi.org/10.1002/9781444303698.ch5>
- Schirmer, B.E., Gugger, M., Donoghue, P.C.J. (2015) Cyanobacteria and the Great Oxidation Event: evidence from genes and fossils. *Palaeontology* 58, 769–785.
- Schmidt, G.L., Kamen, M.D. (1970) Variable cellular composition of Chromatium in growing cultures. *Archiv für Mikrobiologie* 73, 1–18.
- Schoch, C.L. *et al.* (2020) NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database* 2020, baaa062.
- Schopf, J.W. (2006) Fossil evidence of Archaean life. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society 361, 869–885.
- Schopf, J.W. (2006) The First Billion Years: When Did Life Emerge? *Elements* 2, 229–233.
- Schopf, J.W., Kudryavtsev, A.B., Czaja, A.D., Tripathi, A.B. (2007) Evidence of Archean life: Stromatolites and microfossils. *Precambrian Research* 158, 141–155.
- Schuler, C.G., Havig, J.R., Hamilton, T.L. (2017) Hot Spring Microbial Community Composition, Morphology, and Carbon Fixation: Implications for Interpreting the Ancient Rock Record. *Frontiers in Earth Science* 5, 97. <https://doi.org/10.3389/feart.2017.00097>
- Schneider, D., Reimer, A., Hahlbrock, A., Arp, G., Daniel, R. (2015) Metagenomic and Metatranscriptomic Analyses of Bacterial Communities Derived From a Calcifying Karst Water

- Creek Biofilm and Tufa. *Geomicrobiology Journal* 32, 316–331. <https://doi.org/10.1080/01490451.2014.907376>
- Schwalb, A., Burns, S.J., Cusminsky, G., Kelts, K., Markgraf, V. (2002) Assemblage diversity and isotopic signals of modern ostracodes and host waters from Patagonia, Argentina. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 187, 323–339. [https://doi.org/10.1016/S0031-0182\(02\)00484-4](https://doi.org/10.1016/S0031-0182(02)00484-4)
- Scoffin, T.P. (1986) An introduction to carbonate sediments and rocks. Methuen Inc., New York, NY.
- Scott, C.T., Bekker, A., Reinhard, C.T., Schnetger, B., Krapež, B., Rumble, D., Lyons, T.W. (2011) Late Archean euxinic conditions before the rise of atmospheric oxygen. *Geology* 39, 119–122.
- Sekento, L.R. (2012) Geochemical and isotopic study of the Menengai geothermal field, Kenya. *United Nations University, Geothermal Training Programme, Iceland, Report* 31, 769–792. <http://hdl.handle.net/10802/8624>
- Seki, Y., Sever, K., Sarikanat, M., Sakarya, A., Elik, E. (2013) Effect of huntite mineral on mechanical, thermal and morphological properties of polyester matrix. *Composites Part B: Engineering* 45, 1534–1540.
- Şen, F., Madakbaş, S., Kahraman, M.V. (2014) Preparation and characterization of polyaniline/Turkish Huntite-hydromagnesite composites. *Polymer Composites* 35, 456–460.
- Shacat, J.A., Green, W.J., Decarlo, E.H., Newell, S. (2004) The Geochemistry of Lake Joyce, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Aquatic Geochemistry* 10, 325–352. <https://doi.org/10.1007/s10498-004-2264-0>
- Shao, T., Zhao, J., Dong, Z. (2011) Water Chemistry of the Lakes and Groundwater in the Badain Jaran Desert. *Acta Geographica Sinica* 66, 662–672. <http://doi.org/10.11821/xb201105009>
- Shapley, M.D., Ito, E., Donovan, J.J. (2005) Authigenic calcium carbonate flux in groundwater-controlled lakes: Implications for lacustrine paleoclimate records. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69, 2517–2533. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2004.12.001>
- Shaw, G.H. (2008) Earth's atmosphere – Hadean to early Proterozoic. *Geochemistry* 68, 235–264.
- Sheldon, N.D. (2006) Precambrian paleosols and atmospheric CO<sub>2</sub> levels. *Precambrian Research* 147, 148–155.
- Shelton, A.O. *et al.* (2023) Toward quantitative metabarcoding. *Ecology* 104, e3906.
- Shen, Y., Buick, R., Canfield, D.E. (2001) Isotopic evidence for microbial sulphate reduction in the early Archaean era. *Nature*. Nature Publishing Group 410, 77–81.
- Shiraishi, F., Bissett, A., de Beer, D., Reimer, A., Arp, G. (2008a) Photosynthesis, Respiration and Exopolymer Calcium-Binding in Biofilm Calcification (Westerhöfer and Deinschwanger Creek, Germany). *Geomicrobiology Journal* 25, 83–94. <https://doi.org/10.1080/01490450801934888>
- Shiraishi, F., Reimer, A., Bissett, A., de Beer, D., Arp, G. (2008b) Microbial effects on biofilm calcification, ambient water chemistry and stable isotope records in a highly supersaturated setting (Westerhöfer Bach, Germany). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 262, 91–106. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2008.02.011>
- Shock, E.L., Holland, M., Meyer-Dombard, D'A.R., Amend, J.P. (2005) Geochemical Sources of Energy for Microbial Metabolism in Hydrothermal Ecosystems: Obsidian Pool, Yellowstone National Park. In: Inskip, W.P., McDermott, T.R. (Eds.) *Geothermal Biology and Geochemistry in Yellowstone National Park: Proceedings of the Thermal Biology Institute Workshop, Yellowstone National Park, WY*. Montana State University Publications, Bozeman, MT, 95–110.
- Shock, E.L., Holland, M., Meyer-Dombard, D'A., Amend, J.P., Osburn, G.R., Fischer, T.P. (2010) Quantifying inorganic sources of geochemical energy in hydrothermal ecosystems, Yellowstone National Park, USA. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74, 4005–4043. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2009.08.036>
- Silva-Aguilera, R.A., Vilaclara, G., Armienta, M.A., Escolero, Ó. (2022) Hydrogeology and Hydrochemistry of the Serdán-Oriental Basin and the Lake Alchichica. In: Alcocer, J. (ed.) *Lake Alchichica Limnology: The Uniqueness of a Tropical Maar Lake*. Springer International Publishing, Cham, 63–74.
- Simon, C., Daniel, R. (2009) Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches.

- Applied Microbiology and Biotechnology* 85, 265–276.
- Sleep, N.H. (2018) Geological and Geochemical Constraints on the Origin and Evolution of Life. *Astrobiology*. Mary Ann Liebert, Inc., publishers 18, 1199–1219.
- Smith, A.M., Uken, R., Thackeray, Z. (2005) Cape Morgan peritidal stromatolites: the origin of lamination: research in action. *South African Journal of Science* 101, 107–108. <https://hdl.handle.net/10520/EJC96384>
- Smith, A.M., Andrews, J.E., Uken, R., Thackeray, Z., Perissinotto, R., Leuci, R., Marca-Bell, A. (2011) Rock pool tufa stromatolites on a modern South African wave-cut platform: partial analogues for Archaean stromatolites? *Terra Nova* 23, 375–381. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3121.2011.01022.x>
- Smrzka, D., Feng, D., Himmler, T., Zwicker, J., Hu, Y., Monien, P., Tribovillard, N., Chen, D., Peckmann, J. (2020) Trace elements in methane-seep carbonates: Potentials, limitations, and perspectives. *Earth-Science Reviews* 208, 103263.
- Solari, M.A. (2015) The unexplored geobiological heritage of Chile: key to understand the past and future. *XIV Congreso Geológico Chileno*, Proceedings, October 2015, Coquimbo, Chile, AT4 SIM5.
- Solari, M.A., Hervé, F., Le Roux, J.P., Airo, A., Sial, A.N. (2010) Paleoclimatic significance of lacustrine microbialites: A stable isotope case study of two lakes at Torres del Paine, southern Chile. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 297, 70–82. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2010.07.016>
- Somaradne, N., Lawson, J., Ashman, G., Nguyen, K. (2014) Recharge to Blue Lake and Strategies for Water Security Planning, Mount Gambier, South Australia. *Journal of Water Resource and Protection* 6, 772–783. <https://doi.org/10.4236/jwarp.2014.68073>
- Song, H. *et al.* (2017) The onset of widespread marine red beds and the evolution of ferruginous oceans. *Nature Communications*. Nature Publishing Group 8, 399.
- Sorokin, D. (2003) [Oxidation of inorganic sulfur compounds by obligatory organotrophic bacteria]. *Mikrobiologiya* 72, 725–39.
- Sorokin, D.Yu., Kuenen, J.G. (2005) Haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria in soda lakes. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 685–702.
- Souza-Egipsy, V., Wierchos, J., Ascaso, C., Neelson, K.H. (2005) Mg–silica precipitation in fossilization mechanisms of sand tufa endolithic microbial community, Mono Lake (California). *Chemical Geology* 217, 77–87.
- Sprachta, S., Camoin, G., Golubic, S., Le Campion, T. (2001) Microbialites in a modern lagoonal environment: nature and distribution, Tikehau atoll (French Polynesia). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 175, 103–124. [https://doi.org/10.1016/S0031-0182\(01\)00388-1](https://doi.org/10.1016/S0031-0182(01)00388-1)
- Spratt, B.G., Staley, J.T., Fisher, M.C. (2006) Introduction: species and speciation in micro-organisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society 361, 1897–1898.
- Srivastava, N.K. (1999) Lagoa Salgada (Rio de Janeiro) Recent stromatolites. In: Schobbenhaus, C., Campos, D.A., Queiroz, E.T., Winge, M., Berbert-Born, M. (Eds.) *Geological and Paleontological Sites of Brazil* 041, 203–209. <https://sigep.eco.br/sitio041/sitio041english.htm>
- Stadnitskaia, A. *et al.* (2005) Biomarker and 16S rDNA evidence for anaerobic oxidation of methane and related carbonate precipitation in deep-sea mud volcanoes of the Sorokin Trough, Black Sea. *Marine Geology* 217, 67–96.
- Steinkampf, W.C., Werrell, W.L. (2001) *Ground-water flow to Death Valley, as inferred from the chemistry and geohydrology of selected springs in Death Valley National Park, California and Nevada*. USGS Water-Resources Investigations Report 98-4114, U.S. Geological Survey, Denver, CO, 37 p. <https://doi.org/10.3133/wri984114>
- Stephens, E.A., Braissant, O., Visscher, P.T. (2008) Spirochetes and salt marsh microbial mat geochemistry: Implications for the fossil record. *Carnets de Géologie (Notebooks on Geology)*, Brest, CG2008\_A09. <https://doi.org/10.4267/2042/20045>
- Stigliano, Luca. *Comparative microscopic signatures of microbial and abiotic alteration of calcite*. Diss.

- Université Grenoble Alpes [2020-....], 2024.
- Stigliano, L., Caumartin, J., Benzerara, K. (2023) Chapter 6 - Micro- and nanoscale techniques for studying biofilm-mineral interactions. In: Gurtler, V., Patrauchan, M. (eds) *Methods in Microbiology*. Academic Press, 143–192.
- Stockey, R.G., Cole, D.B., Planavsky, N.J., Loydell, D.K., Frýda, J., Sperling, E.A. (2020) Persistent global marine euxinia in the early Silurian. *Nature Communications*. Nature Publishing Group 11, 1804.
- Strauss, H. (2006) ANOXIA THROUGH TIME. In: Neretin, L.N. (ed.) *Past and Present Water Column Anoxia*. Springer Netherlands, Dordrecht, 3–19.
- Su, M., Meng, L., Zhao, L., Tang, Y., Qiu, J., Tian, D., Li, Z. (2021) Phosphorus deficiency in soils with red color: Insights from the interactions between minerals and microorganisms. *Geoderma* 404, 115311.
- Suarez-Gonzalez, P., Benito, M.I., Quijada, I.E., Mas, R., Campos-Soto, S. (2019) ‘Trapping and binding’: A review of the factors controlling the development of fossil agglutinated microbialites and their distribution in space and time. *Earth-Science Reviews* 194, 182–215.
- Sugitani, K., Lepot, K., Nagaoka, T., Mimura, K., Van Kranendonk, M., Oehler, D.Z., Walter, M.R. (2010) Biogenicity of Morphologically Diverse Carbonaceous Microstructures from the ca. 3400 Ma Strelley Pool Formation, in the Pilbara Craton, Western Australia. *Astrobiology*. Mary Ann Liebert, Inc., publishers 10, 899–920.
- Sutter, M., Melnicki, M.R., Schulz, F., Woyke, T., Kerfeld, C.A. (2021) A catalog of the diversity and ubiquity of bacterial microcompartments. *Nature Communications*. Nature Publishing Group 12, 3809.
- Svenson, T., Dickson, W., Hellberg, J., Moberg, G., Munthe, N. (1995) The Swedish liming programme. *Water, Air, and Soil Pollution* 85, 1003–1008. <https://doi.org/10.1007/BF00476961>
- Tan, Q., Shi, Z., Hu, X., Wang, Y., Tian, Y., Wang, C. (2018) Diagenesis of microbialites in the lower Cambrian Qingxudong Formation, South China: Implications for the origin of porosity in deep microbial carbonates. *Journal of Natural Gas Science and Engineering* 51, 166–182.
- Tang, Y.Z., Dobbs, F.C. (2007) Green Autofluorescence in Dinoflagellates, Diatoms, and Other Microalgae and Its Implications for Vital Staining and Morphological Studies. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2306–2313.
- Tang, P., Chen, D., Wang, Y., Ding, Y., El-Shafeiy, M., Yang, B. (2022) Diagenesis of microbialite-dominated carbonates in the Upper Ediacaran Qigebrak Formation, NW Tarim Basin, China: Implications for reservoir development. *Marine and Petroleum Geology* 136, 105476.
- Tavera, R., Komárek, J. (1996) Cyanoprokaryotes in the volcanic lake of Alchichica, Puebla State, Mexico. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* 83, 511–538. [https://doi.org/10.1127/algol\\_stud/83/1996/511](https://doi.org/10.1127/algol_stud/83/1996/511)
- Taylor, G.F. (1975) The occurrence of monohydrocalcite in two small lakes in the south-east of South Australia. *American Mineralogist* 60, 690–697. [http://www.minsocam.org/ammin/AM60/AM60\\_690.pdf](http://www.minsocam.org/ammin/AM60/AM60_690.pdf)
- Taylor, L.S., Zhang, G.G.Z. (2016) Physical chemistry of supersaturated solutions and implications for oral absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews* 101, 122–142.
- Tessin, A., Chappaz, A., Hendy, I., Sheldon, N. (2018) Molybdenum speciation as a paleo-redox proxy: A case study from Late Cretaceous Western Interior Seaway black shales. *Geology* 47, 59–62.
- Thompson, K.J. *et al.* (2019) Photoferrotrophy, deposition of banded iron formations, and methane production in Archean oceans. *Science Advances*. American Association for the Advancement of Science 5, eaav2869.
- Thraillkill, J. (1971) Carbonate Deposition in Carlsbad Caverns. *The Journal of Geology*. The University of Chicago Press 79, 683–695.
- Tice, M.M., Thornton, D.C.O., Pope, M.C., Olszewski, T.D., Gong, J. (2011) Archean Microbial Mat Communities. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*. Annual Reviews 39, 297–319.
- Tosca, N.J., Macdonald, F.A., Strauss, J.V., Johnston, D.T., Knoll, A.H. (2011) Sedimentary talc in Neoproterozoic carbonate successions. *Earth and Planetary Science Letters* 306, 11–22.
- Tostevin, R., Shields, G.A., Tarbuck, G.M., He, T., Clarkson, M.O., Wood, R.A. (2016) Effective use of cerium anomalies as a redox proxy in carbonate-dominated marine settings. *Chemical Geology* 438, 146–162.

- Tostevin, R., Mills, B.J.W. (2020) Reconciling proxy records and models of Earth's oxygenation during the Neoproterozoic and Palaeozoic. *Interface Focus*. Royal Society 10, 20190137.
- Tostevin, R. (2021) Cerium Anomalies and Paleoredox. *Elements in Geochemical Tracers in Earth System Science*. Cambridge University Press.
- Tucker, M.E., Bathurst, R.G.C. (2009) *Carbonate Diagenesis*. John Wiley & Sons.
- Turicchia, S., Ventura, S., Komárková, J., Komárek, J. (2009) Taxonomic evaluation of cyanobacterial microflora from alkaline marshes of northern Belize. 2. Diversity of oscillatorialean genera. *Nova Hedwigia* 89, 165–200. <https://doi.org/10.1127/0029-5035/2009/0089-0165>
- Uroz, S., Kelly, L. C., Turpault, M. P., Lepieux, C., & Frey-Klett, P. (2015). The mineralosphere concept: mineralogical control of the distribution and function of mineral-associated bacterial communities. *Trends in microbiology*, 23(12), 751-762.
- Valdespino-Castillo, P.M., Hu, P., Merino-Ibarra, M., López-Gómez, L.M., Cerqueda-García, D., et al. (2018) Exploring Biogeochemistry and Microbial Diversity of Extant Microbialites in Mexico and Cuba. *Frontiers in Microbiology* 9, 510. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00510>
- Valdespino-Castillo, P.M. et al. (2022) Microbialites: Diversity Hotspots in the Mexican Plateau. In: Alcocer, J. (ed.) *Lake Alchichica Limnology: The Uniqueness of a Tropical Maar Lake*. Springer International Publishing, Cham, 375–390.
- Van der Weijden, C.H., van der Weijden, R.D. (2014) Calcite growth: Rate dependence on saturation, on ratios of dissolved calcium and (bi)carbonate and on their complexes. *Journal of Crystal Growth* 394, 137–144.
- Van Kranendonk, M.J. (2007) Chapter 7.2 A Review of the Evidence for Putative Paleoarchean Life in the Pilbara Craton, Western Australia. In: van Kranendonk, M.J., Smithies, R.H., Bennett, V.C. (eds) *Developments in Precambrian Geology*. Elsevier, 855–877.
- Van Lith, Y., Vasconcelos, C., Warthmann, R., Martins, J.C.F., McKenzie, J.A. (2002) Bacterial sulfate reduction and salinity: two controls on dolomite precipitation in Lagoa Vermelha and Brejo do Espinho (Brazil). *Hydrobiologia* 485, 35–49. <https://doi.org/10.1023/A:1021323425591>
- Vasconcelos, C., Warthmann, R., McKenzie, J. A., Visscher, P. T., Bittermann, A. G., & van Lith, Y. (2006). Lithifying microbial mats in Lagoa Vermelha, Brazil: modern Precambrian relics?. *Sedimentary Geology*, 185(3-4), 175-183.
- Velázquez, N.I.T., Rebolledo Vieyra, M., Paytan, A., Broach, K.H., Hernández Terrones, L.M. (2019) Hydrochemistry and carbonate sediment characterisation of Bacalar Lagoon, Mexican Caribbean. *Marine and Freshwater Research* 70, 382–394. <https://doi.org/10.1071/MF18035>
- Veronesi, M.L., Barbieri, A., Hanselmann, K.W. (n.d.) Phosphorus, carbon and nitrogen enrichment during sedimentation in a seasonally anoxic lake (Lake Lugano, Switzerland).
- Veronesi, G., Koudouna, E., Cotte, M., Martin, F.L., Quantock, A.J. (2013) X-ray absorption near-edge structure (XANES) spectroscopy identifies differential sulfur speciation in corneal tissue. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405, 6613–6620.
- Vignale, F.A., Kurth, D., Lencina, A.I., Poiré, D.G., Chihuailaf, E., Muñoz-Herrera, N.C., Novoa, F., Contreras, M., Turjanski, A.G., Farías, M.E. (2021) Geobiology of Andean Microbial Ecosystems Discovered in Salar de Atacama, Chile. *Frontiers in Microbiology* 12, 762076. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.762076>
- Villafañe, P.G., Corbí, H., Cónsole-Gonella, C., Ruiz-Sánchez, F.J., Soria, J.M. (2018) The Messinian stromatolites of the Sierra del Colmenar (Western Mediterranean): facies characterization and sedimentological interpretation. *PeerJ*. PeerJ Inc. 6, e5766.
- Visscher, P. T., Gallagher, K. L., Bouton, A., Farias, M. E., Kurth, D., Sancho-Tomás, M., Philippot, P., Somogyi, A., Medjoubi, K., Vennin, E., Bourillot, R., Walter, M., R., Burns, B., P., Contreras, M., Dupraz, C. (2020). Modern arsenotrophic microbial mats provide an analogue for life in the anoxic Archean. *Communications Earth & Environment*, 1(1), 24.
- Vitaliano, C.J., Beck, C.W. (1963) Huntite, Gabbs, Nevada. *American Mineralogist* 48, 1158–1163.
- Vogel, M.B., Des Marais, D.J., Parenteau, M.N., Jahnke, L.L., Turk, K.A., Kubo, M.D.Y. (2010) Biological influences on modern sulfates: Textures and composition of gypsum deposits from Guerrero Negro, Baja California Sur, Mexico. *Sedimentary Geology* 223, 265–280. <https://doi.org/10.1016/j.sedgeo.2009.11.013>
- Vogt, L.I. et al. (2023) Sulfur X-ray Absorption and Emission Spectroscopy of Organic Sulfones. *The Journal of Physical Chemistry A*. American Chemical Society 127, 3692–3704.

- Volmer, M. (1939). *Kinetics of Phase Formation: (Kinetik Der Phasenbildung)* (p. 0462). T. Steinkopff.
- Von der Borch, C.C. (1976) Stratigraphy and formation of Holocene dolomitic carbonate deposits of the Coorong Area, South Australia. *Journal of Sedimentary Research* 46, 952–966. <https://doi.org/10.1306/212F709F-2B24-11D7-8648000102C1865D>
- Wacey, D., Wright, D.T., Boyce, A.J. (2007) A stable isotope study of microbial dolomite formation in the Coorong Region, South Australia. *Chemical Geology* 244, 155–174. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2007.06.032>
- Waditee, R., Hossain, G.S., Tanaka, Y., Nakamura, T., Shikata, M., Takano, J., Takabe, T., Takabe, T. (2004) Isolation and Functional Characterization of Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporters from Cyanobacteria \*. *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier 279, 4330–4338.
- Walter, M.R., Heys, G.R. (1985) Links between the rise of the metazoa and the decline of stromatolites. *Precambrian Research* 29, 149–174.
- Wand, U., Schwarz, G., Brüggemann, E., Bräuer, K. (1997) Evidence for physical and chemical stratification in Lake Untersee (central Dronning Maud Land, East Antarctica). *Antarctic Science* 9, 43–45. <https://doi.org/10.1017/S0954102097000060>
- Wand, U., Samarkin, V.A., Nitzsche, H.-M., Hubberten, H.-W. (2006) Biogeochemistry of methane in the permanently ice-covered Lake Untersee, central Dronning Maud Land, East Antarctica. *Limnology and Oceanography* 51, 1180–1194. <https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.2.1180>
- Wang, T., Feng, Q., Huang, Y. (2021) Fossil evidence provides new insights into the origin of the Mesoproterozoic ministromatolites. *Precambrian Research* 366, 106426.
- Wang, C. *et al.* (2023) Archean to early Paleoproterozoic iron formations document a transition in iron oxidation mechanisms. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 343, 286–303.
- Ward, L.M., Kirschvink, J.L., Fischer, W.W. (2016) Timescales of Oxygenation Following the Evolution of Oxygenic Photosynthesis. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 46, 51–65.
- Ward, L.M., Rasmussen, B., Fischer, W.W. (2019) Primary Productivity Was Limited by Electron Donors Prior to the Advent of Oxygenic Photosynthesis. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 124, 211–226.
- Ward, L.M., Shih, P.M. (2019) The evolution and productivity of carbon fixation pathways in response to changes in oxygen concentration over geological time. *Free Radical Biology and Medicine* 140, 188–199.
- Warden, J.G. (2016) *Microbialites of Lake Clifton, Western Australia: groundwater dependent ecosystems in a threatened environment*. Ph.D. thesis, University of Texas at Austin, Austin, TX, 145 p. <http://hdl.handle.net/2152/65482>
- Warden, J.G., Coshell, L., Rosen, M.R., Breecker, D.O., Ruthrof, K.X., Omelon, C.R. (2019) The importance of groundwater flow to the formation of modern thrombolitic microbialites. *Geobiology* 17, 536–550. <https://doi.org/10.1111/gbi.12344>
- Warren, L.A., Ferris, F.G. (1998) Continuum between Sorption and Precipitation of Fe(III) on Microbial Surfaces. *Environmental Science & Technology*. American Chemical Society 32, 2331–2337.
- Watanabe, Y., Tajika, E., & Ozaki, K. (2023). Biogeochemical transformations after the emergence of oxygenic photosynthesis and conditions for the first rise of atmospheric oxygen. *Geobiology*, 21(5), 537-555.
- Welch, K.A., Lyons, W.B., Graham, E., Neumann, K., Thomas, J.M., Mikesell, D. (1996) Determination of major element chemistry in terrestrial waters from Antarctica by ion chromatography. *Journal of Chromatography A* 739, 257–263. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(96\)00044-1](https://doi.org/10.1016/0021-9673(96)00044-1)
- Wentzien, S., Sand, W. (2004) Tetrathionate Disproportionation by *Thiomonas intermedia* K12. *Engineering in Life Sciences* 4, 25–30.
- Weyhenmeyer, G.A., Hartmann, J., Hessen, D.O., Kopáček, J., Hejzlar, J., *et al.* (2019) Widespread diminishing anthropogenic effects on calcium in freshwaters. *Scientific Reports* 9, 10450. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46838-w>
- White III, R.A., Chan, A.M., Gavelis, G.S., Leander, B.S., Brady, A.L., Slater, G.F., Lim, D.S.S., Suttle, C.A. (2016) Metagenomic Analysis Suggests Modern Freshwater Microbialites Harbor a Distinct Core Microbial Community. *Frontiers in Microbiology* 6, 1531. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01531>
- White III, R. (2020) The Global Distribution of Modern Microbialites: Not So Uncommon After All. ,

- 107–134.
- White, W.B. (1971) Infrared characterization of water and hydroxyl ion in the basic magnesium carbonate minerals. *American Mineralogist* 56, 46–53.
- White, R.A., Chan, A.M., Gavelis, G.S., Leander, B.S., Brady, A.L., Slater, G.F., Lim, D.S.S., Suttle, C.A. (2016) Metagenomic Analysis Suggests Modern Freshwater Microbialites Harbor a Distinct Core Microbial Community. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers 6.
- Williams, W.D., Buckney, R.T. (1976) Chemical composition of some inland surface waters in South, Western and northern Australia. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 27, 379–397. <https://doi.org/10.1071/MF9760379>
- Williams, K.P., Kelly, D.P. (2013) Proposal for a new class within the phylum Proteobacteria, Acidithiobacillia classis nov., with the type order Acidithiobacillales, and emended description of the class Gammaproteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Microbiology Society, 63, 2901–2906.
- Wilmeth, D.T., Corsetti, F.A., Beukes, N.J., Awramik, S.M., Petryshyn, V., Spear, J.R., Celestian, A.J. (2019) Neoproterozoic (2.7 Ga) lacustrine stromatolite deposits in the Hartbeesfontein Basin, Ventersdorp Supergroup, South Africa: Implications for oxygen oases. *Precambrian Research* 320, 291–302.
- Wiltfong, R., Mitra-Kirtley, S., Mullins, O.C., Andrews, B., Fujisawa, G., Larsen, J.W. (2005) Sulfur Speciation in Different Kerogens by XANES Spectroscopy. *Energy & Fuels*. American Chemical Society 19, 1971–1976.
- Wittkop, C., Swanner, E. D., Grengs, A., Lambrecht, N., Fakhraee, M., Myrbo, A., Bray, A. W., Poulton, S. W., Katsev, S. (2020). Evaluating a primary carbonate pathway for manganese enrichments in reducing environments. *Earth and Planetary Science Letters*, 538, 116201.
- Woese, Carl R., Otto Kandler, and Mark L. Wheelis. "Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87.12 (1990): 4576-4579.
- Wolberg, D.L., Domski, P. (1989) Paleoenvironmental implications of first documented occurrence of unusual carbonate mineral, huntite, in Late Cretaceous Fruitland Formation, San Juan basin, New Mexico. *AAPG Bulletin (American Association of Petroleum Geologists); (USA)* 73:9.
- Wood, C.M., Perry, S.F., Wright, P.A., Bergman, H.L., Randall, D.J. (1989) Ammonia and urea dynamics in the Lake Magadi tilapia, a ureotelic teleost fish adapted to an extremely alkaline environment. *Respiration Physiology* 77, 1–20. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(89\)90025-X](https://doi.org/10.1016/0034-5687(89)90025-X)
- Wright, D.T., Wacey, D. (2005) Precipitation of dolomite using sulphate-reducing bacteria from the Coorong Region, South Australia: significance and implications. *Sedimentology* 52, 987–1008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3091.2005.00732.x>
- Wu, Y., Wang, N., Zhao, L., Zhang, Z., Chen, L., Lu, Y., Lü, X., Chang, J. (2014) Hydrochemical characteristics and recharge sources of Lake Nuortu in the Badain Jaran Desert. *Chinese Science Bulletin* 59, 886–895. <https://doi.org/10.1007/s11434-013-0102-8>
- Yanez-Montalvo, A., Gómez-Acata, S., Águila, B., Hernández-Arana, H., Falcón, L.I. (2020) The microbiome of modern microbialites in Bacalar Lagoon, Mexico. *PLOS ONE*. Public Library of Science 15, e0230071.
- Yanez-Montalvo, A., Águila, B., Gómez-Acata, S., Mass-Vargas, M., Cabanillas-Terán, N., Vega-Zepeda, A., Bahena, H., Hernández-Arana, H., Falcón, L.I. (2021) Depth Related Structure and Microbial Composition of Microbialites in a Karst Sinkhole, Cenote Azul, Mexico. *Geomicrobiology Journal* 38, 237–251. <https://doi.org/10.1080/01490451.2020.1836086>
- Yuretich, R.F. (1979) Modern sediments and sedimentary processes in Lake Rudolf (Lake Turkana) eastern Rift Valley, Kenya. *Sedimentology* 26, 313–331. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3091.1979.tb00912.x>
- Zahnle, K., Claire, M., Catling, D. (2006) The loss of mass-independent fractionation in sulfur due to a Palaeoproterozoic collapse of atmospheric methane. *Geobiology* 4, 271–283.
- Zak, D. *et al.* (2021) Sulphate in freshwater ecosystems: A review of sources, biogeochemical cycles, ecotoxicological effects and bioremediation. *Earth-Science Reviews* 212, 103446.
- Zamana, L., Borzenko, S. (2011) Elemental sulfur in the brine of Lake Doroninskoe (Eastern

- Transbaikalia). *Doklady Earth Sciences - DOKL EARTH SCI* 438, 775–778.
- Zaytseva, L.V., Samylin, O.S., Prokin, A.A. (2021) Formation of Monohydrocalcite in the Microbialites from Laguna de Los Cisnes (Isla Grande de Tierra Del Fuego, Chile). *Environmental Sciences Proceedings* 6, 2. <https://doi.org/10.3390/iecms2021-09340>
- Zeyen, Nina. *Etude de microbialites lacustres actuels du Mexique: traçage de l'activité biologique et des conditions environnementales de formation*. Diss. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, 2016.
- Zeyen, N. (2016) *Etude de microbialites lacustres actuels du Mexique : traçage de l'activité biologique et des conditions environnementales de formation*. Ph.D. thesis, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, 316 p. <https://theses.hal.science/tel-01659924>
- Zeyen, N., Benzerara, K., Li, J., Groleau, A., Balan, E., *et al.* (2015) Formation of low-T hydrated silicates in modern microbialites from Mexico and implications for microbial fossilization. *Frontiers in Earth Science* 3, 64. <https://doi.org/10.3389/feart.2015.00064>
- Zeyen, N., Daval, D., Lopez-Garcia, P., Moreira, D., Gaillardet, J., Benzerara, K. (2017) Geochemical Conditions Allowing the Formation of Modern Lacustrine Microbialites. *Procedia Earth and Planetary Science* 17, 380–383.
- Zeyen, N., Benzerara, K., Menguy, N., Brest, J., Templeton, A.S., *et al.* (2019) Fe-bearing phases in modern lacustrine microbialites from Mexico. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 253, 201–230. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2019.03.021>
- Zeyen, N., Benzerara, K., Beyssac, O., Daval, D., Muller, E., *et al.* (2021) Integrative analysis of the mineralogical and chemical composition of modern microbialites from ten Mexican lakes: What do we learn about their formation? *Geochimica et Cosmochimica Acta* 305, 148–184. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2021.04.030>
- Zhang, L., Jungblut, A.D., Hawes, I., Andersen, D.T., Sumner, D.Y., Mackey, T.J. (2015) Cyanobacterial diversity in benthic mats of the McMurdo Dry Valley lakes, Antarctica. *Polar Biology* 38, 1097–1110. <https://doi.org/10.1007/s00300-015-1669-0>
- Zhang, F., Lenton, T.M., del Rey, Á., Romaniello, S.J., Chen, X., Planavsky, N.J., Clarkson, M.O., Dahl, T.W., Lau, K.V., Wang, W., Li, Z., Zhao, M., Isson, T., Algeo, T.J., Anbar, A.D. (2020) Uranium isotopes in marine carbonates as a global ocean paleoredox proxy: A critical review. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 287, 27–49.
- Zheng, R., Cai, R., Liu, R., Shan, Y., Liu, G., Sun, C. (2021) Cultivation and characterization of a novel clade of deep-sea Chloroflexi: providing a glimpse of the phylum Chloroflexi involved in sulfur cycling. *bioRxiv*, 2021.01.05.425403.
- Zhu, T., Dittrich, M. (2016) Carbonate Precipitation through Microbial Activities in Natural Environment, and Their Potential in Biotechnology: A Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 4.
- Zimmermann, J., Glöckner, G., Jahn, R., Enke, N., Gemeinholzer, B. (2015) Metabarcoding vs. morphological identification to assess diatom diversity in environmental studies. *Molecular Ecology Resources* 15, 526–542.
- Zopfi, J., Ferdelman, T.G., Fossing, H. (2004) Distribution and fate of sulfur intermediates—sulfite, tetrathionate, thiosulfate, and elemental sulfur—in marine sediments. *Sulfur Biogeochemistry - Past and Present*. Geological Society of America.
- Zorz, J.K., Sharp, C., Kleiner, M., Gordon, P.M.K., Pon, R.T., Dong, X., Strous, M. (2019) A shared core microbiome in soda lakes separated by large distances. *Nature Communications* 10, 4230. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12195-5>
- Zúñiga, L.R., Campos, V., Pinochet, H., Prado, B. (1991) A limnological reconnaissance of Lake Tebenquiche, Salar de Atacama, Chile. *Hydrobiologia* 210, 19–24. <https://doi.org/10.1007/BF00014320>
- Zuñiga, O., Wilson, R., Amat, F., Hontoria, F. (1999) Distribution and characterization of Chilean populations of the brine shrimp *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca). *International Journal of Salt Lake Research* 8, 23–40. <https://doi.org/10.1007/BF02442135>



# **Annexes**

## Annexes Matériel d'étude et Méthodes

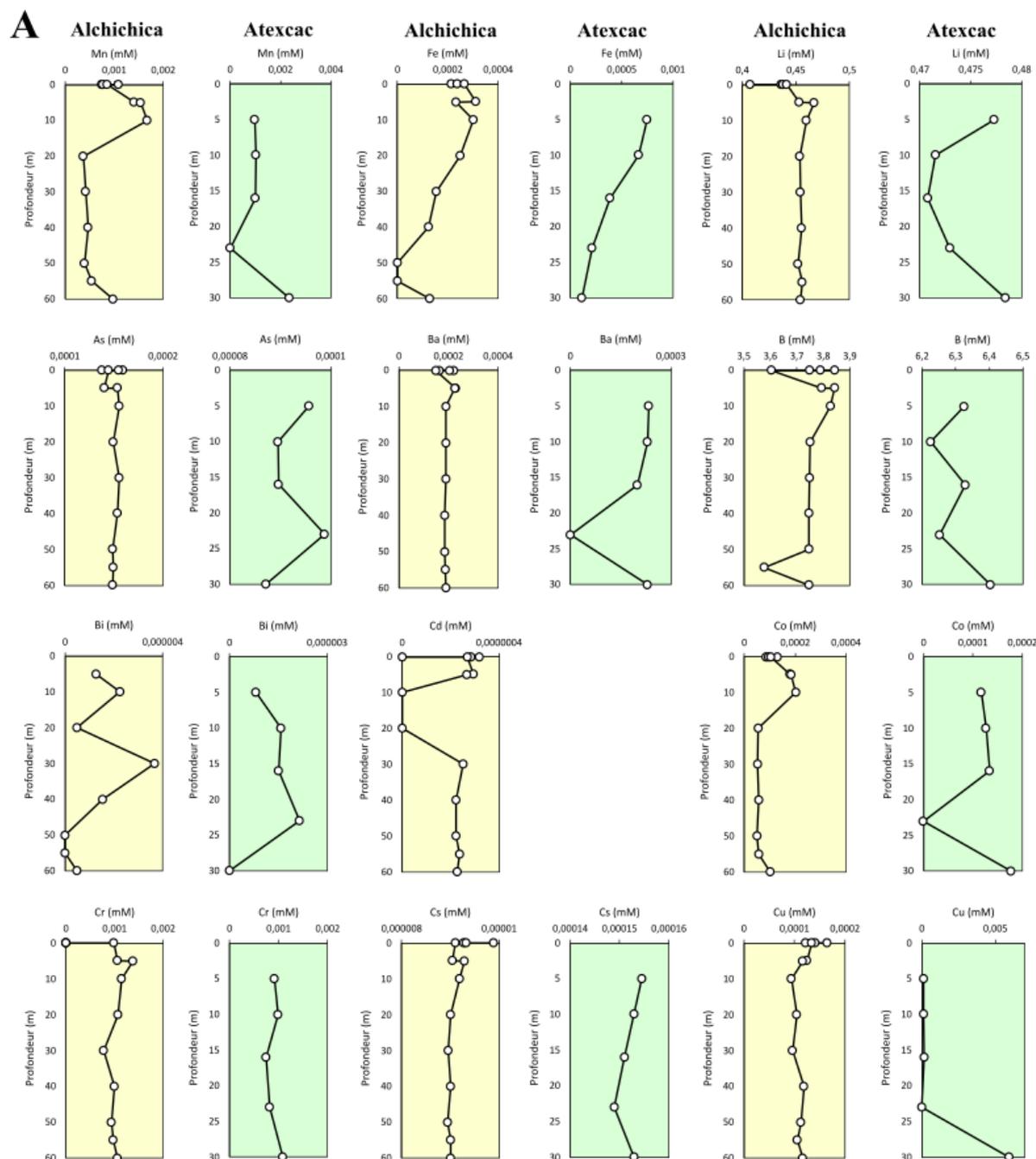
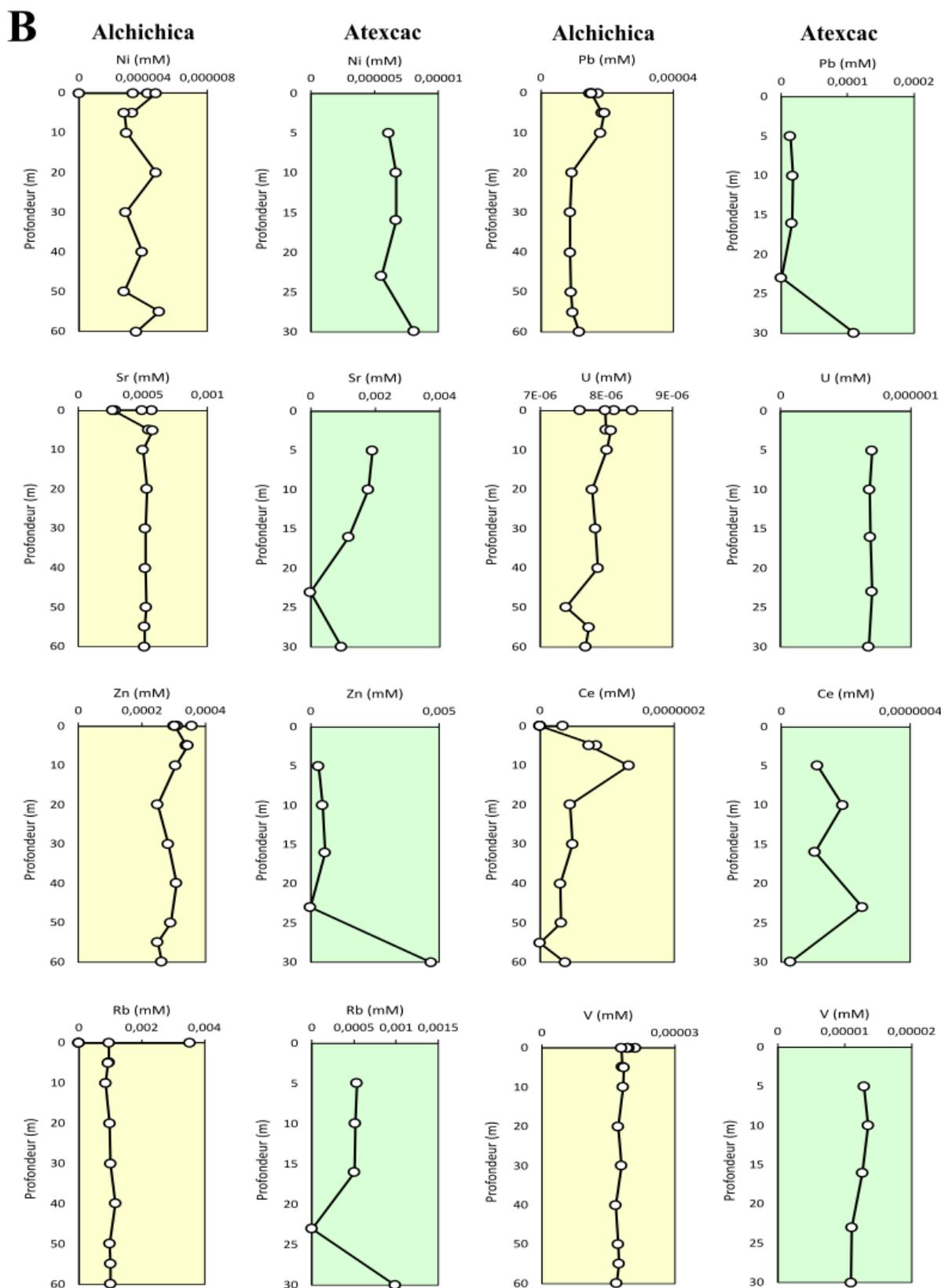


Figure A1. (A)

Variations en fonction de la profondeur des concentrations de plusieurs éléments traces dans les lacs Alchichica et Atexcac en mai 2019 (début de stratification). Les précisions sont estimées à 5 % pour les mesures des concentrations. (A) De haut en bas, en mM : profils du Mn, As, Bi, Cr, Fe, Ba, Cd, Cs, Li, B, Co et Cu.



**Figure A1. (B)**

**Variations en fonction de la profondeur des concentrations de plusieurs éléments traces dans les lacs Alchichica et Atexcac en mai 2019 (début de stratification).** Les précisions sont estimées à 5 % pour les mesures des concentrations. (A) De haut en bas, en mM : profils du Ni, Sr, Zn, Pb, U, Ce, Rb et V.

## Annexes Chapitre I

Lien A1.1

Tableaux A1.1 et A1.2

Lien A1.1 <https://www.geochemicalperspectivesletters.org/article2311/>

a	Station	Country	Station	Country	Station	Country	Station	Country	Station	Country
	Ajkestrask	Sweden	Camp	Canada	Gamlesjon	Sweden	Julia	US, New York		
	Albynsjon	Sweden	Carrol	US, Ontario	Gardssjon	Sweden	Kalkbrottet	Sweden		
	Alcona Dam Pond	US, Michigan	Carson	US, Ontario	Garnsviken	Sweden	Karingsjon	Sweden		
	Algsjon	Sweden	Clear	US, California	Gaslyn	US, Wisconsin	Katharine	US, Wisconsin		
	Allequash Creek	US, Wisconsin	Como	US, Minnesota	Gavellangsjon	Sweden	Katherine	Canada		
	Alsatrask	Sweden	Content	US, Wisconsin	Genesee	US, Wisconsin	Kautashine Lower	US, Wisconsin		
	Altasjon	Sweden	Cooke Dam Pond	US, Michigan	Gisen	Sweden	Keesus	US, Wisconsin		
	Amossar	Sweden	Cranberry	US, Michigan	Glasbergasjon	Sweden	Kilfjarden	Sweden		
	Aspen	Sweden	Crescent	US, New York	Glotttrasjon	Sweden	Killarney	Canada		
	Astrask	Sweden	Crooked	US, Washington	Gorvalns	Sweden	Kimball	Canada		
	Avalon	US, Michigan	Croton Dam Pond	Canada	Guthrie	US, Oklahoma	Klemmen	Sweden		
	Avery	Canada	Dagbrottet	US, Michigan	Gyllebosjon	Sweden	Krageholmssjon	Sweden		
	Badger	US, Washington	Dambatrask	Sweden	Hackebergasjon	Sweden	Krankesjon	Sweden		
	Baptist	US, Ontario	Deer	Sweden	Hagebytrask	Sweden	Kyrksjon	Sweden		
	Bass	US, California	Denoou	Canada	Hallaren	Sweden	Fifteen	Sweden		
	Bastetrask	Sweden	Dixon	US, Wisconsin	Hallsjon	Sweden	Mary	US, Wisconsin		
	Bean	US, Minnesota	Drevvikensroset	US, California	Hanscom	US, Wisconsin	Mecosta	US, Montana		
	Beaver	Antarctica	Duck	Sweden	Hardy Dam Pond	US, Michigan	Missaukee	US, Michigan		
	Beulah	US, Wisconsin	Dyviksmaren	Sweden	Havgardssjon	Sweden	Mitchell	US, Ontario		
	Big Bass	US, California	Eagle	Canada	Heart	Canada	SaintHelen	US, Michigan		
	Big Bradford	US, Michigan	East Flowage	US, Wisconsin	Hicks	Sweden	Winyah	US, Michigan		
	Big Trade	US, Wisconsin	Ekolnvetraudd	Sweden	Hillsview	Canada	Langsjon	Sweden		
	Bjorkesskrasjon	Sweden	Ellestadssjon	Sweden	Hjalstaviken	Canada	Langsjonrimbo	Sweden		
	Bjorsund	Sweden	Emerald	Sweden	Hope	US, New York	Lankyrksjo	Sweden		
	Black Oak	US, Wisconsin	Eriksundsbron	Canada	Hornborgasjon	Sweden	Laren	Sweden		
	Blekvagen	Sweden	Erken	Sweden	Horsan	US, North Carolina	Lattern	Sweden		
	Blue Spring	US, Wisconsin	Fakersjon	Sweden	Horsehead	US, Arkansas	Laurel	US, Kentucky		
	Bogevik	Sweden	Fardumetrask	Sweden	Hosjon	Sweden	Lejondalssjon	Sweden		
	Bohner	US, Wisconsin	Farvik	Sweden	Houghton	US, Michigan	Levrasjon	Sweden		
	Bollen	US, Wisconsin	Five Channels Dam Pond	US, Michigan	Hubbard	US, Michigan	Lillaullfjarden	Sweden		
	Boot	US, Wisconsin	Five	Canada	Igelsjon	Sweden	Limmaren	Sweden		
	Booth	US, Wisconsin	Fjallfotasjon	Sweden	Igetviken	Sweden	Lincoln	US, Arkansas		
	Borgasjon	Sweden	Flaten	Sweden	Indian	US, New York	Lindarvdammen	Sweden		
	Borringesjon	Sweden	Found	US, Wisconsin	Insjon	Sweden	Lipsett (Lipste)	US, Wisconsin		
	Bottenfjarden	Canada	Fridrask	Sweden	Island	US, Illinois	Little Arbor Vitae	US, Wisconsin		
	Bridge	Sweden	Frosjon	Sweden	Jarlason	US, Wisconsin	Little Au Sable	US, Michigan		
	Brosjon	US, Washington	Fysingen	Sweden	Jennie Webber	US, Wisconsin	Little Butternut	US, Wisconsin		
	Browns	Sweden			Jordon	Sweden				
	Bysjon	Sweden			Jose	US, Michigan				

b

Station	Country	Station	Country	Station	Country	Station	Country	Station	Country
Little Spider (Gaffri)	US, Wisconsin	Orlangen	Sweden	Silver	US, California	Tom Doyle	US, Wisconsin		
Little Whitefish	US, Michigan	Osmaren	Sweden	Sinjjarv	Estonia	Torsjon	Sweden		
Locknesjon	Sweden	Osträngsjon	Sweden	Sjöbergasjon	Sweden	Trehomningsjodalen	Sweden		
Lockwood	US, Michigan	Oxundasjon	Sweden	Skarsjon	Sweden	Tripp (Trapp)	US		
Lommaren	Sweden	Paddock	US, Wisconsin	Skarvalangen	Sweden	Trout River	Canada		
Lone Stone	US, Wisconsin	Paviken	Sweden	Skarven	Sweden	Tullingsesjon	Sweden		
Long	US, New York	Phantom	US, Washington	Skedviken	Sweden	Turtle	US, Wisconsin		
Loon	Canada	Pickereel	US, Wisconsin	Skodalsdammen	Sweden	Twenty-Six	US, Wisconsin		
Lorraine	Canada	Pigeon	Canada	Slapy reservoir	Czech Republic	Twin	US, Utah		
Lost	US, Oregon	Pildammar	US	Smith	US, Alabama	Tyresoflaten	Sweden		
Lost Dam Pond	US, Michigan	Pine	US, Georgia	Snogeholmsjon	Sweden	Ullisjon	Sweden		
Love	US, Missouri	Pleasant	US, Arizona	Snowden (Stone)	US, Wisconsin	Uttran	Sweden		
Ludgosjon	Sweden	Pogy	US, Michigan	Sodergimningen	Sweden	Vagsjon	Sweden		
Lyngsjon	Sweden	Potter	US, Wisconsin	Somers	US, Wisconsin	Vallentusjon	Sweden		
Magelungen	Sweden	Rabelovsjon	Sweden	Sovdeborgssjon	Sweden	Valloxen	Sweden		
Malarengarnsviken	Sweden	Rammtrask	Sweden	Sovdesjon	Sweden	Vansjon	Sweden		
Marbysjon	Sweden	Ramsjon	Sweden	Sparren	Sweden	Varpsundsbron	Sweden		
Marilyn Slump	US	Rastasjon	Sweden	Spectacle	Canada	Vassen	Sweden		
Marpestrask	Sweden	Rdningen	Sweden	Spring Lower	US, North Carolina	Vastraringsjon	Sweden		
Masren	Sweden	Rice (Glenton)	US, Wisconsin	Squash	US, Wisconsin	Vaughn	US, Colorado		
Mccollum	US, Michigan	Riga Reservoir	Latvia	Sten	Sweden	Vendelsjon	Sweden		
Mccormick	US, Wisconsin	Rimov reservoir	Czech Republic	Stakasjon	Sweden	Viren	Sweden		
Mcnaughton	US, Wisconsin	Rinsjon	Sweden	Staketbron	Sweden	Vombsjon	Sweden		
Minerva	US, New York	Ripley	US, Wisconsin	Staples	US, Wisconsin	Walker Pond	US, Massachusetts		
Mjolhattetrask	Sweden	Rogers Dam Pond	US, Michigan	Stegeholmsviken	Sweden	Wandawega (Otter)	US, Wisconsin		
Molnortrask	Sweden	Rosjon	Sweden	Stevenson Creek	US, Florida	West Twin	US, Michigan		
Monroe	US	Ross	US, Washington	Storaijungsjon	Sweden	White Ash	US, Wisconsin		
Morley Pond	US, Michigan	Round	US, Illinois	Stordrafsjon	Sweden	Whitefish	US, Montana		
Mud Hen	US, Wisconsin	Rsjofjarden	Sweden	Storsund	Sweden	Whitewater (Bass Ket)	Canada		
Muskellunge	US, Wisconsin	Saddlebag	US, California	Storstrasket	Sweden	Whitlock	US, Michigan		
Nemabbin Upper	US, Wisconsin	Sagsjon	Sweden	Strodjan	Sweden	Winfield	US, Kansas		
Neusiedl	Austria	Sand	US, New York	Stromaren	Sweden	Wolf	US, Indiana		
Norasjon	Sweden	Sauntrys Pocket	US, Wisconsin	Svaneholmsjon	Sweden	Wood	US, Minnesota		
Norrviiken	Sweden	School Section	US, Michigan	Swamp	US, California	Yddingen	Sweden		
North Creek	US, New York	Section One	US, Michigan	Sylvan	Canada	Yddingsesjon	Sweden		
North (Holden)	Canada	Shamrock	US, California	Syningen	Sweden	Yellow Birch	US, Wisconsin		
Okullasjon	Sweden	Shangrila-Benet (Pasche)	US, Wisconsin	Tamren	Sweden	Ymsen	Sweden		
Oljaren	Sweden	Shupac	US, Michigan	Tea	Canada				
Oppmansjon	Sweden	Siesjon	Sweden	Testen	Sweden				
Oringsesjon	Sweden	Sigvaldetrask	Sweden	Tingstadetrask	Sweden				

Tableau A1.1.

(a, b) Environnements sursaturés par rapport aux ACC/MHC dans les bases de données GLEON et EDI.

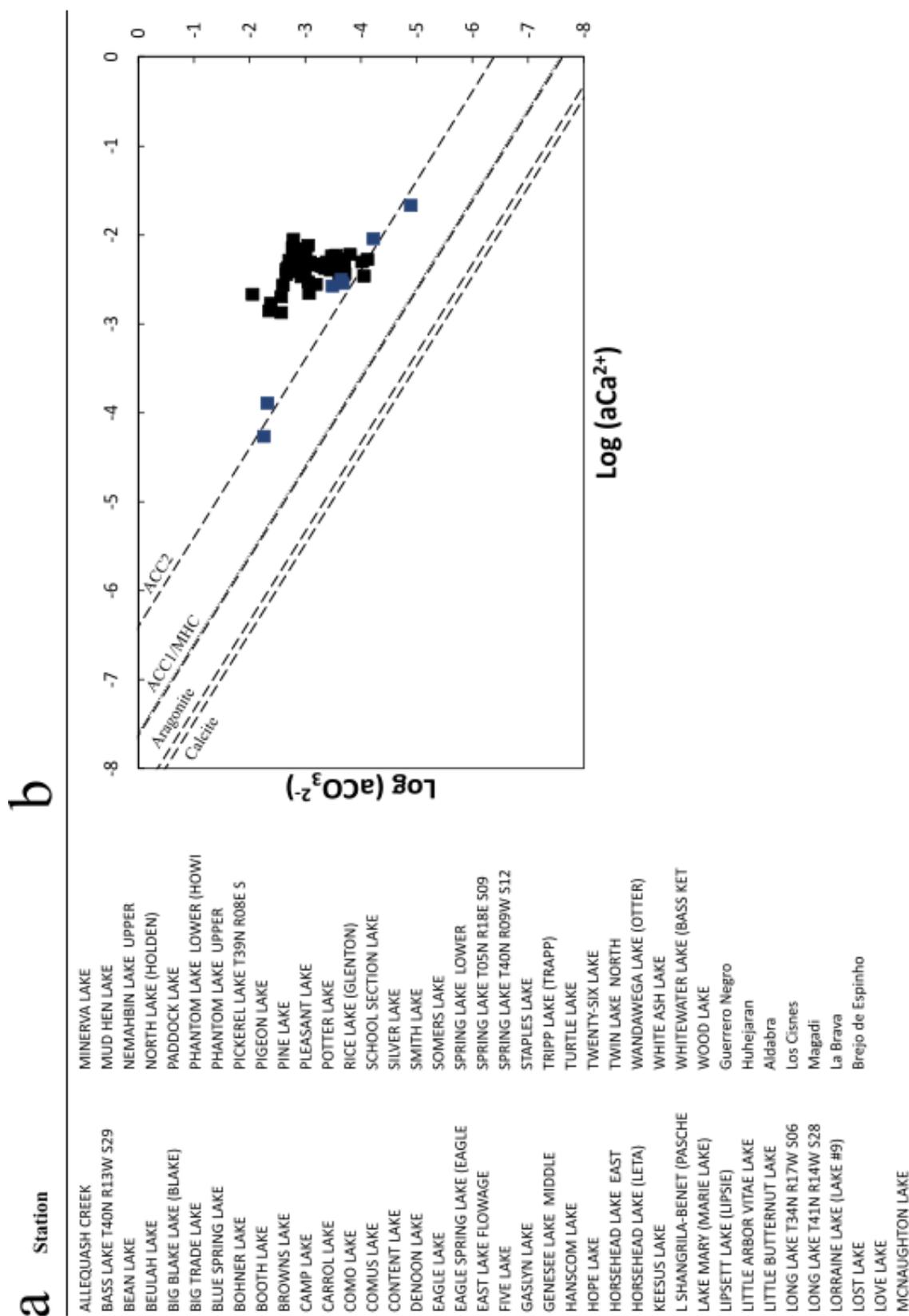


Tableau A1.2.

Quelques environnements sursaturés par rapport aux ACC/MHC. (a) Liste des environnements sursaturés avec les ACC/MHC ; (b) Distribution des environnements de la liste a dans un diagramme de solubilité des carbonates de calcium montrant leur sursaturation par rapport aux ACC.

## Annexes Chapitre II

Tableaux A2.1 et A2.2

Figures A2.1 à A2.10

### Données supplémentaires du manuscrit sur les signatures du soufre dans les microbialites d'Alchichica

Sample	Date of sampling	CaO (%wt)	MgO (%wt)	Na <sub>2</sub> O (%wt)	K <sub>2</sub> O (%wt)	SiO <sub>2</sub> (%wt)	Main mineral phases
AL22_mb_20m	October 2022	6.49 ± 0.32	36.52 ± 0.73	0.22 ± 0.011	0.03 ± 0.002	0.74 ± 0.04	Hydromagnesite-Aragonite-Huntite
AL22_mb_30m	October 2022	3.56 ± 0.18	38.40 ± 0.77	0.28 ± 0.014	0.07 ± 0.003	2.34 ± 0.12	Hydromagnesite-Aragonite-Huntite
AL22_mb_40m	October 2022	11.61 ± 0.58	31.89 ± 0.64	0.25 ± 0.013	< D.L.	0.38 ± 0.02	Hydromagnesite-Aragonite-Huntite
AL19_mb_5m	May 2019	16.51 ± 0.82	27.51 ± 0.55	0.38 ± 0.019	0.1 ± 0.005	2.56 ± 0.13	Hydromagnesite-Aragonite
AL19_mb_10m	May 2019	6.11 ± 0.3	37.16 ± 0.74	0.23 ± 0.011	0.04 ± 0.002	1.36 ± 0.07	Hydromagnesite-Aragonite
AL19_mb_20m	May 2019	21.62 ± 1.08	24.72 ± 0.49	0.32 ± 0.016	< D.L.	0.35 ± 0.02	Hydromagnesite-Aragonite-Huntite
AL19_mb_40m	May 2019	7.67 ± 0.38	37.01 ± 0.74	0.36 ± 0.018	0.03 ± 0.002	0.77 ± 0.04	Hydromagnesite-Aragonite-Huntite

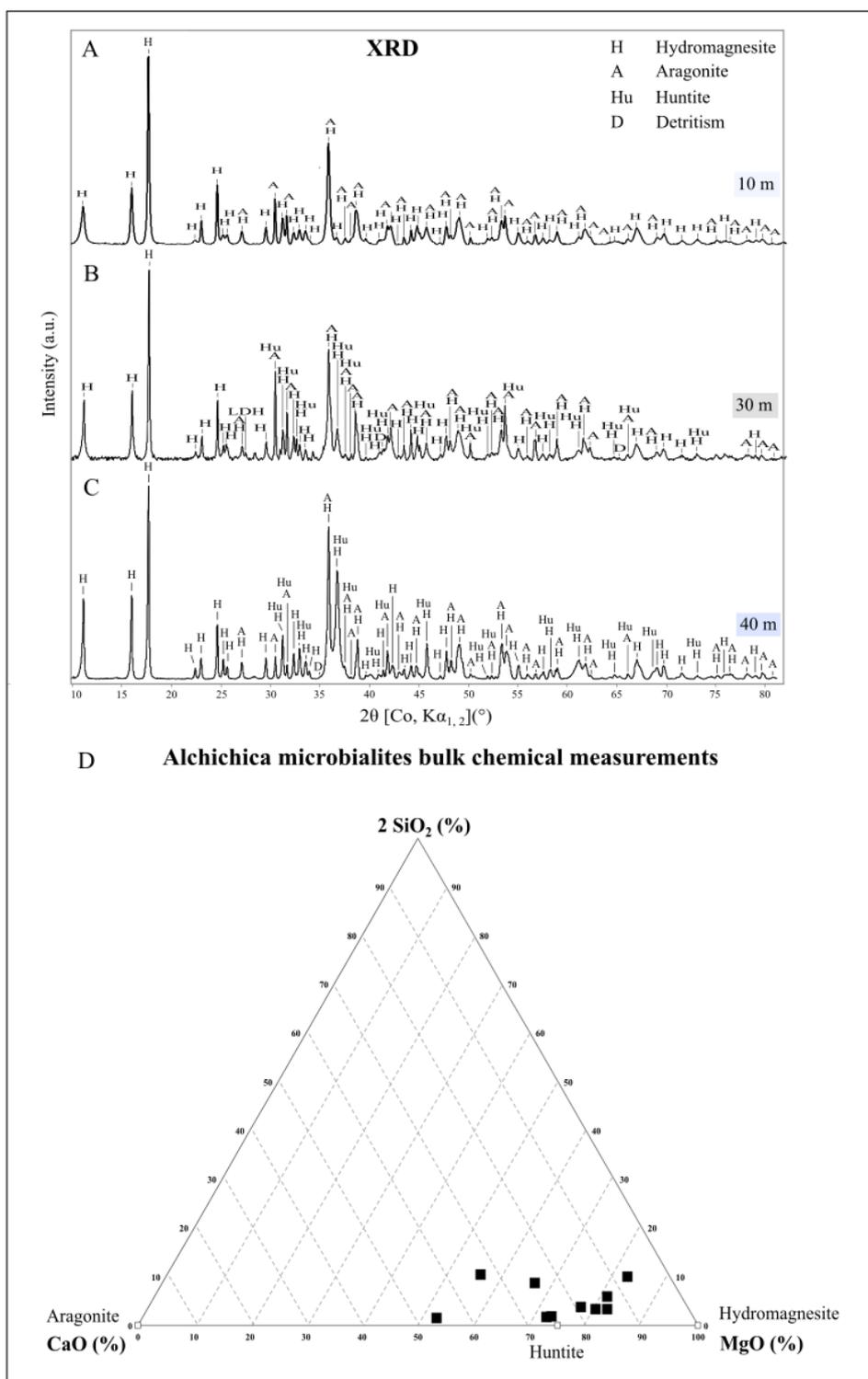
Sample	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (%wt)	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (%wt)	MnO (%wt)	S <sub>total</sub> (%wt)	C <sub>org</sub> (%wt)	Analyses
AL22_mb_20m	0.09 ± 0.009	0.16 ± 0.02	< D.L.	0.09 ± 0.004	0.15 ± 0.007	SEM-EDXS
AL22_mb_30m	0.16 ± 0.016	0.47 ± 0.05	< D.L.	0.03 ± 0.001	0.12 ± 0.006	SEM-EDXS, S K-edge XANES, laboratory XRF, μXRF
AL22_mb_40m	0.10 ± 0.01	0.12 ± 0.01	< D.L.	0.06 ± 0.003	0.19 ± 0.009	SEM-EDXS, S K-edge XANES, laboratory XRF, μXRF
AL19_mb_5m	0.26 ± 0.026	0.59 ± 0.059	0.018 ± 0.001	0.11 ± 0.005	0.37 ± 0.019	SEM-EDXS
AL19_mb_10m	0.1 ± 0.01	0.18 ± 0.018	< D.L.	0.04 ± 0.002	0.09 ± 0.005	SEM-EDXS
AL19_mb_20m	0.28 ± 0.028	0.08 ± 0.008	< D.L.	0.04 ± 0.002	0.26 ± 0.013	SEM-EDXS
AL19_mb_40m	0.07 ± 0.007	0.15 ± 0.015	0.019 ± 0.001	0.01 ± 0.0005	0.04 ± 0.002	SEM-EDXS

**Tableau A2.1.**  
Bulk chemical composition of the Lake Alchichica microbialites collected in May 2019 and October 2022.

Year	Depth (m)	Period	Temperature (°C)	pH	Ca <sup>2+</sup> (mM)	Mg <sup>2+</sup> (mM)	Na <sup>+</sup> +K <sup>+</sup> (mM)	DIC (mM)	Cl <sup>-</sup> (mM)	S (mM)	Mg/Ca	Origin of data
2019	0	Beginning of stratification	-	-	0.09	19.25	113.74	33.55	113.28	10.28	212.08	Muller et al., 2022
2019	0	Beginning of stratification	-	-	0.15	19.10	112.90	34.10	115.50	10.30	122.60	Muller et al., 2022
2019	0	Beginning of stratification	-	-	0.15	18.95	111.18	34.39	113.32	10.01	127.79	Muller et al., 2022
2019	0	Beginning of stratification	-	-	0.09	18.17	106.01	34.43	100.58	9.67	198.78	Muller et al., 2022
2022	1	End of stratification	18.47	9.23	0.23	18.88	115.06	35.99	93.42	10.94	83.10	This study
2019	4.9	Beginning of stratification	19.21	9.14	0.15	18.80	111.32	34.51	106.65	10.15	120.91	This study
2019	5	Beginning of stratification	19.20	9.14	0.16	19.26	113.14	-	107.10	10.25	120.85	Muller et al., 2022
2019	10	Beginning of stratification	19.18	9.22	0.16	19.07	112.02	32.79	106.19	10.13	120.24	Muller et al., 2022
2022	10	End of stratification	18.05	9.23	0.22	18.73	114.13	36.00	93.67	10.83	82.90	This study
2019	20	Beginning of stratification	16.69	9.23	0.15	18.62	109.97	34.03	105.90	10.05	126.10	Muller et al., 2022
2019	30	Beginning of stratification	15.49	9.22	0.15	18.70	110.05	34.02	105.74	10.12	128.11	Muller et al., 2022
2022	30	End of stratification	17.89	9.21	0.22	18.80	112.62	35.82	93.75	10.82	83.86	This study
2022	34.4	End of stratification	16.45	9.21	0.22	18.40	109.76	35.79	93.18	10.58	84.70	This study
2022	34.9	End of stratification	16.45	9.21	0.21	18.26	108.92	36.05	94.19	10.68	85.53	This study
2022	35	End of stratification	16.00	9.21	0.21	18.41	109.21	36.01	94.21	10.64	85.31	This study
2022	36.1	End of stratification	15.85	9.22	0.22	18.13	109.59	35.88	93.71	10.46	83.35	This study
2022	37	End of stratification	15.73	9.21	0.22	18.60	109.56	35.71	93.59	10.70	84.70	This study
2022	38.1	End of stratification	15.66	9.22	0.23	18.16	110.81	35.86	94.14	10.52	80.34	This study
2019	40	Beginning of stratification	15.29	9.24	0.15	18.82	110.76	32.84	106.62	9.97	127.73	Muller et al., 2022
2022	40	End of stratification	15.55	9.22	0.23	18.08	112.19	36.35	94.18	10.43	78.35	This study
2019	50	Beginning of stratification	15.21	9.17	0.14	18.68	109.02	34.30	108.38	10.02	130.13	Muller et al., 2022
2022	50	End of stratification	15.46	9.21	0.22	17.89	111.23	36.47	96.77	10.29	79.69	This study
2019	55	Beginning of stratification	15.21	9.18	0.14	17.85	104.90	34.27	108.83	9.70	128.05	Muller et al., 2022
2019	60	Beginning of stratification	15.19	9.25	0.15	18.71	109.26	34.07	111.48	10.02	127.72	Muller et al., 2022

**Tableau A2.2.**

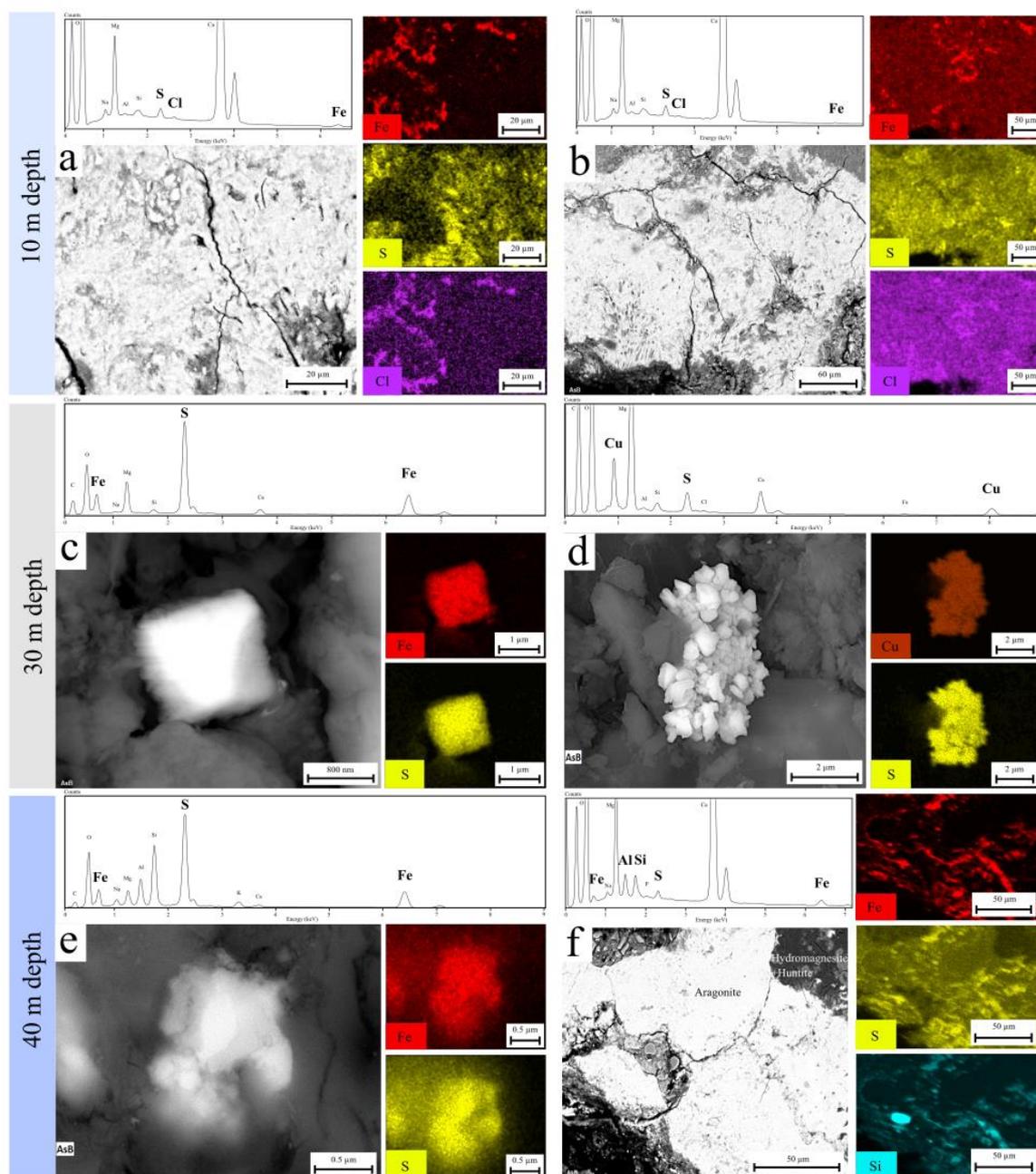
**Bulk major dissolved chemical species and and physico-chemical *in situ* parameters of the Alchichica water column depth profile in May 2019 and October 2022 with a precision of +/- 5 % on the measurements.**



**Figure A2.1.**

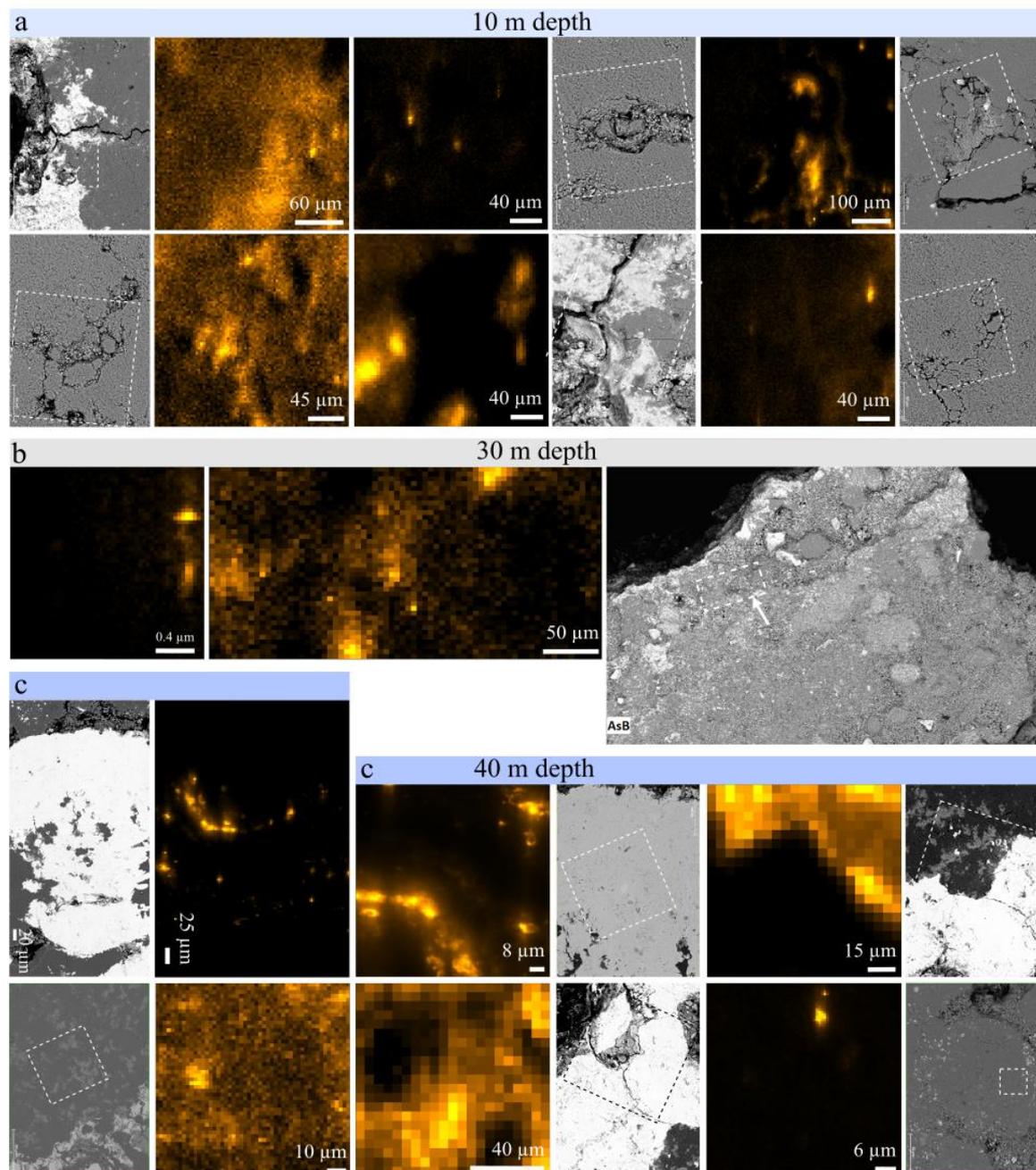
**Powder X-ray diffraction patterns and bulk chemical composition of the Alchichica microbialites.**

Hydromagnesite (H), aragonite (A), huntite (Hu), LDH and detrital mineral phases (D) such as albite, anorthite and/or pyroxene were detected in these samples. (A) Powder X-ray diffraction pattern of a 10-m-deep Alchichica microbialite sample; (B) Powder X-ray diffraction pattern of a 30-m-deep Alchichica microbialite sample; (C) Powder X-ray diffraction pattern of a 40-m-deep Alchichica microbialite sample; (D) Plot of the bulk chemical compositions of microbialites sampled in Lake Alchichica between 0 and 40 m in depth in May 2019 and October 2022 in a Mg-Ca-2\*Si ternary diagram. The small empty squares represent the stoichiometries of hydromagnesite, huntite and aragonite.



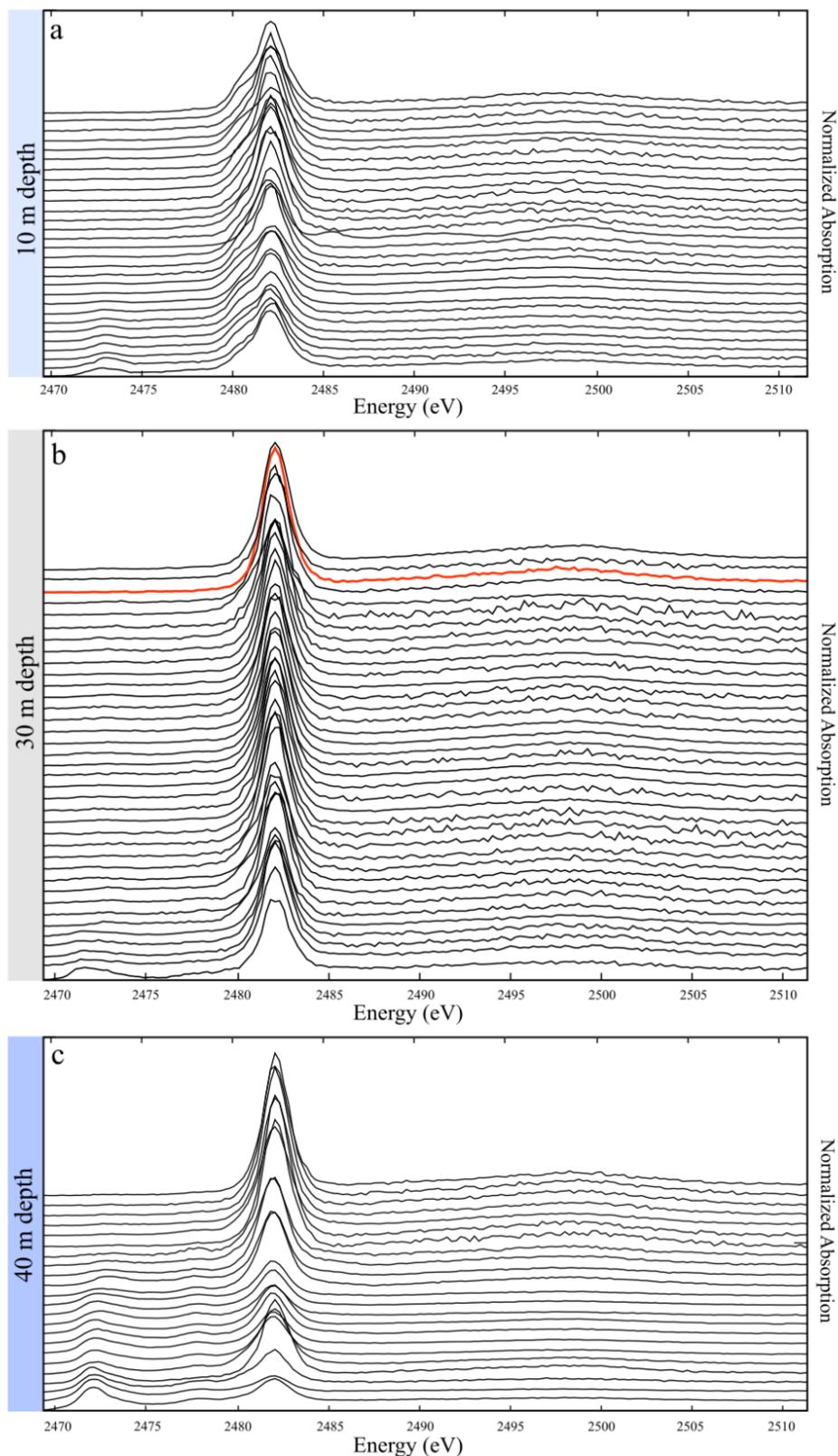
**Figure A2.2.**

**Sulfur-bearing mineral phases in Lake Alchichica microbialites collected in October 2022 detected by SEM-EDXS.** (a) SEM image in the backscattered electron mode of an aragonitic surface layer of the 10-m-deep microbialite sample, with associated EDXS spectrum and elemental EDXS maps of iron (red), sulfur (yellow) and chloride (purple); (b) SEM image in the backscattered electron mode of another aragonitic surface layer of the 10-m-deep microbialite sample, with associated EDXS spectrum and elemental EDXS maps of iron (red), sulfur (yellow) and chloride (purple); (c) SEM image in the backscattered electron mode of euhedral crystal of iron sulfide on the 30-m-deep microbialite sample, with associated EDXS spectrum and elemental EDXS maps of iron (red) and sulfur (yellow); (d) SEM image in the backscattered electron mode of a Cu-S precipitation in the 30-m-deep microbialite sample, with associated EDXS spectrum and elemental EDXS maps of copper (brown) and sulfur (yellow); (e) SEM image in the backscattered electron mode of an iron sulfide precipitation in the 40-m-deep microbialite sample, with associated EDXS spectrum and elemental EDXS maps of iron (red) and sulfur (yellow); (f) SEM image in the backscattered electron mode of an aragonitic surface layer of the 40-m-deep microbialite sample, with associated EDXS spectrum and elemental EDXS maps of iron (red) and sulfur (yellow) and silica (blue).



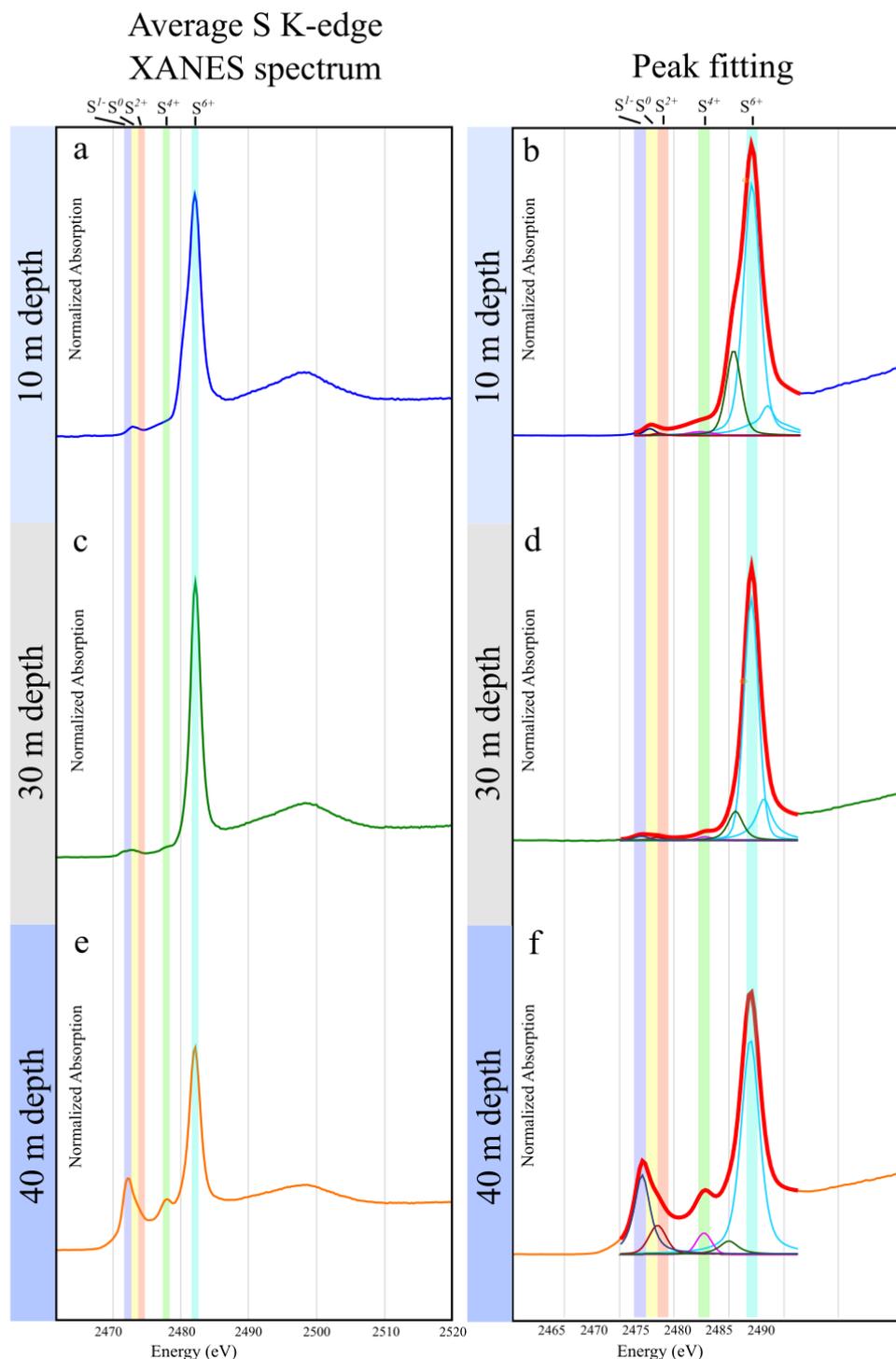
**Figure A2.3.**

All the SR-XRF sulfur maps acquired at the ID21 beamline on the Lake Alchichica microbialites collected in October 2022, ~associated to their SEM image in backscattered electron mode (AsB). (a) SR-XRF sulfur maps and corresponding SEM image in AsB mode acquired on the 10-m-deep microbialite thick section; (b) SR-XRF sulfur maps and corresponding SEM image in AsB mode acquired on the 30-m-deep microbialite thick section; (c) SR-XRF sulfur maps and corresponding SEM image in AsB mode acquired on the 40-m-deep microbialite thick section



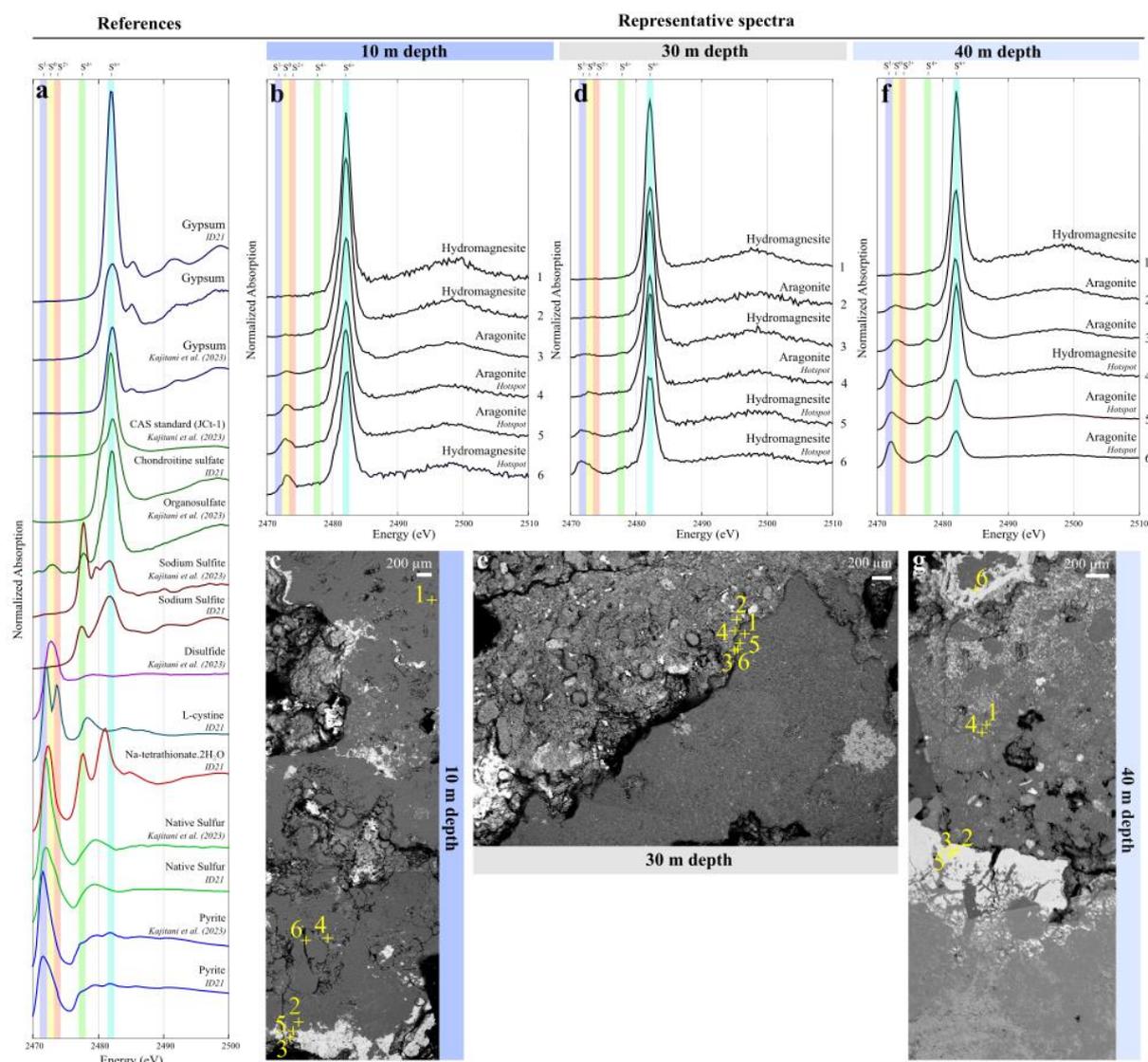
**Figure A2.4.**

**All the sulfur K-edge XANES spectra acquired on the Lake Alchichica microbialites collected in October 2022.** (a) Sulfur K-edge XANES spectra acquired on the 10-m-deep microbialite thick section; (b) Sulfur K-edge XANES spectra acquired on the 30-m-deep microbialite thick section with in red the spectrum used as internal reference; (c) Sulfur K-edge XANES spectra acquired on the 40-m-deep microbialite thick section.



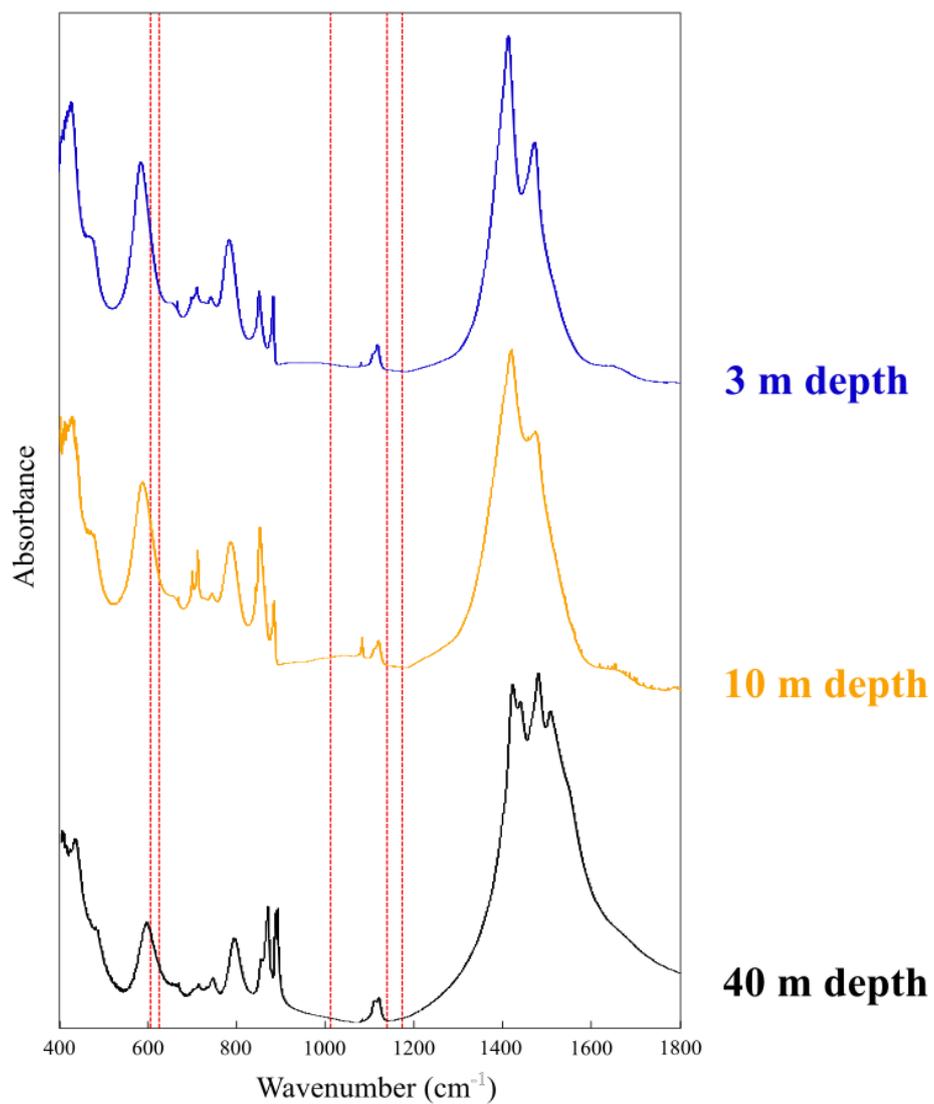
**Figure A2.5.**

**Sulfur K-edge XANES spectra deconvolution.** Oxidation states of the sulfur which were attributed to energy ranges are highlighted by different lines in dark blue for  $S^{-1}$ , yellow for  $S^0$ , red for  $S^{+2}$ , green for  $S^{+4}$  and light blue for  $S^{+6}$ . On the right of the figure, the red line corresponds to the result of the spectrum deconvolution. The pseudo-Voigt curves used to fit the spectrum are represented under the spectrum. (a) Average sulfur K-edge XANES spectrum of the 10-m-deep sample; (b) Peak fitting result of the 10-m-deep average sulfur K-edge XANES spectrum; (c) Average sulfur K-edge XANES spectrum of the 30-m-deep sample; (d) Peak fitting result of the 30-m-deep average sulfur K-edge XANES spectrum; (e) Average sulfur K-edge XANES spectrum of the 40-m-deep sample; (f) Peak fitting result of the 40-m-deep average sulfur K-edge XANES spectrum.



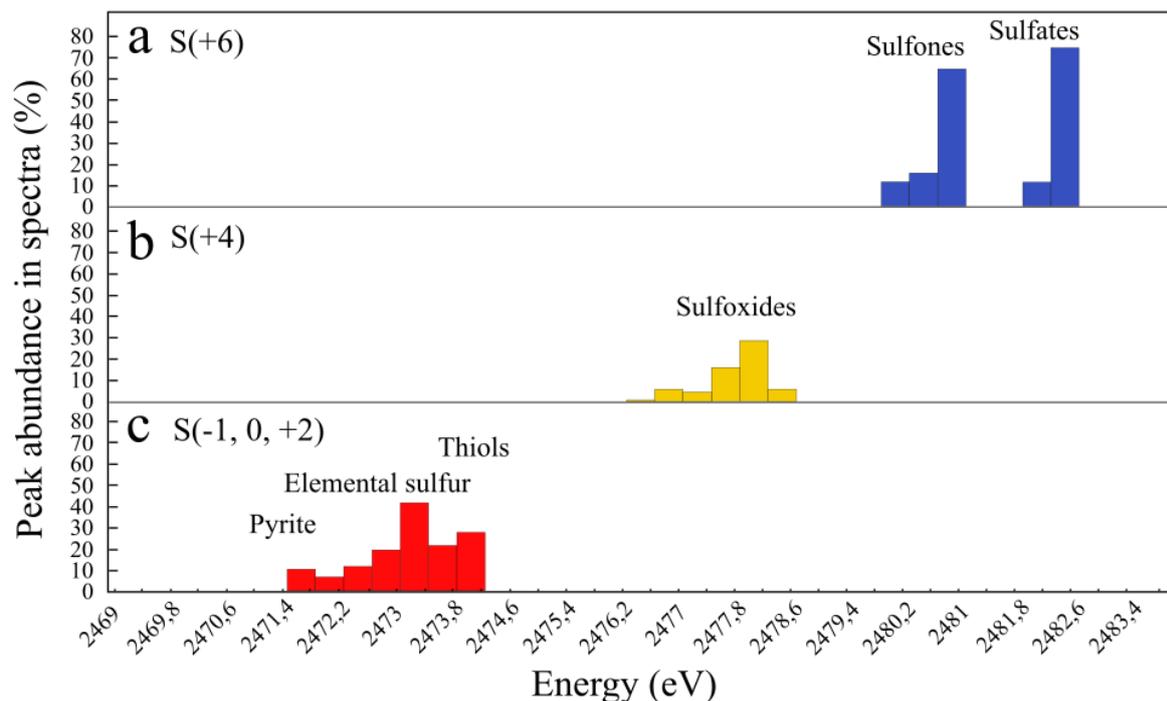
**Figure A2.6.**

**Overview of the sulfur K-edge XANES spectra of the Lake Alchichica microbialites collected in October 2022 with in parallel a list of references sulfur XANES spectra coming from the ID21 organic and inorganic databases and the literature.** (a) List of reference sulfur XANES spectra used to compare the microbialites sulfur XANES spectra (ID21 organic and inorganic databases; Kajitani et al., 2023); (b) Six numbered sulfur XANES spectra representatives of the dataset obtained for different mineral phases present in the 10-m-deep sample; (c) SEM image in the backscattered electron mode at large scale of the 10-m-deep sample. Numbered crosses indicate the places where corresponding numbered sulfur XANES spectra of the image b were acquired; (d) Six numbered sulfur XANES spectra representatives of the dataset obtained for different mineral phases present in the 30-m-deep sample; (e) SEM image in the backscattered electron mode at large scale of the 30-m-deep sample. Numbered crosses indicate the places where corresponding numbered sulfur XANES spectra of the image d were acquired; (f) Six numbered sulfur XANES spectra representatives of the dataset obtained for different mineral phases present in the 40-m-deep sample; (g) SEM image in the backscattered electron mode at large scale of the 40-m-deep sample. Numbered crosses indicate the places where corresponding numbered sulfur XANES spectra of the image f were acquired.



**Figure A2.7.**

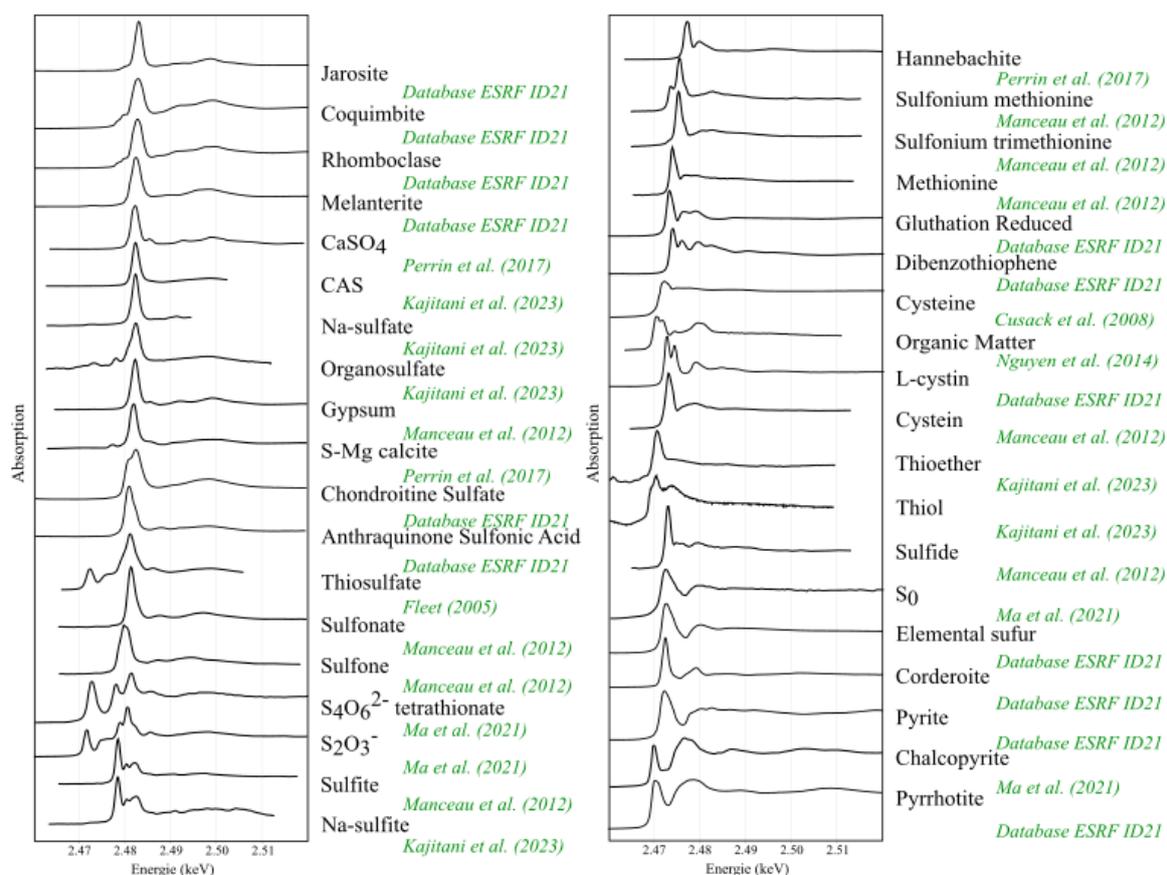
**FTIR spectra of Alchichica microbialites from different depths sampled in 2019 or 2022.** The red dotted lines represent the theoretical bands characteristic of CAS (Balan et al., 2016; Floquet et al., 2015).



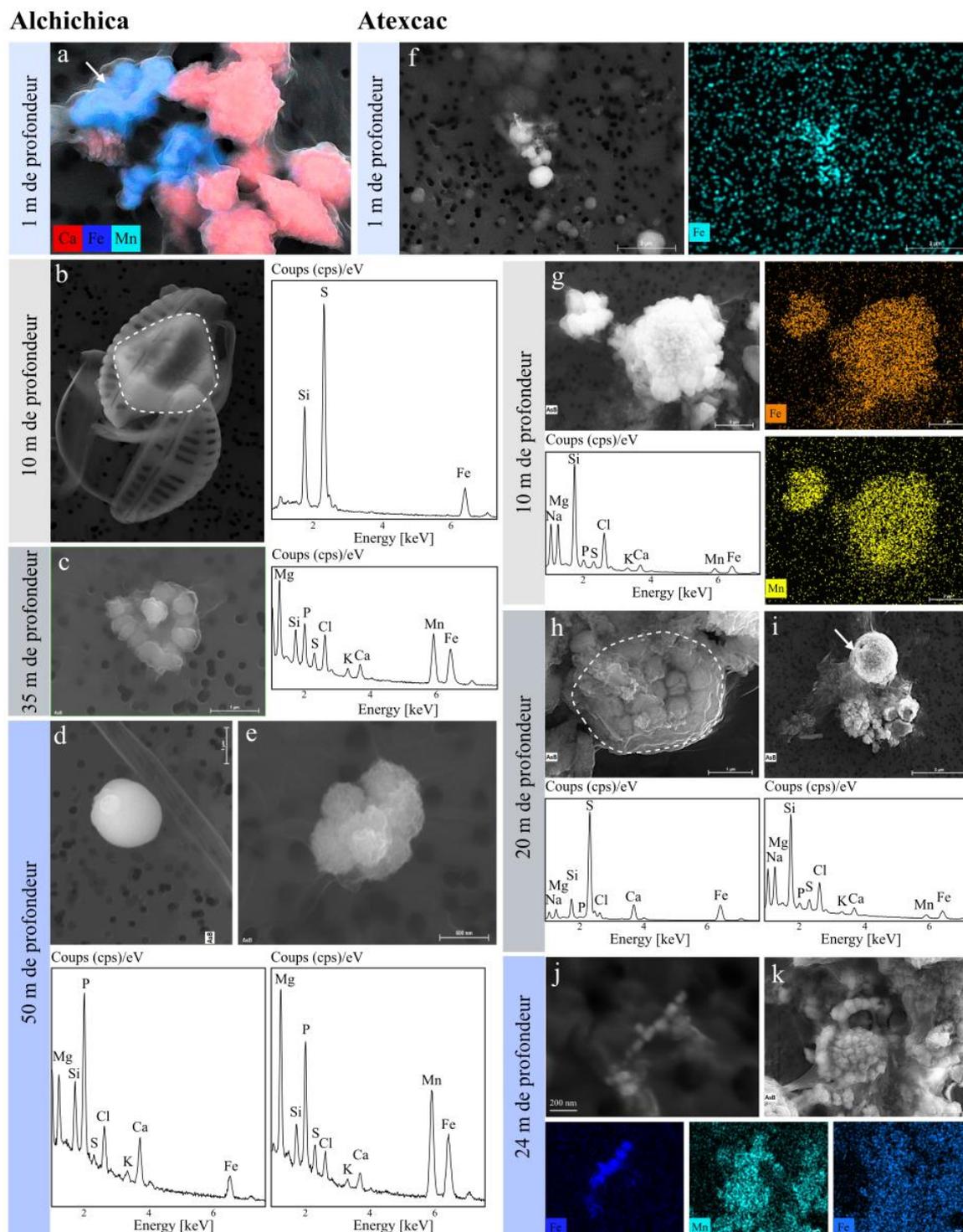
**Figure A2.8.**

**Correlation between the absorption energies of sulfur in the Lake Alchichica microbialites at all depths collected in October 2022 and the estimated associated functions/species based on relative quantifications obtained by spectra deconvolution.** (a) S(+6) absorption edge energy range corresponding to sulfones and sulfates; (b) S(+4) absorption edge energy range corresponding to sulfoxides; (c) S(-1, 0, +2) absorption edges energy range corresponding respectively to pyrite, elemental sulfur and thiol function.

## Données supplémentaires sur les signatures de l'euxinie dans les microbialites d'Alchichica, autres que celles du manuscrit



**Figure A2.9.** Spectres XANES de références au seuil K du soufre qui ont été comparés aux spectres obtenus sur les microbialites d'Alchichica.



**Figure A2.10.**

**Particules contenant du fer et/ou du manganèse dans les colonnes d'eau d'Alchichica et Atexcac en mai 2019 et en octobre 2022.** (a) Cartographie élémentaire du calcium, du manganèse et du fer sur un échantillon de 1 m de profondeur prélevé à Alchichica en 2022. La flèche blanche montre les particules enrichies en fer et manganèse ; (b) Image MEB en électrons rétrodiffusés d'un agrégat de diatomées au-dessus d'une particule riche en fer et en soufre (probablement de la pyrite, entourée en pointillés blancs) sur un échantillon prélevé à 10 m de profondeur en 2022, avec le spectre EDXS associé à droite ; (c) Image MEB en électrons rétrodiffusés d'une particule riche en fer et en manganèse dans un échantillon de 35 m de profondeur prélevé en 2022 à Alchichica, avec le spectre EDXS associé à droite ; (d, e) Images MEB en électrons rétrodiffusés de particules riches en fer et (à gauche) et fer et

manganèse (à droite) dans un échantillon de 50 m de profondeur prélevé en 2019 à Alchichica, avec les spectres EDXS associés en-dessous ; (f) Image MEB en électrons rétrodiffusés d'un agrégat riche en fer dans un échantillon de 1 m de profondeur prélevé en 2022 à Atexcac, avec à droite la carte élémentaire en EDXS pour le fer ; (g) Image MEB en électrons rétrodiffusés d'une particule sphérique riche en fer et en manganèse d'un échantillon prélevé en 2022 à Atexcac, avec à droite les cartographies élémentaires du fer (en orange) et du manganèse (en jaune) et en-dessous le spectre EDXS ; (h) Image MEB en électrons rétrodiffusés d'un agrégat enrichi en fer et en soufre entouré en pointillés blancs (pyrite ?) dans un échantillon prélevé en 2022 à Atexcac, avec le spectre EDXS associé en-dessous ; (i) Image MEB en électrons rétrodiffusés d'une particule sphérique enrichie en fer et en manganèse (flèche blanche) dans un agrégat provenant d'un échantillon de 2022 prélevé à Atexcac, avec le spectre EDXS associé en-dessous ; (j, k) Images MEB en électrons rétrodiffusés de particule riches en fer (à gauche) et en fer et en manganèse (à droite) dans un échantillon de 2022 prélevé à Atexcac, avec les cartographies élémentaires en EDXS du fer (en bleu foncé) et du manganèse (en bleu clair) associées en-dessous.

## Annexes Chapitre III

Tableaux A3.1 et A3.2

Figures A3.1 à A3.8

### Données supplémentaires du manuscrit sur l'acclimatation des communautés microbiennes d'Alchichica à l'anoxie

Lake	Nature of sample	Sample name	Sampling date	Depth of sampling (m)	pH	T (°C)	Dissolved oxygen (mg/L)	Conductivity (mS/cm)	DIC (mM)	S (mM)	Origin of data
Alchichica	Water	AL22_filt_10m_plankton	October 2022	10	9.23	18.05	6.640	13.398	36.00	10.83	This study
Alchichica	Water	AL22_filt_30m_plankton	October 2022	30	9.21	17.89	5.900	13.370	35.82	10.82	This study
Alchichica	Water	AL22_filt_35m_plankton	October 2022	35	9.21	16.00	0.057	13.148	36.01	10.64	This study
Alchichica	Water	AL22_filt_37m_plankton	October 2022	37	9.21	15.73	0.053	13.140	35.71	10.70	This study
Alchichica	Water	AL22_filt_40m_plankton	October 2022	40	9.22	15.55	0	13.145	36.35	10.43	This study
Alchichica	Water	AL22_filt_50m_plankton	October 2022	50	9.21	15.46	0	13.160	36.47	10.29	This study
Atexcac	Water	ATX22_filt_surf_plankton	October 2022	0	8.86	18.45	6.250	13.087	26.09	2.80	This study
Atexcac	Water	ATX22_filt_10.2m_plankton	October 2022	10.2	8.86	18.24	6.260	13.100	26.28	4.09	This study
Atexcac	Water	ATX22_filt_20.1m_plankton	October 2022	20.1	8.84	18.19	6.260	13.101	26.32	2.81	This study
Atexcac	Water	ATX22_filt_23.3m_plankton	October 2022	23.3	8.82	16.21	0.050	12.961	26.43	2.78	This study
Atexcac	Water	ATX22_filt_27m_plankton	October 2022	27	8.80	15.78	0.050	12.888	26.21	2.67	This study
Alchichica	Microbialite	AL19_mb_5m	May 2019	5	9.14	19.20	7.54	12.162	34.51	10.25	This study
Alchichica	Microbialite	AL19_mb_10m	May 2019	10	9.22	19.18	7.19	12.138	32.79	10.13	This study
Alchichica	Microbialite	AL12_mb_15m	January 2012	15	-9.11	-15.00	-4.04	-13.470	-	-	Iniesto et al. (2022)
Alchichica	Microbialite	AL19_mb_20m	May 2019	20	9.23	16.69	0.95	11.624	34.03	10.05	This study
Alchichica	Microbialite	AL19_mb_40m	May 2019	40	9.24	15.29	0	10.982	32.84	9.97	This study
Alchichica	Microbialite	AL22_mb_40m	October 2022	40	9.22	15.55	0	13.145	36.35	10.43	This study
Atexcac	Microbialite	ATX19_mb_S	May 2019	0	-8.85	-20.00	7.22	-11.672	-26.50	-2.45	This study
Atexcac	Microbialite	ATX19_mb_20m	May 2019	20	-8.82	-15.72	2.73	-10.448	-24.43	-2.46	This study
Atexcac	Microbialite	ATX22_mb_27m	October 2022	27	8.80	15.78	0.050	12.888	26.21	2.67	This study

**Tableau A3.1.**

List of microbialite and water samples used in this work, with the nature of sample, the date of sampling, the depth of collection, the pH ( $\pm 0.1$  pH unit), the temperature ( $\pm 0.01$  °C) the dissolved oxygen ( $\pm 0.1$  mg.L<sup>-1</sup>), the conductivity ( $\pm 0.001$  mS.cm<sup>-1</sup>), the DIC concentration (mM,  $\pm 5$  %) and the sulfur concentration (mM,  $\pm 5$  %).

**A Cyanobacteria**

**MT1**

ACTACTGGGAAACGGTAGCTAATACCCTGAGGCCGAGAGGTGAAATGATTATGGCTAGGGATGAGCTCGCTGTGATTAGCTAGTTGGTGAAGTTAAAGGCTTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGTGAGAGG  
 ATGATCAGCCACACTGGGAGCTGAGACACGGCCAGACTCCACGGGAGGCGAGCATGGGGAAATTTCCGCAATGGGCGCAAGGCTGACGGAGCAACGCGCGGTGGGGGAGGAAGGTCTGGGATTGAAACCTTTT  
 CTCTGGGAGAAGACTGACGGTACCAGAGGATAAAGCATCCGCTAACTCCCTGCCCAGCCGCGGTAAAGCGAGGAGATCAAGCGTTATCCGGAATATTGGGCGTAAAGCGTCCCGAGGCGGTAGATAAGTCTG  
 CTGTTAATATCACAGCTCACTGTGAGACGCGGTGGAACTGTATAGCTAGAGTACGGTAGGGGTAGAGGGAAATCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGGGAAGAACACCATGGGGGAAAGCGCTCAC  
 TGGCCGTAACCTGACGCTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCTGTAGTCTAGCTGTAACCATGATGATAGGTTGGCGGTATCGACCCGTCAGTACGGAAGCTAACCGGTTAAGTA  
 TCCCGCTGGGGGATACGACCAAGTGTGAAACTCAAAGGAAATTGACGGGGGCCCGCAACAAGCGTGGAGTAGTGGTTTAATTCTGATGCAACGGGAAGAACTTACCAGGGCTGACATGCGCGGAATCCCTTGA  
 AACGAGGGAGTGCCTCTGGGAGCGGGACACAGGTGGTGCATGCGTGTCTGACGTCTGTGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGCTTCTAGTGTGCAATTAAGTTGGGCACTCTAGA  
 GAGACTGCGGGGACAACTCGGAGGAAGGTGTGGTAGCTCAAGTCTATCATGCCCTTACGTTCTGGGCTACACACGATCAATGCTTCCGCAAAAGGGCACCCAGCCAGGAGGTGGTGGAGCTAATCCATAAACC  
 GAGGCTCAGTTCAGATTGACGGTCAACTCGCTGCTGATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGAGGTGACGATACCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC

**MT2**

CGGAAGGGTAGTAAACGCGTGAGAATCTACCTTAGGACTGGGATAACAGTTGGAACGACTGCTAATACCGGATATGCCGAGAGGTGAAAGGTTAAGCTGCTGAGGAAGAGCTCGGCTGATTAGCTAGTTGGTGG  
 GGTAAAGGCTACCAAGCGGTGATCAGTAGCTGGCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACAGCCGAGACTCTACGGGAGGCAAGGAGTGGGAAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCGACGGAGCA  
 ACGCCGCGTGGGGGAGGAATGCTGTGGATTGTAACCCCTTTCTCAGGGAAGAAAGTTCTCAGCGGTACTGAGGAATCAGATCGGTAACCTCGTCCACAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCG  
 GAATTAATTGGCGGTAAAGCAAGTGGCTGATCAAGTCTGCTTAAAGGCGAGGGCTCAACTCTGTAAGGCGATGGAAACTGATAGGCTAGAGTACGAGGGGACAGAGGAAATCCAGTGTAGCGGTGAA  
 ATGCGTAGATATTGGGAAGACACCAAGTGGCGAAGGCGCTCTCTGGCCGTAACGACTGAGGGAGCAAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCTGTAGTCTAGCTGTAAACGATGGACACTAGGCGT  
 TGGCGTATCGACCCGGTCAAGTCGCTGAGTAAAGTGTCCCGCTGGGGAGTACGCAAGGTTGTA

**MT3**

CGACTGCTAATCCCATATGCGAGAGGTGAAACATTTATGGCTGAGGAGGAGCTCGGCTGATAGTGTAGTTGGTGGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCAC  
 ACTGGGACTGAGACACCGCCAGACTCCCTACGGGAGGCGAGAGTGGGAAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCGCTGAGGAGCAAGAGCCGCTGAGGGGAGGAAGGTCTGTGGATTGAAACCTTTTCTCAGGGAAGA  
 GAACTGACGGTACTCTGAGGAATCAGCTATCGCTAACTCCGTGCCCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCAAGCGTTATTTGGGCGTAAAGCGTCCGATGGTGGCTAAGCAAGTCTGCTGTAAAGAGC  
 GGAGCTAACTCGTAAAGCGCGTGGAAACTGCTAGCTAGAGTGTGATAGGGGTAGAGGAAATCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGCGCTCTACTGGCCGACCAACT  
 GACTCTGAGGAGCAAGCTGAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCTGTAGTCTTAGGCTTACGGCTAAGCAGTGTGGCTGATCGCAACCGGGCGTGCATGAGCTTAAAGTGTTCGCTGCGGG  
 AGTACGCTCGCAAGAGTGAACCTCAAAGGAAATGACGGGGGCCCGCAACAAGCGTGGAGTATGGTTAATTGCGATGCAACGCGAAGAACTTACCAAGGCTTGCATGCGCGCAATCTCAGAGATGAGGAGGATG  
 CTCTGAGGAGCGGGACAGAGTGGTGCATGCTGTGCTGACGCTGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACAAGGCGCAACCTCGTTCTAGTGTGCAATTAAGTTGGGCACTCTAGGGAGACTCGCGT  
 GACAAACGGGAGGAAGGTGAGGATGATCAAGTCTATCGCCCTTACGCTTGGGCTACACAGCTACTACAATGCTTCCGCAAAAGGGCAAGCAACGAGCGATGGAGAGCAATCCATAAACCAGGCGTCTAGTTC  
 AGATTGACGGTCAACTCGCTGCTGATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCCAGGTCAGCATACCTGGGGTGAATACGTTCC

**MT4**

CGAACTGGGAAACGGTGCTAATACCAGCAATGCCGAGAGGTGAAAGGATTATGGCTGAGGATGAGCTCGGCTGTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGAGGCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGG  
 ATGACAGCCACTGGGAGCTGAGACACGGCCAGACTCCCTACGGGAGGCGAGAGTGGGAAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCGCTGAGGAGCAAGAGCCGCTGAGGGGAGGAAGGTCTGTGGATTGAAACCTTTT  
 GACCGGGAAGAATACTGACCGTACCGGTCAACTAGCTCCGCTAACTCCGTGCCCAGCCGCGGTAATACGGAGGAGCAAGCGTTATCCGGAATATTGGGCGTAAAGCGTCCGATGGTGGCTAAGCAAGTCTGCTGTAAAGAGC  
 TGTAAAGGCTGGGGCTAATCCATAAGGCGAGTGAACAATGATAGGCTAGAGTGGGATAGAGGGGCAAGGGAATCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGCGCTTGTCT  
 GGGTCTGACTGACACTGAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCTGTAGTCTTAGGCTTACGGCTAAGCAGTGTGGCTGATCGCAACCGGGCGTGCATGAGCTTAAAGTGTTCGCTGCGGG  
 CCCCCTGGGGATGCTCGCAAGAGTGAACCTCAAAGGAAATGACGGGGGCCCGCAACAAGCGTGGAGTATGGTTAATTGATGCAACGCGAAGAACTTACCAGGCTTGCATGCGCGCAATCTCAGAGATGAGGAGGATG  
 AGGGAGGATGCTTCCGGAACCGGAAACAGAGTGGTGCATGCTGTGCTGACGCTGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACAAGGCGCAACCTCGTTCTAGTGTGCAATTAAGTTGGGCACTCTAGGGAG  
 AGACTGCGGGTGAACAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGCTCAAGTCTAGTCCCTTACGCTTGGGCTACACAGCTACTACAATGCTTCCGCAAAAGGGTGGCAACTGCGAAGTGGCGCTAATCCATAAACCAGC  
 AGGTCAGTTGATGAGGTCAGGCTCAACTCGCTGCTGATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCCAGGTCAGCATACCTGGGGTGAATACGTTCCCGGGCC

**B Proteobacteria**

**MT5**

TGCAAGTGAACCGCACCTCCGGGTGAGTGGCAGAGGGTGAAGGATTATGGCTGAGGATGAGCTCGGCTGTGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGAGGCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGG  
 TGGATCGCCCGCTCGGATGATGTTGTTGGTAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGCAAGTGGGG  
 AATATTGACAAATGGGCGTAAAGCCGTATCCAGCTCAGCTGAGTATAAGGCTTAGGCGTGTAAAGCTTTTCCGCAACGCGACATAATGACGTTAGCCTGAGGAGGAAGAAGCCCGGCTAATCTGCGAGCAGCA  
 CGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCTTGTCTGGAATCAGTGGGCGTAAAGGGCGCTGAGGGGATCTTAAAGTGGGGTGAAGGCCAGGGCTCAACCTGGAATTGCTCCGATACTGGGGATAGAGACCGGAAG  
 GAGTGGTGGAACTGGGAGTGGTAGAGGTGAATTCGATGATATTGCAAGAACAACAGTGGGGAGGGGCTCACTGGTCCGATCTGACGCTGAGGCCGGAAGAAGGTGGGGAGCAAAAGGATAGATACCCTGGTA  
 GTCACCGCGTAAGGATGAATGCCAGCCCTGGCGTGTGCAAGTGTAGTGGCGCACTAACGCTTGTAGCATTCCGCTGGGAGTACCGCCGCAAGGTTAAACTCAAAGGAAATGACGGGGCCCGCAAGCG  
 GTGGAGCATGGGTAAATTCGAAGCAACGCGCAAGCTTACCAGCTTGTAGCATGTTCCGGATTTGGGAGTGTGGCAGAGATGCTTCTCTTGGAGCCGGGAACAGAGTGGCTGATGGGTGTGGTGTGCTG  
 TGAGATTGTGGTTAATGCCCAAGCAGCCACTCGCCCTAGTGTGCTATTAAGTTGGGCACTTAGGGGAGTGCAGCGGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGCTCAAGTCTCAGGCCCTTACG  
 GCTGGGCTACAACTGTCGCTCAATGGCGGTGACAAATGGCGAGCAAGGGCGACTTGAAGCTAATCCCAAAAGCGCTCAGTTCGGATTGCACTTGAACCTGAGGTGGAATGCTAGTAAATCGT  
 GGATCAGCATGCCAGGTAATAGTTCGGGGCTGTACACACCCCGCTCACACCTAGGAGTGTGGTCTACCCGAGCGGCTGCGCCAAACCGGAGGGCGAGC

**MT6**

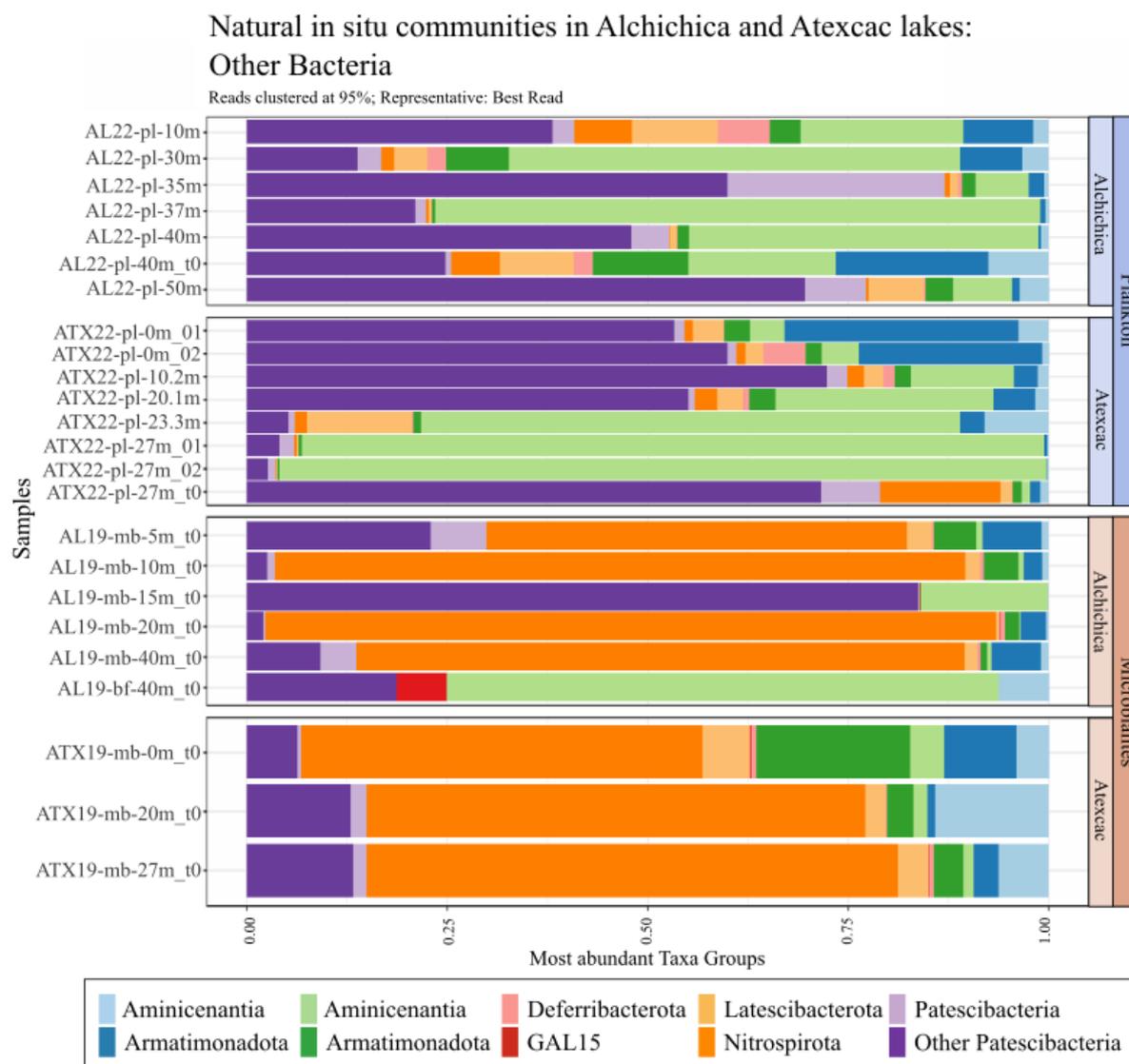
AGTGTGATGGGATCTGCAGAAATCGCCCTTCCCTACGGGGGCGAGCATGGGAAATATGGCAATGGGCGCAAGGCTGATCAGCATCGCCGCTGAGTGTGAAGGCTTAGGGTTGTAAGGCTTTTATCCGG  
 GACGATAATGACGGTACCGGAAGAATAAGCCCGGCTAATCTGTGCGAGCAGCGCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTGTCTGGAATCACTGGGCGTAAAGGGCGGTGAGCGGCAATTAAGTTCGGGGTGAAA  
 GCCCGGGCTCAACCCGGAAATGCTCCGATACTGGATTCTCTGAGCAGCGAAGAGGTAAGTGGAACTGCGAGTGTAGAGGTTGAAATGATGATATCGAAGAACAACAGTGGCGAAGCGGCTTACTGGTCCGG  
 TTCAGCGCTGAGGCGGAAAGCTGGGGAGCAAAAGGATTAGATACCCTGTAGTCCAGCCGTAACAAGCATGATGCAAGCTGTTGGGAGCTTGGCGAGCTGCTGCTCAGTGGGCGAGCTGCTGCTGAGTGGCGAG  
 GGAGTACGCTGCGAAGTAAACTCAAAGGAAATGACGGGGGCCCGCAACAAGCGTGGAGCATGGTTAATTCGAAGAACCGCGAAGAACTTACCAGCTTGTAGCATGCTCCGATGAGCTGGGAGACCGGGT  
 CCTTACGTTCCGGTGGCGGAACAGGTCGATGGCTGTGCTGACGCTGTGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACAAGGCGCAACCTCGCCCTAGTGTGCAATTAAGTTGGGCACTCTAGGGGACT  
 CGCGGTGAAGCGGAGGAAAGTGGGGATGACGCTCAAGTCTCATGCCCTTACGGGCTGGGTACACAGTGTCAATGGCGGTGACAATGGCGAGCA

**C Acidobacteria**

**MT7**

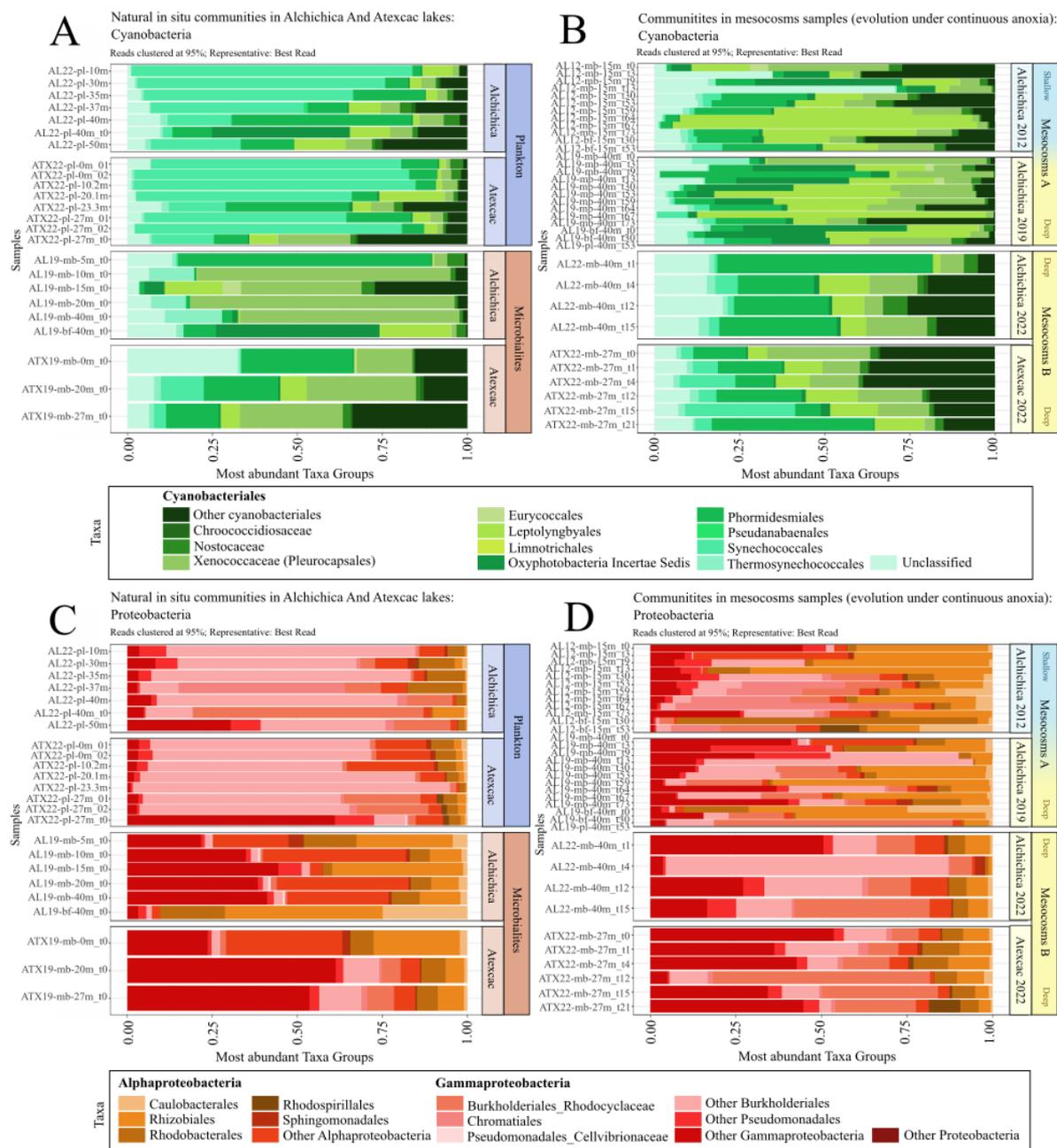
CCTACGGGGGCGAGCAGTGGGAAATCTGACAAATGGAGGAACTCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGCGATGAAGGCTTTCCGGGTGTAAAGCTTACGCCAGGGAGGATAATGACGTTACTGGAGAAGCAGCTG  
 CGGCTAACACTGCTGACAGCAGCCCGGTAATACGATAGGCGAGCAAGCGTTGTTGGAATTAICTGGGGCGTAAAGGGTGGGTAGGCGGTGCTCAAGTTTGGTGTGAAATCTCCCGGCTCAACTGGGAGGGTGCGCCGGAA  
 ACTGGGGTGTGGAGTGTGGGAGAGGAAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAATGCGGTAGAGATCAGGAGGAACAACCTGCGGGTGTAGAGCGGCTTCTGGAGCATAACTGACGCTGAGGGCAGAAAGCGTGGGTAGG  
 AAACAGGATGATGATCCTGTTAGTCCACGCCCTAAACGATGCATCTGGTGTGGGCCCTTACTCGGTTCCGTCGGGAGCTAACGCGTTAAGTATGCGCCCTGGGGAGTACGCTGCAAGGCTGAAACTCAAAGGA  
 ATTAGCGGGGGCCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGACGCAACCGGAAGAACTTACCCTGGGCTCAGGCGGTTGTGACCGGCTTAGAAATAGAGGAGGATTTCCCTGGGGAACGCAACTGAGGCTGCTG  
 CATGGCTGTGCTCAGCTGCTGTGAGATGT

**Tableau A3.2.**  
**Sanger sequences of the enriched four cyanobacteria (A), two proteobacteria (B) and acidobacteria (C) under continuous anoxia after about one year.**

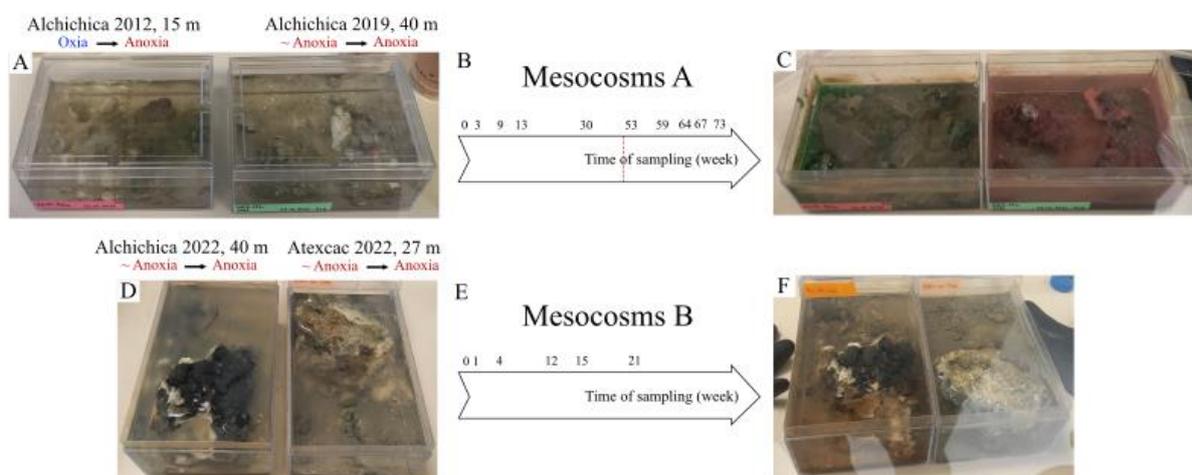


**Figure A3.1.**

***In situ* prokaryotic community composition in water column plankton and microbialite samples in Lake Alchichica and Lake Atexcac for the “other bacteria” fraction not detailed in the figure 3.2.** Relative abundances of the different dominant phylogenetic taxa in plankton and microbialites based on the relative proportions of 16S rRNA gene amplicon sequences are shown.

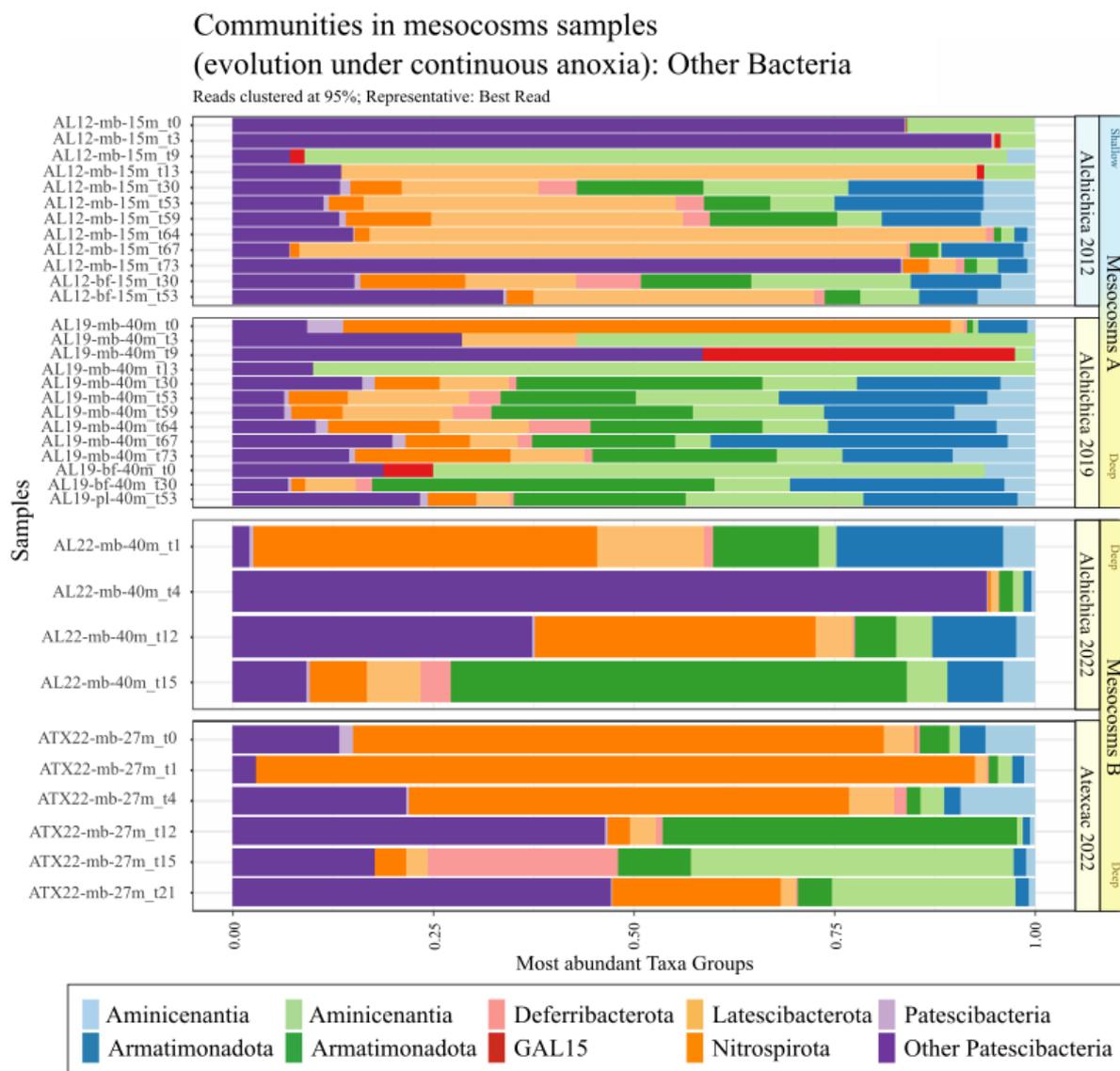
**Figure A3.2.**

***In situ* and evolution in anoxic mesocosms over time prokaryotic community composition in plankton, biofilm and microbialite samples coming from Lake Alchichica and Lake Atexcac for the Cyanobacteria and Proteobacteria fractions.** (A) Histogram of the Cyanobacteria communities composition in water column and microbialites *in situ* samples, showed by the relative proportions of 16S rRNA marker gene amplicon sequences; (B) Histogram of the Cyanobacteria communities composition in samples collected in anoxic mesocosms over time, showed by the relative proportions of 16S rRNA marker gene amplicon sequences; (C) Histogram of the Proteobacteria communities composition in water column and microbialites *in situ* samples, showed by the relative proportions of 16S rRNA marker gene amplicon sequences; (D) Histogram of the Proteobacteria communities composition in samples collected in anoxic mesocosms over time, showed by the relative proportions of 16S rRNA marker gene amplicon sequences.



**Figure A3.3.**

**Color changes and sampling times of microbialite samples incubated in mesocosms under continuous anoxia in glove box.** (A) Mesocosms A from Alchichica incubated in glove box in 2021 with one shallow microbialite from oxic environment (collected in 2012, at 15 m depth) and one deep microbialites from seasonally anoxic environment (collected in 2019, at 40 m depth) at  $t = 0$  week; (B) Sampling times in mesocosms A (week); (C) Mesocosms A after 6 months in the glove box, showing changes of sample colors; (D) Mesocosms B incubated in glove box in 2022 with one deep microbialite from seasonally anoxic environment (collected in Lake Alchichica 2022, at 40 m depth) and one deep microbialites from seasonally anoxic environment (collected in Lake Atexcac in 2022, at 27 m depth) at  $t = 0$  week; (E) Sampling times in mesocosms A (week); (F) Mesocosms B after 6 months in the glove box.

**Figure A3.4.**

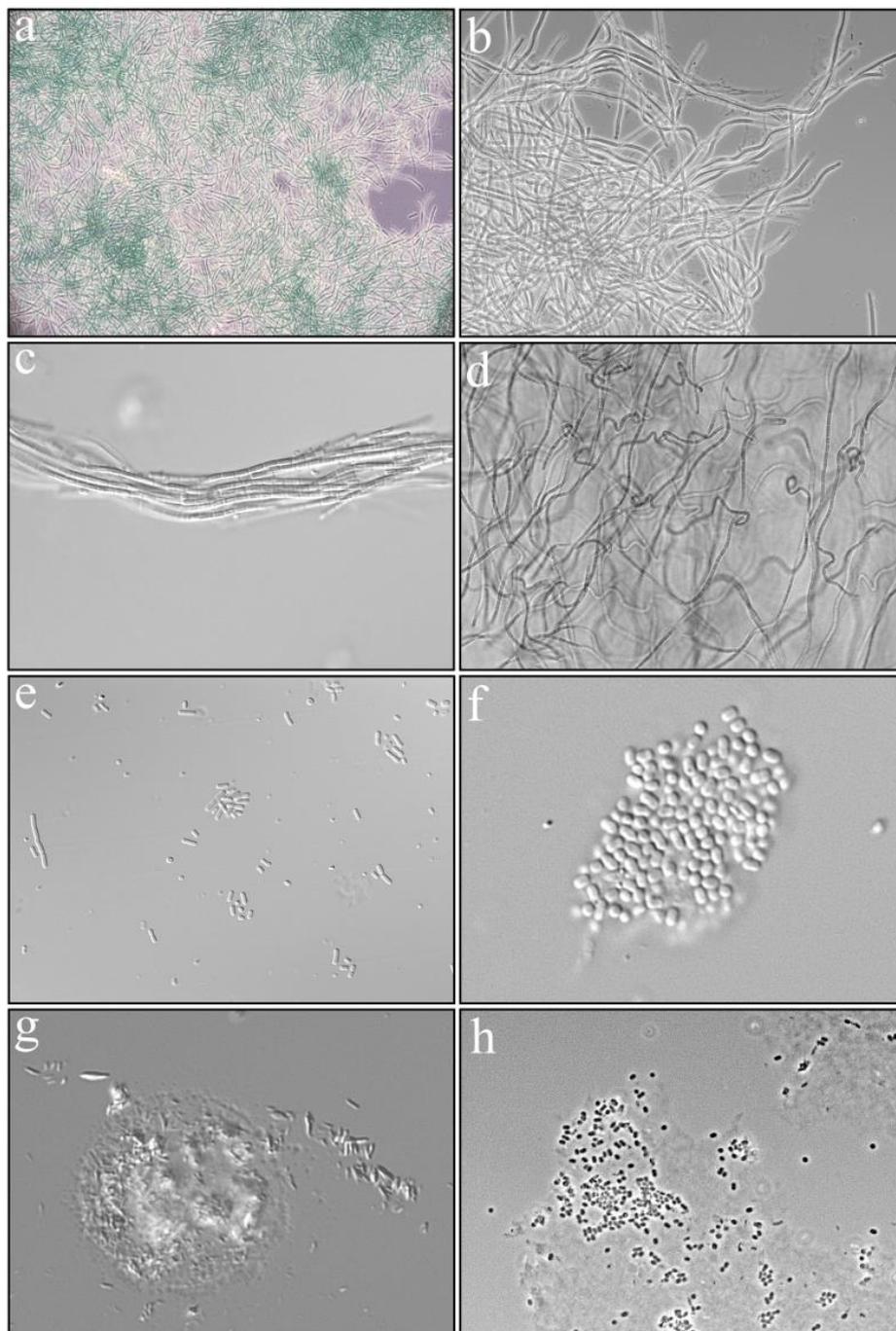
**Prokaryotic community composition in the microbialite samples of Lake Alchichica and Lake Atexcac in anoxic mesocosms over time for the “other bacteria” fraction not detailed in the figure 3.3.** Relative abundances of the different dominant phylogenetic taxa in microbialites based on the relative proportions of 16S rRNA gene amplicon sequences are shown.





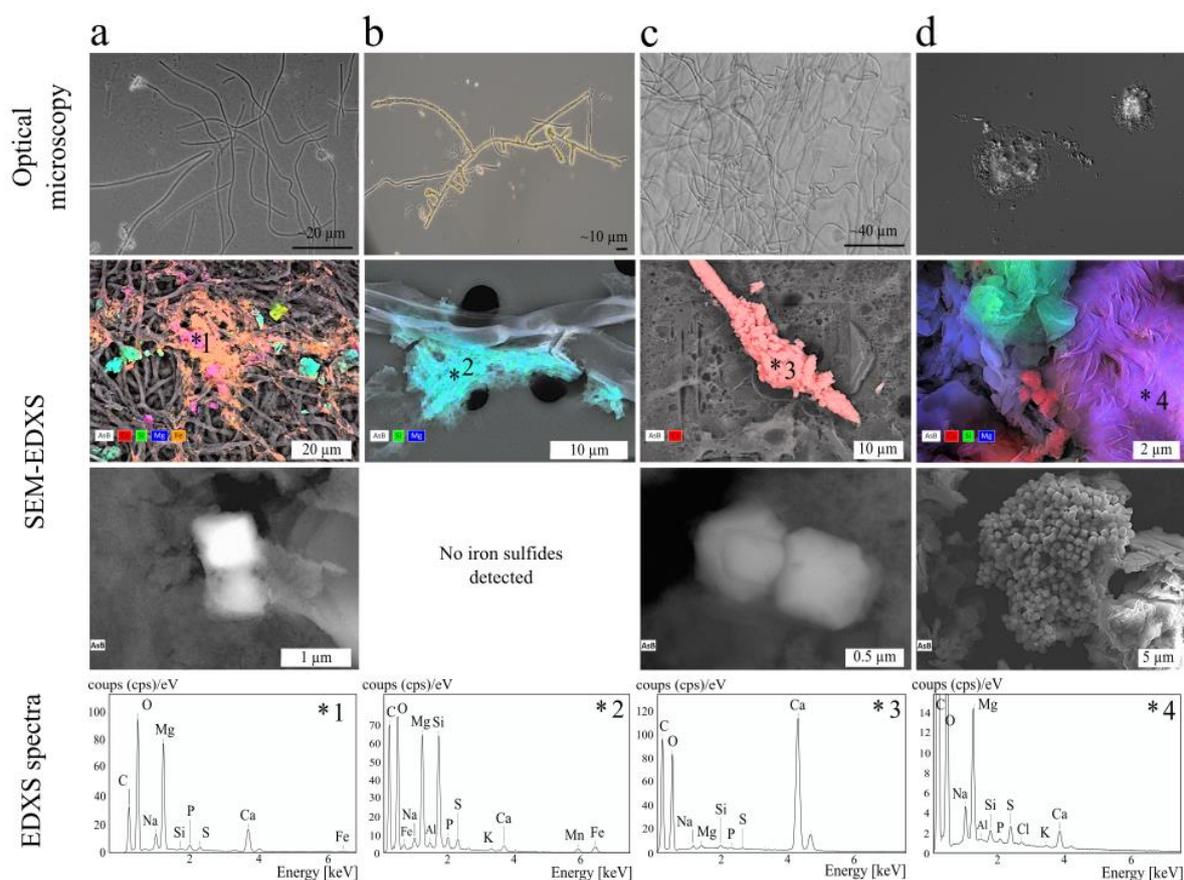
Figure A3.5.

(A, B) Maximum likelihood phylogenetic tree comparing the 16S rRNA gene sequences obtained for Alchichica and Atzacac mesocosms samples (black) and the 16S rRNA gene OTUs belonging to the microbial core evidenced by Iniesto et al. (2021) (red).



**Figure A3.6.**

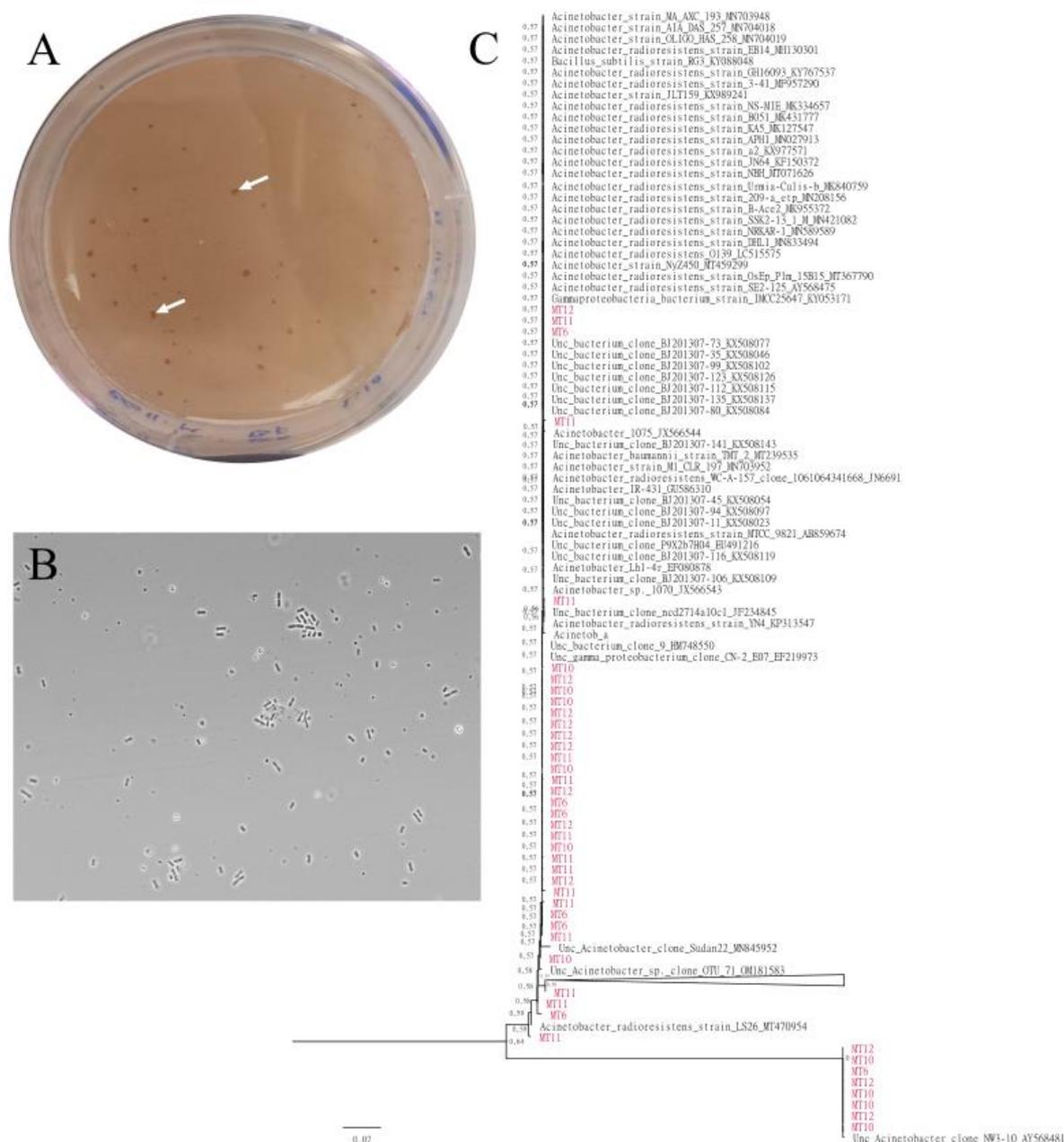
**Diversity of morphotypes obtained by enrichment.** (a) Filamentous cyanobacteria aggregate; (b) Zoom of the filamentous cyanobacteria on the image a; (c) Another aggregate of filamentous morphotype; (d) Filamentous morphotype with a pink color; (e) Bacillus morphotype; (f) Coccoid morphotype; (g) Another bacillus morphotype compared to image e; (h) Coccoid morphotype.



**Figure A3.7.**

**Mineral phases associated to the enriched microorganisms under anoxic atmosphere with form top to bottom the light microscopic image of the microorganisms enriched, the elemental EDXS map of calcium, silica, magnesium and iron of the enriched organism, the SEM image in backscattered electron of the iron sulfide close/on the enriched microorganisms and the EDXS spectrum associated to the elemental EDXS map with the same number. (a) Filamentous cyanobacteria presenting calcium carbonate enriched in iron and magnesium silicates phases on/close to the cells. 1  $\mu\text{m}$  euhedral iron sulfides crystals are present; (b) Ramified filamentous cyanobacteria presenting a magnesium silicate encrustation without iron sulfides presence; (c) Filamentous cyanobacteria (with a pink color) very well encrusted by calcium carbonates; (d) Coccoid bacteria with associated calcium carbonates and magnesium silicates phases with  $\sim 10 \mu\text{m}$  in diameter framboidal iron sulfides.**

## Données supplémentaires sur l'acclimatation des communautés microbiennes des microbialites à l'anoxie, autres que celles du manuscrit



**Figure A3.8.**

Un des microorganismes obtenus par enrichissement sous atmosphère anoxique continue (en boîte à gants). (A) Boîte de Pétri contenant le repiquage de ce morphotype et montrant des colonies rouges (flèches blanches) ; (B) Image en microscopie optique de ce morphotype montrant des formes de bactéries en bacilles ; (C) Positions phylogénétiques des séquences Sanger obtenues sur ce type de morphotypes pour le genre des *Acinetobacter* dans un arbre construit à partir des séquences 16S d'organismes de référence dans les bases de données NCBI, Silva et GTDB. L'échelle indique le nombre de mutations par site pour une longueur de branche donnée.

## Annexes Chapitre IV

Tableaux A4.1 à A4.5

Figures A4.1 à A4.4

Sample Name	Depth (m)	Sampling date	Analyses
AL19_mb_5m	5	21/05/2019	FTIR, XRD, Optical Microscopy, SEM-EDXS
AL19_mb_10m	10	21/05/2019	FTIR, XRD, Optical Microscopy, SEM-EDXS
AL19_mb_20m	20	21/05/2019	FTIR, XRD, Optical Microscopy, SEM-EDXS
AL19_mb_40m	40	21/05/2019	FTIR, XRD, Optical microscopy, SEM-EDXS
AL22_mb_3m	3	22/10/2022	FTIR, XRD, Optical Microscopy, SEM-EDXS, Raman, CLSM, XRF
AL22_mb_10m	10	22/10/2022	FTIR, XRD, Optical Microscopy, SEM-EDXS, CLSM, XRF
AL22_mb_20m	20	22/10/2022	FTIR, XRD, Optical Microscopy, SEM-EDXS, CLSM, XRF
AL22_mb_30m	30	22/10/2022	FTIR, XRD, Optical Microscopy, SEM-EDXS, Raman, CLSM, XRF
AL22_mb_40m	40	22/10/2022	FTIR, XRD, Optical Microscopy, SEM-EDXS, FIB-TEM, Raman, CLSM, XRF

**Tableau A4.1.**

List of microbialite samples used in this work, with the depth at which they were collected, date of sampling, and the techniques used for their analysis. XRD: x-ray diffraction; FTIR: Fourier transform infrared spectroscopy; SEM-EDXS: scanning electron microscopy with energy dispersive x-ray spectrometry; CLSM: confocal laser scanning microscopy; XRF: x-ray fluorescence; FIB: Focused Ion Beam; TEM: transmission electron microscopy.

Sample Name	Depth (m)	Sampling date	Analyses
AL19_filt_0m_01	0	24/05/2019	
AL19_filt_0m_02	0	24/05/2019	
AL19_filt_4-9m	4.9	20/05/2019	
AL19_filt_5m	5	20/05/2019	
AL19_filt_10m	10	20/05/2019	
AL19_filt_20m	20	20/05/2019	
AL19_filt_30m	30	20/05/2019	
AL19_filt_40m	40	20/05/2019	
AL19_filt_50m	50	20/05/2019	
AL19_filt_55m	55	20/05/2019	<i>In situ</i> measurements:pH, Conductivity, Temperature, pO <sub>2</sub> , pressure
AL19_filt_60m	60	20/05/2019	
AL22_filt_1m	1	22/10/2022	Ex situ measurements:DIC, ICP-AES for Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> ,
AL22_filt_10m	10	22/10/2022	Ion Chromatography for Cl <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
AL22_filt_30m	30	22/10/2022	
AL22_filt_34-4m	34.4	22/10/2022	
AL22_filt_34-9m	34.9	22/10/2022	
AL22_filt_35m	35	22/10/2022	
AL22_filt_36-1m	36.1	22/10/2022	
AL22_filt_37m	37	22/10/2022	
AL22_filt_38-1m	38.1	22/10/2022	
AL22_filt_40m	40	22/10/2022	
AL22_filt_50m	50	22/10/2022	

**Tableau A4.2.**

List of water samples used in this work, with the depth and date of sampling, and the techniques used for their analysis.

Year	Depth (m)	Period	Temperature (°C)	pH	Ca <sup>2+</sup> (mM)	Mg <sup>2+</sup> (mM)	Na <sup>+</sup> +K <sup>+</sup> (mM)	DIC (mM)	Cl <sup>-</sup> (mM)	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mM)	Mg/Ca	Origin of data
2012	0	Mixing	15.10	9.08	0.46	18.34	111.67	-	94.51	10.18	39.98	Zeyen et al., 2021
2012	0	Mixing	15.10	9.08	0.47	18.29	110.93	-	94.88	10.19	38.87	Zeyen et al., 2021
2014	0	Beginning of stratification	19.50	9.02	0.19	17.18	108.35	41.13	87.48	10.84	90.03	Zeyen et al., 2021
2014	0	Beginning of stratification	-	9.02	0.23	17.83	106.48	41.03	85.84	10.84	78.61	Zeyen et al., 2021
2016	0	Beginning of stratification	20.17	9.15	0.18	16.01	119.09	-	-	-	89.45	IMP/MC, unpublished data
2019	0	Beginning of stratification	-	-	0.09	19.25	113.74	33.55	113.28	12.53	212.08	Müller et al., 2022
2019	0	Beginning of stratification	-	-	0.15	19.10	112.90	34.10	115.50	12.77	122.60	Müller et al., 2022
2019	0	Beginning of stratification	-	-	0.15	18.95	111.18	34.39	113.32	12.49	127.79	Müller et al., 2022
2019	0	Beginning of stratification	-	-	0.09	18.17	106.01	34.43	100.58	11.11	198.78	Müller et al., 2022
2019	0	Beginning of stratification	-	-	0.23	18.88	115.06	35.99	93.42	10.00	83.10	This study
2022	1	End of stratification	18.47	9.23	0.23	18.88	115.06	-	94.48	10.10	39.09	Zeyen et al., 2021
2012	3	Mixing	15.10	9.10	0.47	18.51	112.59	40.92	87.046	9.66	90.79	Zeyen et al., 2021
2014	3	Beginning of stratification	19.20	9.07	0.19	17.45	107.67	34.51	106.65	11.82	120.91	This study
2019	4.9	Beginning of stratification	19.21	9.14	0.15	18.80	111.32	-	-	-	94.57	IMP/MC, unpublished data
2016	5	Beginning of stratification	19.85	9.15	0.17	15.97	120.22	-	-	-	120.85	Müller et al., 2022
2019	5	Beginning of stratification	19.20	9.14	0.16	19.26	113.14	-	107.10	11.86	120.85	Müller et al., 2022
2012	10	Mixing	15.00	9.10	0.41	18.34	110.85	-	99.44	10.17	45.01	Zeyen et al., 2021
2014	10	Beginning of stratification	18.10	9.06	0.19	17.84	108.85	41.02	87.24	12.69	93.51	Zeyen et al., 2021
2016	10	Beginning of stratification	18.60	9.14	0.17	15.68	114.47	-	-	-	91.86	IMP/MC, unpublished data
2019	10	Beginning of stratification	19.18	9.22	0.22	19.07	112.02	32.79	106.19	11.79	120.24	Müller et al., 2022
2022	10	End of stratification	18.05	9.23	0.22	18.73	114.13	36.00	93.67	10.49	82.90	This study
2016	15	Beginning of stratification	15.89	9.13	0.17	16.20	119.32	-	-	-	96.07	IMP/MC, unpublished data
2019	20	Beginning of stratification	16.69	9.23	0.15	16.62	109.97	34.03	105.90	11.75	126.10	Müller et al., 2022
2012	25	Mixing	14.90	9.11	0.43	18.45	110.12	-	94.90	10.21	42.70	Zeyen et al., 2021
2014	25	Beginning of stratification	15.90	9.05	0.19	17.40	107.77	40.69	87.56	10.15	93.03	Zeyen et al., 2021
2019	30	Beginning of stratification	17.89	9.21	0.15	18.70	110.05	34.02	105.74	11.70	128.11	IMP/MC, unpublished data
2022	30	End of stratification	15.49	9.22	0.22	18.80	112.62	35.82	93.75	10.03	83.86	Müller et al., 2022
2022	34.4	End of stratification	16.45	9.21	0.22	18.40	109.76	35.79	93.18	9.85	84.70	This study
2022	34.9	End of stratification	16.45	9.21	0.21	18.26	108.92	36.05	94.19	10.12	85.53	This study
2022	35	End of stratification	16.00	9.21	0.21	18.41	109.21	36.01	94.21	10.10	85.31	This study
2022	36.1	End of stratification	15.85	9.22	0.22	18.13	109.59	35.88	93.71	9.91	83.55	This study
2022	37	End of stratification	15.73	9.21	0.22	18.60	109.56	35.71	93.59	9.96	84.70	This study
2022	38.1	End of stratification	15.66	9.22	0.23	18.16	110.81	35.86	94.14	9.97	80.34	This study
2012	40	Mixing	14.80	9.12	0.42	18.61	112.21	-	94.72	10.19	44.31	Zeyen et al., 2021
2014	40	Beginning of stratification	15.30	9.07	0.18	17.37	108.17	40.80	89.11	10.64	96.66	Zeyen et al., 2021
2019	40	Beginning of stratification	15.29	9.24	0.15	18.82	110.76	32.84	106.62	11.80	127.73	Müller et al., 2022
2022	40	End of stratification	15.55	9.22	0.23	18.08	112.19	36.35	94.18	10.01	78.35	This study
2019	50	Beginning of stratification	15.21	9.17	0.14	18.68	109.02	34.30	108.38	12.01	130.13	Müller et al., 2022
2022	50	End of stratification	15.46	9.21	0.22	17.89	111.23	36.47	96.77	10.39	79.69	This study
2016	52.9	Beginning of stratification	14.70	9.13	0.17	16.22	119.95	-	-	-	95.77	IMP/MC, unpublished data
2012	55	Mixing	15.20	9.06	0.46	18.68	112.06	-	100.87	10.96	40.54	Zeyen et al., 2021
2014	55	Beginning of stratification	15.10	9.02	0.18	18.06	107.05	41.09	87.82	10.93	98.27	Zeyen et al., 2021
2019	55	Beginning of stratification	15.21	9.18	0.14	17.85	104.90	34.27	108.83	12.03	128.05	Müller et al., 2022
2019	60	Beginning of stratification	15.19	9.25	0.15	18.71	109.26	34.07	111.48	12.24	127.72	Müller et al., 2022
2016	60.8	Beginning of stratification	14.70	9.12	0.17	16.28	119.06	-	-	-	97.13	IMP/MC, unpublished data

Tableau A4.3.

Bulk chemical composition of the studied microbialites (%wt).

Sample	CaO (%wt)	MgO (%wt)	Na <sub>2</sub> O (%wt)	K <sub>2</sub> O (%wt)	SiO <sub>2</sub> (%wt)	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (%wt)	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (%wt)	MnO (%wt)	S <sub>total</sub> (%wt)	C <sub>org</sub> (%wt)	CO <sub>2</sub> (%)	H <sub>2</sub> O (%)	Source
AL22_mb_20m	6.49 ± 0.32	36.52 ± 0.73	0.22 ± 0.011	0.03 ± 0.002	0.74 ± 0.04	0.09 ± 0.009	0.16 ± 0.02	<DL.	0.09 ± 0.004	0.15 ± 0.007	39.96 ± 1.99	18.07 ± 0.9	Our study
AL22_mb_30m	3.56 ± 0.18	38.40 ± 0.77	0.28 ± 0.014	0.07 ± 0.003	2.34 ± 0.12	0.16 ± 0.016	0.47 ± 0.05	<DL.	0.03 ± 0.001	0.12 ± 0.006	40.13 ± 2.01	17.88 ± 0.89	Our study
AL22_mb_40m	11.61 ± 0.58	31.89 ± 0.64	0.25 ± 0.013	<DL.	0.38 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.12 ± 0.01	<DL.	0.06 ± 0.003	0.19 ± 0.009	41.83 ± 2.09	16.4 ± 0.82	Our study
AL19_mb_5m	16.51 ± 0.82	27.51 ± 0.55	0.38 ± 0.019	0.1 ± 0.005	2.56 ± 0.13	0.26 ± 0.026	0.59 ± 0.059	0.018 ± 0.001	0.11 ± 0.005	0.37 ± 0.019	-	-	Our study
AL19_mb_10m	6.11 ± 0.3	37.16 ± 0.74	0.23 ± 0.011	0.04 ± 0.002	1.36 ± 0.07	0.1 ± 0.01	0.18 ± 0.018	<DL.	0.04 ± 0.002	0.09 ± 0.005	-	-	Our study
AL19_mb_20m	21.62 ± 1.08	24.72 ± 0.49	0.32 ± 0.016	<DL.	0.35 ± 0.02	0.28 ± 0.028	0.08 ± 0.008	<DL.	0.04 ± 0.002	0.26 ± 0.013	-	-	Our study
AL19_mb_40m	7.67 ± 0.38	37.01 ± 0.74	0.36 ± 0.018	0.03 ± 0.002	0.77 ± 0.04	0.07 ± 0.007	0.15 ± 0.015	0.019 ± 0.001	0.01 ± 0.0005	0.04 ± 0.002	-	-	Our study
AL2012_1m	10.45 ± 0.52	31.57 ± 1.58	0.31 ± 0.02	0.06 ± 0.003	1.15 ± 0.06	0.13 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.01 ± 0.0004	0.15 ± 0.008	0.46 ± 0.02	-	-	Unpublished data
AL2012_5m	8.18 ± 0.41	34.86 ± 1.74	0.2 ± 0.01	0.04 ± 0.002	1.61 ± 0.08	0.07 ± 0.004	0.21 ± 0.01	0.01 ± 0.0003	0.05 ± 0.003	0.16 ± 0.01	-	-	Unpublished data
AL2012_10m	11.94 ± 0.6	28.56 ± 1.43	0.65 ± 0.03	0.25 ± 0.012	8.20 ± 0.41	0.25 ± 0.01	1.90 ± 0.1	0.02 ± 0.0009	0.08 ± 0.004	0.27 ± 0.01	-	-	Unpublished data

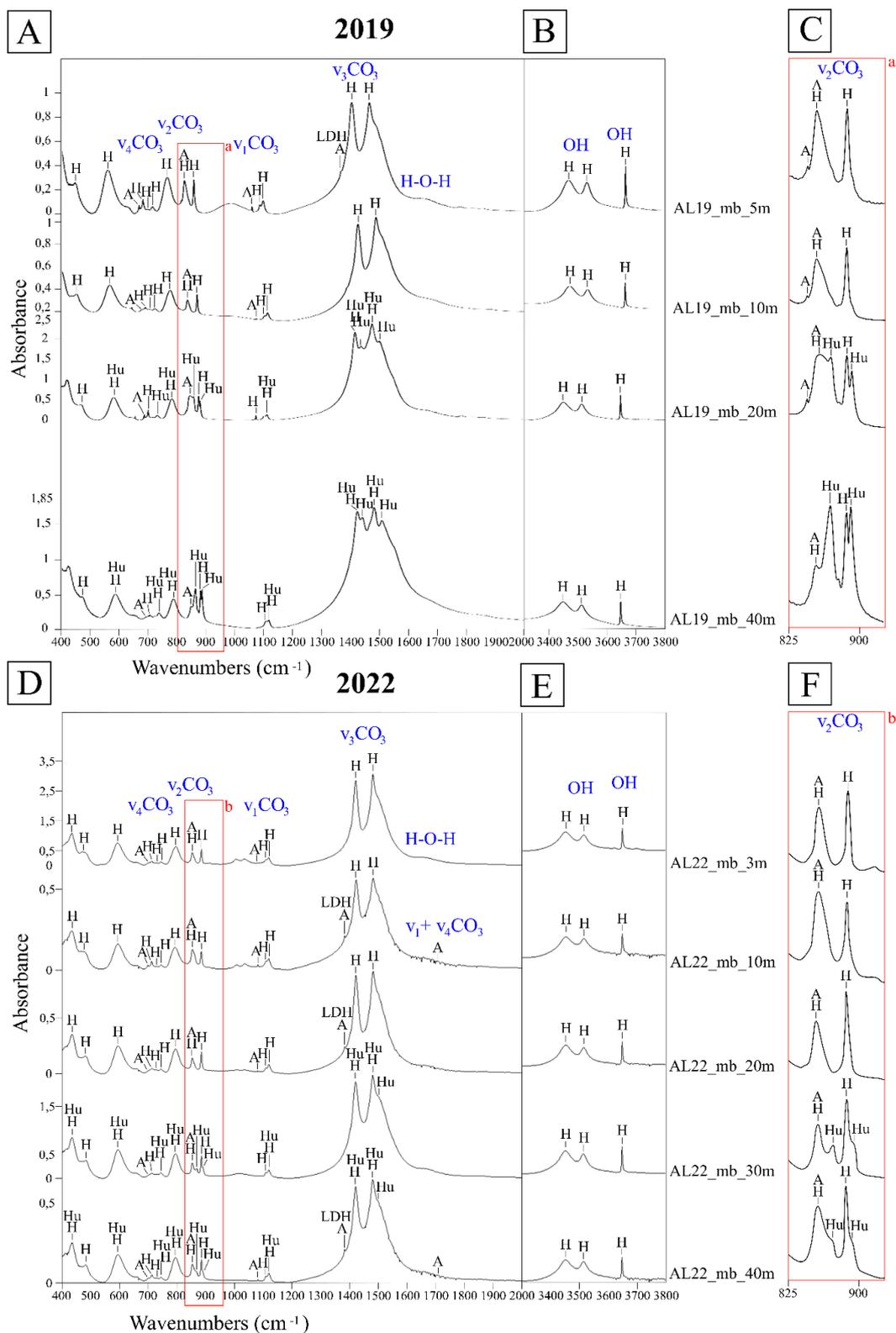
**Tableau A4.4.**

**Physico-chemical parameters and concentrations of major dissolved chemical species in the water column of Lake Alchichica, as a function of year and as a function of depth. Relative standard deviation is ≤ 5 %.**

Sample	Bulk							
	$\delta^{13}\text{C}_{\text{MOY}}$	error	$\delta^{18}\text{O}_{\text{MOY}}$	error	$\delta^{18}\text{O}_{\text{MOY}}$	Temperature of precipitation	$\text{d}18\text{O}_{\text{H}_2\text{O-eq}}$	$\text{d}13\text{C}_{\text{dic}}$
	‰ PDB		‰ PDB		‰ SMOW	° C	VSMOW	VPDB
AL19_mb_5m_bis	6,24	0,21	3,95	0,32	35,0	18,0	2,2	1,4
AL19_mb_10m_bis	6,21	0,10	4,13	0,54	35,2	17,5	2,4	1,4
AL19_mb_20m_bis_a	6,33	0,12	5,02	0,24	36,1	16,5	3,0	1,4
AL19_mb_20m_bis_b	6,28	0,10	4,97	0,18	36,0	16,5	3,2	1,5
AL19_mb_40m_bis	6,16	0,13	5,57	0,16	36,7	15,8	3,5	1,2

**Tableau A4.5.**

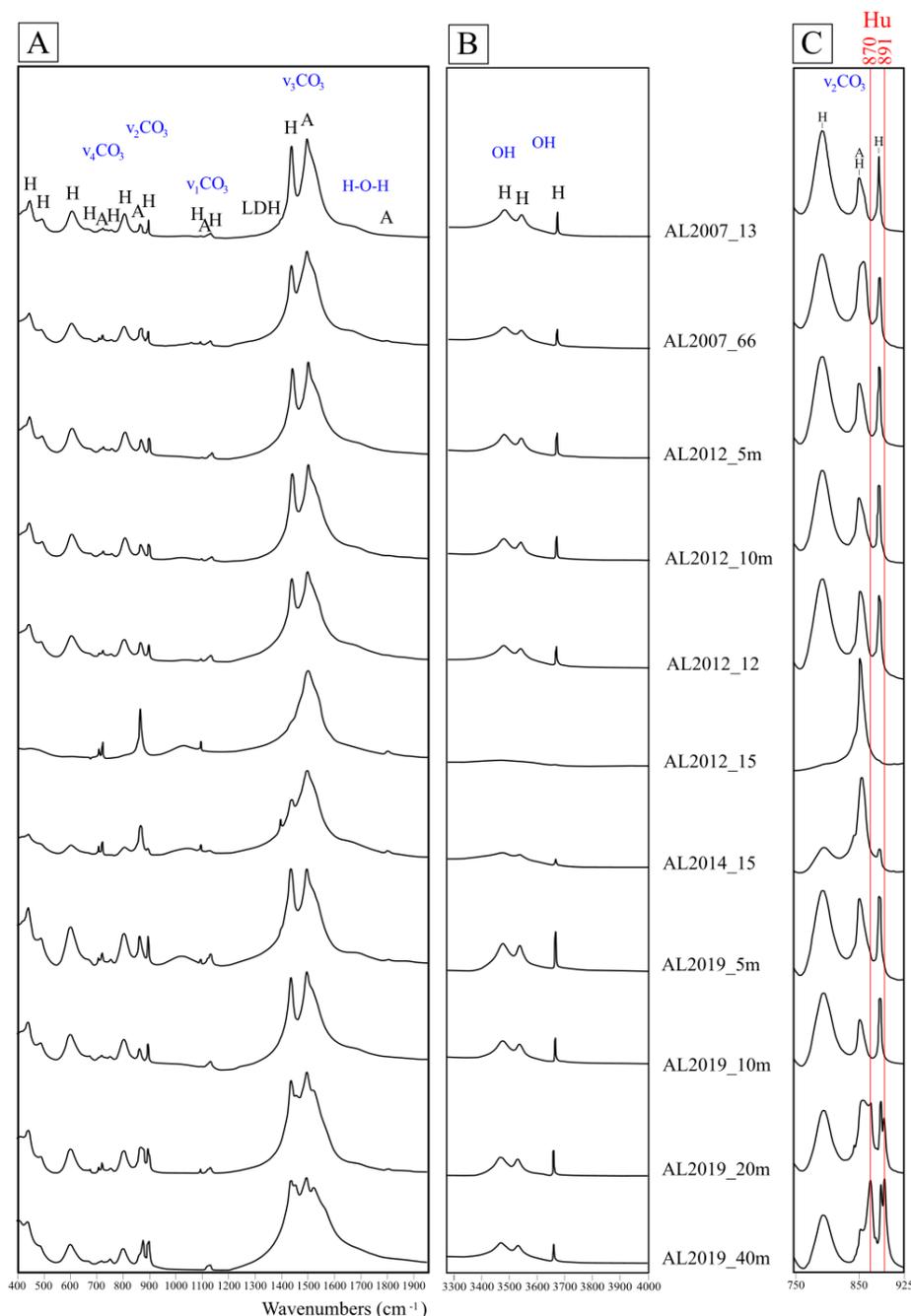
**Isotopic compositions of microbialites bulk (sampled in 2019) carbonate carbon and oxygen isotope compositions and recalculated dissolved inorganic carbon (DIC) and water oxygen isotope compositions in equilibrium with the microbialites.**



**Figure A4.1.**

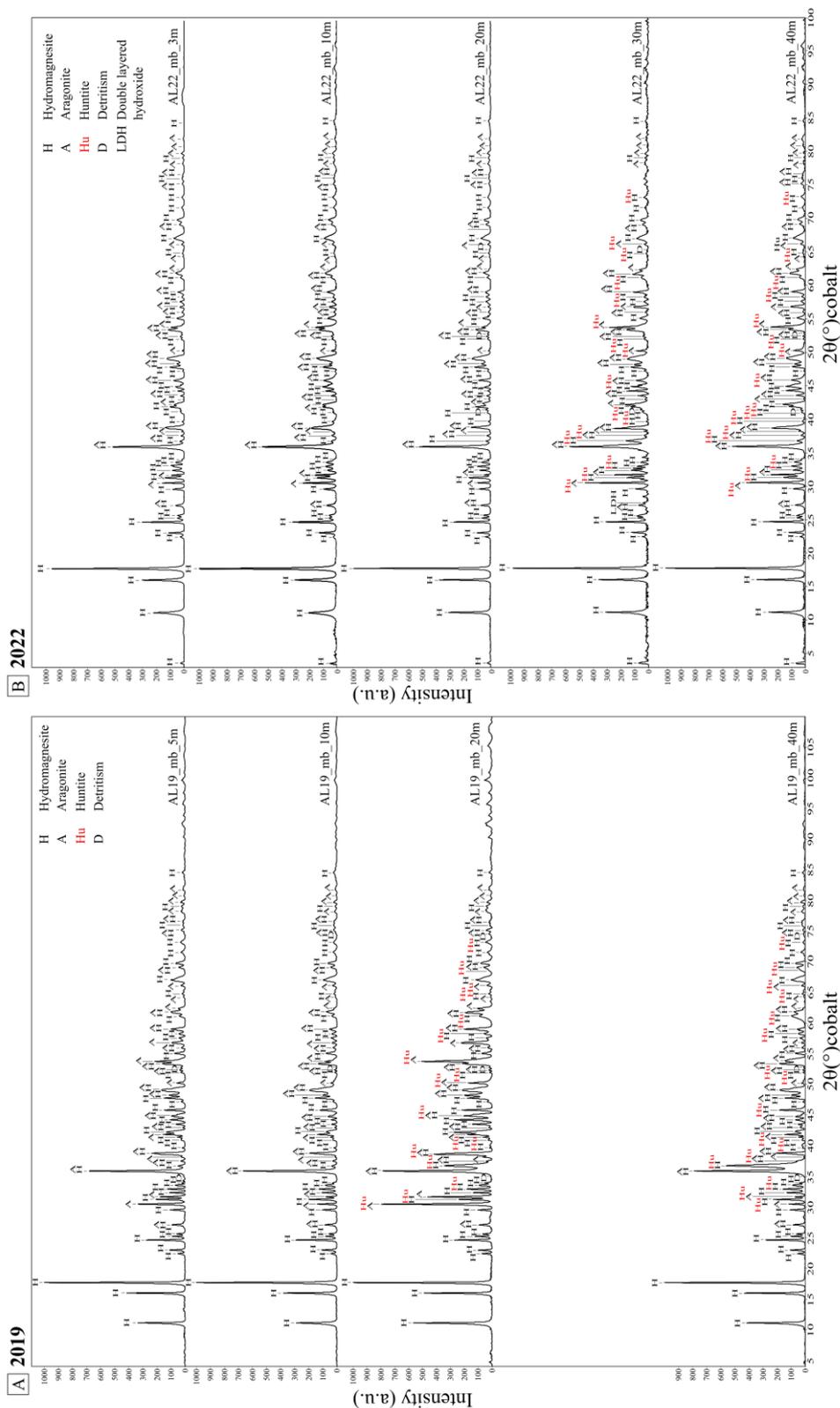
**Spectra of four microbialites sampled in Alchichica in May 2019 (A, B, C) and five microbialites collected in October 2022 (D, E, F).** Depths of collection (between 3 and 40 m) are indicated in the sample name for each spectrum. Bands are indexed using the following abbreviations: hydromagnesite (H), aragonite (A), huntite (Hu) and double lamellar hydroxides (LDH). (A) Spectra between 400 and 2000  $\text{cm}^{-1}$  of microbialites sampled in 2019 at depths of 5, 10, 20 and 40 m (from top to bottom,

respectively); (B) Spectra between 3300 and 3800  $\text{cm}^{-1}$  of the same samples as in (A); (C) Close-up over the 825-925  $\text{cm}^{-1}$  range of the 2019 spectra shown in (A) with bands characteristic of huntite. (D) Spectra between 400 and 2000  $\text{cm}^{-1}$  of microbialites sampled in 2022 at depths of 3, 10, 20, 30 and 40 m (respectively from top to bottom); (E) Spectra between 3300 and 3800  $\text{cm}^{-1}$  of the same samples as in (D). (F) Close-up over the 825-925  $\text{cm}^{-1}$  range of the 2022 spectra shown in (D) with bands characteristic of huntite.



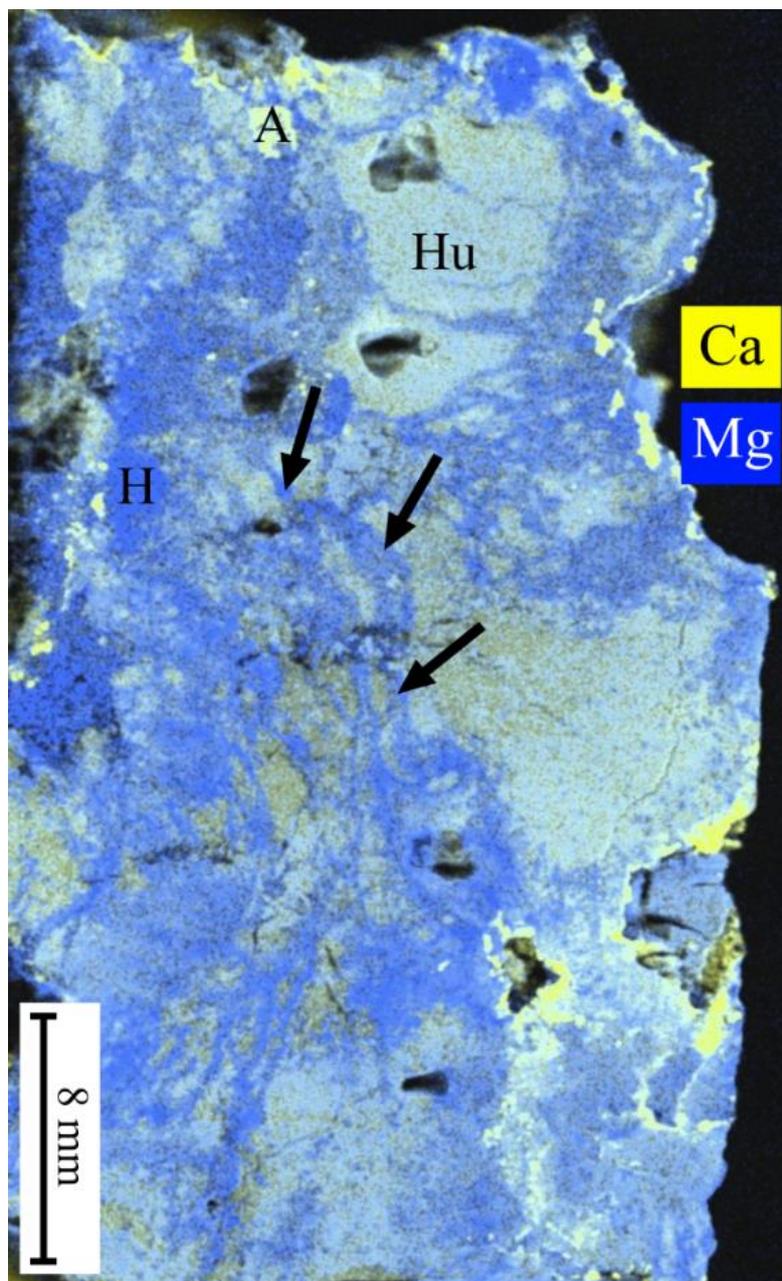
**Figure A4.2.**

**Check of the presence of huntite in FTIR spectra of microbialites sampled at Alchichica between 2007 (data from Zeyen et al., 2016) and 2019 between 5 and 40 m depth, with hydromagnesite (H), aragonite (A), huntite (Hu, red lines) and double lamellar hydroxides (LDH).** (A) Spectra between 400 and 1900  $\text{cm}^{-1}$ ; (B) The same spectra as (A) between 3300 and 4000  $\text{cm}^{-1}$ ; (C) Close-up over the 750-925  $\text{cm}^{-1}$  range of the 2007, 2012 and 2019 spectra shown in (A) and (B) with bands characteristic of huntite.



**Figure A4.3.**

**Powder X-ray diffraction patterns of Alchichica microbialite samples. Hydromagnesite (H), aragonite (A), huntite (Hu), LDH and detrital mineral phases (D) such as albite, anorthite and/or pyroxene were detected in these samples. (A) XRD patterns of Alchichica microbialites sampled in 2019, from 5 m in depth down to 40 m in depth (from top to bottom). (B) XRD patterns of Alchichica microbialites sampled in 2022, from 3 m in depth down to 40 m in depth (top to bottom).**



**Figure A4.4.**

**XRF map of petrographic thin section slab from a 40-m-deep microbialite sampled in October 2022, showing cracks filled by hydromagnesite crosscutting huntite patches (black arrows). Mineral phases are indexed using the following abbreviations: H for hydromagnesite; A for aragonite and Hu for huntite.**

Cette image en XRF provient du laboratoire Biogéosciences de Dijon (Robin Havas, Christophe Thomazo, Christophe Durllet).

## **Articles en co-autrice**

Annexe A, article de *Muller et al., (2023)* : Diagenetic formation of stevensite by replacement of diatom frustules in the sediments of the alkaline Lake Alchichica (Mexico)



*Sedimentology* (2023)

doi: 10.1111/sed.13069

## Diagenetic formation of stevensite by replacement of diatom frustules in the sediments of the alkaline Lake Alchichica (Mexico)

ELODIE MULLER\* , WILLIAM RAPIN\*<sup>†</sup>, JEANNE CAUMARTIN\*, DIDIER JÉZÉQUEL<sup>‡</sup>, ALEXIS DE WEVER\*, CHRISTOPHE THOMAZO<sup>§</sup> , ROBIN HAVAS<sup>§</sup>, PURIFICACIÓN LÓPEZ-GARCÍA<sup>\*\*</sup>, DAVID MOREIRA<sup>\*\*</sup>, ROZALUZ TAVERA<sup>††</sup> and KARIM BENZERARA\* 

\*Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR CNRS 7590, Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC), Sorbonne Université, 4 Place Jussieu, 75005, Paris, France (E-mail: karim.benzerara@upmc.fr)

<sup>†</sup>IRAP, CNRS UMR 5277, OMP, Université de Toulouse, Toulouse, France

<sup>‡</sup>IPGP, CNRS UMR 7154, Université de Paris & UMR CARRTEL, INRAE-USMB, Paris, France

<sup>§</sup>UMR CNRS/uB6282 Biogéosciences, Université de Bourgogne Franche-Comté, 6 Bd Gabriel, 21000, Dijon, France

<sup>¶</sup>Institut Universitaire de France, Paris, France

<sup>\*\*</sup>Ecologie, Systématique et Evolution, CNRS, Université Paris-Saclay, AgroParisTech, Orsay, France

<sup>††</sup>Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Universidad Nacional Autónoma de México, DF México, Mexico

Associate Editor – Andrea Martin Pérez

### ABSTRACT

Better understanding the conditions of formation of authigenic Mg-silicates and their reactivity is key to interpret the palaeoenvironmental message carried by the sedimentary record and evaluate the effect of reverse weathering, a process involved in long-term climate evolution. Microbialites from most alkaline crater lakes in Mexico contain Mg-silicates except those in Lake Alchichica, where concentration of orthosilicic acid is low (<26 µM). This study investigated the first metre of sediments in Lake Alchichica in order to check how their mineralogy compared with that of shoreline microbialites. The mineralogy and chemistry of the sediment column were determined, together with the pore water chemistry, providing insights on the processes occurring during early diagenesis. Below *ca* 3 cm in depth, diatom frustules are progressively pseudomorphized into Al-poor Mg-silicates with a composition corresponding to stevensite. This diagenetic process is massive and the resulting silicate represents between 30 and 53 wt.% of the sediment content at all depths. This observation questions the possibility to infer lake palaeochemistry from the presence/absence of Mg-silicates in the sedimentary record. Moreover, it allowed refinement of the conditions under which Mg-silicates authigenesis occurs: the saturation of the solution should be higher or equal to the solubility of a Mg-silicate phase close to that of 'amorphous sepiolite'. Although the solubility of authigenic silicates is a key parameter of reverse weathering modelling during geological times, it is still debated. In this study, a solubility constant deduced from a natural system is proposed that should be considered when modelling the formation of Mg-silicates in a natural environment. The proportion of reverse weathering associated with this solubility constant could be higher than previously predicted based on experiments and thus have a greater impact on climate stability over geological timescales.

**Keywords** Diagenesis, diatoms, Mg-silicates, reverse weathering, solubility.

## INTRODUCTION

Authigenic clays are reported in various sedimentary environments from marine (e.g. Tosca *et al.*, 2011) to soils (e.g. Cuadros *et al.*, 2016), speleothems (e.g. L evill e *et al.*, 2002) and lacustrine environments (e.g. Deocampo, 2015; Wright & Barnett, 2015). They form either through direct precipitation from solution (i.e. neoformation) or by transformation of precursor minerals (also called neoformation by addition; Jones & Mumpton, 1986; Galán & Pozo, 2011). In the sedimentary environment, transformation is mostly related to diagenesis, whereas neoformation can take place in both syngenetic (depositional) and diagenetic environments (Galán & Pozo, 2011). Clays forming in evaporitic closed basins where parent rocks are enriched in ferromagnesian minerals, tend to be Mg-rich minerals, as reported in the American Great Salt Lake (Jones & Spencer, 1999) and Lake Abert (Jones & Weir, 1983), in several modern East African lake basins (Jones & Mumpton, 1986; Deocampo, 2005, 2015) and in Mexican crater lakes (Zeyen *et al.*, 2015). Hereafter, they are referred to as Mg-silicates (Jones, 1986). They constitute a significant part of the Mg-rich phyllosilicate family. They structurally and chemically encompass diverse phases, either rich in Al such as saponite and palygorskite or poor in Al such as sepiolite, stevensite and kerolite (Pozo & Calvo, 2018). The latter, not listed as a valid mineral species by the International Mineralogical Association, is considered as a stacking-disordered talc phase (Brindley *et al.*, 1977).

Aluminium-poor Mg-silicates have been studied extensively in modern lakes from different localities such as the Satonda crater lake (Indonesia; Arp *et al.*, 2003; Benzerara *et al.*, 2010), Eyasi and Ngorongoro crater lakes (Tanzania; Deocampo, 2005), Lake Van (eastern Anatolia; Reimer *et al.*, 2009), Lake Clifton (western Australia; Burne *et al.*, 2014), Atexcac, Quechulac and La Preciosa lakes (Mexico; Zeyen *et al.*, 2015), Dziani Dzaha Lake (Mayotte; Gérard *et al.*, 2018; Milesi *et al.*, 2019, 2020), Mono Lake and Great Salt Lake (USA; Souza-Egipsy *et al.*, 2005; Pace *et al.*, 2016), as well as peri-marine environments (e.g. L evill e *et al.*, 2000a,b; Warren, 2016). Last but not least, such authigenic Mg-silicate phases have

been observed in some ancient marine and lacustrine formations showing that they can be traced back in the geological record. For example, Tosca *et al.* (2011) reported occurrences of talc in two early Neoproterozoic carbonate formations located in the Akademikerbreen Group (Svalbard) and in the upper Fifteenmile Group of the Ogilvie Mountains (north-west Canada), which they interpreted as the product of dehydration of authigenic hydrous Mg-silicates, including kerolite. It has been shown that the identity of these phases in modern environments depends on specific geochemical factors, such as pH, dissolved CO<sub>2</sub>, salinity, alkalinity, dissolved element concentration ratios, and the activities of Mg<sup>2+</sup>, H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub>, Al<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> in solution (Jones & Galan, 1988; Weaver, 1989; Deocampo, 2005; Bristow & Milliken, 2011). Several experimental studies have investigated the conditions allowing their formation (e.g. Wollast *et al.*, 1968; Tosca *et al.*, 2011). They have shown that high pH > 8.2 and high concentrations of Si and/or Mg are required for their precipitation (Tosca *et al.*, 2011; Zeyen *et al.*, 2015). In addition, high salinity favours the formation of stevensite, whereas sepiolite and kerolite are formed under lower saline conditions, with a high Si/Mg ratio favouring the formation of sepiolite. Likewise, precipitation of kerolite instead of sepiolite is favoured by an increase of pH and dissolved Mg concentration (Pozo & Calvo, 2018). Last, Millot (1970) proposed that the Al content of Mg-silicates could be indicative of the distance to the detrital source. The Millot (1970) model shows that detrital clay inputs, mainly kaolinite, illite, chlorite and Al-rich smectite, preferentially occur in the margins of saline lake basins and transition to fibrous clays (palygorskite, sepiolite) that precipitate in the centre of lakes.

Overall, these minerals have received considerable attention as potential palaeoenvironmental recorders of the geochemistry of the solution in which they precipitated. In addition to their value for palaeoenvironmental reconstruction, better understanding the conditions of Mg-silicates formation and their reactivity is interesting for two broad reasons. First, they can have a crucial role in the control of carbonate fabrics and porosity as exemplified by the study of offshore Barra Velha Formation carbonate

reservoirs in Brazil (Tosca & Wright, 2018; Wright & Barnett, 2020). Second, their precipitation feeds a process called reverse weathering, which consumes alkalinity without consuming carbon and may therefore have a significant role in the evolution of climates at the geological timescale (Isson & Planavsky, 2018; Krissansen-Totton & Catling, 2020). However, there remain a few difficulties for their use as a proxy. First, there is some uncertainty about the exact value of the solubility constant of the amorphous Mg-silicates, commonly considered as precursors to the formation of Mg-silicates in laboratory experiments (i.e. sepiolite, kerolite, stevensite; e.g. Tosca *et al.*, 2011). Second, Mg-silicates may form either in the water column or in sediments during early diagenesis (Işık Ece, 1998; Bristow *et al.*, 2009; Milesi *et al.*, 2019, 2020). In the latter case, they do not reflect the chemistry of the waters in the depositional basin but instead that in the sediment pore waters. Moreover, several authors have suggested that some biogeochemical processes may trigger Mg-silicate formation, possibly obscuring the relationship between the identity and presence/absence of Mg-silicates and bulk chemical conditions. For instance, recent studies reported Mg-silicates formed by a local pH increase and/or nucleation on extracellular polymeric substances within microbial mats, acting as precursors of carbonate precipitation in microbialites (Bontognali *et al.*, 2010; Burne *et al.*, 2014; Zeyen *et al.*, 2015; Pace *et al.*, 2016). The association of Mg-silicates and biofilms has also been evidenced in certain speleothems (Melim & Spilde, 2018), mostly in volcanic caves (Léveillé *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2014). In some cases, Mg-silicates were shown to develop at the surface of diatom frustules (Badaut & Risacher, 1983; Bentz & Peterson, 2020). Yet, although Mg-silicates have shown a strong potential for fossilization of microbes and organic matter (Zeyen *et al.*, 2015), the role of the microorganisms in the formation of these phases remains unclear.

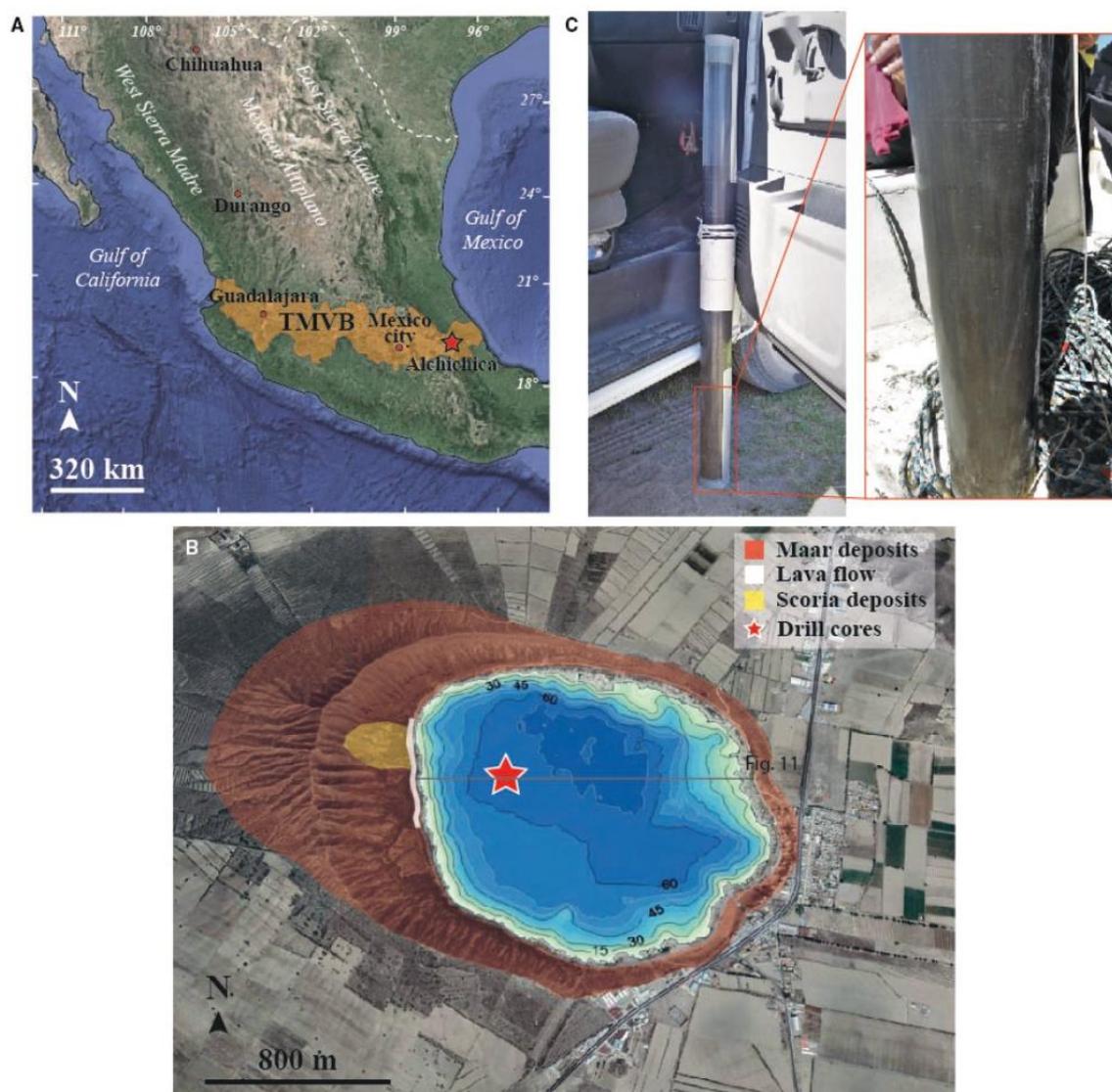
Magnesium-silicates, characterized as poorly crystalline hydrated talc phases similar to kerolite, were reported in shallow microbialites from numerous alkaline crater lakes in Mexico (e.g. Atexcac, La Preciosa, Quechulac; Zeyen *et al.*, 2015, 2021). By contrast, the shallow microbialites of the Mexican Lake Alchichica were essentially composed of hydromagnesite and aragonite, but did not contain kerolite, possibly because lake water had a low concentration in orthosilicic acid (<26  $\mu\text{M}$ ). This study

investigated deep sediments in Lake Alchichica in order to check how their mineralogy compared with that of shoreline microbialites. The mineralogy and chemistry of the first metre of the sediment column were studied together with the pore water chemistry, providing insights on the processes occurring during early diagenesis.

## GEOLOGICAL SETTING

Alchichica is a crater lake located in the eastern part of the trans-Mexican volcanic belt (TMVB) in the Cuenca de Oriental region (19°24'N and 97°24'W; Fig. 1A). The TMVB is a seismically and volcanically active zone resulting from the subduction of the Rivera and Cocos plates beneath North America at the Middle American Trench during the Neogene period (Ferrari *et al.*, 2012). It is composed of diverse volcanic structures formed on a basement predominately composed of highly folded and faulted Cretaceous limestones and shales, as well as small plutonic intrusions of granodiorite, monzonite and syenite emplaced during the Oligocene and the Miocene (Negendank *et al.*, 1985). These basement rocks are covered by Miocene to Pleistocene andesitic rocks, which are themselves overlain by: (i) widespread pyroclastic deposits derived from both local phreatomagmatic volcanoes and large eruptions from nearby volcanoes; as well as (ii) lacustrine deposits. The crater of Alchichica is surrounded by an asymmetrical ring of tephra, deposited by several Hawaiian, strombolian and phreatomagmatic eruptions dated from >114 ka to  $6.3 \pm 5.1$  ka by  $^{40}\text{Ar}/^{39}\text{Ar}$  methods (Tchamabé *et al.*, 2020). The crater rim is mainly composed of maar deposits (i.e. pyroclastic rocks including 44 to 73 wt.% of juvenile clasts) and basaltic andesite lava flow and scoriaeous pre-maar deposits cropping out only on the west side of the crater (Fig. 1; Tchamabé *et al.*, 2020).

With a maximum depth of 65 m (Arredondo-Figueroa *et al.*, 1983; Vilaclara *et al.*, 1993), Alchichica is the deepest crater lake in Mexico. It is located at 2320 m above sea level (a.s.l.) on a high-altitude plateau called Los Llanos de San Juan. The climate is semi-arid with an annual precipitation regime of less than 400 mm and an annual evaporation rate of about 1700 mm (Alcocer, 2021). The air temperature seasonally ranges from -5.5 to 30°C (Alcocer & Hammer, 1998). The lake is supplied by rainfall and groundwaters as suggested by Armienta

4 E. Muller *et al.*

**Fig. 1.** (A) Relief map of Mexico representing the location of the lake Alchichica in the trans-Mexican volcanic belt (TMVB, orange area; modified from Ferrari *et al.*, 2012). (B) Google Earth image of Lake Alchichica showing the surrounding volcanic deposits (from Tchamabé *et al.*, 2020), bathymetrical data (from Alcocer & Oseguera, 2019) and the location of the drill core (red star). (C) Pictures of the 85.5 cm long sediment core.

*et al.* (2008) for all maar lakes. The water deficit between evaporation and rainfall could be partially balanced by underground sources and outflows (García Martínez, 2010), yet the lake water level has decreased to a rate of about 8 cm.yr<sup>-1</sup> for several decades (Alcocer, 2021). Water in Lake Alchichica is alkaline (pH > 9), subsaline (ca 7.9 g l<sup>-1</sup>) and dominated by Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>

and Mg<sup>2+</sup> ions. Two main factors control its chemical composition: (i) the weathering of surrounding bedrocks (basalts and Cretaceous limestones) through groundwater supply; and (ii) the evaporation of the lake due to the semi-arid climate (Zeyen *et al.*, 2021). Alchichica is a monomictic lake stratified during most of the year and homogenized during winter

(Arredondo-Figueroa, 2002). Two annual blooms of primary producers were observed by previous studies: a diatom bloom during the winter mixing (December–January) and a cyanobacteria bloom at the onset of the stratification period (April–May; Vilaclara *et al.*, 1993; Alcocer *et al.*, 2000). Microbialites were studied extensively in Lake Alchichica and are mainly composed of hydromagnesite and aragonite in varying proportions (Couradeau *et al.*, 2011, 2013; Kaźmierczak *et al.*, 2011; Gérard *et al.*, 2013; Saghāi *et al.*, 2015; Valdespino-Castillo *et al.*, 2018; Zeyen *et al.*, 2021). They are covered by complex microbial communities dominated by oxygenic and anoxygenic photosynthesizers (Couradeau *et al.*, 2011; Saghāi *et al.*, 2016; Iniesto *et al.*, 2021).

## MATERIAL AND METHODS

### Sample collection

Lake water was sampled with a Niskin bottle in May 2019 in the centre of the lake at 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 55 and 60 m depth. Temperature, pH and salinity were measured *in situ* with a YSI Exo 2 multi-parameter probe (YSI Incorporated, Yellow Springs, OH, USA). Hundreds of millilitres of solution were systematically filtered using 0.22 µm Filtropur S filters (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Germany). For major cation analysis, 30 ml of solution were acidified with nitric acid (2%). One hundred and thirty millilitres were used for measurements of anion and orthosilicic acid (H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub>) concentrations, without pre-acidification. For dissolved inorganic carbon (DIC) analysis, 12 ml were placed in airtight Labco Exetainer<sup>®</sup> tubes (Labco Limited, Ceredigion, UK) in order to avoid exchange of DIC with atmospheric CO<sub>2</sub>.

The sediment core was collected from the bottom of the lake at 61 m depth during the same field campaign in May 2019, using a gravitational Uwitec corer (Uwitec GmbH, Mondsee, Austria) with a diameter of 90 mm. The total length of the recovered core was 85.5 cm (Fig. 1C). The sediment core was then cut in two in order to allow its processing in a glove-bag. The two cores were transferred into a glove-bag and placed under anoxic conditions (N<sub>2</sub> atmosphere) immediately after collection. They were then processed and split into centimetre-scale fractions along the core's vertical axis. The pore water was separated from the solid phases

once extracted from the core barrel using Rhizon samplers (Rhizosphere Research Products B.V., Wageningen, The Netherlands) connected via tubing to syringes (filtration to 0.2 µm). During all of the slicing process, oxygen levels were monitored with a Multi 3630 IDS WTW oxygen meter (equipped with a FDO 925-3 O<sub>2</sub> optode; Xylem Analytics Germany GmbH, Weilheim, Germany) and were always below the detection limit of 0.1 mg l<sup>-1</sup>. The pH of the pore waters was measured (with a Sentix 940 IDS WTW electrode; Xylem Analytics) immediately after water collection within the glove-bag. Sediments were packaged under nitrogen and transported in heat sealed airtight bags (PP016 H Protective Packaging Limited, Manchester, UK) with O<sub>2</sub> trap (Anaerocult<sup>®</sup> A), then fully dried in an anoxic N<sub>2</sub>-filled glove-box in the laboratory.

### Chemical analyses of solutions

Chemical analyses for major elements (Al, B, Ca, K, Li, Mg, Na, Mn, Si, S and Cl) are summarized in Table 1. They were carried out at the Laboratoire Géoscience Océan (UBO, Brest, France) using inductively coupled plasma–atomic emission spectroscopy (ICP-AES). Anion concentrations (F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup> and SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) were measured by ion chromatography and orthosilicic acid (H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub>) concentrations were determined by continuous flow colorimetric analyses at the Institut de physique du globe de Paris (IPGP, Paris, France). The uncertainty on the concentration measurements of cations, anions and orthosilicic acid was lower than ±5%.

Dissolved inorganic carbon concentrations were determined at the IPGP, using an 'Analytical Precision 2003' Gas Chromatograph – Isotope Ratio Mass Spectrometer (running under He-continuous flow) following the analytical protocol detailed in Assayag *et al.* (2006). An aliquot of the water sample was injected into a Labco Exetainer<sup>®</sup> tube pre-loaded with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and He. After the dissolved CO<sub>2</sub> has equilibrated with the head-space gas (for one night), gases (i.e. He and CO<sub>2</sub>) were sampled and quantified with the GC-IRMS by comparison with internal standards of known concentrations. Each measurement represents an average of four injections in the mass spectrometer and all samples were duplicated (including chemical preparation and analysis). Standard deviation for [DIC] is 1 mM (*n* = 33), on average.

Activities of cations, anions and orthosilicic acid, as well as saturation indices of the

6 E. Muller et al.

**Table 1.** pH, DIC and major element concentrations measured in lake and pore waters. Relative standard deviation is  $\leq 5\%$  for DIC and element concentrations and  $\pm 0.02$  units for pH values. Charge balance (Bal.) in % is calculated as  $100 * (\sum \text{cations} - \sum \text{anions}) / (\sum \text{cations} + \sum \text{anions}) / 2$ .

	Depth	pH	T (°C)	DIC (mmol)	Cl (mmol)	Na (mmol)	Mg (mmol)	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mmol)	K (mmol)	B (mmol)	Li (mmol)	Ca (mmol)	Mn (mmol)	H <sub>4</sub> SiO <sub>4</sub> (mmol)	Al (μmol)	Bal. (%)
Lake water																
AL19_0m-ext	0 m	9.19	19.6	34.1	116	108	19.1	12.8	4.96	3.79	0.35	0.16	<DL	<DL	<DL	-14.2
AL19_4.9m	4.9	9.14	19.2	34.5	107	106	18.8	11.8	4.91	3.79	0.35	0.16	<DL	<DL	0.96	-9.5
AL19_5m	5	9.14	19.2	-	107	108	19.3	11.9	5.01	3.84	0.35	0.16	<DL	<DL	<DL	-8.0
AL19_10m	10	9.22	19.2	32.8	106	107	19.1	11.8	5.00	3.83	0.35	0.16	<DL	<DL	<DL	-7.3
AL19_20m	20	9.23	16.7	34.0	106	105	18.6	11.8	4.90	3.75	0.34	0.15	<DL	<DL	<DL	-10.0
AL19_30m	30	9.22	15.5	34.0	106	105	18.7	11.7	4.90	3.75	0.34	0.15	<DL	0.002	<DL	-9.7
AL19_40m	40	9.24	15.3	32.8	106	106	18.8	11.8	4.87	3.74	0.35	0.15	<DL	0.005	<DL	-9.0
AL19_50m	50	9.17	15.2	34.3	108	104	18.7	12.0	4.82	3.75	0.34	0.14	<DL	0.018	<DL	-12.6
AL19_55m	55	9.18	15.2	34.3	109	100	17.9	12.0	4.62	3.58	0.32	0.14	<DL	0.013	<DL	-16.9
AL19_60m	60	9.25	15.2	34.1	112	104	18.7	12.2	4.84	3.75	0.34	0.15	<DL	0.026	<DL	-14.3
Sediment pore water																
AL19_C2a_0.5cm	0-1 cm	8.95	N.D.	35.8	97.4	109	18.1	9.92	5.05	3.85	0.35	0.13	0.02	0.76	2.01	2.4
AL19_C2a_2cm	1-3	8.76	N.D.	36.2	99.8	105	16.6	9.50	5.03	3.71	0.34	0.10	0.012	0.75	<DL	8.0
AL19_C2a_4cm	3-5	8.61	N.D.	36.8	99.0	106	16.3	9.21	5.03	3.74	0.34	0.10	0.012	0.69	<DL	5.9
AL19_C2a_6cm	5-7	8.53	N.D.	34.5	99.6	105	15.9	9.09	5.06	3.68	0.33	0.10	0.013	0.67	0.08	7.7
AL19_C2a_8.5cm	7-10	8.45	N.D.	34.6	100.2	104	15.7	8.70	5.06	3.72	0.33	0.11	0.022	0.66	1.16	8.1
AL19_C2a_11.5cm	10-13	8.42	N.D.	34.9	98.9	105	15.4	8.26	5.08	3.77	0.33	0.12	0.028	0.64	0.45	8.8
AL19_C2a_17.5cm	16-19	8.4	N.D.	38.2	98.2	103	15.2	8.06	5.02	3.71	0.32	0.11	0.036	0.59	0.47	10.2
AL19_C2a_23.5cm	22-25	8.45	N.D.	39.0	96.2	103	15.6	7.40	5.02	3.74	0.31	0.11	0.011	0.49	<DL	8.1
AL19_C2a_29.3cm	28-30.5	8.48	N.D.	39.8	94.6	100	16.0	7.00	4.96	3.68	0.30	0.09	0.011	0.38	<DL	9.1
AL19_C2a_37.3cm	34.5-40	8.5	N.D.	42.2	93.2	102	17.1	6.16	5.06	3.80	0.30	0.09	0.011	0.39	<DL	4.4
AL19_C2a_41.5cm	40-43	8.56	N.D.	42.4	94.4	100	17.0	5.56	4.93	3.62	0.29	0.09	0.011	0.42	<DL	6.1
AL19_C2b_44.5cm	43-46	8.5	N.D.	42.9	96.6	99.4	16.7	5.62	4.89	3.59	0.29	0.09	0.012	0.47	0.44	8.9
AL19_C2b_50.5cm	49-52	8.46	N.D.	43.2	97.2	99.4	16.4	5.47	4.87	3.57	0.28	0.11	0.012	0.54	0.34	8.6
AL19_C2b_56.5cm	55-58	8.44	N.D.	43.4	95.3	97.8	16.2	5.13	4.81	3.56	0.28	0.12	0.013	0.57	<DL	9.5
AL19_C2b_62.5cm	61-64	8.47	N.D.	41.8	95.4	97.0	15.8	4.84	4.79	3.52	0.27	0.12	0.013	0.59	0.27	10.2
AL19_C2b_68.5cm	67-70	8.47	N.D.	43.1	94.6	96.3	15.7	4.90	4.71	3.48	0.27	0.13	0.002	0.60	0.50	10.3
AL19_C2b_74.5cm	73-76	8.47	N.D.	43.0	96.7	96.2	15.5	4.49	4.74	3.50	0.26	0.14	0.002	0.63	0.71	11.4
AL19_C2b_80.5cm	79-82	8.47	N.D.	43.0	94.2	95.6	15.3	4.20	4.68	3.52	0.26	0.14	0.002	0.63	0.31	10.3
AL19_C2b_83cm	82-84	8.46	N.D.	43.2	93.8	95.9	15.1	4.09	4.65	3.48	0.26	0.13	0.002	0.62	0.03	2.1

solutions were calculated using the software PHREEQC 3 (Parkhurst & Appelo, 2013) and the thermodynamic database 'thermodem.dat' (Blanc *et al.*, 2012).

### Bulk analyses of sediments

A quantity of about 10 g for each sediment sample was finely ground and homogenized in an agate mortar and aliquots of the same powdered sample were used for the different bulk analyses.

#### X-ray powder diffraction

For X-ray diffraction (XRD) analyses, each core sample powder was placed onto 3 cm diameter sample holders and levelled to form a flat surface for analysis. XRD analyses were performed using a Panalytical Xpert Pro transmission diffractometer (Malvern Panalytical Limited, Malvern, UK) with a cobalt anode operated at 45 kV and 40 mA and a slit of 0.5° at 240 mm radius distance. The 2 $\theta$  scan was performed in the continuous mode from 4° to 110° (2 $\theta$ ) with a step of 0.024°.

Each diffractogram was corrected for small relative displacements of sample height using the alignment with major aragonite diffraction peaks (2 $\theta$ -Co angles 30.52° and 53.77°), dominant in all samples. The background signal was fit so that the contribution of X-ray low crystalline phases could be removed from peak analysis. Automatic background determination did not produce adequate results, given the presence of magnesium silicate and opaline silica in the sample generating broad diffraction signals, but these were used to assess the relative presence of the two low crystalline materials (Fig. S1). The background signal was manually fit with an interpolated spline for each diffractogram. Peak identification was performed using pattern search on the XRD database of reference spectra 'Crystallography Open Database (COD)' (from <http://www.crystallography.net/>).

Structural data of identified minerals were obtained from the COD. The structure and abundance of crystalline minerals were estimated using a Rietveld refinement analysis implemented in the Highscore Plus software (Fig. S2). XRD identifications were cross-checked back and forth with results from energy dispersive X-ray spectrometry (EDXS) elemental composition data obtained by scanning electron microscopy (SEM) to more confidently identify the mineralogy of (core) samples.

#### Fourier transform infrared spectroscopy analyses

For attenuated total reflectance (ATR) – Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy analyses, *ca* 1 mg of sediment powder was pressed against a single-reflection diamond prism. ATR spectra were recorded between 400 and 4000 cm<sup>-1</sup> with a resolution of 1 cm<sup>-1</sup>, using a Nicolet 6700 FTIR spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) equipped with a deuterated triglycine sulphate detector. Spectra were corrected from the atmospheric signal.

#### Bulk chemical analyses of sediments

Concentrations of major elements were measured on 30 sediment samples using an ICP-AES ICap 6500 (Thermo Fisher) after alkali fusion of rock samples with LiBO<sub>2</sub> followed by dissolution in HNO<sub>3</sub> at the Service d'Analyse des Roches et Minéraux (Centre de Recherches Pétrographiques et Géochimiques, Nancy, France). About two grams of ground powder were used for these analyses. The uncertainties on the major element measurements, between 1% and 25% depending on their concentrations, were assessed from relative standard deviations calculated on a minimum of 30 measurements of reference geochemical standards.

#### Microscopy analyses of sediments

Around 5 mm<sup>3</sup> of powder (<100  $\mu$ m) from eight samples (at 0.5, 2.0, 4.0, 8.5, 37.3, 41.5, 44.5 and 84.8 cm) collected all the way along the core length were progressively impregnated in hard grade LR-white resin (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) by incubating them at 6°C for 18 h in (1 : 2) then (2 : 1) mixture of LR-white/ethanol and finally in pure LR-white resin. After 1 h at room temperature, the resin was polymerized by incubation at 40°C for 1 h and at 60°C for 24 h. Once polymerization was completed, inclusions were polished with diamond polishing paper with a grain size down to a one quarter of a micrometre and rinsed in deionized water with ultrasound for 10 min. SEM analyses were performed using a Zeiss Ultra 55 field emission gun (FEG) SEM (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany). Backscattered electron (BSE) images were acquired using an angle selective backscattered (AsB) detector at an accelerating voltage of 15 kV, a working distance of *ca* 7.5 mm and a 60 mm aperture at high current. The elemental composition of mineral phases was determined by EDXS using an EDS QUANTAX detector after copper calibration. Semi-

quantification of the spectra was achieved using the ESPRIT software package (Bruker, Billerica, MA, USA) and the phi-rho-z method.

An electron-transparent foil (*ca* 100 nm in thickness) was cut by focused ion beam (FIB) milling from one of the embedded samples, to further analyse by transmission electron microscopy (TEM) a diatom replaced by Mg-silicates (at 16 to 19 cm in depth). This was performed at IMPMC using a Zeiss Crossbeam Neon40. The lift-out procedure as described by Benzerara *et al.* (2005) was used. A FIB-assisted Pt deposit was first made. A 30 kV Ga + beam operated at *ca* 5 nA was then used for initial milling, resulting in rough excavation from both sides of the thin foil. An *in situ* micromanipulator was attached to the foil by FIB-assisted platinum deposition prior to separation of the foil (at *ca* 100 pA). The thin foil was transferred to a TEM grid and welded to it. Further thinning of the foil was performed with the beam operated at a low, *ca* 100 pA current. A last cleaning step was performed at low acceleration tension (*ca* 3 kV).

The electron-transparent foil was then analysed by TEM using a JEOL 2100F (JEOL Limited, Tokyo, Japan) operating at 200 kV and equipped with a field emission gun (FEG-TEM). Scanning transmission electron microscopy (STEM) observations were performed in the high-angle annular dark field mode (HAADF) and a probe size of 1 nm. EDXS mapping was performed using the STEM mode.

## RESULTS

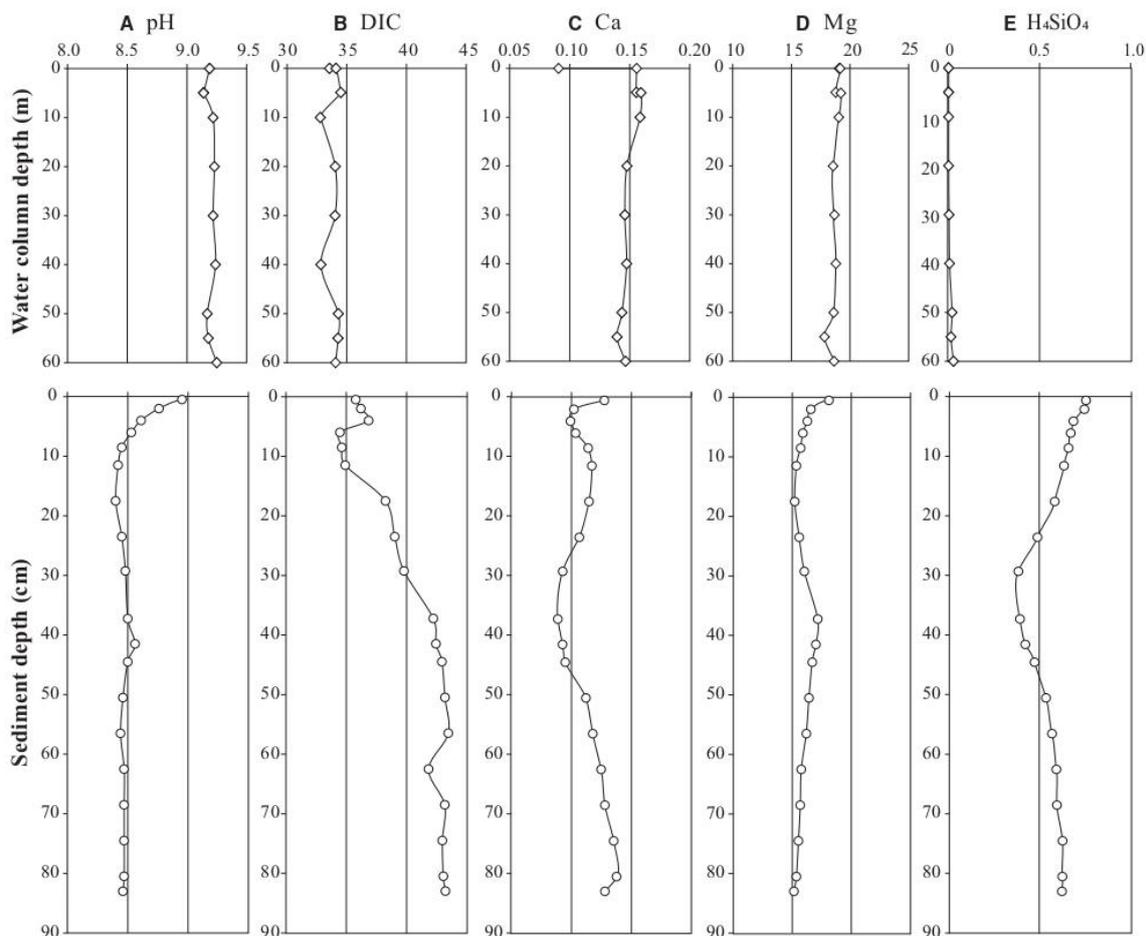
### Solution chemistry of the water column and the sediment pore water

Solutions at all depths in the water column of Lake Alchichica are dominated by sodium, chloride and magnesium (Fig. 2; Table 1). In the water column, the temperature decreases from 19.5 to 15.2°C with depth and the chemical composition remains stable, with a pH of 9.2 and concentrations of DIC at 33.9 mM, Mg at 18.8 mM and Ca at 0.1 mM (Fig. 2; Table 1). The concentration of orthosilicic acid in the water column is below the detection limit (0.1 μM) from the surface down to 30 m in depth, then increases to 26 μM at 60 m (maximum depth of the lake). In the sediments, pore waters are also dominated by sodium, chloride and magnesium (Fig. 2; Table 1). The [Mg] decreases in the first 20 cm from 18.1 to 15.2 mM and then remains constant with a peak at 17.1 mM

at 34.5 to 40.0 cm depth. The pH also decreases down to 8.47 in the first 10 cm of the sediments and then remains constant. The concentration of orthosilicic acid in pore water is significantly higher than in the lake water. It decreases from 760 μM at 0.5 cm down to 380 μM at 28 to 40 cm and raises again to 620 μM at 83 cm deep. The DIC concentration globally increases from the top to the bottom of the core, from 35.8 to 43.2 mM. The [Ca] varies non-monotonously between 0.09 mM and 0.14 mM (Fig. 2; Table 1).

Saturations of the solutions with respect to authigenic silicate and silica phases are best visualized in a diagram, where the logarithm of the  $a(\text{Mg}^{2+})/a(\text{H}^+)^2$  activity ratio is plotted against the logarithm of the orthosilicic acid activity ( $a(\text{H}_4\text{SiO}_4)$ ; Fig. 3). As the orthosilicic acid concentration increases with depth in the water column, the lake water reaches saturation with respect to several low-temperature Mg-silicates such as sepiolite, kerolite, talc and stevensite below 30 m in depth. However, all lake waters down to 60 m remain undersaturated with respect to ‘amorphous sepiolite’, as defined by Wollast *et al.* (1968). By contrast, all sediment pore solutions are saturated/supersaturated with respect to ‘amorphous sepiolite’. Two trends can be detected: (i) from 0 to 11.5 cm in depth, pore waters align along a vertical trend, i.e. at a constant  $a(\text{H}_4\text{SiO}_4)$ , located between the solubility lines of quartz and amorphous silica (arrow 1 in Fig. 3); and (ii) from 11.5 to 84.8 cm, pore waters follow a trend parallel to the ‘amorphous sepiolite’ solubility line (arrow 2 in Fig. 3). Only one sample of pore water from the top of the sediments (0 to 1 cm) lies above the critical supersaturation line for homogeneous nucleation of Mg-silicates as defined by Tosca *et al.* (2011) and Tosca & Masterson (2014).

Saturations of solutions with respect to several carbonate phases are visualized in other diagrams, where the logarithms of  $a(\text{Ca}^{2+})$  or  $a(\text{Mg}^{2+})$  are plotted against the log of  $a(\text{CO}_3^{2-})$  (Fig. S3). These diagrams clearly show that lake and pore waters are supersaturated with respect to calcite and aragonite at all depths but only lake waters reach saturation with monohydrocalcite (MHC; Fig. S3a). The water column of Lake Alchichica is oversaturated at all depths with amorphous Mg carbonate (AMC), as defined by Fukushi & Matsumiya (2018) (Fig. S3b), and therefore with hydromagnesite as well. All pore waters except those between 8.5 cm and 23.5 cm, are saturated or supersaturated with hydromagnesite.

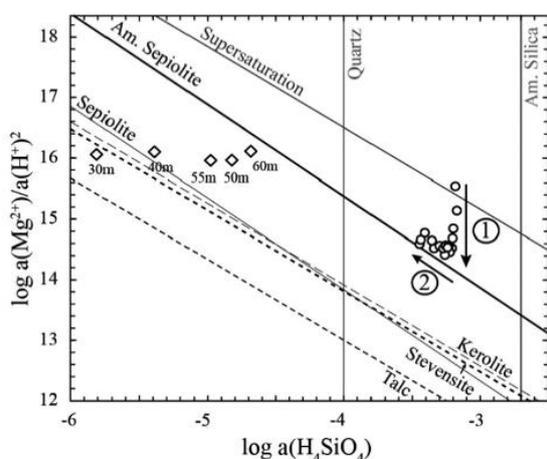


**Fig. 2.** Depth profiles of (A) pH, (B) dissolved inorganic carbon (DIC), (C) Ca, (D) Mg and (E) H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub> concentrations in mm along the water column (top part, diamonds) versus in pore water in the first 83 cm of sediments (bottom part, circles).

### Bulk mineralogy

X-ray diffraction analyses highlight that aragonite is the dominant mineral species in the sediments with an abundance varying between 40 wt.% and 80 wt.% (amorphous-free) as estimated by Rietveld (Figs 4 and S4; Table S1). Detrital silicate minerals (albite, bytownite, quartz and pigeonite) are also detected in all diffractograms, their total abundance varying from 15 to 48 wt.% (amorphous-free). The relative abundance of aragonite and detrital species is anticorrelated to some degree along the core, but other mineral phases exhibit key variations with depth. In particular, a substantial amount of hydromagnesite is identified in the first two

samples near the sediment surface (up to 15 wt.% in the top 3 cm of the core), but is absent at depth (<1 wt.%) except within a specific interval near 35 cm in depth where hydromagnesite is clearly detected (*ca* 8 wt.%) along with huntite (*ca* 11 wt.%), a trigonal carbonate phase of formula Mg<sub>3</sub>Ca(CO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>. Poorly crystalline magnesium silicates and opaline silica can also be detected by XRD (Fig. S1). The estimation of the intensity of the broad X-ray scattering signal related to silica reveals that it is most intense near the surface but significantly decreases within the sediment beneath, with the lowest signal near 35 cm. By contrast, the magnesium silicate, identified as a kerolite or a



**Fig. 3.** Solubility diagram in the  $\log[a(\text{Mg}^{2+})/a(\text{H}^+)^2] - \log a(\text{H}_4\text{SiO}_4)$  space determined at 25°C. Lake (diamond) and pore waters (dots) of Alchichica are plotted against the solubility lines of talc (Jones & Galan, 1988), stevensite (Chahi *et al.*, 1997), kerolite and sepiolite (Stoessel, 1988), amorphous sepiolite (Wollast *et al.*, 1968), quartz and amorphous silica (Truesdell & Jones, 1974). The ‘supersaturation’ line results from experiments conducted by Tosca *et al.* (2011) and Tosca & Masterson (2014), and relates to homogeneous nucleation of Mg-silicate phases from solution. The arrows 1 and 2 show the main trends followed by Alchichica sediment pore waters, respectively, between 0 cm and 11.5 cm and between 11.5 cm and 84.8 cm. Above 30 m in the lake waters, silica is below the detection limit and hence data are not represented in this diagram.

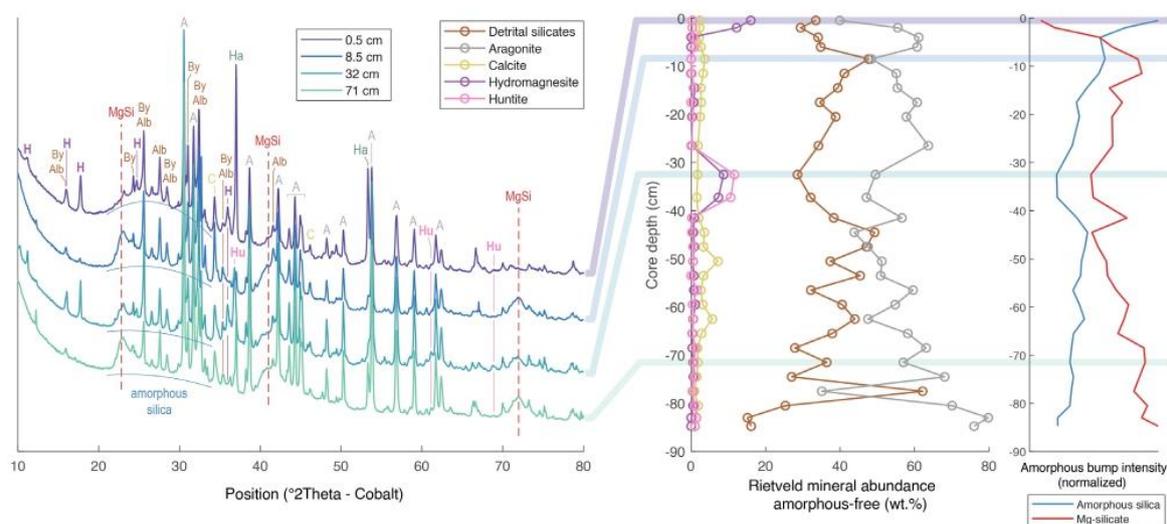
stevensite, based on broad diffraction peaks at 22.7°, 41.2° and 71.8° 2 $\theta$  angles (see Zeyen *et al.*, 2015, for more details about XRD identification), is not detected in the first two samples at the surface but clearly detected deeper down, with a low relative intensity near 35 cm. Other minor minerals are detected by XRD in all samples, such as calcite (average abundance of 2.6 wt.% as suggested by Rietveld), and halite, which likely formed when the samples containing Cl-rich pore waters were dried.

The FTIR analyses of the sediment samples show an evolution of their mineralogical composition with depth in perfect agreement with XRD analyses (Figs 5, S4 and S5). The aragonite signal is present in all samples at all depths (Fig. S5), as attested to by bands at 700, 713, 845, 855, 1083, 1464 and 1512  $\text{cm}^{-1}$  (Zeyen *et al.*, 2015). In surface sediment spectra (down to 10 cm), bands at 796, 1059 and 1230  $\text{cm}^{-1}$ , characteristic of

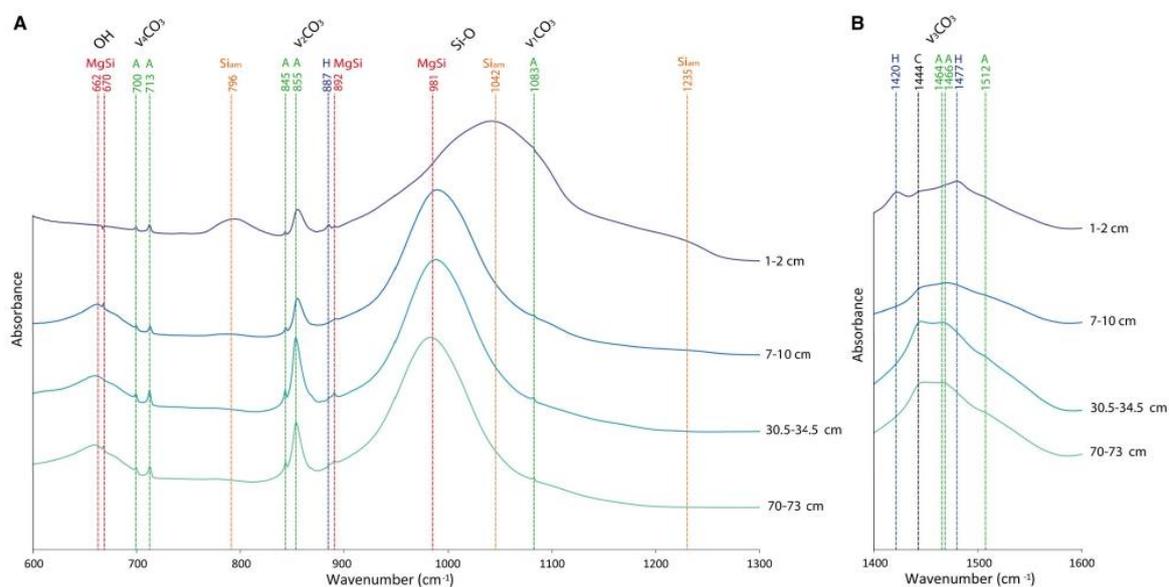
amorphous silica (d’Espinoze de la Caillerie *et al.*, 1995; Nied *et al.*, 2016), are detected as well as bands at 887, 1420 and 1477  $\text{cm}^{-1}$ , characteristic of hydromagnesite (Farmer, 1974). These bands disappear in deeper samples except for those at 37.3 cm depth. By contrast, Mg-silicates (for example, kerolite or stevensite) are absent in surface samples but detected in FTIR spectra of all sediments deeper than 10 cm as shown by the presence of OH absorption bands at 662 and 670  $\text{cm}^{-1}$  (Tosca & Masterson, 2014), a Si–OH stretching band at 892  $\text{cm}^{-1}$  and a Si–O stretching band at 981  $\text{cm}^{-1}$  (Zeyen *et al.*, 2015). Only the sediment samples at 34.5 to 40.0 cm in depth appeared anomalous in that trend: in particular it notably shows the reappearance of hydromagnesite as attested to by the bands at 887 and 1420  $\text{cm}^{-1}$ , but also the presence of huntite as attested to by the bands at 870, 878, 891, 1442, 1511 and 1551  $\text{cm}^{-1}$  (Kangal *et al.*, 2005; Hollingbery & Hull, 2012).

Observations by SEM and EDXS analyses of eight samples also confirm the evolution of the mineralogical composition of the sediments with depth in total agreement with FTIR and XRD data. SEM-EDXS analyses show that the sediments contain abundant fine-grained Ca-carbonates chemically consistent with aragonite at all depths. By contrast, Mg-rich non-silicate minerals (containing Mg, O and C only) are detected only in the first 10 cm of sediments and at 34.5 to 40.0 cm and likely correspond to hydromagnesite as supported by XRD and FTIR analyses (Fig. 6). A Ca-rich and Mg-rich mineral interpreted as huntite based on a Mg/Ca ratio of about three is locally observed in samples C2a-05 (7 to 10 cm), C2a-10 (34.5 to 40.0 cm), C2a-11 (40 to 43 cm) and C2b-12 (43 to 46 cm). Huntite grains are relatively small, measuring less than 20  $\mu\text{m}$  in size. Regarding Si-rich mineral phases, various grains are best interpreted as detrital minerals. The stoichiometry of these grains together with XRD analyses allowed to identify them as alkaline feldspars and quartz (Table S2). Other detrital minerals rich in Mg, Al, Si and K show elemental Si/Al and Mg/Al ratios consistent with olivine and pyroxenes (Table S2). Last, SEM images show that diatom frustules are very abundant in the sediments at all depths, most of them are broken (and potentially degraded during sample preparation) but show a nicely preserved fine ultrastructure with, for example, visible nanopores (Figs 6 to 8). However, notable chemical differences are observed, depending on depth in the sediments. In the first 10 cm, the

## Stevensite authigenesis in Lake Alchichica 11



**Fig. 4.** X-ray diffraction analyses of Alchichica sediment core samples. (Left panel) Selected diffraction patterns (at 0.5, 8.5, 32.5 cm and 71.5 cm depth) highlighting the key crystalline mineral assemblages used for Rietveld refinement analysis (A: aragonite, Alb: albite, By: bytownite, H: hydromagnesite, Hu: huntite, Ha: halite, C: calcite, see Fig. S4 for all patterns), along with the broad diffraction signals of poorly crystalline magnesium silicate (MgSi, kerolite or stevensite) and amorphous silica. (Middle panel) Estimated crystalline mineral relative abundances and (Right panel) relative intensity of XRD signals affiliated to poorly crystalline phases (see also Fig. S1) in the core with depth.

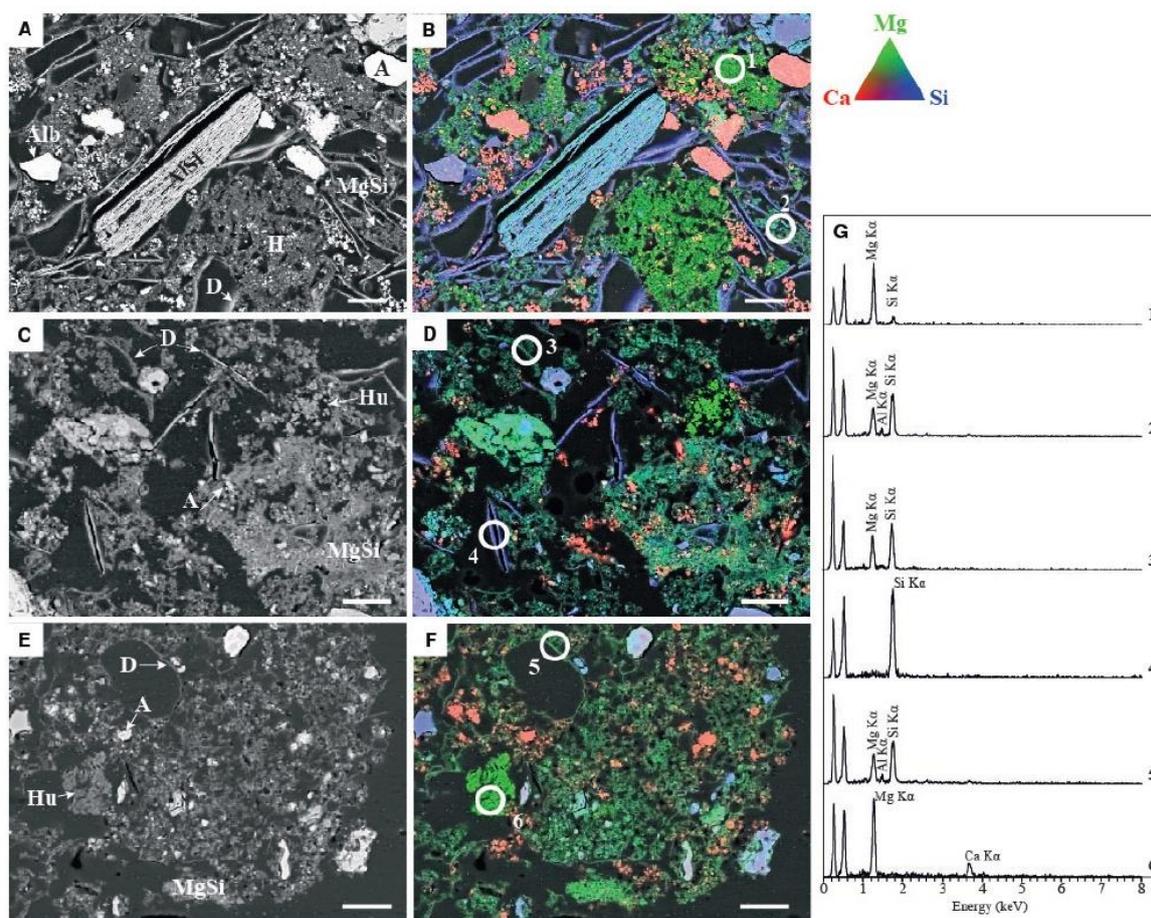


**Fig. 5.** Selected Fourier transform infrared (FTIR) spectra of Alchichica sediment samples (at increasing depth from top to bottom, same depths as those shown in Fig. 4). (A) Spectra in the 600 to 1300  $\text{cm}^{-1}$  wavenumber range. (B) Spectra of the same samples from 1400 to 1600  $\text{cm}^{-1}$ . The dashed lines show characteristic bands of silicates [red for authigenic magnesium silicates (MgSi), orange for amorphous silicates (Siam)] and carbonates [green for aragonite (A), black for calcite (C), blue for hydromagnesite (H)] in the samples.

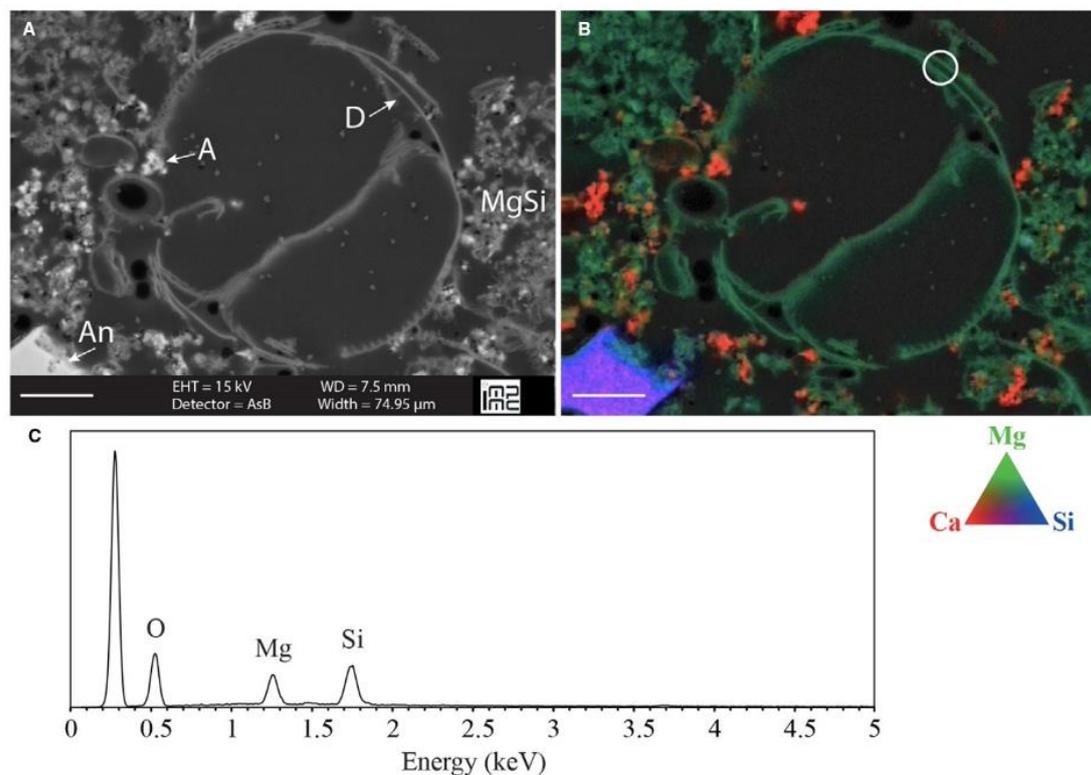
12 *E. Muller et al.*

frustules are composed of silica. Morphologically well-preserved frustules become less abundant below 10 cm depth and the silica composing them gradually transforms to a poorly crystalline Mg-silicate phase, as shown by SEM-EDXS and TEM-EDXS as well as SAED (Figs 6, 7 and 8). Despite this chemical/mineralogical transformation, the ultrastructure sometimes remains finely preserved, showing that

this mineralogical transformation is pseudomorphic. The average Mg/Si ratio of this phase as analysed by EDXS is  $0.74 \pm 0.18$  ( $n = 12$ ), which is consistent with kerolite  $[\text{Mg}_3\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]$  and stevensite  $[(\text{Ca}, \text{Na})_x\text{Mg}_{3-x}(\text{Si}_4\text{O}_{10})(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}]$ . The stoichiometry estimated more precisely as  $\text{Na}_{0.12}\text{K}_{0.009}\text{Ca}_{0.31}\text{Fe}_{0.2}\text{Al}_{0.15}\text{Mg}_{2.65}\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  is more consistent with Al-poor stevensite ( $\text{Al} = 0.19 \pm 0.26$  at.%,  $n = 12$ ).



**Fig. 6.** Evolution of the sediment mineralogy with depth. Backscattered electron (BSE) images (left) and corresponding energy dispersive X-ray spectrometry (EDXS) maps (right) of Mg (green), Ca (red) and Si (blue) at 1 to 3 cm (A) and (B), 7 to 10 cm (C) and (D), and 34.5 to 40.0 cm depth in the sediment core (E) and (F). (G) EDXS spectra of areas circled in white. On the chemical composition maps, aragonite appears in red, silica in blue, huntite and hydromagnesite in light green and Mg-silicates in dark green. Hydromagnesite is mainly observed at 1 to 3 cm (spectrum 1), whereas huntite is only detected at 7 to 10 cm and 34.5 to 40.0 cm (spectrum 6). Mg-silicates with very low amount of Al ( $0.19 \pm 0.26$  wt.% in average,  $n = 12$ ) are detected in all of the samples (spectrum 2). Diatoms are progressively transformed into Mg-silicate. At 1 to 3 cm depth, they are mostly composed of silica, whereas at 7 to 10 cm depth, some are transformed into Mg-silicates (spectrum 3) while others are not (spectrum 4). Then, at 34.5 to 40.0 cm depth, all diatoms are replaced by Mg-silicates (spectrum 5). Scale bars correspond to 20  $\mu\text{m}$ . H: hydromagnesite; MgSi: Mg-silicate; D: diatom; A: aragonite; Hu: huntite; AlSi: detrital Al-silicate (containing Al, Si, Fe, K, Na and Mg).



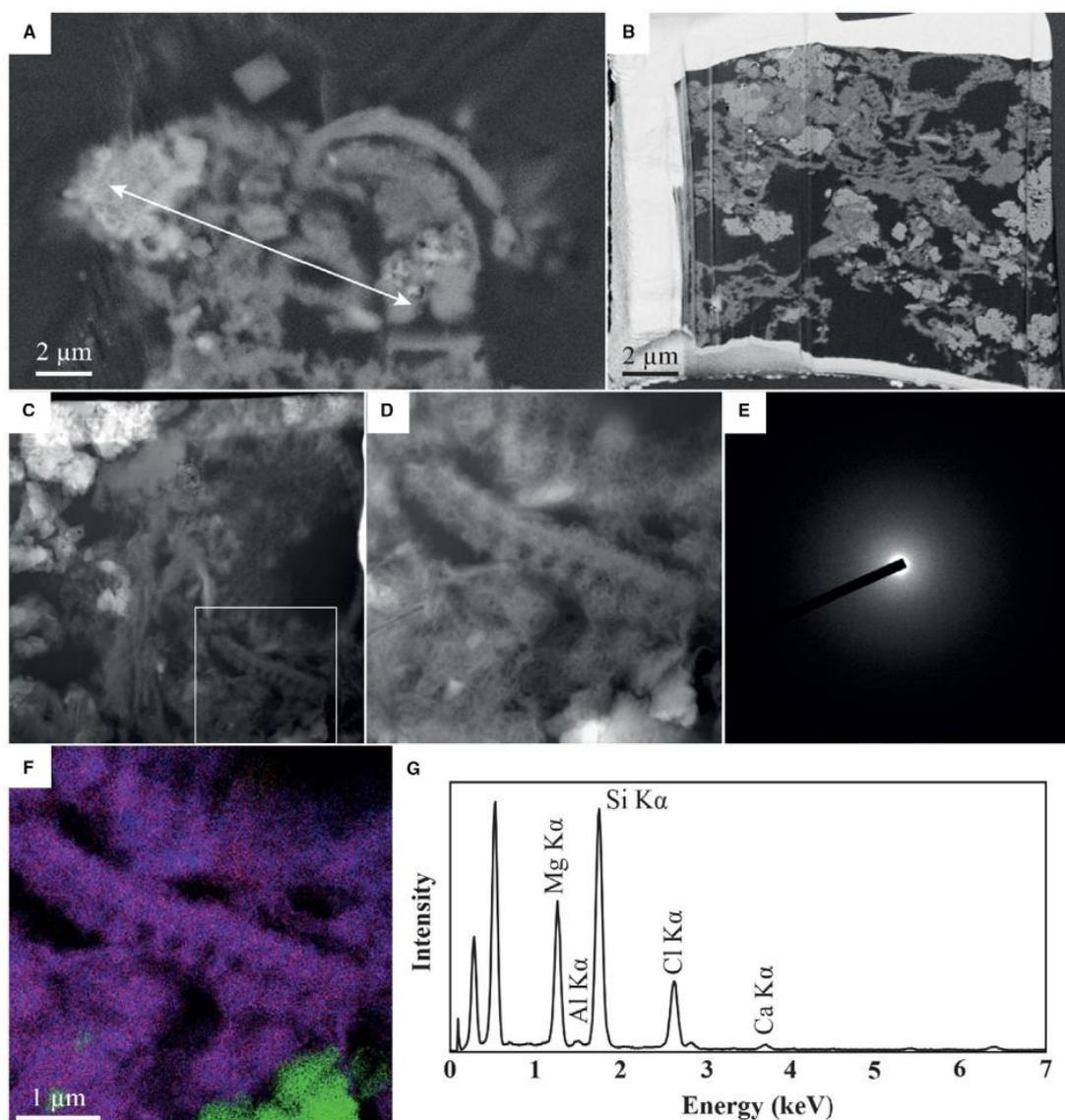
**Fig. 7.** Remnants of diatom frustule composed of Mg-silicates at a 41.5 cm depth in the sediment core. (A) Backscattered electron (BSE) image, (B) corresponding energy dispersive X-ray spectrometry (EDXS) map of Mg (green), Ca (red) and Si (blue) and (C) EDXS spectra of the zone highlighted by a white circle. On the chemical composition map, aragonite appears in red, Mg-silicates in dark green and anorthite in pink-blue (at bottom left corner). Scale bars correspond to 10  $\mu\text{m}$ . An: anorthite, A: aragonite, D: diatom, MgSi: Mg-silicate.

Some grains of this phase are also observed away of the diatoms and not just replacing them. In a few cases, Al-containing Mg-silicates were detected but mostly in the vicinity of detrital grains in Lake Alchichica sediments ( $\text{Al} = 2.41 \pm 0.85 \text{ at.}\%$ ,  $n = 20$ ; Fig. S6). In the literature, up to 1 wt.% of Al is commonly reported in sepiolite, kerolite and stevensite (e.g. Stoessell, 1988; Capet, 1990), sometimes reaching up to 5 wt.% (e.g. Rhouta *et al.* 2008, and references therein).

#### Bulk chemistry of the sediment solid phases

The bulk chemical composition of the sediments mostly consists of silicon, calcium, magnesium and aluminium (Table 2). Titanium content shows a strong positive correlation with aluminium with a y-intercept of about 0 in all

sediments interpreted as a result of the shared detrital origin of these two elements (Fig. 9B).  $\text{SiO}_2$  and  $\text{Al}_2\text{O}_3$  also correlate positively for most of the samples suggesting that Al is mostly found in silicates (Fig. 9A). However, since  $[\text{SiO}_2] = 25.78 \text{ wt.}\%$  when  $[\text{Al}_2\text{O}_3] = 0$ , phases other than detritic Al-containing silicates contribute massively to the total concentration of silica in the sediments. Based on all mineralogical analyses shown above, the authors suggest that those phases are the amorphous silica of diatoms and/or authigenic Mg-silicates, depending on the depth in the core. Moreover, Fig. 9 suggests that the top sediments (from 0 to 11.5 cm) are enriched in non-detrital silica, possibly due to the accumulation of diatoms, whereas samples at 37.3 cm and 71.5 cm are depleted in non-detrital silica, in agreement with FTIR and XRD data.

14 *E. Muller et al.*

**Fig. 8.** Scanning transmission electron microscopy (STEM) analyses of a diatom pseudomorphosed into Mg-silicates. (A) SEM image showing sediment particles collected at 16 to 19 cm and embedded in resin. The white line indicates where the focused ion beam (FIB) section was excavated. (B) Image of the FIB foil. Aragonite appears in bright and Mg-silicates in grey. (C) STEM image in high-angle annular dark field mode (HAADF) showing sediment particles. (D) Zoom showing a diatom fragment with a fibrous texture. (E) Electron diffraction pattern measured on the diatom fragment, indicating that it is amorphous. (F) Overlay of magnesium (red), silicon (blue) and calcium (green) elemental maps as measured by energy dispersive X-ray spectrometry (EDXS). (G) EDXS spectrum obtained on the diatom fragment showing major Mg and Si peaks. Cl is attributed to resin. A small Al peak can be observed.

The semi-quantitative evolution of the mineral composition with depth was assessed based on bulk chemical analyses of the

sediments and relying on XRD and FTIR analyses (Fig. 10; Table S3). The feldspars (albite and bytownite) and aragonite contents are

## Stevensite authigenesis in Lake Alchichica 15

**Table 2.** Elemental composition of the sediments determined by inductively coupled plasma – atomic emission spectroscopy (ICP–AES) in wt.%. LOI (loss on ignition) refers to the mass difference before and after ignition and represents the amount of water, organic carbon and volatile elements contained in the sediment.

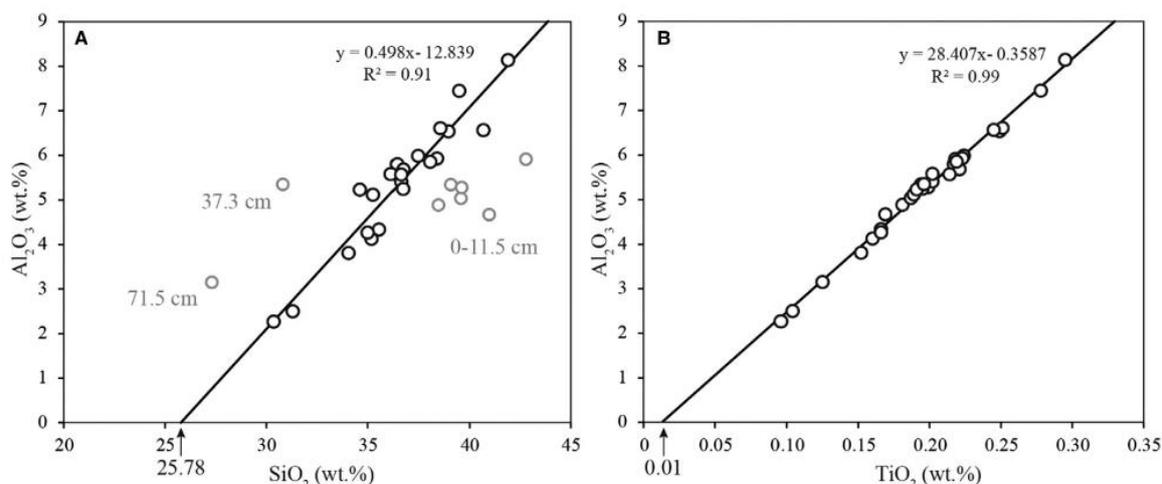
	Depth (cm)	SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	MgO	CaO	Na <sub>2</sub> O	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> O	TiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	MnO	LOI	Total
AL19_C2a_0.5cm	0–1	40.97	4.67	6.34	8.35	5.01	1.81	1.09	0.17	0.21	0.04	31.9	100.5
AL19_C2a_2cm	1–3	38.47	4.89	7.14	12.12	2.88	1.87	0.94	0.18	0.18	0.05	31.3	100.0
AL19_C2a_4cm	3–5	39.57	5.04	8.15	12.24	3.01	1.87	0.95	0.19	0.17	0.05	28.9	100.1
AL19_C2a_6cm	5–7	39.08	5.34	8.60	12.71	2.96	1.88	0.98	0.19	0.16	0.05	28.1	100.1
AL19_C2a_8.5cm	7–10	42.78	5.92	10.28	9.62	2.94	2.02	1.04	0.22	0.16	0.06	24.4	99.4
AL19_C2a_11.5cm	10–13	39.61	5.28	10.68	10.74	2.53	1.88	0.90	0.20	0.15	0.05	27.6	99.6
AL19_C2a_14.5cm	13–16	36.63	5.41	9.06	13.55	2.83	1.83	0.93	0.20	0.14	0.05	29.2	99.8
AL19_C2a_17.5cm	16–19	36.73	5.25	9.81	14.31	2.63	1.74	0.90	0.20	0.14	0.05	20.1	99.9
AL19_C2a_20.5cm	19–22	37.46	5.99	9.12	14.39	2.95	1.89	1.01	0.22	0.15	0.06	26.8	100.1
AL19_C2a_23.5cm	22–25	36.44	5.80	9.42	14.87	2.57	1.86	0.95	0.22	0.15	0.06	27.3	99.6
AL19_C2a_26.5cm	25–28	36.13	5.58	9.68	14.19	2.62	1.75	0.93	0.20	0.13	0.05	29.1	100.4
AL19_C2a_29.3cm	28–30.5	35.26	5.12	10.53	15.49	2.55	1.69	0.84	0.19	0.15	0.05	28.0	99.8
AL19_C2a_32.5cm	30.5–34.5	34.61	5.23	10.35	15.13	3.10	1.72	0.89	0.19	0.13	0.05	28.5	99.9
AL19_C2a_37.3cm	34.5–40	30.81	5.35	11.90	16.28	2.02	1.69	0.84	0.20	0.14	0.05	30.6	99.9
AL19_C2a_41.5cm	40–43	38.40	5.93	10.49	14.11	2.34	1.90	0.94	0.22	0.15	0.06	25.1	99.6
AL19_C2b_44.5cm	43–46	41.90	8.14	7.69	12.79	2.65	2.45	1.29	0.30	0.16	0.06	22.3	99.7
AL19_C2b_47.5cm	46–49	39.49	7.45	7.76	13.00	3.35	2.30	1.23	0.28	0.15	0.06	24.6	99.7
AL19_C2b_50.5cm	49–52	38.96	6.54	9.09	14.22	2.46	2.13	1.05	0.25	0.16	0.06	24.6	99.5
AL19_C2b_53.5cm	52–55	38.56	6.61	8.62	12.95	3.33	2.17	1.11	0.25	0.15	0.05	25.4	99.2
AL19_C2b_56.5cm	55–58	36.74	5.68	9.75	14.40	2.91	1.95	0.95	0.22	0.16	0.05	27.1	99.9
AL19_C2b_59.5cm	58–61	36.63	5.57	9.44	11.92	2.94	1.91	0.94	0.21	0.14	0.05	29.4	99.1
AL19_C2b_62.5cm	61–64	40.69	6.56	9.60	12.60	2.59	2.15	1.07	0.25	0.14	0.05	24.5	100.2
AL19_C2b_65.5cm	64–67	38.06	5.85	9.68	12.71	3.24	1.97	1.01	0.22	0.13	0.05	26.7	99.6
AL19_C2b_68.5cm	67–70	35.56	4.34	11.40	14.08	2.64	1.61	0.75	0.17	0.15	0.05	28.9	99.6
AL19_C2b_71.5cm	70–73	27.31	3.15	8.99	10.68	2.88	1.26	0.63	0.13	0.10	0.03	45.4	100.5
AL19_C2b_74.5cm	73–76	35.19	4.13	11.36	15.61	2.19	1.59	0.69	0.16	0.15	0.05	28.8	99.9
AL19_C2b_77.5cm	76–79	35.00	4.27	11.08	13.51	3.22	1.59	0.78	0.17	0.13	0.05	30.2	100.0
AL19_C2b_80.5cm	79–82	34.05	3.81	11.60	15.75	2.18	1.49	0.64	0.15	0.14	0.05	30.5	100.3
AL19_C2b_83cm	82–84	31.30	2.50	12.65	17.89	2.03	1.11	0.46	0.10	0.14	0.04	32.3	100.5
AL19_C2b_84.8cm	84–85.5	30.36	2.27	12.35	15.88	3.05	1.02	0.51	0.10	0.12	0.04	33.7	99.3

relatively constant along the core, between 40 wt.% and 60 wt.%. The uppermost sediments (0 to 3 cm) also show more than 30 wt.% of amorphous silica and 20 wt.% of hydromagnesite. Then, amorphous silica decreases with depth down to 3 wt.% on average, while Mg-silicates accumulate to reach up to 40 wt.% on average. Because hydromagnesite is not detected by XRD (Fig. S4), FTIR (Fig. S5) or SEM (Fig. 6) below 3 cm in depth, it is no longer considered in the calculations. Between 30 cm and 40 cm in depth, sediments are devoid of silica. Concurrently, between 35 cm and 40 cm, they show a lower Mg-silicates content (34 wt.%) and a relatively high amount of Mg carbonates (10 wt.% of huntite and hydromagnesite).

## DISCUSSION

### Massive formation of Mg-silicates in the sediments of Lake Alchichica

The uppermost sediments (0 to 3 cm) are dominated by hydromagnesite, aragonite, diatom frustules which settled down the water column, detrital alkaline feldspars and quartz inherited from the erosion of the surrounding volcanic rocks (Figs 10 and 11). The presence of aragonite and hydromagnesite in the first centimetres of sediment suggests that they precipitated in the water column or at the sediment–water interface, where solutions are oversaturated with all calcium and magnesium carbonate phases, including their potential precursors, i.e.

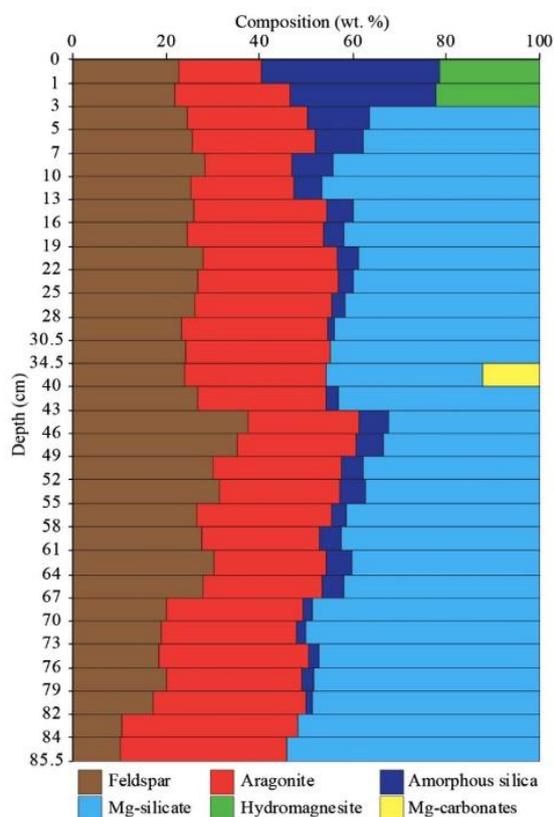
16 *E. Muller et al.*

**Fig. 9.** Correlation between bulk concentrations of: (A)  $\text{Al}_2\text{O}_3$  and  $\text{SiO}_2$ ; and (B)  $\text{Al}_2\text{O}_3$  and  $\text{TiO}_2$  in the sediments of Alchichica. Symbolized by grey dots, the top sediments (from 0 to 11.5 cm) are enriched in non-detrital silica possibly due to the accumulation of diatoms, whereas samples at 37.3 cm and 71.5 cm are depleted in non-detrital silica, in agreement with FTIR and XRD data.

amorphous phases (Zeyen *et al.*, 2021). This is also consistent with the fact that these phases are found in shallow microbialites populating Lake Alchichica (Zeyen *et al.*, 2021). However, below *ca* 3 cm depth, hydromagnesite rapidly disappears, and diatom frustules are progressively replaced by Al-poor Mg-silicates with a composition corresponding to stevensite, as evidenced by SEM-EDXS and STEM (Figs 6 to 8). These Mg-silicates then rapidly become a dominant phase detected by XRD, FTIR and SEM-EDXS (Figs 4 to 6), and represent between 30 wt.% and 53 wt.% of the sediment content at all depths below *ca* 3 cm, as calculated from the bulk chemistry and relying on FTIR and XRD results (Fig. 10). Thereafter, the authors explain how this massive amount of Mg-silicates results from a diagenetic process occurring within the sediments and not past variations of the nature of the mineral phases settling down in the water column.

Large amounts of authigenic Mg-silicates in modern environments are rarely described in the literature. Badaut & Risacher (1983), and more recently Bentz & Peterson (2020), reported authigenesis of Mg-silicates from diatom frustules (from 25 to 100% of the total diatom content) in the sediments of Bolivian salars. High amounts of Mg-silicates (*ca* 296  $\mu\text{mol Si g}^{-1}$  sediments) were also described in the Amazon delta

sediments (Michalopoulos & Aller, 1995, 2004) and in Lake Dziani Dzaha (Mayotte), including Al-poor Mg-silicate associated with shallow microbialites and up to 20 wt.% of Mg-saponite in the sediments (Gérard *et al.*, 2018; Milesi *et al.*, 2019, 2020). Interestingly, the high proportion of Mg-silicates in Lake Alchichica sediments contrasts with the absence of authigenic Mg-silicates in Alchichica shallow microbialites (Zeyen *et al.*, 2019). Zeyen *et al.* (2021) systematically assessed the presence/absence of authigenic Mg-silicates in microbialites from 10 Mexican alkaline crater lakes. They showed that microbialites from most lakes contained Mg-silicates except those in Lake Alchichica. Those authors suggested that this difference may result from the very low orthosilicic acid concentration in Lake Alchichica ( $64 \pm 94 \mu\text{M}$ ) compared with other lakes (for example, 1.10 mM and 0.58 mM in Lakes Atexcac and La Preciosa, respectively; Zeyen *et al.*, 2021), and therefore that water was not saturated enough to allow spontaneous precipitation. They also speculated about the potential causes for a lower acid orthosilicic acid concentration in the water column of Lake Alchichica, mentioning variations in the nature of the weathered protolith and the active extraction of orthosilicic acid by diatoms, similar to what has been shown in oceans (Conley *et al.*, 2017). As explained thereafter, the formation of



**Fig. 10.** Estimated mineral content of the sediment (wt. %) as function of depth based on bulk chemical analyses. Mineral stoichiometry used for the quantification of mineral phases is given in Table S3.

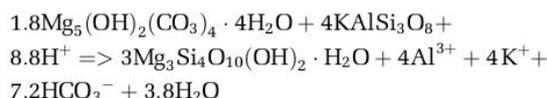
Mg-silicates in Lake Alchichica sediments results from a diagenetic process which locally increases the orthosilicic acid concentrations highly enough to allow the precipitation of these phases. The source of the orthosilicic acid is discussed in the next section.

### Geochemical processes involved in the formation of Mg-silicates

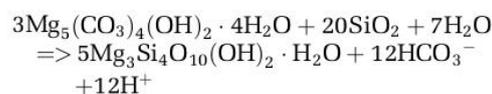
This section discusses the processes that may explain the evolution at depth of the mineralogical composition of Lake Alchichica sediments, i.e. the correlated disappearance of Mg-carbonates and amorphous silica and appearance of Mg-silicates. In the sediments of Lake Alchichica, the formation of Mg-silicates may result from three different mechanisms providing alternate Mg and/or Si sources:

#### Stevensite authigenesis in Lake Alchichica 17

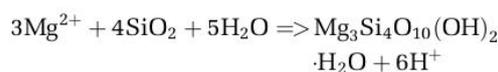
**1** A reaction between detrital silicates as the main source of Si and hydromagnesite as the source of Mg, along the same mechanism as that mentioned by Milesi *et al.* (2019) for the sediments of Lake Dziani Dzaha (Mayotte), and following the equation:



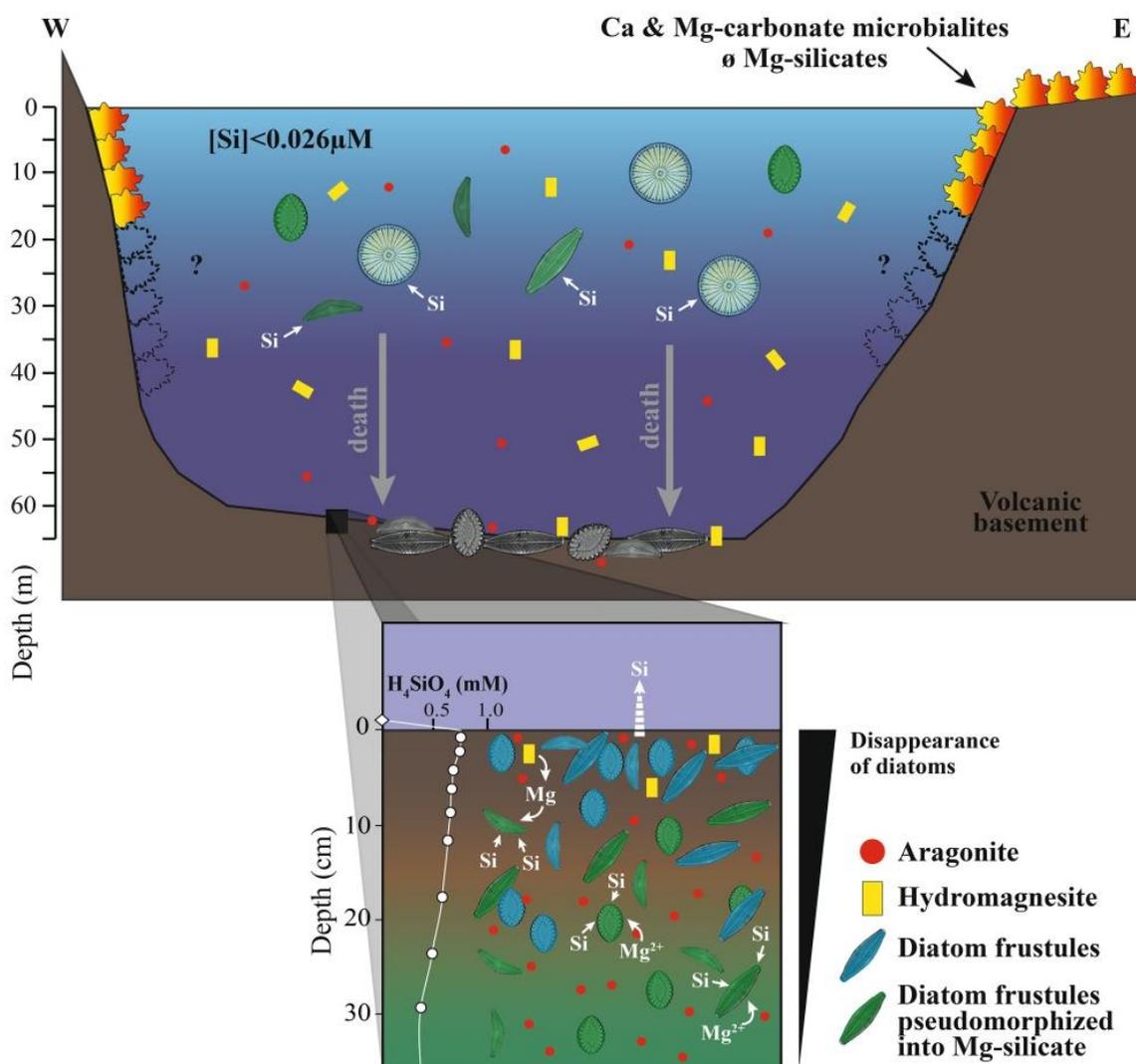
**2** A reaction between diatom frustules as the main source of Si and hydromagnesite as the source of Mg:



**3** The same reaction as in (2) with aqueous  $\text{Mg}^{2+}$  from pore water instead of hydromagnesite:



Detrital silicates, which represent 12 to 39 wt.% of the sediment content, could be a source of silica for the formation of Mg-silicates similar to those in Lake Dziani Dzaha. In Dziani Dzaha, the diagenetic Mg-silicates contain significant amounts of Al (3.65 wt.% on average; Milesi *et al.*, 2019). Accordingly, some Al-containing Mg-silicates were observed. However, they were rare and mostly spatially associated with altered detrital silicate phases (Figs 6 and S6). By contrast, diatom frustules appear as a more likely source of  $\text{SiO}_2$  involved in the diagenetic formation of Mg-silicates in Lake Alchichica sediments. First, they are abundant enough (around 35 wt.% of the uppermost sediments) to provide all of the Si necessary for the formation of the Mg-silicates detected in the sediments. Second, there is very good correlation between the disappearance of the FTIR bands of amorphous silica and the concomitant appearance of silicates bands below 10 cm (Fig. 5). Last, SEM and TEM analyses showed a massive pseudomorphic replacement of the amorphous silica composing diatoms by Mg-silicates, providing direct images of this diagenetic process (Figs 7 and 8). It can be noted that some Mg-silicate grains do not form as pseudomorphic replacements of diatoms but likely precipitate in the

18 *E. Muller et al.*

**Fig. 11.** Summarizing sketch of the mineralogical evolution of the first centimetres of sediments in Lake Alchichica compared to that of the shallow microbialites populating lake waters. In Lake Alchichica, microbialites form at low concentrations of  $H_4SiO_4$  in the lake because the living diatoms are an active  $SiO_2$  sink. They are mainly composed of aragonite (in red) and hydromagnesite (in yellow). In contrast, in the sediments, hydromagnesite rapidly disappears and diatom frustules (in blue) are progressively pseudomorphized into Al-poor Mg-silicates, which become a dominant phase (in green). Therefore, the authigenesis of Mg-silicates in the sediments is mainly controlled by the spontaneous dissolution of diatom frustules which reduces the diffusion rate of  $H_4SiO_4$  from the sediments to the water column.

pore water containing high orthosilicic acid concentrations dissolved from diatoms. Authigenesis of Mg-silicates on diatom frustules was previously observed in the sediments of Bolivian saline lakes (Badaut *et al.*, 1979; Hoffert, 1980; Badaut & Risacher, 1983; Bentz &

Peterson, 2020) and marine settings (Michalopoulos & Aller, 2004). The pseudomorphic replacement of the amorphous silica of diatoms by Mg-silicates was also observed occasionally in some microbialites (e.g. Zeyen *et al.*, 2021) but this did not produce the massive amounts

of Mg-silicates as observed in Lake Alchichica sediments.

In cases where diatoms are replaced by Mg-silicates, two sources of Mg can contribute to this process: hydromagnesite and/or dissolved  $Mg^{2+}$ . In Lake Alchichica sediments, hydromagnesite disappears below the first 3 cm of sediments, possibly entirely consumed by reaction (2). Using chemical and mineralogical data, the authors calculated that the 20 wt.% of hydromagnesite present in the uppermost sediments (at 0 to 3 cm depth) represent 0.17 mmol of  $Mg\ g^{-1}$  sediment. However, 42 wt.% of Mg-silicates are formed along the core, which represent 0.24 mmol of  $Mg\ g^{-1}$  sediment on average (at 41 to 85 cm;  $n = 16$ ). Therefore, some dissolved  $Mg^{2+}$  may also contribute to the formation of Mg-silicates by reaction (3). In addition, between 30 cm and 40 cm depth, hydromagnesite is not totally consumed. Therefore, it is suggested that a lower input of diatoms to the sediments from this depth, at the time they settled down, limited the reaction of Mg-silicates formation, preserving some hydromagnesite. Overall, this suggests that the amount of amorphous silica provided by the diatom frustules (and therefore the ecological dynamics of diatom populations in the lake) is one major control of the extent of Mg-silicates authigenesis in Lake Alchichica sediments.

#### Geochemical conditions necessary for the authigenesis of Mg-silicates in sediments

While the replacement of amorphous silica by Mg-silicates is massive in Lake Alchichica sediments, and possibly other lakes, it does not obviously occur in all lakes. This work discusses the conditions necessary for this process to take place. For this purpose, the chemical composition of the pore water is helpful. Pore waters in the first 10 cm of the sediments had a constant orthosilicic acid activity (Fig. 3), around  $661 \pm 24$  on average, suggesting a potential control by the solubility of a silica phase that would have a  $\log(Ks)$  of  $-3.18$  ( $\log(Ks) = \log(a[H_4SiO_4])$ ; Fig. S7). This value is consistent with what is known for the solubility of diatom silica. Indeed, the solubility constant of diatom frustules is known to be variable and a function of the physicochemical properties of the solid material (for example, degree of condensation and order of the silica framework, water and impurity contents, specific surface area; Willey, 1980; Hurd & Birdwhistell, 1983; Beck *et al.*,

#### Stevensite authigenesis in Lake Alchichica 19

2002; Dixit & Van Cappellen, 2002; Gehlen & Van Raaphorst, 2002; Loucaides *et al.*, 2012a) and of the surrounding solution (for example, temperature, salinity, pressure; Loucaides *et al.*, 2012b). As a result, it likely varies substantially between different diatom species. Overall, it has been shown that diatomaceous silica solubilities exhibit a large variability from 200 to 1600  $\mu M$  in seawater [ $\log(Ks)$  between  $-3.70$  and  $-2.79$ ; Loucaides *et al.*, 2012a,b, and references therein]. Badaut & Risacher (1983) observed similar solubilities in continental saline lakes around  $-3$ . Therefore, the  $\log(Ks)$  of  $-3.18$  tentatively inferred from the chemical measurements in the pore water of Lake Alchichica is consistent with an equilibrium of pore waters with the amorphous silica phase composing the abundant diatoms of the sediments.

Below 11.5 cm in the sediment depth, the activity of orthosilicic acid is no longer constant, which is consistent with the observed disappearance of silica in the solid by, for example, FTIR. However, the  $\log[a(Mg^{2+})/a(H^+)^2]/\log[a(H_4SiO_4)]$  becomes constant (see trend 2 in Fig. 3), i.e. in a  $\log[a(Mg^{2+})/a(H^+)^2]$  versus  $\log[a(H_4SiO_4)]$  graph, pore waters become aligned along a trend parallel to the solubility line of the 'amorphous sepiolite' defined by Wollast *et al.* (1968) at 25°C (with a  $\log(Ks)$  of 18.78). The  $\log(Ks)$  inferred for the Mg-silicate phase observed in Alchichica sediments at 15°C is 19.26 (Fig. S7). This strongly suggests that below 11.5 cm depth, a Mg-silicate phase with this solubility controls the activities of protons,  $Mg^{2+}$  and orthosilicic acids in the pore water. This is again in agreement with the fact that such a phase becomes a dominant Si and Mg-bearing phase in the sediments at these depths. This also answers the question of the geochemical conditions necessary for the formation of Mg-silicates in sediments: the ionic product of the solution should be higher or equal to the solubility of a Mg-silicate phase close to that of 'amorphous sepiolite'.

Tosca *et al.* (2011) suggested that a much higher saturation of the solution was needed so that precipitation could spontaneously occur. According to those authors, the different solubility constants obtained by their study versus that by Wollast *et al.* (1968) were related to the source of Si used in their experiments (i.e. respectively sodium metasilicate nonahydrate versus tetraethyl orthosilicate). Here, the observations point to a phase less soluble than that formed in the Tosca *et al.* (2011) experiments.

However, the critical supersaturation line defined by these authors refers to the conditions allowing homogeneous nucleation of Mg-silicates. In Alchichica sediments, the replacement of the diatom frustules by Mg-silicates likely involves heterogeneous nucleation, which is known to occur at lower saturations than homogenous nucleation. Therefore, this may explain why the solubility of the Mg-silicate phase formed in the sediments of Lake Alchichica is lower than that determined by Tosca *et al.* (2011) and closer to that of the 'amorphous sepiolite' defined by Wollast *et al.* (1968). In any case, the authors suggest that the solubility constant determined here should be considered when modelling the formation of Mg-silicates in a natural environment.

Now that the geochemical conditions necessary for the formation of Mg-silicates have been better assessed, some other observations can be understood. First, despite oversaturation relative to the reported solubilities of Mg-silicate phases such as kerolite, stevensite, talc and sepiolite below 30 m depth, the whole water column of Lake Alchichica remains undersaturated with 'amorphous sepiolite'. This explains why no Mg-silicate was observed in the mineral assemblage of the uppermost sediments, suggesting that they do not precipitate from the lake water. Second, pore waters in Lake Dziani Dzaha sediments were undersaturated with 'amorphous sepiolite' at almost all depths, explaining why Al-poor Mg-silicates could not form there and therefore were not observed (Fig. S7). One reason why the saturation in Lake Dziani sediments might be lower than in Lake Alchichica and Bolivian saline lakes sediments (Badaut & Risacher, 1983) may relate to the low abundance of diatoms in the water column of this lake (Gérard *et al.*, 2018). However, Mg-silicates detected in the sediments of Lake Dziani Dzaha were rich in Al (Milesi *et al.*, 2019) in contrast to those observed in Alchichica sediments. Al-rich Mg-silicates have a lower solubility (Milesi *et al.*, 2020), explaining why those phases may form in Lake Dziani Dzaha sediments.

In Lake Dziani Dzaha, the formation of Mg-silicates from detrital silicates by reaction (1) consumes protons and can therefore be driven by a pH decrease. Milesi *et al.* (2019, 2020) proposed that oxidation of organic matter and input of volcanic CO<sub>2</sub> tend to decrease the pH of pore waters, which promotes destabilization of hydromagnesite and ultimately allows Mg supply for the formation of saponite. In Lake

Alchichica sediments, the decrease of pH from 9.25 to 8.46 and the DIC increase from 34.1 to 43.2 mM may also reflect oxidation of organic matter and/or input of volcanic CO<sub>2</sub>. However, reactions (2) and (3) based on diatom transformation produce protons instead of consuming them. Therefore, these reactions are encouraged by a pH increase, provided that concentrations of Mg and Si are high enough to reach the supersaturation with respect to Mg-silicates precursors, i.e. 'amorphous sepiolite'. Thus, it is suggested here that, in Alchichica sediments, the spontaneous dissolution of the diatom frustules and not organic matter mineralization drives Mg-silicates authigenesis.

### Some implications of massive authigenesis of Mg-silicates

Three possible geochemical implications associated with the massive authigenesis of Mg-silicates in Lake Alchichica sediments can be noted.

First, the precipitation of Mg-silicates in Alchichica sediments imposes lower dissolved H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub> concentrations in pore waters than if they were in equilibrium with the silica of diatoms (such as in the top 10 cm of sediment, Fig. 3). Therefore, it is suggested that the H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub> concentration gradient between the sediments and the water column is also lower, decreasing the diffusion rate of this species from the sediments to the water column. Accordingly, although the H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub> concentration increases with lake water depth from below the detection limit to 0.026 mM at 60 m depth and 0.084 mM at the sediment interface, it is much lower than the pore water concentration of 0.76 mM (Table 1). This low Si release rate from the sediments, in addition to a possibly higher abundance of diatoms in the water column, could ultimately favour the low concentrations of H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub> observed in Lake Alchichica compared with other lakes in the vicinity (namely Lakes Atexcac and La Preciosa).

Second, the diagenetic formation of Mg-silicates calls for care when interpreting the palaeoenvironmental message carried by the sedimentary record. The presence/absence of Mg-silicates has been suggested to provide information about the palaeochemistry of lakes. However, in Lake Alchichica, the authors observed on the one hand shallow microbialitic deposits without Mg-silicate and on the other hand deep sediments dominated by Mg-silicates. A basin-

wide assessment should therefore be considered whenever possible. In the modern system of Lake Alchichica, it is clear that stromatolites form at low concentrations of  $H_4SiO_4$  in the lake because the living diatoms are an active  $SiO_2$  sink, whereas in the sediments, the dead diatoms are a source of Si that feeds the Mg-silicates precipitation. How likely would it be to find signatures of this process in ancient sediments? Although fossilization of microorganisms by silicates was occasionally observed in modern microbialites (Zeyen *et al.*, 2015), the preservation of diatom morphologies/structures in sediments is not systematic (Michalopoulos & Aller, 2004). In Alchichica, they rather gradually disappear through the massive authigenesis of Mg-silicate around diatoms (Fig. 6). Therefore, the presence/absence of diatoms is not a robust criterion to identify this diagenetic process in the past.

Last, better understanding silicate authigenesis in a variety of environments is key to evaluating the effect of reverse weathering, and especially its involvement in the long-term cycles of C and Si (Mackenzie & Kump, 1995). Reverse weathering refers to the reactions that produce authigenic silicates, which consume soluble cations generated by silicate weathering, but unlike carbonates do not consume carbon (e.g. Isson & Planavsky, 2018; Krissansen-Totton & Catling, 2020). Therefore, it affects not only Si and C cycles but also the climate by retaining  $CO_2$  within the atmosphere–ocean system. While robust evidence for clay authigenesis in modern environments has emerged (Badaut & Risacher, 1983; Michalopoulos & Aller, 1995; Wallmann *et al.*, 2008; Ehlert *et al.*, 2016; Bentz & Peterson, 2020), both laboratory studies (Michalopoulos & Aller, 1995) and analyses of natural marine sediments (Wallmann *et al.*, 2008; Ehlert *et al.*, 2016) suggest that it is almost exclusively restricted to environments characterized by extremely high rates of biogenic opal remineralization (Michalopoulos & Aller, 2004; Ehlert *et al.*, 2016). This type of environment is supposedly rare. Consequently, reverse weathering is generally estimated to constitute only a relatively minor (<10%) component of total dissolved silica export in the modern oceans (e.g. Wallmann *et al.*, 2008). The present study shows a continental system in which Mg-silicate authigenesis by diatom remineralization is major. This allowed us to refine the conditions under which authigenesis occurs. Furthermore, models have tried to quantify reverse weathering over

geological times (Isson & Planavsky, 2018; Krissansen-Totton & Catling, 2020). In the Precambrian, before the advent of significant biogenic silica precipitation, ocean silica concentrations were likely elevated (Siever, 1992; Conley *et al.*, 2017), deriving from continental and seafloor weathering (Isson & Planavsky, 2018). Isson & Planavsky (2018) argued that these elevated silica levels may have increased the reverse weathering flux, maintained high levels of  $CO_2$  and warmed the Precambrian climate. Additionally, these authors proposed that reverse weathering is strongly pH dependent, and thus may have buffered ocean pH and stabilized the atmosphere–ocean  $pCO_2$  during the Precambrian. A key parameter in these models is the solubility of authigenic silicates, which has been determined by laboratory experiments and is still debated (Wollast *et al.*, 1968; Tosca *et al.*, 2011). The present work provides a solubility constant deduced from a natural system, lower than that proposed by Tosca *et al.* (2011) and Tosca & Masterson (2014). Therefore, despite there being no observational evidence to date suggesting a greater importance of reverse weathering in the past, its proportion associated with this solubility constant could be higher than predicted by Tosca *et al.* (2011), and thus have a greater impact on pH buffering potential of the oceans and climate regulation. The authors also showed that Mg-silicate authigenesis in Alchichica is strongly driven by diatoms, which appeared late in geological history, likely during the Cretaceous (Girard *et al.*, 2020). Earlier organisms such as sponges, radiolarians and some bacteria (Li *et al.*, 2022) may also have produced silica-rich sediments by biomineralization in the past, which may have fed this reverse weathering process in the same way.

## CONCLUSION

Alchichica lacustrine sediments exhibit a particular mineralogical evolution in their first centimetres, which can be explained by early diagenetic reactions (Fig. 11). Below *ca* 3 cm in depth, hydromagnesite rapidly disappears and diatom frustules are progressively pseudomorphized by an Al-poor Mg-silicate phase with a composition corresponding to stevensite. Interestingly, the replacement of amorphous silica by Mg-silicates is massive in Lake Alchichica sediments and contrasts with the absence of

authigenic Mg-silicates in Alchichica shallow microbialites, mainly composed of aragonite and hydromagnesite (Fig. 11). This observation raises questions about the palaeoenvironmental message carried by the sedimentary record, since the presence/absence of Mg-silicates is considered to provide information about the palaeochemistry of lakes. However, in Lake Alchichica, microbialites form at low concentrations of  $H_4SiO_4$  in the lake because the living diatoms are an active  $SiO_2$  sink, whereas in the sediments, the spontaneous dissolution of the diatom frustules drives the Mg-silicates precipitation (Fig. 11). Therefore, an appraisal at the basin scale should be considered whenever possible. Moreover, this study confirms that the preservation of diatom morphologies/structures in sediments is not systematic, and not a robust criterion to identify this process in the past.

In Lake Alchichica sediments, Mg-silicate authigenesis by diatom pseudomorphosis occurs in pore waters saturated with ‘amorphous sepiolite’ as defined by Wollast *et al.* (1968) (Fig. 3). The solubility constant deduced from this study [ $\log(K_s) = 19.26$  at  $15^\circ C$ ] is thus lower than that proposed by Tosca *et al.* (2011) and Tosca & Masterson (2014) [ $\log(K_s) = 33.82$  at  $25^\circ C$ ]. The authors propose that this deduced solubility constant should be considered when modelling the formation of Mg-silicates in a natural environment. The reassessment of this higher solubility constant suggests that reverse weathering may have a greater impact on climate stabilization than previously thought.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by IMPMC (Muséum National d’Histoire Naturelle de Paris, CNRS and Sorbonne University, France), the Adaptation MITI program of the CNRS, the European Research Council under the European Community’s Seventh Framework Program (FP7/2007-2013 Grant Agreement 30711-0-ERC CALCYAN) and Agence Nationale de la Recherche (France; ANR Microbialites, grant number ANR-18-CE02-0013-02). We thank Ludovic Delbes and Benoit Baptiste who managed the XRD platform at IMPMC where analyses were performed. We thank Keevin Beneut and Maxime Guillaumet who managed the FTIR platform at IMPMC where analyses were performed. We thank Imene Esteve, Béatrice Doisneau and Stéphanie Delbrel who managed the SEM

platform at IMPMC where analyses were performed. We thank SARM (Nancy, France) for bulk chemical analyses of solids. We thank Laure Cordier for performing ion chromatography analyses at IPGP (France) and Céline Liorzou for performing ICP-AES analyses at Pôle Spectrométrie Océan (Laboratoire Géo-Océan, Brest, France). We thank the anonymous reviewer and Andrea Martín Pérez for their constructive reviews.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that supports the findings of this study are included in this article and available in [Supplementary Material](#).

## REFERENCES

- Alcocer, J. (2021) Lake Alchichica limnology. In: *The Uniqueness of a Tropical Maar Lake*, p. 491. Springer Nature, Berlin/Heidelberg, Germany.
- Alcocer, J. and Hammer, U.T. (1998) Saline lake ecosystems of Mexico. *Aquat. Ecosyst. Health Manage.*, **1**, 291–315.
- Alcocer, J. and Oseguera, L.A. (2019) Lago Alchichica: Una joya de biodiversidad. In: *El cuerpo de agua* (Ed Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México), pp. 63–75. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Mexico City, 1a edición. pp.
- Alcocer, J., Lugo, A., Escobar, E., Sánchez, M.D.R. and Vilaclara, G. (2000) Water column stratification and its implications in the tropical warm monomictic Lake Alchichica, Puebla, Mexico. *Int. Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, **27**, 3166–3169.
- Armienta, M.A., Vilaclara, G., De la Cruz-Reyna, S., Ramos, S., Cenicerros, N., Cruz, O., Aguayo, A. and Arcega-Cabrera, F. (2008) Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes. *J. Volcanol. Geotherm. Res.*, **178**, 249–258.
- Arp, G., Reimer, A. and Reitner, J. (2003) Microbialite formation in seawater of increased alkalinity, Satonda crater Lake, Indonesia. *J. Sediment. Res.*, **73**, 105–127.
- Arredondo-Figueroa, J.L. (2002) Los axalapascos de la cuenca oriental, Puebla. In: *Lagos y presas de México* (Eds De la Lanza-Espino, G. and García Calderón, J.L.), **8**(1), pp. 81–107. Biotica, compiladores, AGT. México, DF.
- Arredondo-Figueroa, J.L., Borrego-Enriquez, L.E., Castillo-Domínguez, R.M. and Valladolid-Laredo, M.A. (1983) Batimetría y morfometría de los lagos “maars” de la cuenca de Oriental, Puebla, México. *Biótica*, **8**, 37–47.
- Assayag, N., Rivé, K., Ader, M., Jézéquel, D. and Agrinier, P. (2006) Improved method for isotopic and quantitative

- analysis of dissolved inorganic carbon in natural water samples. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, 2243–2251.
- Badaut, D. and Risacher, F.** (1983) Authigenic smectite on diatom frustules in Bolivian saline lakes. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **47**, 363–375.
- Badaut, D., Risacher, F., Paquet, H., Eberhart, J.P. and Weber, F.** (1979) Néof ormation de minéraux argileux à partir de frustules de diatomées: le cas des lacs de l'Altiplano Bolivien. *C. R. Acad. Sci.*, **289**(16), 1191–1193.
- Beck, L., Gehlen, M., Flank, A.M., Van Bennekom, A.J. and Van Beusekom, J.E.E.** (2002) The relationship between Al and Si in biogenic silica as determined by PIXE and XAS. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B*, **189**(1–4), 180–184.
- Bentz, J.L. and Peterson, R.C.** (2020) The formation of clay minerals in the mudflats of Bolivian salars. *Clays and Clay Minerals*, **68**(2), 115–134.
- Benzerara, K., Menguy, N., Guyot, F., Vanni, C. and Gillet, P.** (2005) TEM study of a silicate-carbonate-microbe interface prepared by focused ion beam milling. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **69**, 1413–1422.
- Benzerara, K., Meibom, A., Gautier, Q., Kaźmierczak, J., Stolarski, J., Menguy, N. and Brown, G.E.** (2010) Nanotextures of aragonite in stromatolites from the quasi-marine Satonda crater lake, Indonesia. *Geol. Soc. Lond. Spec. Publ.*, **336**, 211–224.
- Blanc, P., Lassin, A., Piantone, P., Azaroual, M., Jacquemet, N., Fabbri, A. and Gaucher, E.C.** (2012) Thermoddem: a geochemical database focused on low temperature water/rock interactions and waste materials. *Appl. Geochem.*, **27**, 2107–2116.
- Bontognali, T.R., Vasconcelos, C., Warthmann, R.J., Bernasconi, S.M., Dupraz, C., Strohmenger, C.J. and McKenzie, J.A.** (2010) Dolomite formation within microbial mats in the coastal sabkha of Abu Dhabi (United Arab Emirates). *Sedimentology*, **57**, 824–844.
- Brindley, G.W., Bish, D.L. and Wan, H.M.** (1977) The nature of kerolite, its relation to talc and stevensite. *Mineral. Mag.*, **41**(320), 443–452.
- Bristow, T.F. and Milliken, R.E.** (2011) Terrestrial perspective on authigenic clay mineral production in ancient martian lakes. *Clays Clay Minerals*, **59**, 339–358.
- Bristow, T.F., Kennedy, M.J., Derkowski, A., Droser, M.L., Jiang, G. and Creaser, R.A.** (2009) Mineralogical constraints on the paleoenvironments of the Ediacaran Doushantuo formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **106**, 13190–13195.
- Burne, R.V., Moore, L.S., Christy, A.G., Troitzsch, U., King, P.L., Carnerup, A.M. and Hamilton, P.J.** (2014) Stevensite in the modern thrombolites of Lake Clifton, Western Australia: a missing link in microbialite mineralization? *Geology*, **42**, 575–578.
- Capet, X.** (1990). Clay mineralogy of sites 671 and 672, Barbados accretionary complex and Atlantic abyssal plain: Paleoenvironmental and diagenetic implications. In: *Proceedings of the Ocean Drilling Program, scientific results*, pp. 85–96. Ocean Drilling Program.
- Chahi, A., Fritz, B., DuPlay, J., Weber, F. and Lucas, J.** (1997) Textural transition and genetic relationship between precursor stevensite and sepiolite in lacustrine sediments (Jbel Rhassoul, Morocco). *Clays Clay Minerals*, **45**, 378–389.
- Conley, D.J., Frings, P.J., Fontorbe, G., Clymans, W., Stadmark, J., Hendry, K.R., Marron, A.O. and De La Rocha, C.L.** (2017) Biosilicification drives a decline of dissolved Si in the oceans through geologic time. *Front. Mar. Sci.*, **4**, 397.
- Couradeau, E., Benzerara, K., Moreira, D., Gerard, E., Kaźmierczak, J., Tavera, R. and López-García, P.** (2011) Prokaryotic and eukaryotic community structure in field and cultured microbialites from the alkaline Lake Alchichica (Mexico). *PLoS One*, **6**, e28767.
- Couradeau, E., Benzerara, K., Gérard, E., Estève, I., Moreira, D., Tavera, R. and López-García, P.** (2013) Cyanobacterial calcification in modern microbialites at the submicrometer scale. *Biogeosciences*, **10**, 5255–5266.
- Cuadros, J., Diaz-Hernandez, J.L., Sanchez-Navas, A., Garcia-Casco, A. and Yepes, J.** (2016) Chemical and textural controls on the formation of sepiolite, palygorskite and dolomite in volcanic soils. *Geoderma*, **271**, 99–114.
- Deocampo, D.M.** (2005) Evaporative evolution of surface waters and the role of aqueous CO<sub>2</sub> in magnesium silicate precipitation: Lake Eyasi and Ngorongoro crater, northern Tanzania. *S. Afr. J. Geol.*, **108**, 493–504.
- Deocampo, D.M.** (2015) Authigenic clay minerals in lacustrine mudstones. *Geol. Soc. Am. Spec. Pap.*, **515**, SPE515-03.
- d'Espinose de la Caillerie, J.B., Kermarec, M. and Clause, O.** (1995) <sup>29</sup>Si NMR observation of an amorphous magnesium silicate formed during impregnation of silica with Mg(II) in aqueous solution. *J. Phys. Chem.*, **99**, 17273–17281.
- Dixit, S. and Van Cappellen, P.** (2002) Surface chemistry and reactivity of biogenic silica. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **66**, 2559–2568.
- Ehlert, C., Doering, K., Wallmann, K., Scholz, F., Sommer, S., Grasse, P., Geilert, S. and Frank, M.** (2016) Stable silicon isotope signatures of marine pore waters–biogenic opal dissolution versus authigenic clay mineral formation. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **191**, 102–117.
- Farmer, V. C.** (1974) *The Infrared Spectra of Minerals*. Mineralogical Society, London, UK.
- Ferrari, L., Orozco-Esquivel, T., Manea, V. and Manea, M.** (2012) The dynamic history of the trans-Mexican Volcanic Belt and the Mexico subduction zone. *Tectonophysics*, **522**, 122–149.
- Fukushi, K. and Matsumiya, H.** (2018) Control of water chemistry in alkaline lakes: solubility of monohydrocalcite and amorphous magnesium carbonate in CaCl<sub>2</sub>–MgCl<sub>2</sub>–Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solutions. *ACS Earth Space Chem.*, **2**, 735–744.
- Galán, E. and Pozo, M.** (2011) Palygorskite and sepiolite deposits in continental environments. Description, genetic patterns and sedimentary settings. In: *Developments in Clay Science*, Vol. **3**, pp. 125–173. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- García Martínez, J.** (2010) *Efectos climáticos sobre el agua subterránea y el Lago Alchichica, Puebla, México* (Doctoral dissertation, Dissertation, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico).
- Gehlen, M. and Van Raaphorst, W.** (2002) The role of adsorption–desorption surface reactions in controlling interstitial Si(OH)<sub>4</sub> concentrations and enhancing Si(OH)<sub>4</sub> turn-over in shallow shelf seas. *Cont. Shelf Res.*, **22**, 1529–1547.
- Gérard, E., Ménez, B., Couradeau, E., Moreira, D., Benzerara, K., Tavera, R. and López-García, P.** (2013) Specific carbonate–microbe interactions in the modern microbialites of Lake Alchichica (Mexico). *ISME J.*, **7**, 1997–2009.
- Gérard, E., De Goeyse, S., Hugoni, M., Agogué, H., Richard, L., Milesi, V., Guyot, F., Lecourt, L., Borensztajn, S.,**

- Joseph, M.-B., Leclerc, T., Sarazin, G., Jézéquel, D., Leblouanger, C. and Ader, M. (2018) Key role of alphaproteobacteria and cyanobacteria in the formation of stromatolites of Lake Dziani Dzaha (Mayotte, Western Indian Ocean). *Front. Microbiol.*, **9**, 796.
- Girard, V., Saint Martin, S., Buffetaut, E., Saint Martin, J.P., Néraudeau, D., Peyrot, D., Roghi, G., Ragazzi, E. and Suteethorn, V. (2020) Thai amber: insights into early diatom history? *BSGF-Earth Sci. Bull.*, **191**, 191.
- Hoffert, M. (1980) Les "Argiles rouges des grands fonds" dans le Pacifique Centre-Est. In: *Authigenese, Transport, Diagenese*, Vol. 61. Persée-Portail des revues scientifiques en SHS, Strasbourg (France).
- Hollingbery, L.A. and Hull, T.R. (2012) The thermal decomposition of natural mixtures of huntite and hydromagnesite. *Thermochimica Acta*, **528**, 45–52.
- Hurd, D.C. and Birdwhistell, S. (1983) On producing a more general model for biogenic silica dissolution. *Am. J. Sci.*, **283**, 1–28.
- Iniesto, M., Moreira, D., Reboul, G., Deschamps, P., Benzerara, K., Bertolino, P., Saghafi, A., Tavera, R. and López-García, P. (2021) Core microbial communities of lacustrine microbialites sampled along an alkalinity gradient. *Environ. Microbiol.*, **23**, 51–68.
- İşik Ece, Ö. (1998) Diagenetic transformation of magnesite pebbles and cobbles to sepiolite (meerschaum) in the Miocene Eskisehir lacustrine basin, Turkey. *Clays Clay Minerals*, **46**, 436–445.
- Isson, T.T. and Planavsky, N.J. (2018) Reverse weathering as a long-term stabilizer of marine pH and planetary climate. *Nature*, **560**, 471–475.
- Jones, B.F. and Galan, E. (1988) Sepiolite and palygorskite. *Rev. Mineral.*, **19**, 631–674.
- Jones, B.F. and Mumpston, F.A. (1986) Clay mineral diagenesis in lacustrine sediments. *US Geol. Surv. Bull.*, **1578**, 291–300.
- Jones, B.F. and Spencer, R.J. (1999) Clay mineral diagenesis at Great Salt Lake, Utah, USA. In: *Geochemistry of the Earth's Surface, Proceedings of the 5th International Symposium on Geochemistry of the Earth's Surface* (Ed Armannsson, H.), pp. 293–297. Rotterdam, Balkema.
- Jones, B.F. and Weir, A.H. (1983) Clay minerals of Lake Abert, an alkaline, saline lake. *Clays and Clay Minerals*, **31**(3), 161–172.
- Kangal, O., Firat, C. and Güney, A. (2005) Flotation properties of unusual carbonates: huntite and hydromagnesite. *Miner. Eng.*, **18**, 631–634.
- Kaźmierczak, J., Kempe, S., Kremer, B., López-García, P., Moreira, D. and Tavera, R. (2011) Hydrochemistry and microbialites of the alkaline crater lake Alchichica, Mexico. *Facies*, **57**, 543–570.
- Krissansen-Totton, J. and Catling, D.C. (2020) A coupled carbon-silicon cycle model over earth history: reverse weathering as a possible explanation of a warm mid-Proterozoic climate. *Earth Planet. Sci. Lett.*, **537**, 116181.
- Léveillé, R.J., Fyfe, W.S. and Longstaffe, F.J. (2000a) Geomicrobiology of carbonate-silicate microbialites from Hawaiian basaltic sea caves. *Chem. Geol.*, **169**, 339–355.
- Léveillé, R.J., Fyfe, W.S. and Longstaffe, F.J. (2000b) Unusual secondary Ca-Mg-carbonate-kerolite deposits in basaltic caves, Kauai, Hawaii. *J. Geol.*, **108**, 613–621.
- Léveillé, R.J., Longstaffe, F.J. and Fyfe, W.S. (2002) Kerolite in carbonate-rich speleothems and microbial deposits from basaltic caves, Kauai, Hawaii. *Clays Clay Mineral.*, **50**, 514–524.
- Li, J., Liu, P., Menguy, N., Zhang, X., Wang, J., Benzerara, K., Feng, L., Sun, L., Zheng, Y., Meng, F., Gu, L., Leroy, E., Hao, J., Chu, X. and Pan, Y. (2022). Intracellular silicification by early-branching magnetotactic bacteria. *Sci. Adv.*, **8**(19), eabn6045.
- Loucaides, S., Van Cappellen, P., Roubeix, V., Moriceau, B. and Ragueneau, O. (2012a) Controls on the recycling and preservation of biogenic silica from biomineralization to burial. *Silicon*, **4**, 7–22.
- Loucaides, S., Koning, E. and Van Cappellen, P. (2012b) Effect of pressure on silica solubility of diatom frustules in the oceans: results from long-term laboratory and field incubations. *Mar. Chem.*, **136**, 1–6.
- Mackenzie, F.T. and Kump, L.R. (1995) Reverse weathering, clay mineral formation, and oceanic element cycles. *Science*, **270**, 586.
- Melim, L.A. and Spilde, M.N. (2018) A new unified model for cave pearls: insights from cave pearls in Carlsbad cavern, New Mexico, USA. *J. Sediment. Res.*, **88**, 344–364.
- Michalopoulos, P. and Aller, R.C. (1995) Rapid clay mineral formation in Amazon delta sediments: reverse weathering and oceanic elemental cycles. *Science*, **270**, 614–617.
- Michalopoulos, P. and Aller, R.C. (2004) Early diagenesis of biogenic silica in the Amazon delta: alteration, authigenic clay formation, and storage. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **68**, 1061–1085.
- Milesi, V.P., Jézéquel, D., Debure, M., Cadeau, P., Guyot, F., Sarazin, G., Claret, F., Vennin, E., Chaduteau, C., Virgone, A., Gaucher, E.C. and Ader, M. (2019) Formation of magnesium-smectite during lacustrine carbonates early diagenesis: study case of the volcanic crater lake Dziani Dzaha (Mayotte-Indian Ocean). *Sedimentology*, **66**, 983–1001.
- Milesi, V.P., Debure, M., Marty, N.C., Capano, M., Jézéquel, D., Steefel, C., Rouchon, V., Albéric, P., Bard, E., Sarazin, G., Guyot, F., Virgone, A., Gaucher, E.C. and Ader, M. (2020) Early diagenesis of lacustrine carbonates in volcanic settings: the role of magmatic CO<sub>2</sub> (Lake Dziani Dzaha, Mayotte, Indian Ocean). *ACS Earth Space Chem.*, **4**, 363–378.
- Miller, A.Z., Pereira, M.F., Calaforra, J.M., Forti, P., Dionísio, A. and Saiz-Jimenez, C. (2014) Siliceous speleothems and associated microbe-mineral interactions from Ana Heva lava tube in Easter Island (Chile). *Geomicrobiol. J.*, **31**, 236–245.
- Millot, G. (1970) Superficial geochemistry and the silicate cycle. In: *Geology of Clays*, pp. 355–388. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Negendank, J.F.W., Emmermann, R., Krawczyk, R., Mooser, F., Tobschall, H. and Werle, D. (1985) Geological and geochemical investigations on the eastern Transmexican Volcanic Belt. *Geofisica Int.*, **24**, 477–575.
- Nied, D., Enemark-Rasmussen, K., L'Hopital, E., Skibsted, J. and Lothenbach, B. (2016) Properties of magnesium silicate hydrates (MSH). *Cem. Concr. Res.*, **79**, 323–332.
- Pace, A., Bourillot, R., Bouton, A., Vennin, E., Galaup, S., Bundeleva, I., Patrier, P., Dupraz, C., Thomazo, C., Sansjofre, P., Yokoyama, Y., Franceschi, M., Anguy, Y., Pigot, L., Virgone, A. and Visscher, P.T. (2016) Microbial and diagenetic steps leading to the mineralisation of great salt Lake microbialites. *Sci. Rep.*, **6**, 1–12.
- Parkhurst, D.L. and Appelo, C.A.J. (2013) Description of input and examples for PHREEQC version 3—a computer program for speciation, batch-reaction, one-dimensional

- transport, and inverse geochemical calculations. *US Geol. Surv. Techniques Methods*, **6**(A43), 497.
- Pozo, M. and Calvo, J.P.** (2018) An overview of authigenic magnesian clays. *Minerals*, **8**, 520.
- Reimer, A., Landmann, G. and Kempe, S.** (2009) Lake Van, eastern Anatolia, hydrochemistry and history. *Aquat. Geochem.*, **15**, 195–222.
- Rhouta, B., Kaddami, H., Elbarqy, J., Amjoud, M., Daoudi, L., Maury, F., Senocq, F., Maazouz, A. and Gerard, J.F.** (2008) Elucidating the crystal-chemistry of Jbel Rhassoul stevensite (Morocco) by advanced analytical techniques. *Clay Minerals*, **43**(3), 393–403.
- Saghaï, A., Zivanovic, Y., Moreira, D., Benzerara, K., Bertolino, P., Rogon, M., Tavera, R., López-Archilla, A.I. and López-García, P.** (2016) Comparative metagenomics unveils functions and genome features of microbialite-associated communities along a depth gradient. *Environ. Microbiol.*, **18**(12), 4990–5004.
- Saghaï, A., Zivanovic, Y., Zeyen, N., Moreira, D., Benzerara, K., Deschamps, P., Bertolino, P., Rogon, M., Tavera, R., López-Archilla, A. and López-García, P.** (2015) Metagenome-based diversity analyses suggest a significant contribution of non-cyanobacterial lineages to carbonate precipitation in modern microbialites. *Front. Microbiol.*, **6**, 797.
- Siever, R.** (1992) The silica cycle in the Precambrian. *Geochim. Cosmochim. Acta.*, **56**(8), 3265–3272.
- Souza-Egipsy, V., Wierzbos, J., Ascaso, C. and Neelson, K.H.** (2005) Mg–silica precipitation in fossilization mechanisms of sand tufa endolithic microbial community, mono Lake (California). *Chem. Geol.*, **217**, 77–87.
- Stoessel, R.K.** (1988) 25°C and 1 atm dissolution experiments of sepiolite and kerolite. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **52**, 365–374.
- Tchamabé, B.C., Carrasco-Núñez, G., Miggins, D.P. and Németh, K.** (2020) Late Pleistocene to Holocene activity of Alchichica maar volcano, eastern trans-Mexican volcanic belt. *J. South Am. Earth Sci.*, **97**, 102404.
- Tosca, N.J. and Masterson, A.L.** (2014) Chemical controls on incipient Mg-silicate crystallization at 25 C: implications for early and late diagenesis. *Clay Miner.*, **49**, 165–194.
- Tosca, N.J. and Wright, V.P.** (2018) Diagenetic pathways linked to labile Mg-clays in lacustrine carbonate reservoirs: a model for the origin of secondary porosity in the cretaceous pre-salt Barra Velha formation, offshore Brazil. *Geol. Soc. Lond. Spec. Publ.*, **435**, 33–46.
- Tosca, N.J., Macdonald, F.A., Strauss, J.V., Johnston, D.T. and Knoll, A.H.** (2011) Sedimentary talc in Neoproterozoic carbonate successions. *Earth Planet. Sci. Lett.*, **306**, 11–22.
- Truesdell, A.H. and Jones, B.F.** (1974) WATEQ, a computer program for calculating chemical equilibria of natural waters. *J. Res. US Geol. Surv.*, **2**, 233–248.
- Valdespino-Castillo, P.M., Hu, P., Merino-Ibarra, M., López-Gómez, L.M., Cerqueda-García, D., Zayas, G.D., Pi-Puig, T., Lestayo, J.A., Holman, H.-Y. and Falcón, L.I.** (2018) Exploring biogeochemistry and microbial diversity of extant microbialites in Mexico and Cuba. *Front. Microbiol.*, **9**, 510.
- Vilaclara, G., Chávez, M., Lugo, A., González, H. and Gaytán, M.** (1993) Comparative description of crater-lakes basic chemistry in Puebla state, Mexico. *Int. Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, **25**, 435–440.
- Wallmann, K., Aloisi, G., Haeckel, M., Tishchenko, P., Pavlova, G., Greinert, J., Kutterolf, S. and Eisenhauer, A.** (2008) Silicate weathering in anoxic marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **72**, 2895–2918.
- Warren, J.K.** (2016) *Evaporites: A geological compendium*. 2nd edn, Springer, Switzerland.
- Weaver, C.E.** (1989) *Clays, Muds, and Shales. Developments in Sedimentology 44*. Elsevier Science Publisher B.V, The Netherlands.
- Willey, J.D.** (1980) Effects of aging on silica solubility: a laboratory study. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **44**, 573–578.
- Wollast, R., Mackenzie, F.T. and Bricker, O.P.** (1968) Experimental precipitation and genesis of sepiolite at earth-surface conditions. *Am. Mineral. J. Earth Planetary Mater.*, **53**, 1645–1662.
- Wright, V.P. and Barnett, A.J.** (2015) An abiotic model for the development of textures in some South Atlantic early cretaceous lacustrine carbonates. *Geol. Soc. Lond. Spec. Publ.*, **418**, 209–219.
- Wright, V.P. and Barnett, A.J.** (2020) The textural evolution and ghost matrices of the cretaceous Barra Velha formation carbonates from the Santos Basin, offshore Brazil. *Facies*, **66**, 1–18.
- Zeyen, N., Benzerara, K., Li, J., Groleau, A., Balan, E., Robert, J.L., Estève, I., Tavera, R., Moreira, D. and López-García, P.** (2015) Formation of low-T hydrated silicates in modern microbialites from Mexico and implications for microbial fossilization. *Front. Earth Sci.*, **3**, 64.
- Zeyen, N., Benzerara, K., Menguy, N., Brest, J., Templeton, A.S., Webb, S.M., Gérard, E., Moreira, D., López-García, P., Tavera, R. and Morin, G.** (2019) Fe-bearing phases in modern lacustrine microbialites from Mexico. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **253**, 201–230.
- Zeyen, N., Benzerara, K., Beyssac, O., Daval, D., Muller, E., Thomazo, C., Tavera, R., López-García, P., Moreira, D. and Duprat, E.** (2021) Integrative analysis of the mineralogical and chemical composition of modern microbialites from ten Mexican lakes: what do we learn about their formation? *Geochim. Cosmochim. Acta*, **305**, 148–184.

Manuscript received 14 June 2022; revision accepted 7 December 2022

## Supporting Information

Additional information may be found in the online version of this article:

**Figure S1.** Poorly crystalline phases produce broad diffraction signal on the diffractograms, from which intensity could be estimated.

**Figure S2.** Example Rietveld fit result (sample AL19\_C2a\_05) showing the actual data in red and the modelled diffractogram in blue.

**Figure S3.** Solubility diagram in the: (A)  $\log[a(\text{CO}_3^{2-})] - \log[a(\text{Ca}^{2+})]$ ; and (B)  $\log[a(\text{CO}_3^{2-})] - \log[a(\text{Mg}^{2+})]$  spaces.

**Figure S4.** All diffractograms collected on samples from shallowest to deepest.

26 *E. Muller et al.*

**Figure S5.** Fourier transform infrared (FTIR) spectra of the Alchichica sediment cores from the shallowest to the deepest (from top to bottom).

**Figure S6.** Mg-silicates formed around a detrital feldspar grain.

**Figure S7.** Solubility diagram in the  $\log[a(\text{Mg}^{2+})/a(\text{H}^+)^2] - \log[a(\text{H}_4\text{SiO}_4)]$  space determined at 25°C.

**Table S1.** Sediment composition in wt.% estimated by Rietveld (amorphous free).

**Table S2.** Stoichiometry of the mineral phases estimated by energy dispersive X-ray spectrometry (EDXS).

**Table S3.** Method for quantification of mineral phases.

*Annexe B, article de Havas et al. (2023a) : The hidden role of dissolved organic carbon in the biogeochemical cycle of carbon in modern redox-stratified lakes*

Biogeosciences, 20, 2405–2424, 2023  
<https://doi.org/10.5194/bg-20-2405-2023>  
 © Author(s) 2023. This work is distributed under  
 the Creative Commons Attribution 4.0 License.



## The hidden role of dissolved organic carbon in the biogeochemical cycle of carbon in modern redox-stratified lakes

Robin Havas<sup>1</sup>, Christophe Thomazo<sup>1,2</sup>, Miguel Iniesto<sup>3</sup>, Didier Jézéquel<sup>4,5</sup>, David Moreira<sup>3</sup>, Rosaluz Tavera<sup>6</sup>, Jeanne Caumartin<sup>7</sup>, Elodie Muller<sup>7</sup>, Purificación López-García<sup>3</sup>, and Karim Benzerara<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Biogéosciences, CNRS, Université de Bourgogne Franche-Comté, 21 000 Dijon, France

<sup>2</sup>Institut Universitaire de France, 75005 Paris, France

<sup>3</sup>Ecologie Systématique Evolution, CNRS, Université Paris-Saclay, AgroParisTech, 91190 Gif-sur-Yvette, France

<sup>4</sup>IPGP, CNRS, Université de Paris Cité, 75005 Paris, France

<sup>5</sup>UMR CARRTEL, INRAE and USMB, 74200 Thonon-les-bains, France

<sup>6</sup>Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México

<sup>7</sup>Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC), CNRS, Muséum National d'Histoire Naturelle, Sorbonne Université, 75005 Paris, France

**Correspondence:** Robin Havas (robin.havas@gmail.com)

Received: 6 January 2023 – Discussion started: 12 January 2023

Revised: 18 April 2023 – Accepted: 25 May 2023 – Published: 23 June 2023

**Abstract.** The dissolved organic carbon (DOC) reservoir plays a critical role in the C cycle of marine and freshwater environments because of its size and implication in many biogeochemical reactions. Although it is poorly constrained, its importance in ancient Earth's C cycles is also commonly invoked. Yet DOC is rarely quantified and characterized in modern stratified analogues. In this study, we investigated the DOC reservoirs of four redox-stratified alkaline crater lakes in Mexico. We analyzed the concentrations and isotopic compositions of DOC throughout the four water columns and compared them with existing data on dissolved inorganic and particulate organic C reservoirs (DIC and POC). The four lakes have high DOC concentrations with great variability between and within the lakes (averaging  $2 \pm 4$  mM; 1 SD,  $n = 28$ ; i.e., from  $\sim 15$  to 160 times the amount of POC). The  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  signatures also span a broad range of values from  $-29.3\text{‰}$  to  $-8.7\text{‰}$  (with as much as  $12.5\text{‰}$  variation within a single lake). The prominent DOC peaks (up to 21 mM), together with their associated isotopic variability, are interpreted as reflecting oxygenic and/or anoxygenic primary productivity through the release of excess fixed carbon in three of the lakes (Alberca de los Espinos, La Preciosa, and Atexcac). By contrast, the variability of [DOC] and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  in the case of Lake Alchichica is mainly explained by the partial degradation of organic matter and the accumulation of

DOC in anoxic waters. The DOC records detailed metabolic functions such as active DIC-uptake and DIC-concentrating mechanisms, which cannot be inferred from DIC and POC analyses alone but which are critical to the understanding of carbon fluxes from the environment to the biomass. Extrapolating our results to the geological record, we suggest that anaerobic oxidation of DOC may have caused the very negative C isotope excursions in the Neoproterozoic. It is, however, unlikely that a large oceanic DOC reservoir could outweigh the entire oceanic DIC reservoir. This study demonstrates how the analysis of DOC in modern systems deepens our understanding of the C cycle in stratified environments and helps to set boundary conditions for the Earth's past oceans.

### 1 Introduction

Dissolved organic carbon (DOC) is a major constituent of today's marine and freshwater environments (e.g., Ridgwell and Arndt, 2015; Brailsford, 2019). It is an operationally defined fraction of aqueous organic carbon within a continuum of organic molecules spanning a broad range of sizes, compositions, degrees of reactivity, and bioavailability (Kaplan et al., 2008; Hansell, 2013; Beaupré, 2015; Carlson and

Hansell, 2015; Brailsford, 2019). Oceanic DOC is equivalent to the total amount of atmospheric carbon (Jiao et al., 2010; Thornton, 2014) and represents the majority of freshwater organic matter (Kaplan et al., 2008; Brailsford, 2019). The DOC reservoir (i) is at the base of many trophic chains (Bade et al., 2007; Hessen and Anderson, 2008; Jiao et al., 2010; Thornton, 2014), (ii) is key in physiological and ecological equilibria (Hessen and Anderson, 2008), and (iii) plays a critical role in climate change as a long-term C storage reservoir (Jiao et al., 2010; Hansell, 2013; Thornton, 2014; Ridgwell and Arndt, 2015). Although isotopic signatures are a powerful and widespread tool in biogeochemical studies, the use of DOC isotopes has been relatively limited owing to technical difficulties (Cawley et al., 2012; Barber et al., 2017). Radioisotopes or labeled stable isotopes of DOC have been used to date and retrace DOC compounds in diverse aquatic environments (e.g., Repeta and Aluwihare, 2006; Bade et al., 2007; Kaplan et al., 2008; Brailsford, 2019). Studies featuring natural abundances of DOC stable isotope data (i.e.,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$ ) mainly used them to discriminate between different source endmembers (e.g., terrestrial vs. autochthonous) (e.g., Cawley et al., 2012; Santinelli et al., 2015; Barber et al., 2017). After a pioneer study by Williams and Gordon (1970), few studies have used natural DOC stable isotope compositions to explore processes intrinsically related to its production and recycling. Recently, Wagner et al. (2020) reaffirmed the utility of stable isotopes to investigate DOC biosynthesis, degradation pathways, and transfer within the food web.

Several studies have suggested a significant role for the DOC reservoir throughout geological time, when it would have been much larger in size and impacted various phenomena, including the regulation of climate and glaciations during the Neoproterozoic (e.g., Peltier et al., 2007), the paleoecology of Ediacaran biota and its early complex life forms (e.g., Sperling et al., 2011), the oxygenation of the ocean through innovations of eukaryotic life near the Neoproterozoic–Cambrian transition (e.g., Lenton and Daines, 2018), and the perturbation of the C cycle recorded in  $\delta^{13}\text{C}$  sedimentary archives from the Neoproterozoic to the Phanerozoic (e.g., Rothman et al., 2003; Fike et al., 2006; Sexton et al., 2011; Ridgwell and Arndt, 2015).

The contribution of DOC reservoirs to the past and modern Earth's global climate and biogeochemical cycles remains poorly constrained (Jiao et al., 2010; Sperling et al., 2011; Dittmar, 2015; Fakhraee et al., 2021), and the existence and consequences of large ancient oceanic DOC are still debated (e.g., Jiang et al., 2010, 2012; Ridgwell and Arndt, 2015; Li et al., 2017; Fakhraee et al., 2021). Thus, in addition to modeling approaches (e.g., Shi et al., 2017; Fakhraee et al., 2021), the understanding of DOC-related processes in the past anoxic and redox-stratified oceans (Lyons et al., 2014; Havig et al., 2015; Satkoski et al., 2015) should rely on the characterization of DOC dynamics in comparable modern analogues (Sperling et al., 2011). Although many studies have explored the C cycle of modern redox-stratified envi-

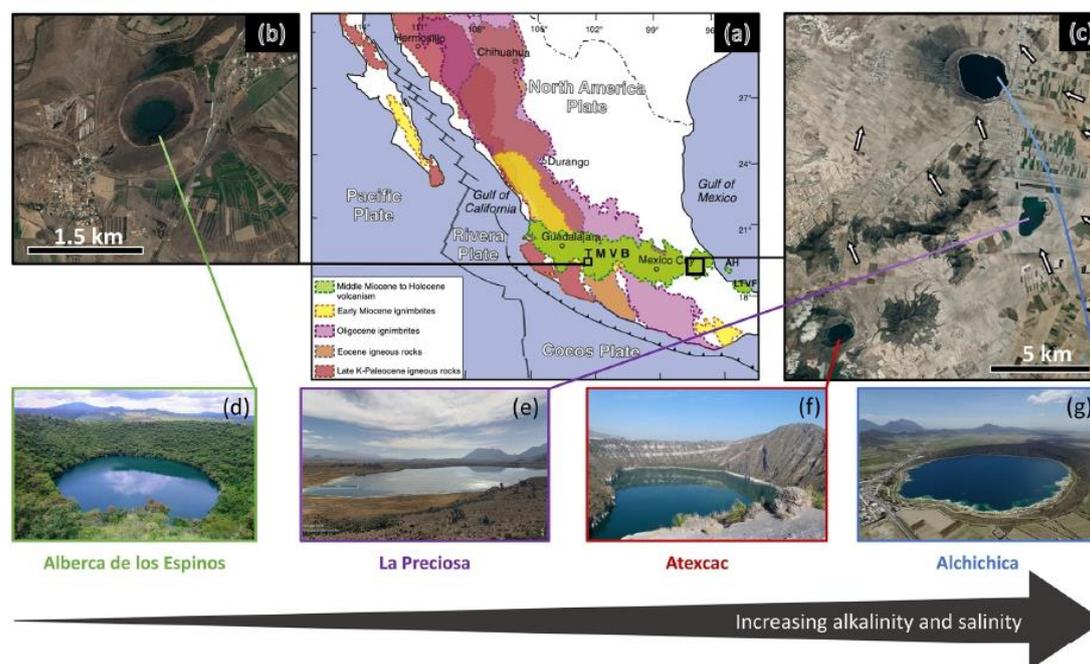
ronments (e.g., Crowe et al., 2011; Kuntz et al., 2015; Posth et al., 2017; Schiff et al., 2017; Havig et al., 2018; Cadeau et al., 2020; Saini et al., 2021; Petrash et al., 2022), very few have analyzed DOC, and even fewer have measured its stable isotope signature (Havig et al., 2018).

In this study, we characterize the DOC reservoir of four modern redox-stratified alkaline crater lakes from the Trans-Mexican Volcanic Belt (Ferrari et al., 2012) and its role within the C cycle of these environments. We report DOC concentration and isotopic composition at multiple depths in the four water columns and discuss these results in the context of physicochemical parameters (temperature, dissolved oxygen, chlorophyll *a*, and nutrient concentrations) and the isotopic composition of dissolved inorganic and particulate organic carbon (DIC, POC), all measured in the same lakes and from the same water samples as in Havas et al. (2023a). The four lakes show distinct water chemistries, along an alkalinity–salinity gradient (Zeyen et al., 2021), with diverse planktonic microbial communities (Iniesto et al., 2022; Havas et al., 2023a). These characteristics allow us to examine the effect of specific environmental and ecological constraints on the production and recycling of DOC in redox-stratified environments. We then present how the analysis of DOC deepens our understanding of the C cycle in these lakes compared to more classical DIC and POC analyses. Finally, the production and fate of the DOC reservoir in these modern analogues is used to discuss the potential role of DOC in past perturbations of the sedimentary C isotope record from the Neoproterozoic and Phanerozoic.

## 2 Site description

The main characteristics of the geological, climatic, and limnological context of the lakes under study are presented here, but a more detailed description is available in Havas et al. (2023a).

The four lakes are volcanic maars formed after phreatic, magmatic, and phreatomagmatic explosions and are located in the Trans-Mexican Volcanic Belt (TMVB, Fig. 1). The first lake, Alberca de los Espinos, is located at the margin of the Zacapu tectonic lacustrine basin in the Michoacán–Guanajuato Volcanic Field (MGVF) in the western-central part of the TMVB (Fig. 1). The other three (La Preciosa, Atexcac, and Alchichica) are located within the same zone ( $\sim 50\text{km}^2$ ) of the Serdán-Oriental Basin (SOB) in the easternmost part of the TMVB (Fig. 1). Alberca, with a temperate semi-humid climate, is predominantly underlain by andesitic rocks (Siebe et al., 2012, 2014). By contrast, Alchichica shows much higher evaporation than precipitation rates, reflecting the temperate sub-humid to temperate arid climate experienced by the SOB lakes (Silva-Aguilera et al., 2022). These lakes overlie calcareous and basaltic or andesitic basement rocks (Carrasco-Núñez et al., 2007; Chako Tchamabé et al., 2020).



**Figure 1.** Geographical location and photographs of the four crater lakes. (a) Geological map from Ferrari et al. (2012) with black squares showing the location of the four studied lakes within the Trans-Mexican Volcanic Belt (TMVB). (b, c) Close-up ©Google Earth views of Alberca de los Espinos and the Serdán-Oriental Basin (SOB). The white arrows represent the approximate groundwater flow path (based on Silva-Aguilera, 2019). (d–g) Photographs of the four lakes (panel d from ©Google Image [“enamoredemexicowebiste”] – panel e from ©Google Earth street view, and panel g is from ©Agencia Es Imagen). Figure from Havas et al. (2023a).

These variations in geological context and hydrological processes generate a gradient of water chemical compositions, where salinity, alkalinity, and DIC increase in the following order: (i) Lake Alberca, (ii) La Preciosa, (iii) Atexcac, and (iv) Alchichica (Zeyen et al., 2021). The four lakes are alkaline with pH values around 9. Under these conditions, DIC is composed of  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$  ions with minor amounts of  $\text{CO}_{2(\text{aq})}$  (< 0.5 %). This favors the precipitation of microbialite deposits, which are found in the four systems but more abundantly as alkalinity increases (Zeyen et al., 2021).

The four lakes are defined as warm monomictic with anoxic conditions prevailing in the bottom waters during most of the year (i.e., one mixing period per year, during winter; Armienta et al., 2008; Macek et al., 2020; Havas et al., 2023a). They are all closed lakes with no inflow or outflow of surficial waters and are thus fed by rain and groundwater only.

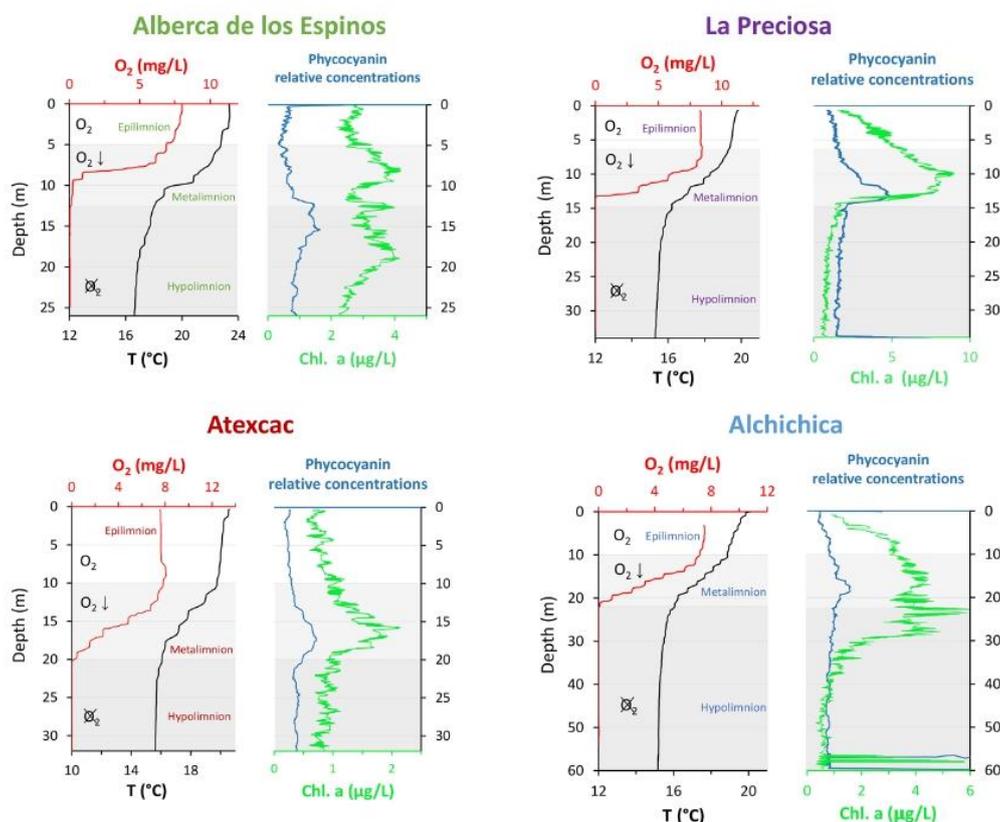
Atexcac is the most oligotrophic of the three SOB lakes (Lugo et al., 1993; Vilaclara et al., 1993; Sigala et al., 2017). Chlorophyll *a* data from May 2019 (Fig. 2), based on mean and maximum value categories (OECD et al., 1982), indicate ultra-oligotrophic conditions for Atexcac ( $\leq 1$  and  $2 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively), oligotrophic conditions for Alchichica ( $\leq 2$  and  $6 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively), intermediate conditions between oligo- and mesotrophic for Alberca ( $\leq 3$  and  $4.5 \mu\text{g L}^{-1}$ , re-

spectively), and low-mesotrophic conditions for La Preciosa ( $\leq 3$  and  $9 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively). Total dissolved P concentrations from May 2019 show similar values for the three SOB lakes close to the surface (increasing in the anoxic zone of Alchichica) but much higher values for Alberca (Havas et al., 2023a). This pattern was observed during previous sampling campaigns (Zeyen et al., 2021). Alberca is surrounded by more vegetation, which could favor the input of nutrients to this lake. La Preciosa and Alberca are thus the least oligotrophic of the four lakes. Importantly, although differences in trophic status exist between the four lakes, they are more oligotrophic than eutrophic.

### 3 Method

#### 3.1 Sample collection

All samples were collected in May 2019. Samples for DOC analyses were collected at different depths from the surface to the bottom of the water columns, particularly where the physicochemical parameters showed pronounced variation (e.g., at the chemocline and turbidity peaks; Fig. 2 and Table 1). Water samples were collected with a Niskin bottle. For comparison with DIC and POC data, the DOC was analyzed



**Figure 2.** Physicochemical parameter depth profiles of Alberca de los Espinos, La Preciosa, Atexcac, and Alchichica: dissolved oxygen concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ ), water temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ), and phycocyanin and chlorophyll *a* pigments ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Absolute values for phycocyanin concentrations were not determined; only relative variations are represented (with increasing concentrations to the right). Epi-, meta-, and hypolimnion layers are represented for each lake by the white, gray, and dark-gray areas based on temperature profiles with the metalimnion corresponding to the thermocline. The three layers match the oxygen-rich, intermediate, and oxygen-poor zones, except in La Preciosa). Original data from Havas et al. (2023a).

from the same Niskin sampling as in Havas et al. (2023a), except where indicated (Fig. 4; Tables 1 and 2). Analyses of DOC and major, minor, and trace ions were carried out after water filtration at  $0.22\ \mu\text{m}$ , directly in the field with Filtropur S filters pre-rinsed with lake water. Details about the sampling procedure and analysis of the physicochemical parameters, as well as DIC and POC measurements, are reported in Havas et al. (2023a).

### 3.2 Dissolved organic carbon (DOC) concentration and isotope measurements

Filtered solutions were acidified to a pH of  $\sim 1\text{--}2$  to degas all the DIC and leave DOC as the only C species in the solution. The bulk DOC was analyzed directly from the acidified waters (i.e., all organic C molecules smaller than  $0.22\ \mu\text{m}$ ). The bulk concentration was measured with a Vario TOC at the Laboratoire Biogéosciences (Dijon), calibrated with a range of potassium hydrogen phthalate (Acros®) solutions. Before

isotopic analysis, the DOC concentration of the samples was adjusted to match international standards at 5 ppm (USGS 40 glutamic acid and USGS 62 caffeine). Isotopic compositions were measured at the Laboratoire Biogéosciences using an IsoTOC (Elementar, Hanau, Germany), running under He-continuous flow and coupled with an IsoPrime stable isotope ratio mass spectrometer (IRMS; Isoprime, Manchester, UK). Samples were stirred with a magnetic bar and flushed with He before injection of 1 mL sample aliquots (repeated three times). The DOC was then converted into gaseous  $\text{CO}_2$  by combustion at  $850\ ^{\circ}\text{C}$ , quantitatively oxidized by copper oxide, and separated from other combustion products in a reduction column and a water condenser. This  $\text{CO}_2$  was transferred to the IRMS via an open-split device. To avoid a significant memory effect between consecutive analyses, each sample (injected and measured three times) was separated by six injections of deionized water, and the first sample measurement was discarded. Average  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  reproducibility was 1.0‰ for standards and 0.5‰ for sam-

ples (1 SD). The average reproducibility for sample [DOC] measurements was 0.3 mM, and blank tests were below the detection limit.

In addition to DOC measurements, we calculated the total carbon concentration as the sum of DOC, DIC, and POC concentrations, with DIC and POC data from Havas et al. (2023a). The corresponding isotopic composition ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{Total}}$ ) was calculated as the weighted average of the three  $\delta^{13}\text{C}$ . The DIC and POC isotope data were also used to calculate isotopic differences with  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$ , expressed in the  $\Delta^{13}\text{C}$  notation. The values for  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$  are detailed in Havas et al. (2023a) and summarized in the results section.

## 4 Results

The water columns of the four lakes were clearly stratified in May 2019 (Fig. 2; Havas et al., 2023a). The epi-, meta-, and hypolimnion layers of each lake were identified based on the thermocline depths and correspond to the oxygen-rich, intermediate, and oxygen-poor layers in the four lakes, although the oxycline in La Preciosa is slightly thinner than the thermocline ( $\sim 5$  vs. 8 m). In the following, DIC, POC,  $\text{O}_2$ , chlorophyll *a* (Chl *a*),  $\text{NH}_4$ , P, and  $\text{CO}_2(\text{aq})$  data are also presented.

### 4.1 Lake Alberca de los Espinos

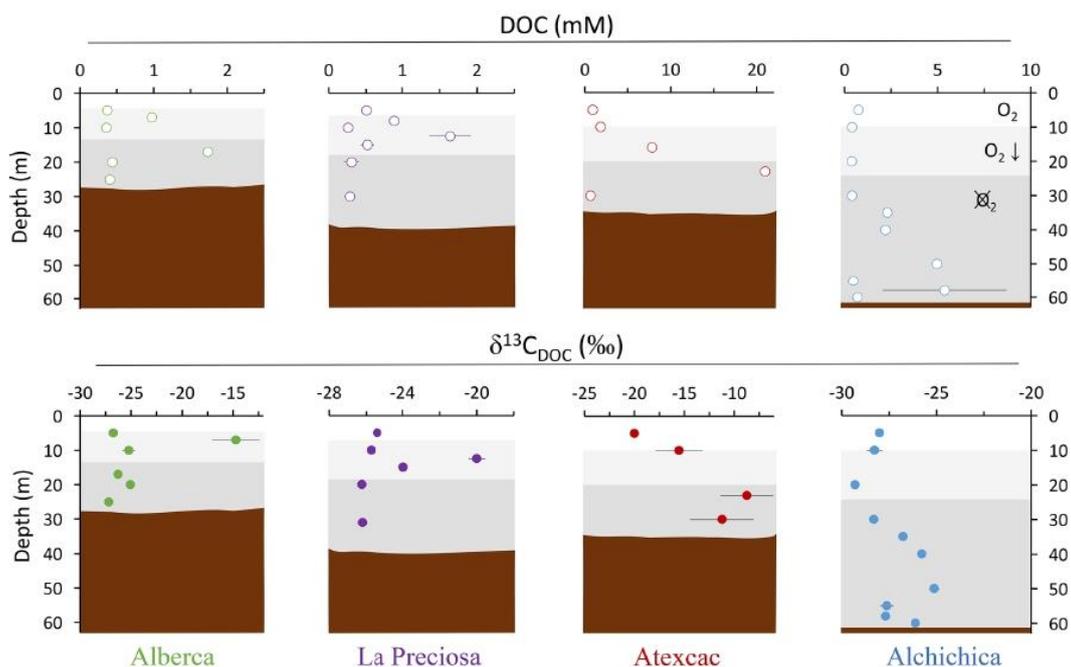
Bulk DOC had a concentration of  $\sim 0.4$  mM throughout the water column, except at 7 and 17 m, where it peaked at 1.0 and 1.7 mM, respectively (Fig. 3). Its isotopic composition ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$ ) was comprised between  $-27.2\text{‰}$  and  $-25.1\text{‰}$ , except at 7 m, where it reached  $-14.7\text{‰}$  (Fig. 3). It represented  $\sim 8\%$  of total carbon on average and 93% of the organic carbon present in the water column. Total C concentration increased downward from about 7 to 9 mM. The  $\delta^{13}\text{C}_{\text{Total}}$  decreased from  $-3.9\text{‰}$  to  $-7.9\text{‰}$  between 5 and 17 m and then increased to  $-3.2\text{‰}$  at 25 m (Table 1). The isotopic difference between DOC and DIC ( $\Delta^{13}\text{C}_{\text{DOC-DIC}}$ ) was between  $-21.2\text{‰}$  and  $-25.2\text{‰}$ , except at 7 m depth, where it peaked to  $-12.4\text{‰}$  (Fig. 4; Table 2). The  $\Delta^{13}\text{C}_{\text{DOC-POC}}$  values were comprised between  $-1.5\text{‰}$  and  $+3.1\text{‰}$ , except at 7 m depth, where DOC was enriched in  $^{13}\text{C}$  by  $\sim 11.5\text{‰}$  (Fig. 4; Table 2). The DIC concentration and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  averaged  $7.5 \pm 0.7$  mM and  $-2.9 \pm 0.8\text{‰}$ ; the POC concentration and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$  averaged  $0.04 \pm 0.02$  mM and  $-27.1 \pm 1.3\text{‰}$ . Dissolved oxygen showed a stratified profile with an oxycline layer transitioning from  $\text{O}_2$ -saturated to  $\text{O}_2$ -depleted conditions between 5 and 12 m depths (Fig. 2). Chl *a* concentration showed three distinct peaks at  $\sim 7.5$ , 12.5, and 17.5 m depths, all reaching  $\sim 4 \mu\text{g L}^{-1}$  (Fig. 2). The average  $\text{NH}_4^+$  and P concentrations were 3.9 and 11.3  $\mu\text{M}$ , respectively. The activity of  $\text{CO}_2(\text{aq})$  was  $10^{-5.00}$  at 7 m depth and increased to  $10^{-3.40}$  at the bottom of the lake.

### 4.2 Lake La Preciosa

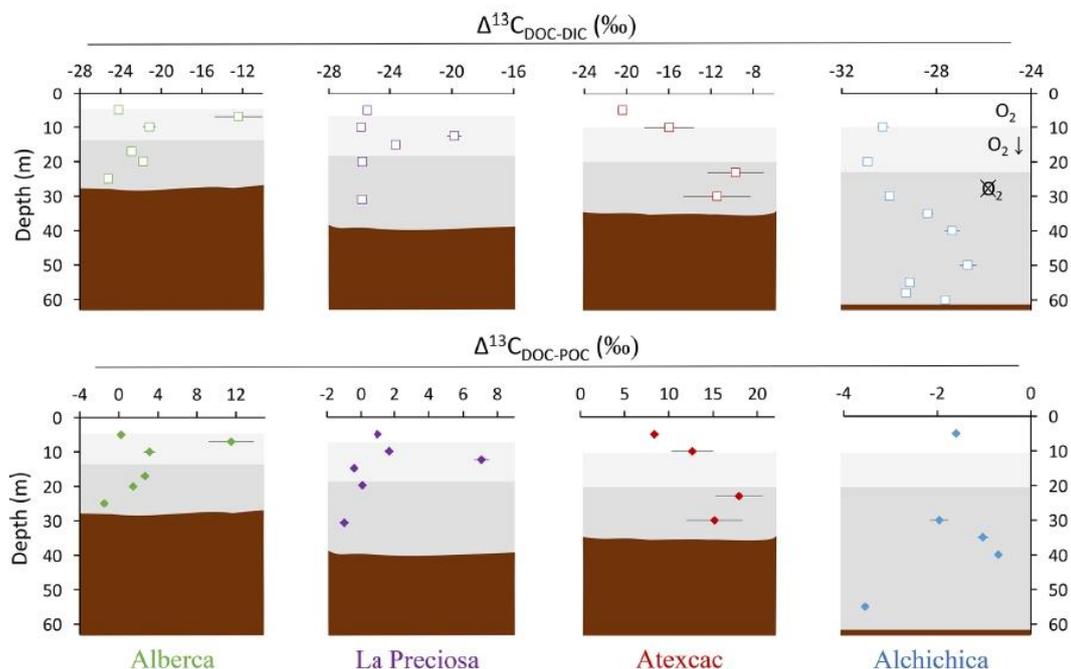
Bulk DOC had a concentration of  $\sim 0.5$  mM throughout the water column, except at 12.5 m, where it peaked at 1.6 mM. The  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  was  $-25.9 \pm 0.4\text{‰}$  throughout the water column, except between 12.5 and 15 m, where it reached  $-20.0\text{‰}$  (Fig. 3). The DOC represented  $\sim 3\%$  of the total carbon on average and 91% of the organic carbon present in the water column. The total C concentration was relatively stable at  $\sim 13.8$  mM, while  $\delta^{13}\text{C}_{\text{Total}}$  was centered around  $-1\text{‰}$  with a decrease to  $-2.8\text{‰}$  at 12.5 m (Table 1). The  $\Delta^{13}\text{C}_{\text{DOC-DIC}}$  values were very stable with depth around  $-26\text{‰}$  but markedly increased at 12.5 m up to  $-19.8\text{‰}$  (Fig. 4; Table 2). The  $\Delta^{13}\text{C}_{\text{DOC-POC}}$  values decreased from  $\sim 1.3\text{‰}$  in the upper waters to  $\sim -0.4\text{‰}$  in the bottom waters but showed a peak at  $+7.1\text{‰}$  at a depth of 12.5 m (Fig. 4; Table 2). The DIC concentration and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  averaged  $13.0 \pm 0.8$  mM and  $-0.2 \pm 0.3\text{‰}$ ; the POC concentration and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$  averaged  $0.05 \pm 0.02$  mM and  $-26.1 \pm 1.4\text{‰}$ . Dissolved oxygen showed a stratified profile with an oxycline layer transitioning from  $\text{O}_2$ -saturated to  $\text{O}_2$ -depleted conditions between 8 and 14 m depths (Fig. 2). The Chl *a* concentration showed a large peak at  $\sim 10$  m, reaching  $9 \mu\text{g L}^{-1}$  (Fig. 2). The average  $\text{NH}_4^+$  and P concentrations were 1.9 and 0.2  $\mu\text{M}$ , respectively. The activity of  $\text{CO}_2(\text{aq})$  averaged  $10^{-4.57}$ .

### 4.3 Lake Atexcac

Bulk DOC had a concentration of  $\sim 1.1$  mM throughout the water column, except at 16 and 23 m, where it reached 7.7 and 20.8 mM, respectively. The  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  increased from  $-20.0\text{‰}$  to  $-8.7\text{‰}$  between 5 and 23 m and decreased to  $-11.2\text{‰}$  at 30 m. It represented about 16% of the total carbon on average and 98% of the organic carbon present in the water column. Total C concentrations and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{Total}}$  are centered around 27.7 mM and  $-0.6\text{‰}$  with a clear increase to 38.9 mM and a decrease to  $-2.7\text{‰}$  at 23 m, respectively. The  $\Delta^{13}\text{C}_{\text{DOC-DIC}}$  values significantly increased from the surface ( $-20.4\text{‰}$ ) to the hypolimnion ( $\sim -11.4\text{‰}$ ). The DOC isotope compositions were strictly and significantly less negative than POC (i.e., enriched in heavy  $^{13}\text{C}$ ), with  $\Delta^{13}\text{C}_{\text{DOC-POC}}$  reaching as much as  $+17.9\text{‰}$  at the depth of 23 m (Fig. 4; Table 2). The DIC concentration and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  averaged  $25.7 \pm 0.9$  mM and  $0.5 \pm 0.3\text{‰}$ ; the POC concentration and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$  averaged  $0.04 \pm 0.02$  mM and  $-27.7 \pm 1.1\text{‰}$ . Dissolved oxygen showed a stratified profile with an oxycline layer transitioning from  $\text{O}_2$ -saturated to  $\text{O}_2$ -depleted conditions between 10 and 20 m depths (Fig. 2). Chl *a* concentration showed a small peak at 16 m, reaching  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  (Fig. 2). The average  $\text{NH}_4^+$  and P concentrations were 2.5 and 0.3  $\mu\text{M}$ , respectively. The activity of  $\text{CO}_2(\text{aq})$  averaged  $10^{-4.27}$ .



**Figure 3.** Vertical profiles of concentration and isotopic composition of dissolved organic carbon (DOC) throughout the water columns of the studied lakes: Alberca de los Espinos, La Preciosa, Atexcac, and Alchichica. Concentration is in  $\text{mmol L}^{-1}$  (mM), and isotopic composition is in ‰ vs. VPDB. The white, gray, and dark-gray shading are as in Fig. 2. The brown shading symbolizes the presence of sediment at the bottom of the water columns (showing the greater water depth in Lake Alchichica).



**Figure 4.** Vertical profiles of the difference in  $\delta^{13}\text{C}$  values of DOC and DIC (top) and of DOC and POC (bottom) throughout the water columns of the four lakes (all expressed as  $\Delta^{13}\text{C}$  in ‰ vs. VPDB). POC and DIC data used in these calculations are from Havas et al. (2023a). In Alchichica,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  was not measured at 5 m, and its value at 10 m was used in this calculation of  $\Delta^{13}\text{C}_{\text{DOC-POC}}$ . The white, gray, and dark-gray shading are as in Fig. 2. The brown shading symbolizes the presence of sediment at the bottom of the water columns.

#### 4.4 Lake Alchichica

Bulk DOC had a concentration of  $\sim 0.5$  mM throughout the water column, except in the hypolimnion, where it reached up to 5.4 mM. The  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  varied from  $-29.3\text{‰}$  to  $-25.1\text{‰}$ , with maximum values found in the hypolimnion (Fig. 3). The DOC represented about 5 % of the total carbon on average and 93 % of the organic carbon present in the water column. Total carbon concentration depth profile roughly followed that of DOC, while  $\delta^{13}\text{C}_{\text{total}}$  was between  $-0.2\text{‰}$  and  $1.6\text{‰}$  throughout the water column, except in the lower part of the hypolimnion, where it decreased to  $-2.3\text{‰}$  (Table 1). The isotopic difference between DOC and DIC ( $\Delta^{13}\text{C}_{\text{DOC-DIC}}$ ) was slightly smaller in the hypolimnion and was comprised between  $-26.7\text{‰}$  and  $-30.9\text{‰}$ . The DOC isotope compositions were more negative than POC, with  $\Delta^{13}\text{C}_{\text{DOC-POC}}$  values between  $-0.7\text{‰}$  and  $-3.5\text{‰}$  (Fig. 4; Table 2). The DIC concentration and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  averaged  $34.6 \pm 0.6$  mM and  $1.7 \pm 0.2\text{‰}$ ; the POC concentration and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$  averaged  $0.01 \pm 0.04$  mM and  $-25.6 \pm 1.0\text{‰}$ . Dissolved oxygen showed a stratified profile with an oxycline layer transitioning from  $\text{O}_2$ -saturated to  $\text{O}_2$ -depleted conditions between  $\sim 10$  and 20 m depths (Fig. 2). Chl *a* showed a broad peak between  $\sim 10$  and 30 m, averaging  $4 \mu\text{g L}^{-1}$  and with a narrow maximum of  $6 \mu\text{g L}^{-1}$  (Fig. 2). The average  $\text{NH}_4^+$  and P concentrations were 4.3 and 1.5  $\mu\text{M}$ , respectively. The activity of  $\text{CO}_2(\text{aq})$  averaged  $10^{-4.53}$ .

## 5 Discussion

The four Mexican lakes studied here have a high DOC content but very different profiles and signatures for [DOC] and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  (Fig. 3). Evaporation may increase DOC concentration (Anderson and Stedmon, 2007; Zeyen et al., 2021) but would not explain the significant intra-lake DOC variability with depth. It is likely marginal because, in contrast with what was observed for DIC (Havas et al., 2023a), there is no correlation between the average DOC concentration in the Mexican lakes and their salinity ( $R^2 = 0.47$ ,  $p = 0.2$  for DOC and  $R^2 = 0.93$ ,  $p = 5.8 \times 10^{-5}$  for DIC). In the following discussion, we therefore explore the different patterns of DOC production and fate in relation to other environmental and biological variations and how this can provide information about past DOC-related perturbations of the C cycle.

### 5.1 Sources and fate of DOC

Due to their endorheic nature, the four lakes receive relatively little allochthonous OM (Alcocer et al., 2014b; Havas et al., 2023a). It is therefore possible to focus on DOC-related processes occurring within the water column, particularly on autochthonous DOC primary production. Autochthonous DOC can form through higher-rank OM degradation processes such as sloppy feeding by zooplankton, UV photolysis, or bacterial and viral cell lysis (Lampert, 1978;

Hessen, 1992; Bade et al., 2007; Thornton, 2014; Brailsford, 2019), as well as passive (leakage) or active (exudation) release by healthy cells (e.g., Baines and Pace, 1991; Hessen and Anderson, 2008; Thornton, 2014; Ivanovsky et al., 2020). Generally, this C release (whether active or passive) tends to be enhanced in nutrient-limited conditions because recently fixed C is in excess compared with other essential nutrients such as N or P (Hessen and Anderson, 2008; Morana et al., 2014; Ivanovsky et al., 2020). For oxygenic phototrophs, this is particularly true under high photosynthesis rates because photorespiration bolsters the excretion of DOC (Renstrom-Kellner and Bergman, 1989). Oligotrophic conditions also tend to limit heterotrophic bacterial activity and thus preserve DOC stocks (Thornton, 2014; Dittmar, 2015). Both these production and preservation aspects are consistent with the trend of increasing DOC concentrations observed in the lakes, from the less oligotrophic Alberca and La Preciosa (0.7 mM on average) to the more oligotrophic Alchichica (1.8 mM) and Atexcac (6.5 mM).

#### 5.1.1 DOC release by autotrophs

In the four Mexican lakes, DOC concentration profiles exhibit one or several peaks that occur in both oxic and anoxic waters (Fig. 3). These peaks correlate with Chl *a* peaks in Alberca and La Preciosa, but not in the other two lakes. However, in Atexcac, a remarkable DOC peak (Fig. 3) occurs at the same depth as a peak of anoxygenic photosynthesis (Havas et al., 2023a). These co-occurrences indicate that a large portion of DOC in these three lakes (at least at these depths) arises from the release of photosynthetic C fixed in excess. Phytoplankton in aerobic conditions generally release dissolved organic matter by (i) an active “overflow mechanism” (DOM exudation) or (ii) passive diffusion through the cell membranes, but this remains to be shown for anoxygenic organisms. In the first case, DOM is actively released from the cells as a result of C fixation rates higher than growth and molecular synthesis rates (e.g., Baines and Pace, 1991). Hence, DOM exudation depends not only on the nature of primary producers (different taxa may display very different growth rates, photosynthetic efficiency, and exudation mechanisms) but also on environmental factors such as irradiance and nutrient availability (e.g., Otero and Vincenzini, 2003; Morana et al., 2014; Rao et al., 2021). Exudation of DOM may also serve fitness-promoting purposes such as storage, defense, or mutualistic goals (Bateson and Ward, 1988; Hessen and Anderson, 2008). In the case of passive diffusion, DOM release also depends on cell permeability and the outward DOC gradient but is more directly related to the amount of phytoplankton biomass (e.g., Marañón et al., 2004). Thus, any new photosynthate production drives a steady DOM release rate, independent of environmental conditions to some extent (Marañón et al., 2004; Morana et al., 2014). The fact that Alberca and La Preciosa have lower DOC but Chl *a* concentrations higher than Atexcac and

**Table 1.** Concentration and isotopic composition of dissolved organic carbon (DOC). Total carbon concentration is the sum of DOC, DIC, and POC reservoirs. For LP 8 m, [DIC] was not measured, and the total carbon concentration was not calculated. The DIC and POC were determined by Havas et al. (2023a). The  $\delta^{13}\text{C}_{\text{Total}}$  is the weighted average of the three  $\delta^{13}\text{C}$ . ND: non-determined.

Lake	Sample	DOC	Total carbon	$\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{Total}}$
		mmol L <sup>-1</sup>		‰	
Alberca de Los Espinos	Albesp 5 m	0.4	7.2	-26.7	-3.9
	Albesp 7 m	1.0	8.1	-14.7	-3.9
	Albesp 10 m	0.4	7.6	-25.2	-5.1
	Albesp 17 m	1.7	9.0	-26.3	-7.9
	Albesp 20 m	0.4	8.4	-25.1	-4.5
	Albesp 25 m	0.4	9.2	-27.2	-3.2
La Preciosa	LP 5 m	0.5	14.0	-25.4	-0.9
	LP 8 m	0.9		ND	ND
	LP 10 m	0.3	13.7	-25.7	-0.4
	LP 12.5 m	1.6	13.2	-20.0	-2.8
	LP 15 m	0.5	13.9	-24.0	-1.3
	LP 20 m	0.3	13.6	-26.2	-1.0
	LP 31 m	0.3	13.6	-26.2	-0.9
Atexcac	ATX 5 m	0.92	27.4	-20.0	-0.4
	ATX 10 m	1.8	28.1	-15.5	-0.7
	ATX 16 m	7.8	34.7	ND	ND
	ATX 23 m	21.0	45.2	-8.7	-3.6
	ATX 30 m	0.7	26.4	-11.2	-0.1
Alchichica	AL 5 m	0.7	35.8	ND	ND
	AL 10 m	0.4	33.5	-28.3	1.6
	AL 20 m	0.4	35.0	-29.3	1.3
	AL 30 m	0.4	35.1	-28.3	1.2
	AL 35 m	2.3	37.2	-26.8	-0.2
	AL 40 m	2.2	37.0	-25.8	-0.1
	AL 50 m	5.0	39.8	-25.1	-1.8
	AL 55 m	0.5	35.3	-27.6	1.1
	AL 58 m	5.4	40.2	-27.7	-2.3
AL 60 m	0.7	35.3	-26.1	1.0	

Alchichica overall suggests that DOC production does not directly relate to phytoplankton biomass and is not passively released. By contrast, active DOC release is supported by DOC isotope signatures. These tropical Mexican lakes correspond precisely to environmental contexts (high irradiance and oligotrophic freshwater bodies) where DOC exudation has been observed and is predicted (e.g., Baines and Pace, 1991; Morana et al., 2014; Thornton, 2014; Rao et al., 2021).

Release of DOC by primary producers can be characterized by the percentage of extracellular release (PER), which corresponds to the fraction of DOC over total (dissolved and particulate) OM primary production (e.g., Thornton, 2014). The PER is highly variable and averages about 13 % of C biomass over a wide range of environments (e.g., Baines and Pace, 1991; Thornton, 2014). Values as high as 99 % have been reported (see Bertilsson and Jones, 2003), showing that most of the fixed C can be released in the external aqueous media as DOC. At depths where oxygenic photosynthesis oc-

curs, the DOC over total OC ratio averages approximately 95 %, 94 %, 99 %, and 85 % for Alberca, La Preciosa, Atexcac, and Alchichica, respectively. Thus, although the PER was not directly measured and some of the measured DOC may correspond to an older long-term DOC reservoir, the majority of DOC measured could represent a recent phytoplankton exudation.

The DOC peaks associated with primary production (mainly photosynthesis) are characterized by very positive  $\Delta^{13}\text{C}_{\text{DOC-POC}}$  (from +3 ‰ to +18 ‰, Fig. 4). These signatures further support a primary origin of DOC as photosynthate release at these depths rather than a secondary origin by OM degradation. Bacterial heterotrophy would generate smaller and rather negative  $\Delta^{13}\text{C}_{\text{DOC-POC}}$  (Sect. 5.1.2 and references therein), and cell lysis or zooplankton sloppy feeding would also produce  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  close to  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$  values. Photo-degradation is unlikely to proceed at these depths and would not generate such positive fractionations

(Chomiccki, 2009). A switch from  $\text{CO}_2(\text{aq})$  to  $\text{HCO}_3^-$  as an inorganic C source (which differ by 10‰, e.g., Mook et al., 1974) would not adequately explain the deviation between  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$  and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$ . The isotopic enrichment of DOC molecules relative to POC must therefore have a different origin.

The  $^{13}\text{C}$ -enriched DOC could originate from photosynthetic organisms using a different C fixation pathway, inducing a smaller isotopic fractionation (provided that these organisms contributed predominantly to the DOC rather than to the POC fraction). In Alberca and Atexcac, anoxygenic phototrophic bacteria may release large amounts of DOC, especially under nutrient-limiting conditions (Ivanovsky et al., 2020). Unlike cyanobacteria or purple sulfur bacteria (PSB, anoxygenic phototrophs belonging to the Proteobacteria), which use the Calvin–Benson–Bassham pathway (CBB), green sulfur bacteria (GSB, another group of anoxygenic phototrophs belonging to the Chlorobi) use the reductive citric acid cycle or reverse tricarboxylic acid (TCA) cycle, which tends to induce smaller isotopic fractionations (between  $\sim 3\%$ – $13\%$ ; Hayes, 2001). The DOC isotope signatures recorded in the hypolimnion of Alberca ( $\varepsilon_{\text{DOC-CO}_2} \approx -13.5 \pm 2\%$ ) agree well with fractionations found for this type of organism in laboratory cultures and in stratified water bodies (Posth et al., 2017). By contrast,  $\varepsilon_{\text{DOC-CO}_2}$  signatures in the hypolimnion of Atexcac are higher ( $\varepsilon_{\text{DOC-CO}_2} \approx 0\%$ ) and thus cannot be explained by the use of the reductive citric acid cycle C fixation pathway. Consistently, GSB were identified in Alberca but not in Atexcac (Havas et al., 2023a).

Phytoplankton blooms may specifically release isotopically heavy organic molecules. Carbohydrates could be preferentially released under nutrient-limiting conditions as they are devoid of N and P (Bertilsson and Jones, 2003; Wetz and Wheeler, 2007; Thornton, 2014). Carbohydrates typically have a  $^{13}\text{C}$ -enriched (heavy) isotopic composition (Blair et al., 1985; Jiao et al., 2010; Close and Henderson, 2020). Considering the isotopic mass balance of cell-specific organic compounds, this molecular hypothesis is insufficient to explain the full range of  $\Delta^{13}\text{C}_{\text{DOC-POC}}$  variations measured in Alberca and Atexcac (Hayes, 2001).

Alternatively, such enrichments require that DOC and DIC first accumulate in the cells. If DOC molecules were released as soon as they were produced, their isotopic composition would tend towards that of the biomass (i.e.,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$ , within the range of molecule-specific isotopic compositions), which is not the case. If DIC could freely exchange between inner- and outer-cell media, maximum carboxylation-limited fractionation (between  $\sim 18\%$  and  $30\%$  depending on Ru-BisCO form; Thomas et al., 2019) would be expressed in all synthesized organic molecules, as represented in Fig. 5a (e.g., O’Leary, 1988; Descolas-Gros and Fontugne, 1990; Fry, 1996). This is also inconsistent with the DOC isotopic signatures (see  $\varepsilon_{\text{DOC-CO}_2}$  in Table 2).

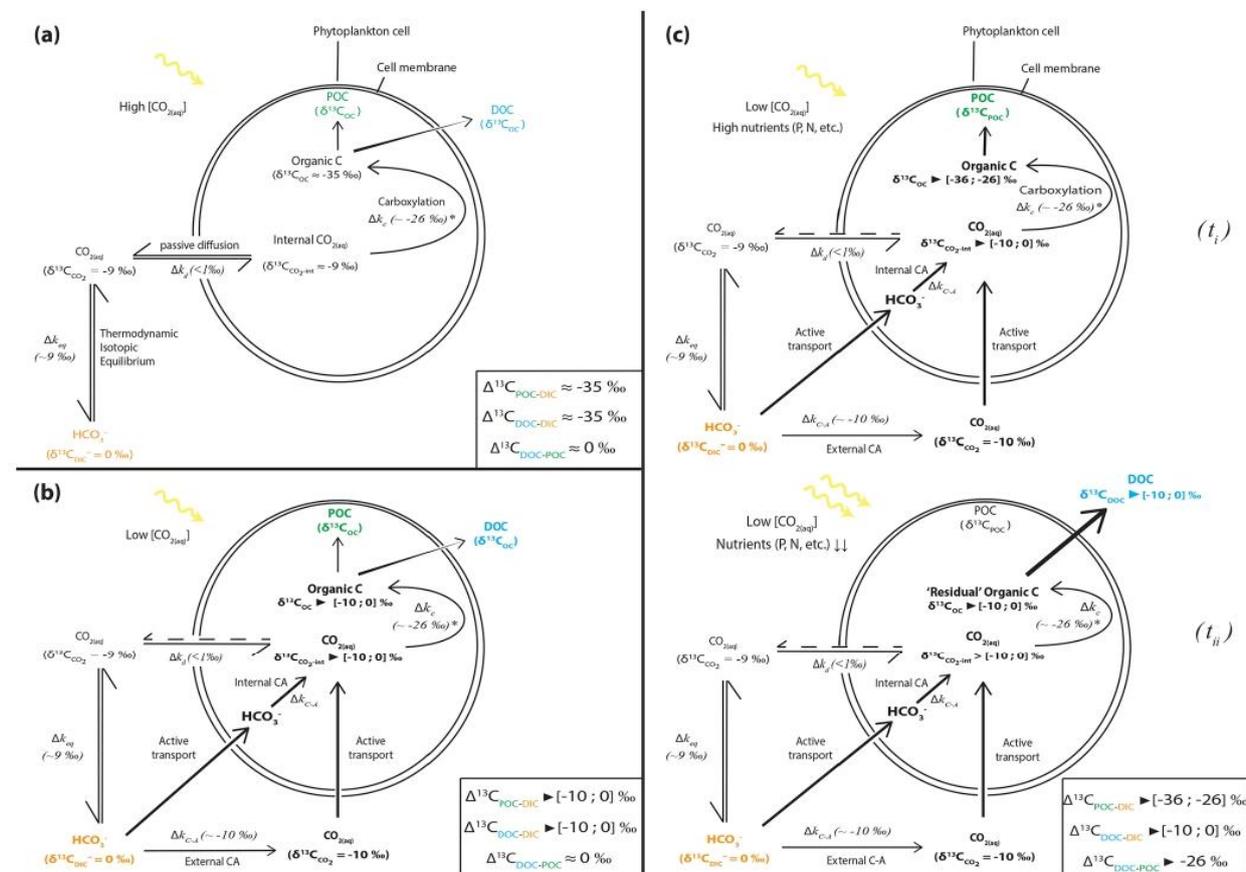
Under the environmental conditions of the lakes studied (i.e., low  $\text{CO}_2$  relative to  $\text{HCO}_3^-$ , local planktonic competi-

tion for  $\text{CO}_2$ , and low nutrient availability), the activation of an intracellular DIC-concentrating mechanism (DIC-CM) is expected (Beardall et al., 1982; Burns and Beardall, 1987; Fogel and Cifuentes, 1993; Badger et al., 1998; Iñiguez et al., 2020). This mechanism is particularly relevant in oligotrophic aqueous media (Beardall et al., 1982), where  $\text{CO}_2$  diffusion is slower than in the air (O’Leary, 1988; Fogel and Cifuentes, 1993; Iñiguez et al., 2020). A DIC-CM has been proposed to reduce the efflux of DIC from the cells back to the extracellular solution. This internal DIC is eventually converted into organic biomass, thereby drawing the cell isotopic composition closer to that of  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  (Fig. 5; Beardall et al., 1982; Fogel and Cifuentes, 1993; Werne and Hollander, 2004). As a conceptual model, we suggest that the activation of a DIC-CM could preserve a large  $\Delta^{13}\text{C}_{\text{POC-DIC}}$  while generating an apparent fractionation between the DOC and POC molecules. The initially fixed OC would be discriminated against the heavy C isotopes and incorporated into the cellular biomass (Fig. 5c,  $t_i$ ). In turn, following the overflow mechanism scenario, high photosynthetic rates (due to high irradiance and temperature and high DIC despite low  $\text{CO}_2$ ) coupled with low population growth rates and organic molecule synthesis (due to limited abundances of P, N, and Fe) would result in the exudation of excess organic molecules with heavy  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  as they are synthesized from residual internal DIC, which progressively becomes  $^{13}\text{C}$  enriched (Fig. 5c,  $t_{ii}$ ). This process could explain the formation of DOC with  $\delta^{13}\text{C}$  very close to DIC and/or  $\text{CO}_2$  signatures as observed in Lake Atexcac. This suggests that oligotrophic conditions could be a determinant factor in the generation of significantly heavy  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$ , even more so if they are coupled to high irradiance. This also demonstrates that considerable isotopic variability can exist between these two organic C reservoirs.

In summary, the unusual [DOC] and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  profiles in Alberca, La Preciosa, and Atexcac could be interpreted as mainly reflecting a prominent exudation of autochthonous C, fixed in excess by oxygenic and/or anoxygenic phototrophs in nutrient-poor and high-irradiance conditions. The striking  $^{13}\text{C}$ -rich signatures of these exudates are interpreted as reflecting either the activation of a DIC-CM by oxygenic and/or anoxygenic phototrophs or the fixation of C via the reductive citric acid cycle. We propose a conceptual model involving the DIC-CM, whereby oligotrophic and high irradiance contexts can lead to high  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  compared to both  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$ .

### 5.1.2 OM partial degradation and DOC accumulation: the case of Lake Alchichica

From the previous discussion, it appears that the environmental conditions of the Mexican lakes favor substantial phytoplankton production of DOC. Alcocer et al. (2014a) proposed that an early-spring cyanobacterial bloom in Lake Alchichica may favor the production of DOC in the epilimnion. How-



**Figure 5.** Schematic view of phytoplankton cells during autotrophic C fixation through different C supply strategies and associated apparent isotopic fractionation between DIC and POC or DOC and between DOC and POC. **(a)** Case where [CO<sub>2(aq)</sub>] is high enough to allow for a DIC supply by passive CO<sub>2(aq)</sub> diffusion through the cell membrane and where CO<sub>2(aq)</sub> is at equilibrium with other DIC species. Isotopic fractionation is maximum (minimum  $\delta^{13}\text{C}_{\text{OC}}$ ) because C fixation is limited by the carboxylation step. DOC is released following an in- to outward cell concentration gradient and has a similar composition to POC. **(b)** Classic view of C isotopic cycling resulting from active DIC transport within the cell because of low ambient [CO<sub>2(aq)</sub>] (through a DIC-CM). Carbonic anhydrase (CA) catalyzes the conversion between HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and CO<sub>2(aq)</sub> inside or outside the cell with isotopic fractionation close to equilibrium fractionation ( $\sim 10 \text{‰}$ ). While inward passive CO<sub>2(aq)</sub> diffusion can still occur, the DIC-CM activation reduces the reverse diffusion, resulting in internal CO<sub>2(aq)</sub> isotopic composition approaching that of the incoming DIC (depending on the fraction of internal CO<sub>2(aq)</sub> leaving the cell). Acting as a “closed system”, most of the internal DIC is fixed as OC, and minimum isotopic fractionation is expressed for both POC and DOC. **(c)** Proposed model for C isotopic fractionation with active DIC transport including isotopic discrimination between POC and DOC. **(t<sub>i</sub>)** Initially fixed C is isotopically depleted and incorporates the cell’s biomass as long as there are sufficient nutrients to enable the synthesis of complex organic molecules. **(t<sub>ii</sub>)** In low nutrient conditions but with high photosynthetic activity – subsequently, fixed C is released out of the cell as DOC following the overflow hypothesis and inherits heavier isotopic compositions from the residual internal DIC. This leads to distinct POC and DOC isotopic signatures, with small fractionation between DOC and DIC, the amplitude of which will depend on the rate of CO<sub>2</sub> backward diffusion and the ratio of the biomass C (POC) to released C (DOC).

ever, at the time of sampling, the DOC reservoir in this lake was not correlated with any sizable autotrophic activity at any depth. The large epilimnetic Chl *a* peak did not correlate with any changes in [DOC] or  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  (Fig. 3). Compared with the other lakes, the geochemical conditions in which Chl *a* was produced in Alchichica may have been incompatible with the activation of a DIC-CM and significant DOC

exudation. Alchichica had similar [CO<sub>2(aq)</sub>] to La Preciosa but higher P and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentrations (Havas et al., 2023a); Alberca had higher P concentrations but similar [NH<sub>4</sub><sup>+</sup>] and lower [CO<sub>2(aq)</sub>]. In contrast with measurements from 2013 (Alcocer et al., 2014a), we found a large increase in DOC in the middle of the anoxic hypolimnion of Alchichica, which did not correspond to any change in the DIC reservoir, unlike

that observed for La Preciosa at 12.5 m and for Atexcac at 23 m (Havas et al., 2023a). At these depths, photosynthetic active radiation (PAR) is below 0.1 % in Alchichica during the stratified season (Macek et al., 2020), which might not be sufficient to trigger major anoxygenic phytoplankton DOC release.

The DOC reservoir in Alchichica is characterized by a  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  (and  $\Delta^{13}\text{C}_{\text{DOC-DIC}}$ ) lower than in the other lakes, systematically showing  $^{13}\text{C}$ -depleted signatures relative to POC (i.e.,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}} < \delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$ ; Fig. 4). Thus, if the DOC increase in the hypolimnion of Alchichica resulted from the release of photosynthetic OC, as in some of the other lakes, it was not associated with the same C isotope fractionation (e.g., if anoxygenic phototrophs did not concentrate intracellular DIC – cf. Fig. 5a). Some PSB have been identified, but they only become abundant toward the end of the stratification (from July–August to December–January; Alcántara-Hernández et al., 2022; Iniesto et al., 2022).

Alternatively, the hypolimnetic DOC increase in Lake Alchichica may reflect the preservation and accumulation of DOM over the years, consistent with the higher [DOC] measured in 2019 than in the previous years (Alcocer et al., 2014a). While alteration of the DOC reservoir by UV photolysis would induce positive isotopic fractionation (Chomicki, 2009), the slightly negative  $\Delta^{13}\text{C}_{\text{DOC-POC}}$  signatures support the possibility of DOC being mainly a recalcitrant residue of primary OM degradation by heterotrophic organisms (Alcocer et al., 2014a). The preferential consumption of labile  $^{13}\text{C}$ -enriched molecules by heterotrophic bacteria would leave the residual OM with more negative isotopic signatures (Williams and Gordon, 1970; Lehmann et al., 2002; Close and Henderson, 2020). The DIC and POM data were also consistent with heterotrophic activity from the surface to the hypolimnion of Alchichica by recording complementary decreasing and increasing  $\delta^{13}\text{C}$ , respectively, and a decreasing C : N ratio (Havas et al., 2023a). Degradation by heterotrophic bacteria leaves more recalcitrant DOM in the water column, which tends to accumulate over longer periods of time (Ogawa et al., 2001; Jiao et al., 2010; Kawasaki et al., 2013). The DOM content is a balance between production by autotrophs and consumption by heterotrophs, especially in environments where both types of organism compete for low-concentration nutrients (Dittmar, 2015). If the DOC in Alchichica represents a long-term reservoir, its presence might favor the development of bacterial populations. A shift of the cyanobacterial DOC from the epilimnion toward the hypolimnion of Alchichica was described at the end of the spring (Alcocer et al., 2014a, 2022). Thus, part of the hypolimnetic DOC in Alchichica may originate from a phytoplankton release, as observed in the other lakes, but it was already partially degraded by heterotrophic bacteria at the time we sampled it. The deeper and darker anoxic waters of Alchichica could help to better preserve this DOC from intense microbial and light degradation, hence allowing its accumulation over time.

In conclusion, the DOC reservoir in Alchichica (notably in the hypolimnion) more likely represents an older, more evolved DOM pool. The time required for its accumulation and long-term stability has not yet been evaluated.

## 5.2 DOC analysis provides deeper insights into planktonic cell functioning and water column C cycle dynamics than POC or DIC analyses

The depth profiles of DOC concentration and isotope composition differ significantly from those of POC. Notably, in La Preciosa, the photosynthetic DOC production (+1.5 mM) at the Chl *a* peak depth matches the decrease in DIC (−2 mM), while there was no change in [POC] or  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$  (Havas et al., 2023a). Just below, at 15 m depth,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$  exhibited a marked increase (+3.6‰), interpreted as reflecting heterotrophic activity (Havas et al., 2023a). It is likely explained by the production of DOC with heavier isotope compositions between 12.5 and 15 m depth and its consumption by heterotrophic organisms (as seen with  $\Delta^{13}\text{C}_{\text{DOC-POC}} \approx 0$ ). In Alberca, the peaks of oxygenic and anoxygenic photosynthesis clearly stand out from DOC concentrations (+0.5/1.5 mM) but not from POC concentrations (+ < 0.03 mM), while the DIC geochemical signatures reflected the influence of OC respiration, sediment-associated methanogenesis, and possible volcanic degassing at the bottom of the lake (Havas et al., 2023a). In Atexcac, anoxygenic photosynthesis is clearly evidenced by [DOC] and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  data (see Sect. 5.1.1) but is not recorded by the POC reservoir (a decrease of 0.03 mM at this depth) and not as distinctively by the DIC reservoir (a decrease of ~ 2 mM; Havas et al., 2023a). It implies that recently fixed OC is quickly released out of the cells as DOC, transferring most C from DIC to DOC rather than POC, which is therefore an incomplete archive of the biogeochemical reactions occurring in water columns. The isotopic analysis of DIC, and by extension of authigenic carbonates, especially in alkaline-buffered waters, might not be sensitive enough to faithfully record all environmental and biological changes.

The  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  values recorded in Alberca, La Preciosa, and Atexcac present peculiar heavy signatures, which provide strong constraints on plankton intra-cellular functioning and their use of C. These signatures may arise from the activation of a DIC-CM or from a specific metabolism or C fixation pathway. By contrast, the use of a DIC-CM is poorly captured by  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$ , although recognition of active DIC uptake has often been based on this signal (by reduced isotopic fractionation with DIC; e.g., Beardall et al., 1982; Erez et al., 1998; Riebesell et al., 2000). Most interestingly, intra-cellular amorphous Ca carbonates (iACC) are formed in some of the cyanobacteria from Alchichica microbialites, possibly due to supersaturated intra-cell media following active DIC uptake through a DIC-CM (Couradeau et al., 2012; Benzerara et al., 2014). While the link between DIC-CM and iACC still needs to be demonstrated (Benzerara et al., 2014),

**Table 2.** Isotopic fractionation between DOC and DIC and between DOC and POC, where  $\Delta^{13}\text{C}_{x-y} = \delta^{13}\text{C}_x - \delta^{13}\text{C}_y$  is the apparent fractionation and  $\varepsilon$  is computed as the actual metabolic isotopic discrimination between  $\text{CO}_2$  and DOC. In Alchichica,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DOC}}$  was not measured at 5 m, and its value at 10 m was used in this calculation of  $\Delta^{13}\text{C}_{\text{DOC-POC}}$ . The full chemistry at depths 35 and 58 m was not determined; thus, the calculation of  $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}$  for these samples is based on the composition of samples above and below. Isotopic data for DIC, POC, and  $\text{CO}_2$  are from Havas et al. (2023a).

Lake	Sample	$\Delta^{13}\text{C}_{\text{DOC-DIC}}$ ‰	$\Delta^{13}\text{C}_{\text{DOC-POC}}$ ‰	$\varepsilon_{\text{DOC-CO}_2}$ ‰
Alberca de Los Espinos	Albesp 5 m	-24.2	0.2	-14.8
	Albesp 7 m	-12.4	11.5	-3.0
	Albesp 10 m	-21.2	3.1	-11.6
	Albesp 17 m	-22.9	2.7	-13.1
	Albesp 20 m	-21.8	1.5	-12.2
	Albesp 25 m	-25.2	-1.5	-15.9
La Preciosa	LP 5 m	-25.5	1.0	-15.7
	LP 10 m	-25.9	1.7	-16.0
	LP 12.5 m	-19.8	7.1	-9.8
	LP 15 m	-23.6	-0.4	-13.5
	LP 20 m	-25.8	0.1	-15.7
	LP 31 m	-25.8	-1.0	-15.7
Atexcac	ATX 5 m	-20.4	8.4	-10.6
	ATX 10 m	-16.0	12.6	-6.1
	ATX 23 m	-9.7	17.9	0.6
	ATX 30 m	-11.4	15.2	-1.2
Alchichica	AL 5 m	ND	-1.6	
	AL 10 m	-30.3		-20.1
	AL 20 m	-30.9		-20.5
	AL 30 m	-30.0	-2.0	-19.5
	AL 35 m	-28.4	-1.0	-17.9
	AL 40 m	-27.3	-0.7	-16.8
	AL 50 m	-26.7		-16.2
	AL 55 m	-29.1	-3.5	-18.7
	AL 58 m	-29.3		-18.8
AL 60 m	-27.6		-17.1	

the active use of DIC-CMs in Mexican lakes is independently supported by the DOC isotopic signature.

In summary, the analysis of DOC concentrations and isotope compositions showed that most of the autochthonous C fixation ends up in the DOC reservoir, thus highlighting important features of the lakes and their C cycle that were not evidenced by POC and DIC analyses alone, notably the activation of a DIC-CM and a better description of the planktonic diversity. In the future, it will be interesting to couple the present analyses with deeper molecular and compound-specific isotopic analyses of DOM (Wagner et al., 2020).

### 5.3 Implications for the hypothesis of a large DOC reservoir controlling past carbon cycling

In these Mexican lakes, the DOC concentrations (from 0.6 to 6.5 mM on average) are between 14 and 160 times higher than the POC concentrations. The DOC represents from 5 %

to 16 % of the total C measured in the four lakes. In comparison, it remains under 0.3 mM in large-scale anoxic basins such as the Black Sea (Ducklow et al., 2007). In the modern ocean, DOC is also the main organic pool, but its concentration rarely exceeds 0.08 mM (Hansell, 2013). Thus, the DOC pools of these lakes are much larger than in the modern ocean and can be used to draw comparisons with studies invoking past occurrences of oceanic carbon cycles dominated by vast DOC reservoirs (e.g., Rothman et al., 2003; Sexton et al., 2011).

#### 5.3.1 Eocene carbon isotope excursions (CIEs)

Ventilation and/or oxidation cycles of a large deep-ocean DOC reservoir have been inferred to explain carbonate isotopic records of successive warming events through the Eocene (Sexton et al., 2011). In this scenario, the release of carbon dioxide into the ocean–atmosphere system following

DOC oxidation would trigger both the precipitation of low  $\delta^{13}\text{C}$  carbonates and an increase of the atmospheric greenhouse gas content. The size of this DOC reservoir should have been at least 1600 PgC (about twice the size of the modern ocean DOC reservoir) to account for a 2–4 °C increase in deep-ocean temperatures (Sexton et al., 2011). However, the main counter-argument to this hypothesis is that the buildup of such a DOC reservoir at modern DOC production rates implies sustained deep-ocean anoxia over several hundred thousand years, while independent geochemical proxies do not support the persistence of such anoxic conditions (Ridgwell and Arndt, 2015). Our study suggests, albeit at a different scale, that this kinetic argument may be weak. In these Mexican lakes, the lowest recorded [DOC] is 260  $\mu\text{M}$  (Table 1), which is about 6 times the deep modern ocean concentration ( $\sim 45 \mu\text{M}$ ; Hansell, 2013). Yet the entire water columns of these lakes down to the surficial sediments are seasonally mixed with di-oxygen, showing that high [DOC] (notably in Alchichica, which likely harbors a long-term DOC reservoir) can be achieved despite frequent oxidative conditions. The oxidation of only half of the DOC in the lakes would generate average  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  deviations between  $-0.6\text{‰}$  and  $-1\text{‰}$ , corresponding to the C isotope excursion magnitudes described by Sexton et al. (2011).

Similarly, deep anoxic waters in the Black Sea hold about 3 times the amount of DOC found in the modern deep open ocean (Ducklow et al., 2007; Sexton et al., 2011; Dittmar, 2015). In the Black Sea and in the Mexican lakes, low nutrient availability may limit sulfate-reduction despite high sulfate and labile organic matter concentrations, thus favoring DOM preservation and accumulation (Dittmar, 2015, and references therein). Margolin et al. (2016) argued that substantial DOM is maintained in the Black Sea by large terrigenous inputs only. Our study attests to the possibility for “autochthonous systems” to reach DOC concentrations well above what is found in the Black Sea without requiring terrigenous inputs. Therefore, it supports the hypothesis that the buildup of a large DOC reservoir may have influenced the carbonate isotopic record of Eocene warming events. Nonetheless, it remains to be proven how this could apply to larger oceanic-type basins, with more variable environmental conditions (e.g., tropical vs. polar latitudes), greater diversity of eukaryotic heterotrophs (in Phanerozoic oceans), and more-active water currents and ventilation processes. A better characterization of the molecular composition of DOM in the Mexican lakes will help us understand how it can accumulate over time and refine the suggested analogy with Phanerozoic carbon isotope excursions (CIEs). Furthermore, investigating the paleo-ecology and paleo-geography of the CIE time period will also help to constrain the potential applicability of a large DOC hypothesis (Sexton et al., 2011).

### 5.3.2 Neoproterozoic carbon isotope excursions (CIEs)

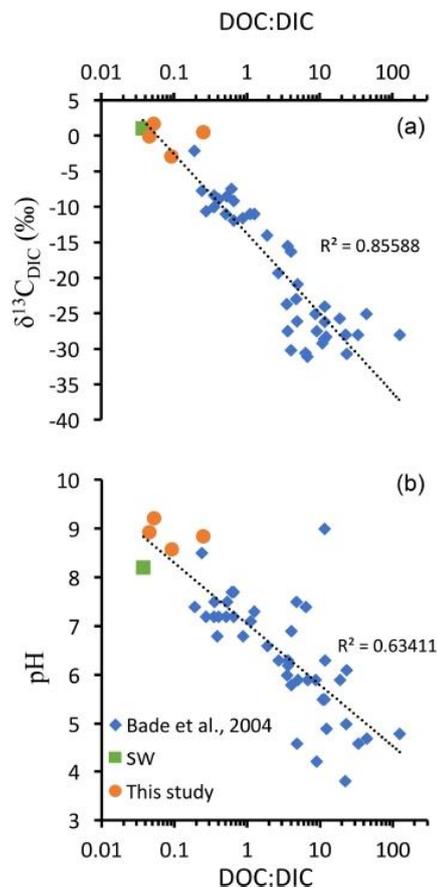
The presence of a large oceanic DOC reservoir has also been used to account for the Neoproterozoic C isotope record, where carbonates show  $\delta^{13}\text{C}$  negative excursions of more than 10‰ over tens of millions of years (Rothman et al., 2003; Fike et al., 2006; Swanson-Hysell et al., 2010; Tziperman et al., 2011). Once again, this hypothesis has been questioned because of (i) the oversized DOC reservoir (10 times the contemporaneous DIC, i.e.,  $10^2$  to  $10^3$  times that of modern DOC) and (ii) the amount of oxidants required to generate such a sustained DOC oxidation process (see Ridgwell and Arndt, 2015). Recent studies offered potential explanations for this latter issue, showing that pulses of continental weathering and an associated increase of sulfate supply would have provided sufficient oxidants (Shields et al., 2019; Chen et al., 2022), while lateral heterogeneity of the carbonate geochemical signatures – with a restricted record of the CIEs on the continental shelves – would require lower amounts of oxidants (Li et al., 2017; Shi et al., 2017).

Critically though, direct evidence for the existence of such high oceanic DOC levels in the past remains scarce (Li et al., 2017), although multiple studies have built on the Neoproterozoic large-DOC scenario (e.g., Sperling et al., 2011; Cañadas et al., 2022). Purported high oceanic DOC concentrations during the Ediacaran period have been estimated from the Ge/Si ratio of diagenetic chert nodules (Xing et al., 2022), but they reflect the sediment porewater geochemistry and remain difficult to directly relate to the ocean water itself. Besides, some modeling approaches have suggested that DOC abundance in the past Earth’s oceans could not have markedly differed from today’s values (Fakhraee et al., 2021).

Modern analogous systems such as the Black Sea or Mexican lakes studied here support the possibility of greater DOC accumulation in anoxic waters (Ducklow et al., 2007) but only to levels substantially lower than those required to account for the Neoproterozoic CIEs (minimum concentrations estimated between 25 and 100 mM; Ridgwell and Arndt, 2015). One could argue that the development of larger DOC pools in the three Mexican lakes from the SOB is hindered by relatively large sulfate reservoirs (especially in Alchichica –  $\sim 10\text{mM}$ ). However, we notice that Alberca does not show a larger DOC reservoir despite having the lowest oxidant availability (both oxygen- and sulfate-free at depth) and being the only one of the four lakes to present isotopic signatures associated with methanogenesis (Havas et al., 2023a). Furthermore, the Mexican lakes are seasonally oxidized, which could consume part of their DOC reservoir. However, the Black Sea is permanently stratified and shows even lower [DOC], suggesting that DOC production might be the primary control on DOC concentration over DOC oxidation. The processes of DOC production and accumulation in the Neoproterozoic ocean could have been less efficient than today (Fakhraee et al., 2021). Nonetheless, an important limit

to the analogy between modern analogues and the Precambrian oceans is the difference in the time over which DOC could have accumulated in both environments (Ridgwell and Arndt, 2015). One could expect the formation of such a large autochthonous DOC reservoir to increase the ocean inorganic C isotope composition by mass balance. However, from  $\delta^{13}\text{C}_{\text{Carb}}$  data compilation (e.g., Fike et al., 2006; Saltzman and Thomas, 2012; Li et al., 2017), we see that there are no positive increases of  $\delta^{13}\text{C}_{\text{Carb}}$  at the magnitude of the negative CIEs tens to hundreds of millions of years before the Neoproterozoic CIEs. Thus, even if the oxidant paradox may have found satisfactory explanations, the origin of the massive DOC reservoir required to generate these excursions still remains to be elucidated (Jiang et al., 2010; Lu et al., 2013; Li et al., 2017).

In the alkaline lakes studied, oxidation of the DOC reservoir would generate a maximum  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  deviation of  $-2\%$  in Alberca de los Espinos, which has the lowest alkalinity. The other lakes'  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  values are less impacted, notably because they are largely buffered by high DIC content (Havas et al., 2023a). Bade et al. (2004) showed that modern low-alkalinity and/or low-pH lakes generally show more negative  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  (down to  $\sim -30\%$ ), partly due to a higher responsiveness of the  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  to remineralization of OM and especially DOC. Compiling our data with that of Bade et al. (2004), we consistently show a clear negative trend of  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  with an increasing DOC:DIC ratio over a broad range of lacustrine DOC and DIC concentrations (Fig. 6). This trend also matches modern ocean values (Fig. 6). These observations are consistent with the inference that systems where  $\text{DOC}:\text{DIC} \gg 1$  should drive  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  to very negative values (Rothman et al., 2003). However, in modern environments, the biomass is largely influenced by aerobic heterotrophs, and high DOC:DIC waters usually lean toward acidic pH values (Fig. 6; Bade et al., 2004), at which carbonate precipitation is prevented. Instead, in anoxic waters, remineralization of OM through sulfate or iron reduction generates alkalinity (e.g., Tziperman et al., 2011). Hence, environmental conditions where  $\text{DOC}:\text{DIC} \gg 1$  might be inconsistent with large carbonate deposits unless they are associated with anaerobic remineralization. This further supports the hypothesis that negative  $\delta^{13}\text{C}_{\text{Carb}}$  excursions of the Ediacaran were triggered by continental sulfate addition to the ocean (Li et al., 2017; Shields et al., 2019; Chen et al., 2022) but following the oxidation of DOC by anaerobic (e.g., sulfate reduction) rather than aerobic (e.g., by free oxygen) pathways. At the same time, additional DOC inputs (e.g., terrigenous) might be necessary to reach the required high DOC conditions allowing the Neoproterozoic CIEs. This echoes previous suggestions of “Neoproterozoic greening”, referring to a phase of biological land colonization, although evidence for this phenomenon currently remains equivocal (Lenton and Daines, 2017). While a concomitant supply of sulfate and DOC via rivers may cause a partial oxidation of



**Figure 6.** DOC:DIC ratios, pH, and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  values from different lakes compiled from Bade et al. (2004) and the four Mexican lakes from Havas et al. (2023a), as well as modern surface ocean values (from Kroopnick, 1985; Zeebe and Wolf-Gladrow, 2009; and Hansell, 2013). (a)  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  as a function of DOC:DIC ratio represented with a logarithmic abscissa scale and logarithmic trend line which combines the three datasets. (b) pH as a function of DOC:DIC ratio, with a logarithmic abscissa scale and logarithmic trend line which combines the three datasets.

DOC at least, it would still result in a  $^{13}\text{C}$ -depleted source of alkalinity to the coastal environments.

The inferences from Fig. 6 also foster the scenario proposed by Tziperman et al. (2011), where the anaerobic respiration of large DOM production leads to the sequestration of newly produced C in carbonates – with very negative  $\delta^{13}\text{C}$  – and thereby to the drawdown of atmospheric  $p\text{CO}_2$  and the initiation of Cryogenian glaciations. We therefore suggest that the climatic feedbacks associated with the negative Neoproterozoic CIEs have been controlled by the total amount and balance between different DOC sources (autochthonous vs. allochthonous) and different oxidation pathways (e.g., via  $\text{O}_2$  vs.  $\text{SO}_4^{2-}$ ).

In summary, Neoproterozoic carbonate carbon isotope excursions likely require DOC and DIC pools to be spatially decoupled (e.g., through terrestrial DOM inputs), which suggests that DOC was not necessarily larger than DIC in the entire ocean. The analogues studied here further support that the Neoproterozoic CIEs recorded in carbonates should have occurred following DOC oxidation through anaerobic rather than aerobic pathways.

## 6 Conclusions and summary

Based on its concentration and isotopic signatures, we characterized the nature and role of the DOC reservoir within the C cycle of four stratified alkaline crater lakes in comparison with previously described DIC and POC data. Despite similar contexts, the DOC reservoirs of the four lakes show considerable variability, driven by environmental and ecological differences, as summarized below.

The DOC is the largest OC reservoir in the water column of the studied lakes (> 90 %). Its concentration and isotopic composition provide novel information about the C cycle of these stratified water bodies. In each of the four lakes, diverse photosynthetic planktonic communities release greater or smaller amounts of DOC, depending strongly on environmental factors such as nutrient and DIC availability, and transfer most of the inorganic C to DOC rather than POC.

This process is marked by very heavy and distinct isotopic signatures of DOC compared with POC. They reflect different metabolism and C fixation pathways and/or the activity of a DIC-CM coupled with an overflow mechanism (i.e., DOM exudation), which could be active for both oxygenic and anoxygenic phototrophs and for which we propose a novel isotopic model of cell carbon cycling, integrating DOC molecules.

The DOC reservoir in one of the lakes was not characterized by this release process but rather by partial degradation and accumulation in anoxic waters, associated with more negative isotopic signatures.

Our results bring further constraints to the environmental conditions under which autochthonous DOM can accumulate in anoxic water bodies, providing boundary conditions to the large DOC reservoir scenarios. This study of modern redox-stratified analogues supports the idea that a large oceanic DOC reservoir may have generated the record of successive C isotope excursions during the Eocene. Our study suggests, however, that the Neoproterozoic large-DOC hypothesis and its record in carbonates as negative CIEs would only have been possible if external DOC sources largely contributed and if DOC oxidation occurred via anaerobic pathways.

*Data availability.* Data are publicly accessible at <https://doi.org/10.26022/IEDA/112943> (Havas et al., 2023b).

*Author contributions.* RH and CT designed the study in a project directed by PLG, KB, and CT. CT, MI, DJ, DM, RT, PLG, and KB collected the samples in the field. RH carried out the measurements for C data, DJ carried out the physicochemical parameter probe measurements, and EM provided data for trace and major elements. RH and CT analyzed the data. RH wrote the paper with important contributions from all the co-authors.

*Competing interests.* The contact author has declared that none of the authors has any competing interests.

*Disclaimer.* Publisher's note: Copernicus Publications remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

*Acknowledgements.* The authors thank Anne-Lise Santoni, Elodie Cognard, Théophile Cocquerez, and the GISMO platform (Biogéosciences, University Bourgogne Franche-Comté, UMR CNRS 6282, France). We thank Céline Liorzou and Bleuenn Guéguen for the analyses at the Pôle Spectrométrie Océan (Laboratoire Géo-Océan, Brest, France) and Laure Cordier for the ion chromatography analyses at IPGP (France). We thank Nelly Assayag and Pierre Cadeau for their help on the AP 2003 at IPGP. We warmly thank Carmela Chateau-Smith for improving the syntax and clarity of the paper.

*Financial support.* This research has been supported by the Agence Nationale de la Recherche (grant no. ANR-18-CE02-0013-02).

*Review statement.* This paper was edited by Tina Treude and reviewed by three anonymous referees.

## References

- Alcántara-Hernández, R. J., Macek, M., Torres-Huesca, J., Arellano-Posadas, J., and Valdespino-Castillo, P. M.: Bacterioplankton, in: *Lake Alchichica Limnology: The Uniqueness of a Tropical Maar Lake*, edited by: Alcocer, J., Springer International Publishing, Cham, 183–196, [https://doi.org/10.1007/978-3-030-79096-7\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-79096-7_11), 2022.
- Alcocer, J., Guzmán-Arias, A., Oseguera, L. A., and Escobar, E.: Dinámica del carbono orgánico disuelto y particulado asociados al florecimiento de *Nodularia spumigena* en un lago tropical oligotrófico, in: *n Estado Actual del Conocimiento del Ciclo del Carbono y sus Interacciones en México: Síntesis a 2014*, edited by: Paz, F. and Wong, J., Programa Mexicano del Carbono, 404–410, 2014a.
- Alcocer, J., Ruiz-Fernández, A. C., Escobar, E., Pérez-Bernal, L. H., Oseguera, L. A., and Ardiles-Gloria, V.: Deposition, burial and sequestration of carbon in an oligotrophic, tropical lake, *J. Limnol.*, 73, 223–235, <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2014.783>, 2014b.

- Alcocer, J., Merino-Ibarra, M., Ramírez-Zierold, J. A., Oseguera, L. A., Cortés-Guzmán, D., Castillo-Sandoval, F. S., Guzmán-Arias, A. P., and Pérez-Ramírez, M. G.: Physicochemical Characteristics, in: *Lake Alchichica Limnology: The Uniqueness of a Tropical Maar Lake*, 101–142, Cham, Springer International Publishing, [https://doi.org/10.1007/978-3-030-79096-7\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-79096-7_7), 2022.
- Anderson, N. J. and Stedmon, C. A.: The effect of evapoconcentration on dissolved organic carbon concentration and quality in lakes of SW Greenland, *Freshwater Biol.*, 52, 280–289, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2006.01688.x>, 2007.
- Armienta, M. A., Vilaclara, G., De la Cruz-Reyna, S., Ramos, S., Cenicerros, N., Cruz, O., Aguayo, A., and Arcega-Cabrera, F.: Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes, *J. Volcanol. Geoth. Res.*, 178, 249–258, <https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2008.06.019>, 2008.
- Bade, D. L., Carpenter, S. R., Cole, J. J., Hanson, P. C., and Hesslein, R. H.: Controls of  $\delta^{13}\text{C}$ -DIC in lakes: Geochemistry, lake metabolism, and morphometry, *Limnol. Oceanogr.*, 49, 1160–1172, <https://doi.org/10.4319/lo.2004.49.4.1160>, 2004.
- Bade, D. L., Carpenter, S. R., Cole, J. J., Pace, M. L., Kritzberg, E., Van de Bogert, M. C., Cory, R. M., and McKnight, D. M.: Sources and fates of dissolved organic carbon in lakes as determined by whole-lake carbon isotope additions, *Biogeochemistry*, 84, 115–129, <https://doi.org/10.1007/s10533-006-9013-y>, 2007.
- Badger, M. R., Andrews, T. J., Whitney, S. M., Ludwig, M., Yellowlees, D. C., Leggat, W., and Price, G. D.: The diversity and coevolution of Rubisco, plastids, pyrenoids, and chloroplast-based  $\text{CO}_2$ -concentrating mechanisms in algae, *Can. J. Botany*, 76, 1052–1071, <https://doi.org/10.1139/b98-074>, 1998.
- Baines, S. B. and Pace, M. L.: The production of dissolved organic matter by phytoplankton and its importance to bacteria: Patterns across marine and freshwater systems, *Limnol. Oceanogr.*, 36, 1078–1090, <https://doi.org/10.4319/lo.1991.36.6.1078>, 1991.
- Barber, A., Sirois, M., Chaillou, G., and Gélinas, Y.: Stable isotope analysis of dissolved organic carbon in Canada's eastern coastal waters: Stable isotope analysis of DOC, *Limnol. Oceanogr.*, 62, S71–S84, <https://doi.org/10.1002/lno.10666>, 2017.
- Bateson, M. M. and Ward, D. M.: Photoexcretion and Fate of Glycolate in a Hot Spring Cyanobacterial Mat, *Appl. Environ. Microb.*, 54, 1738–1743, <https://doi.org/10.1128/aem.54.7.1738-1743.1988>, 1988.
- Beardall, J., Griffiths, H., and Raven, J. A.: Carbon Isotope Discrimination and the  $\text{CO}_2$  Accumulating Mechanism in *Chlorella emersonii*, *J. Exp. Bot.*, 33, 729–737, <https://doi.org/10.1093/jxb/33.4.729>, 1982.
- Beaupré, S. R.: The Carbon Isotopic Composition of Marine DOC, in: *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*, edited by: Hansell, D. A. and Carlson, C. A., Elsevier, 335–368, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405940-5.00006-6>, 2015.
- Benzerara, K., Skouri-Panet, F., Li, J., Féraud, C., Gugger, M., Laurent, T., Couradeau, E., Ragon, M., Cosmidis, J., Menguy, N., Margaret-Oliver, I., Tavera, R., López-García, P., and Moreira, D.: Intracellular Ca-carbonate biomineralization is widespread in cyanobacteria, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 111, 10933–10938, <https://doi.org/10.1073/pnas.1403510111>, 2014.
- Bertilsson, S. and Jones, J. B.: Supply of Dissolved Organic Matter to Aquatic Ecosystems: Autochthonous Sources, in: *Aquatic Ecosystems, Aquatic Ecology*, edited by: Findlay, S. E. G. and Sinsabaugh, R. L., Academic Press, Burlington, 3–24, <https://doi.org/10.1016/B978-012256371-3/50002-0>, 2003.
- Blair, N., Leu, A., Muñoz, E., Olsen, J., Kwong, E., and Des Marais, D.: Carbon isotopic fractionation in heterotrophic microbial metabolism, *Appl. Environ. Microb.*, 50, 996–1001, <https://doi.org/10.1128/aem.50.4.996-1001.1985>, 1985.
- Brailsford, F. L.: Dissolved organic matter (DOM) in freshwater ecosystems, Bangor University, UK, [https://research.bangor.ac.uk/portal/en/theses/dissolved-organic-matter-dom-in-freshwater-ecosystems\(80ce7e34-f41a-43fb-b943-f24296419832\).html](https://research.bangor.ac.uk/portal/en/theses/dissolved-organic-matter-dom-in-freshwater-ecosystems(80ce7e34-f41a-43fb-b943-f24296419832).html) (last access: 17 June 2023), 2019.
- Burns, B. D. and Beardall, J.: Utilization of inorganic carbon by marine microalgae, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 107, 75–86, [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(87\)90125-0](https://doi.org/10.1016/0022-0981(87)90125-0), 1987.
- Cadeau, P., Jézéquel, D., Le Boulanger, C., Fouilland, E., Le Floch, E., Chaduteau, C., Milesi, V., Guélaud, J., Sarazin, G., Katz, A., d'Amore, S., Bernard, C., and Ader, M.: Carbon isotope evidence for large methane emissions to the Proterozoic atmosphere, *Sci. Rep.*, 10, 18186, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75100-x>, 2020.
- Cañadas, F., Papineau, D., Leng, M. J., and Li, C.: Extensive primary production promoted the recovery of the Ediacaran Shuram excursion, *Nat. Commun.*, 13, 148, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27812-5>, 2022.
- Carlson, C. A. and Hansell, D. A.: DOM Sources, Sinks, Reactivity, and Budgets, in: *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*, edited by: Hansell, D. A. and Carlson, C. A., Elsevier, 65–126, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405940-5.00003-0>, 2015.
- Carrasco-Núñez, G., Ort, M. H., and Romero, C.: Evolution and hydrological conditions of a maar volcano (Atexcac crater, Eastern Mexico), *J. Volcanol. Geoth. Res.*, 159, 179–197, <https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2006.07.001>, 2007.
- Cawley, K. M., Ding, Y., Fourqurean, J., and Jaffé, R.: Characterising the sources and fate of dissolved organic matter in Shark Bay, Australia: a preliminary study using optical properties and stable carbon isotopes, *Mar. Freshwater Res.*, 63, 1098, <https://doi.org/10.1071/MF12028>, 2012.
- Chako Tchamabé, B., Carrasco-Núñez, G., Miggins, D. P., and Németh, K.: Late Pleistocene to Holocene activity of Alchichica maar volcano, eastern Trans-Mexican Volcanic Belt, *J. South Am. Earth Sci.*, 97, 102404, <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2019.102404>, 2020.
- Chen, B., Hu, C., Mills, B. J. W., He, T., Andersen, M. B., Chen, X., Liu, P., Lu, M., Newton, R. J., Poulton, S. W., Shields, G. A., and Zhu, M.: A short-lived oxidation event during the early Ediacaran and delayed oxygenation of the Proterozoic ocean, *Earth Planet. Sc. Lett.*, 577, 117274, <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2021.117274>, 2022.
- Chomicki, K.: The use of stable carbon and oxygen isotopes to examine the fate of dissolved organic matter in two small, oligotrophic Canadian Shield lakes, University of Waterloo, Canada, <https://www.researchgate.net/publication/268368579> (last access: 17 June 2023), 2009.
- Close, H. G. and Henderson, L. C.: Open-Ocean Minimum in  $\delta^{13}\text{C}$  Values of Particulate Organic Carbon in the Lower Euphotic Zone, *Front. Mar. Sci.*, 7, 540165, <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.540165>, 2020.

## R. Havas et al.: The hidden role of dissolved organic carbon in the biogeochemical cycle of carbon

2421

- Couradeau, E., Benzerara, K., Gérard, E., Moreira, D., Bernard, S., Brown, G. E., and López-García, P.: An Early-Branching Microbialite Cyanobacterium Forms Intracellular Carbonates, *Science*, 336, 459–462, <https://doi.org/10.1126/science.1216171>, 2012.
- Crowe, S. A., Katsev, S., Leslie, K., Sturm, A., Magen, C., Nomosatryo, S., Pack, M. A., Kessler, J. D., Reeburgh, W. S., Roberts, J. A., González, L., Douglas Haffner, G., Mucci, A., Sundby, B., and Fowle, D. A.: The methane cycle in ferruginous Lake Matano: Methane cycle in ferruginous Lake Matano, *Geobiology*, 9, 61–78, <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2010.00257.x>, 2011.
- Descolas-Gros, C. and Fontugne, M.: Stable carbon isotope fractionation by marine phytoplankton during photosynthesis, *Plant Cell Environ.*, 13, 207–218, <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1990.tb01305.x>, 1990.
- Dittmar, T.: Reasons Behind the Long-Term Stability of Dissolved Organic Matter, in: *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*, Elsevier, 369–388, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405940-5.00007-8>, 2015.
- Ducklow, H. W., Hansell, D. A., and Morgan, J. A.: Dissolved organic carbon and nitrogen in the Western Black Sea, *Mar. Chem.*, 105, 140–150, <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2007.01.015>, 2007.
- Erez, J., Bouevitch, A., and Kaplan, A.: Carbon isotope fractionation by photosynthetic aquatic microorganisms: experiments with *Synechococcus* PCC7942, and a simple carbon flux model, *Can. J. Bot.*, 76, 1109–1118, <https://doi.org/10.1139/b98-067>, 1998.
- Fakhraee, M., Tarhan, L. G., Planavsky, N. J., and Reinhard, C. T.: A largely invariant marine dissolved organic carbon reservoir across Earth's history, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 118, e2103511118, <https://doi.org/10.1073/pnas.2103511118>, 2021.
- Ferrari, L., Orozco-Esquivel, T., Manea, V., and Manea, M.: The dynamic history of the Trans-Mexican Volcanic Belt and the Mexico subduction zone, *Tectonophysics*, 522–523, 122–149, <https://doi.org/10.1016/j.tecto.2011.09.018>, 2012.
- Fike, D. A., Grotzinger, J. P., Pratt, L. M., and Summons, R. E.: Oxidation of the Ediacaran Ocean, *Nature*, 444, 744–747, <https://doi.org/10.1038/nature05345>, 2006.
- Fogel, M. L. and Cifuentes, L. A.: Isotope Fractionation during Primary Production, in: *Organic Geochemistry, Topics in Geobiology*, edited by: Engel, M. H. and Macko, S. A., Springer US, Boston, MA, 73–98, [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2890-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2890-6_3), 1993.
- Fry, B.:  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  fractionation by marine diatoms, *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 134, 283–294, <https://doi.org/10.3354/meps134283>, 1996.
- Hansell, D. A.: Recalcitrant Dissolved Organic Carbon Fractions, *Annu. Rev. Mar. Sci.*, 5, 421–445, <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120710-100757>, 2013.
- Havas, R., Thomazo, C., Iniesto, M., Jézéquel, D., Moreira, D., Tavera, R., Caumartin, J., Muller, E., López-García, P., and Benzerara, K.: Biogeochemical processes captured by carbon isotopes in redox-stratified water columns: a comparative study of four modern stratified lakes along an alkalinity gradient, *Biogeosciences*, 20, 2347–2367, <https://doi.org/10.5194/bg-20-2347-2023>, 2023a.
- Havas, R., Thomazo, C., Iniesto, M., Jezequel, D., Moreira, D., Tavera, R., Caumartin, J., Muller, E., Lopez Garcia, P., and Benzerara, K.: Carbon isotopes and alkalinity gradient for biogeochemical processes in modern stratified lakes v. 2, Version 1.0, Interdisciplinary Earth Data Alliance (IEDA) [data set], <https://doi.org/10.26022/IEDA/112943>, 2023b.
- Havig, J. R., McCormick, M. L., Hamilton, T. L., and Kump, L. R.: The behavior of biologically important trace elements across the oxic/euxinic transition of meromictic Fayetteville Green Lake, New York, USA, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 165, 389–406, <https://doi.org/10.1016/j.gca.2015.06.024>, 2015.
- Havig, J. R., Hamilton, T. L., McCormick, M., McClure, B., Sowers, T., Wegter, B., and Kump, L. R.: Water column and sediment stable carbon isotope biogeochemistry of permanently redox-stratified Fayetteville Green Lake, New York, U.S.A., *Limnol. Oceanogr.*, 63, 570–587, <https://doi.org/10.1002/lno.10649>, 2018.
- Hayes, J. M.: Fractionation of Carbon and Hydrogen Isotopes in Biosynthetic Processes\*, *Rev. Mineral. Geochem.*, 43, 225–277, <https://doi.org/10.2138/gsrmg.43.1.225>, 2001.
- Hessen, D. O.: Dissolved organic carbon in a humic lake: effects on bacterial production and respiration, in: *Dissolved Organic Matter in Lacustrine Ecosystems: Energy Source and System Regulator*, Developments in Hydrobiology, edited by: Salonen, K., Kairesalo, T., and Jones, R. I., Springer Netherlands, Dordrecht, 115–123, [https://doi.org/10.1007/978-94-011-2474-4\\_9](https://doi.org/10.1007/978-94-011-2474-4_9), 1992.
- Hessen, D. O. and Anderson, T. R.: Excess carbon in aquatic organisms and ecosystems: Physiological, ecological, and evolutionary implications, *Limnol. Oceanogr.*, 53, 1685–1696, <https://doi.org/10.4319/lno.2008.53.4.1685>, 2008.
- Iniesto, M., Moreira, D., Benzerara, K., Reboul, G., Bertolino, P., Tavera, R., and López-García, P.: Planktonic microbial communities from microbialite-bearing lakes sampled along a salinity-alkalinity gradient, *Limnol. Oceanogr.*, 67, 2718–2733, <https://doi.org/10.1002/lno.12233>, 2022.
- Iñiguez, C., Capó-Bauçà, S., Niinemets, Ü., Stoll, H., Aguiló-Nicolau, P., and Galmés, J.: Evolutionary trends in RuBisCO kinetics and their co-evolution with CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms, *Plant J.*, 101, 897–918, <https://doi.org/10.1111/tbj.14643>, 2020.
- Ivanovsky, R. N., Lebedeva, N. V., Keppen, O. I., and Chudnovskaya, A. V.: Release of Photosynthetically Fixed Carbon as Dissolved Organic Matter by Anoxygenic Phototrophic Bacteria, *Microbiology*, 89, 28–34, <https://doi.org/10.1134/S0026261720010075>, 2020.
- Jiang, G., Wang, X., Shi, X., Zhang, S., Xiao, S., and Dong, J.: Organic carbon isotope constraints on the dissolved organic carbon (DOC) reservoir at the Cryogenian–Ediacaran transition, *Earth Planet. Sc. Lett.*, 299, 159–168, <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2010.08.031>, 2010.
- Jiang, G., Wang, X., Shi, X., Xiao, S., Zhang, S., and Dong, J.: The origin of decoupled carbonate and organic carbon isotope signatures in the early Cambrian (ca. 542–520 Ma) Yangtze platform, *Earth Planet. Sc. Lett.*, 317–318, 96–110, <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2011.11.018>, 2012.
- Jiao, N., Herndl, G. J., Hansell, D. A., Benner, R., Kattner, G., Wilhelm, S. W., Kirchman, D. L., Weinbauer, M. G., Luo, T., Chen, F., and Azam, F.: Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean, *Nat. Rev. Microbiol.*, 8, 593–599, <https://doi.org/10.1038/nrmicro2386>, 2010.

- Kaplan, L. A., Wiegner, T. N., Newbold, J. D., Ostrom, P. H., and Gandhi, H.: Untangling the complex issue of dissolved organic carbon uptake: a stable isotope approach. *Freshwater Biol.*, 53, 855–864, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01941.x>, 2008.
- Kawasaki, N., Komatsu, K., Kohzu, A., Tomioka, N., Shinohara, R., Satou, T., Watanabe, F. N., Tada, Y., Hamasaki, K., Kushairi, M. R. M., and Imai, A.: Bacterial Contribution to Dissolved Organic Matter in Eutrophic Lake Kasumigaura, Japan. *Appl. Environ. Microb.*, 79, 7160–7168, <https://doi.org/10.1128/AEM.01504-13>, 2013.
- Kroopnick, P. M.: The distribution of  $^{13}\text{C}$  of  $\Sigma\text{CO}_2$  in the world oceans. *Deep-Sea Res. Pt. A*, 32, 57–84, [https://doi.org/10.1016/0198-0149\(85\)90017-2](https://doi.org/10.1016/0198-0149(85)90017-2), 1985.
- Kuntz, L. B., Laakso, T. A., Schrag, D. P., and Crowe, S. A.: Modeling the carbon cycle in Lake Matano. *Geobiology*, 13, 454–461, <https://doi.org/10.1111/gbi.12141>, 2015.
- Lampert, W.: Release of dissolved organic carbon by grazing zooplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 23, 831–834, <https://doi.org/10.4319/lo.1978.23.4.0831>, 1978.
- Lehmann, M. F., Bernasconi, S. M., Barbieri, A., and McKenzie, J. A.: Preservation of organic matter and alteration of its carbon and nitrogen isotope composition during simulated and in situ early sedimentary diagenesis. *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 66, 3573–3584, [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(02\)00968-7](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(02)00968-7), 2002.
- Lenton, T. M. and Daines, S. J.: Matworld – the biogeochemical effects of early life on land. *New Phytol.*, 215, 531–537, <https://doi.org/10.1111/nph.14338>, 2017.
- Lenton, T. M. and Daines, S. J.: The effects of marine eukaryote evolution on phosphorus, carbon and oxygen cycling across the Proterozoic–Phanerozoic transition. *Emerg. Top. Life Sci.*, 2, 267–278, <https://doi.org/10.1042/ETLS20170156>, 2018.
- Li, C., Hardisty, D. S., Luo, G., Huang, J., Algeo, T. J., Cheng, M., Shi, W., An, Z., Tong, J., Xie, S., Jiao, N., and Lyons, T. W.: Uncovering the spatial heterogeneity of Ediacaran carbon cycling. *Geobiology*, 15, 211–224, <https://doi.org/10.1111/gbi.12222>, 2017.
- Lu, M., Zhu, M., Zhang, J., Shields-Zhou, G., Li, G., Zhao, F., Zhao, X., and Zhao, M.: The DOUNCE event at the top of the Ediacaran Doushantuo Formation, South China: Broad stratigraphic occurrence and non-diagenetic origin. *Precambrian Res.*, 225, 86–109, <https://doi.org/10.1016/j.precamres.2011.10.018>, 2013.
- Lugo, A., Alcocer, J., Sanchez, M. R., and Escobar, E.: Trophic status of tropical lakes indicated by littoral protozoan assemblages. *Int. Ver. The.*, 25, 4441–4443, <https://doi.org/10.1080/03680770.1992.11900159>, 1993.
- Lyons, T. W., Reinhard, C. T., and Planavsky, N. J.: The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere. *Nature*, 506, 307–315, <https://doi.org/10.1038/nature13068>, 2014.
- Macek, M., Medina, X. S., Picazo, A., Peřtová, D., Reyes, F. B., Hernández, J. R. M., Alcocer, J., Ibarra, M. M., and Camacho, A.: *Spirostomum teres*: A Long Term Study of an Anoxic-Hypolimnion Population Feeding upon Photosynthesizing Microorganisms. *Acta Protozool.*, 59, 13–38, <https://doi.org/10.4467/16890027AP.20.002.12158>, 2020.
- Marañón, E., Cermeño, P., Fernández, E., Rodríguez, J., and Zabala, L.: Significance and mechanisms of photosynthetic production of dissolved organic carbon in a coastal eutrophic ecosystem. *Limnol. Oceanogr.*, 49, 1652–1666, <https://doi.org/10.4319/lo.2004.49.5.1652>, 2004.
- Margolin, A. R., Gerringa, L. J. A., Hansell, D. A., and Rijkenberg, M. J. A.: Net removal of dissolved organic carbon in the anoxic waters of the Black Sea. *Mar. Chem.*, 183, 13–24, <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2016.05.003>, 2016.
- Mook, W. G., Bommerson, J. C., and Staverman, W. H.: Carbon isotope fractionation between dissolved bicarbonate and gaseous carbon dioxide. *Earth Planet. Sc. Lett.*, 22, 169–176, [https://doi.org/10.1016/0012-821X\(74\)90078-8](https://doi.org/10.1016/0012-821X(74)90078-8), 1974.
- Morana, C., Sarmiento, H., Descy, J.-P., Gasol, J.M., Borges, A.V., Bouillon, S., and Darchambeau, F.: Production of dissolved organic matter by phytoplankton and its uptake by heterotrophic prokaryotes in large tropical lakes. *Limnol. Oceanogr.*, 59, 1364–1375, <https://doi.org/10.4319/lo.2014.59.4.1364>, 2014.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), Vollenweider, R. A., and Kerekes, J. (Eds.): *Eutrophication of waters, Monitoring, assessment and control*, OECD, Paris, 154 pp., <http://lakes.chebucto.org/TPMODELS/OECD/OECD1982.pdf> (last access: 17 June 2023), 1982.
- Ogawa, H., Amagai, Y., Koike, I., Kaiser, K., and Benner, R.: Production of Refractory Dissolved Organic Matter by Bacteria. *Science*, 292, 917–920, <https://doi.org/10.1126/science.1057627>, 2001.
- O'Leary, M. H.: Carbon Isotopes in Photosynthesis. *BioScience*, 38, 328–336, <https://doi.org/10.2307/1310735>, 1988.
- Otero, A. and Vincenzini, M.: Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity. *J. Biotechnol.*, 102, 143–152, [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00022-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00022-1), 2003.
- Peltier, W. R., Liu, Y., and Crowley, J. W.: Snowball Earth prevention by dissolved organic carbon remineralization. *Nature*, 450, 813–818, <https://doi.org/10.1038/nature06354>, 2007.
- Petrash, D. A., Steenbergen, I. M., Valero, A., Meador, T. B., Pačes, T., and Thomazo, C.: Aqueous system-level processes and prokaryote assemblages in the ferruginous and sulfate-rich bottom waters of a post-mining lake. *Biogeosciences*, 19, 1723–1751, <https://doi.org/10.5194/bg-19-1723-2022>, 2022.
- Posth, N. R., Bristow, L. A., Cox, R. P., Habicht, K. S., Danza, F., Tonolla, M., Frigaard, N.-U., and Canfield, D.E.: Carbon isotope fractionation by anoxygenic phototrophic bacteria in euxinic Lake Cadagno. *Geobiology*, 15, 798–816, <https://doi.org/10.1111/gbi.12254>, 2017.
- Rao, D. N., Chopra, M., Rajula, G. R., Durgadevi, D. S. L., and Sarma, V. V. S. S.: Release of significant fraction of primary production as dissolved organic carbon in the Bay of Bengal. *Deep-Sea Res. Pt. I*, 168, 103445, <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2020.103445>, 2021.
- Renstrom-Kellner, E. and Bergman, B.: Glycolate metabolism in cyanobacteria. III. Nitrogen controls excretion and metabolism of glycolate in *Anabaena cylindrica*. *Physiol. Plant.*, 77, 46–51, <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1989.tb05976.x>, 1989.
- Repeta, D. J. and Aluwihare, L. I.: Radiocarbon analysis of neutral sugars in high-molecular-weight dissolved organic carbon: Implications for organic carbon cycling. *Limnol. Oceanogr.*, 51, 1045–1053, <https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.2.1045>, 2006.
- Ridgwell, A. and Arndt, S.: Chapter 1 – Why Dissolved Organics Matter: DOC in Ancient Oceans and Past Climate Change, in: *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*, 2nd

- Edn., edited by: Hansell, D. A. and Carlson, C. A., Academic Press, Boston, 1–20, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405940-5.00001-7>, 2015.
- Riebesell, U., Burkhardt, S., Dauelsberg, A., and Kroon, B.: Carbon isotope fractionation by a marine diatom: dependence on the growth-rate-limiting resource, *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 193, 295–303, <https://doi.org/10.3354/meps193295>, 2000.
- Rothman, D. H., Hayes, J. M., and Summons, R. E.: Dynamics of the Neoproterozoic carbon cycle, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 8124–8129, <https://doi.org/10.1073/pnas.0832439100>, 2003.
- Saini, J. S., Hassler, C., Cable, R., Fourquez, M., Danza, F., Roman, S., Tonolla, M., Storelli, N., Jacquet, S., Zdobnov, E. M., and Duhaime, M. B.: Microbial loop of a Proterozoic ocean analogue, *bioRxiv*, 2021-08, <https://doi.org/10.1101/2021.08.17.456685>, 2021.
- Saltzman, M. R. and Thomas, E.: Carbon Isotope Stratigraphy, in: *The Geologic Time Scale*, Elsevier, 207–232, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59425-9.00011-1>, 2012.
- Santinelli, C., Follett, C., Retelletti Brogi, S., Xu, L., and Repeta, D.: Carbon isotope measurements reveal unexpected cycling of dissolved organic matter in the deep Mediterranean Sea, *Mar. Chem.*, 177, 267–277, <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2015.06.018>, 2015.
- Satkoski, A. M., Beukes, N. J., Li, W., Beard, B. L., and Johnson, C. M.: A redox-stratified ocean 3.2 billion years ago, *Earth Planet. Sc. Lett.*, 430, 43–53, <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2015.08.007>, 2015.
- Schiff, S. L., Tsuji, J. M., Wu, L., Venkiteswaran, J. J., Molot, L. A., Elgood, R. J., Paterson, M. J., and Neufeld, J. D.: Millions of Boreal Shield Lakes can be used to Probe Archaean Ocean Biogeochemistry, *Sci. Rep.*, 7, 46708, <https://doi.org/10.1038/srep46708>, 2017.
- Sexton, P. F., Norris, R. D., Wilson, P. A., Pälike, H., Westerhold, T., Röhl, U., Bolton, C. T., and Gibbs, S.: Eocene global warming events driven by ventilation of oceanic dissolved organic carbon, *Nature*, 471, 349–352, <https://doi.org/10.1038/nature09826>, 2011.
- Shi, W., Li, C., and Algeo, T. J.: Quantitative model evaluation of organic carbon oxidation hypotheses for the Ediacaran Shuram carbon isotopic excursion, *Sci. China Earth Sci.*, 60, 2118–2127, <https://doi.org/10.1007/s11430-017-9137-1>, 2017.
- Shields, G. A., Mills, B. J. W., Zhu, M., Raub, T. D., Daines, S. J., and Lenton, T. M.: Unique Neoproterozoic carbon isotope excursions sustained by coupled evaporite dissolution and pyrite burial, *Nat. Geosci.*, 12, 823–827, <https://doi.org/10.1038/s41561-019-0434-3>, 2019.
- Siebe, C., Guilbaud, M.-N., Salinas, S., and Chédeville-Monzo, C.: Eruption of Alberca de los Espinos tuff cone causes transgression of Zacapu lake ca. 25,000 yr BP in Michoacán, México, Presented at the IAS 4IMC Conference, Auckland, New Zealand, 74–75, <https://www.researchgate.net/publication/283927123> (last access: 8 June 2023), 2012.
- Siebe, C., Guilbaud, M.-N., Salinas, S., Kshirsagar, P., Chevrel, M. O., Jiménez, A. H., and Godínez, L.: Monogenetic volcanism of the Michoacán-Guanajuato Volcanic Field: Maar craters of the Zacapu basin and domes, shields, and scoria cones of the Tarascan highlands (Paracho-Paricutin region), Presented at the Pre-meeting field guide for the 5th international Maar Conference, Querétaro, México, 1–37, 2014.
- Sigala, I., Caballero, M., Correa-Metrio, A., Lozano-García, S., Vázquez, G., Pérez, L., and Zawisza, E.: Basic limnology of 30 continental waterbodies of the Transmexican Volcanic Belt across climatic and environmental gradients, *B. Soc. Geol. Mex.*, 69, 313–370, <https://doi.org/10.18268/BSGM2017v69n2a3>, 2017.
- Silva Aguilera, R. A.: Análisis del descenso del nivel de agua del Lago Alchichica, Puebla, México (Tesis de Maestría), Universidad Nacional Autónoma de México, Coordinación General de Estudios de Posgrado, UNAM, <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3534827> (last access: 6 June 2023), 2019.
- Silva-Aguilera, R. A., Vilaclara, G., Armienta, M. A., and Escolero, Ó.: Hydrogeology and Hydrochemistry of the Serdán-Oriental Basin and the Lake Alchichica, in: *Lake Alchichica Limnology*, edited by: Alcocer, J., Springer International Publishing, Cham, 63–74, [https://doi.org/10.1007/978-3-030-79096-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-79096-7_5), 2022.
- Sperling, E. A., Peterson, K. J., and Laflamme, M.: Rangeomorphs, Thectardis (Porifera?) and dissolved organic carbon in the Ediacaran oceans: Rangeomorphs, Thectardis and DOC, *Geobiology*, 9, 24–33, <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2010.00259.x>, 2011.
- Swanson-Hysell, N. L., Rose, C. V., Calmet, C. C., Halverson, G. P., Hurtgen, M. T., and Maloof, A. C.: Cryogenian Glaciation and the Onset of Carbon-Isotope Decoupling, *Science*, 328, 608–611, <https://doi.org/10.1126/science.1184508>, 2010.
- Thomas, P. J., Boller, A. J., Satagopan, S., Tabita, F. R., Cavanaugh, C. M., and Scott, K. M.: Isotope discrimination by form IC RubisCO from *Ralstonia eutropha* and *Rhodobacter sphaeroides*, metabolically versatile members of “*Proteobacteria*” from aquatic and soil habitats, *Environ. Microbiol.*, 21, 72–80, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14423>, 2019.
- Thornton, D. C. O.: Dissolved organic matter (DOM) release by phytoplankton in the contemporary and future ocean, *Eur. J. Phycol.*, 49, 20–46, <https://doi.org/10.1080/09670262.2013.875596>, 2014.
- Tziperman, E., Halevy, I., Johnston, D. T., Knoll, A. H., and Schrag, D. P.: Biologically induced initiation of Neoproterozoic snowball-Earth events, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 15091–15096, <https://doi.org/10.1073/pnas.1016361108>, 2011.
- Vilaclara, G., Chávez, M., Lugo, A., González, H., and Gaytán, M.: Comparative description of crater-lakes basic chemistry in Puebla State, Mexico, *Int. Ver. The.*, 25, 435–440, <https://doi.org/10.1080/03680770.1992.11900158>, 1993.
- Wagner, S., Schubotz, F., Kaiser, K., Hallmann, C., Waska, H., Rossel, P. E., Hansman, R., Elvert, M., Middelburg, J. J., Engel, A., Blattmann, T. M., Catalá, T. S., Lennartz, S. T., Gomez-Saez, G. V., Pantoja-Gutiérrez, S., Bao, R., and Galy, V.: Soothsaying DOM: A Current Perspective on the Future of Oceanic Dissolved Organic Carbon, *Front. Mar. Sci.*, 7, 341, <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00341>, 2020.
- Werne, J. P. and Hollander, D.J.: Balancing supply and demand: controls on carbon isotope fractionation in the Cariaco Basin (Venezuela) Younger Dryas to present, *Mar. Chem.*, 92, 275–293, <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2004.06.031>, 2004.
- Wetz, M. S. and Wheeler, P. A.: Release of dissolved organic matter by coastal diatoms, *Limnol. Oceanogr.*, 52, 798–807, <https://doi.org/10.4319/lo.2007.52.2.0798>, 2007.
- Williams, P. M. and Gordon, L. I.: Carbon-13: carbon-12 ratios in dissolved and particulate organic matter in the sea, *Deep-Sea*

**2424 R. Havas et al.: The hidden role of dissolved organic carbon in the biogeochemical cycle of carbon**

- Res. Oceanogr. Abstr., 17, 19–27, [https://doi.org/10.1016/0011-7471\(70\)90085-9](https://doi.org/10.1016/0011-7471(70)90085-9), 1970.
- Xing, C., Liu, P., Wang, R., Li, C., Li, J., and Shen, B.: Tracing the evolution of dissolved organic carbon (DOC) pool in the Ediacaran ocean by Germanium/silica (Ge/Si) ratios of diagenetic chert nodules from the Doushantuo Formation, South China, *Precambrian Res.*, 374, 106639, <https://doi.org/10.1016/j.precamres.2022.106639>, 2022.
- Zeebe, R. E. and Wolf-Gladrow, D. A.: Carbon Dioxide, Dissolved (Ocean), in: *Encyclopedia of Paleoclimatology and Ancient Environments*, *Encyclopedia of Earth Sciences Series*, edited by: Gornitz, V., Springer, Dordrecht, [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4411-3\\_30](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4411-3_30), 2009.
- Zeyen, N., Benzerara, K., Beyssac, O., Daval, D., Muller, E., Thomazo, C., Tavera, R., López-García, P., Moreira, D., and Duprat, E.: Integrative analysis of the mineralogical and chemical composition of modern microbialites from ten Mexican lakes: What do we learn about their formation?, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 305, 148–184, <https://doi.org/10.1016/j.gca.2021.04.030>, 2021.

*Annexe C, article de Havas et al. (2023b) : Biogeochemical processes captured by carbon isotopes in redox-stratified water columns: a comparative study of four modern stratified lakes along an alkalinity gradient*

Biogeosciences, 20, 2347–2367, 2023  
<https://doi.org/10.5194/bg-20-2347-2023>  
 © Author(s) 2023. This work is distributed under  
 the Creative Commons Attribution 4.0 License.



## Biogeochemical processes captured by carbon isotopes in redox-stratified water columns: a comparative study of four modern stratified lakes along an alkalinity gradient

Robin Havas<sup>1</sup>, Christophe Thomazo<sup>1,2</sup>, Miguel Iniesto<sup>3</sup>, Didier Jézéquel<sup>4,5</sup>, David Moreira<sup>3</sup>, Rosaluz Tavera<sup>6</sup>, Jeanne Caumartin<sup>7</sup>, Elodie Muller<sup>7</sup>, Purificación López-García<sup>3</sup>, and Karim Benzerara<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Biogéosciences, CNRS, Université Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France

<sup>2</sup>Institut Universitaire de France, 75005 Paris, France

<sup>3</sup>Ecologie Systématique Evolution, CNRS, Université Paris-Saclay, AgroParisTech, 91190 Gif-sur-Yvette, France

<sup>4</sup>IPGP, CNRS, Université de Paris Cité, 75005 Paris, France

<sup>5</sup>UMR CARRTEL, INRAE and USMB, 74200 Thonon-les-Bains, France

<sup>6</sup>Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, México

<sup>7</sup>Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC), CNRS, Muséum National d'Histoire Naturelle, Sorbonne Université, 75005 Paris, France

**Correspondence:** Robin Havas (robin.havas@gmail.com)

Received: 7 July 2022 – Discussion started: 14 July 2022

Revised: 25 April 2023 – Accepted: 4 May 2023 – Published: 21 June 2023

**Abstract.** Redox-stratified water columns are a prevalent feature of the Earth's history, and ongoing environmental changes tend to promote a resurgence of such settings. Studying modern redox-stratified environments has improved our understanding of biogeochemical processes and element cycling in such water columns. These settings are associated with peculiar carbon biogeochemical cycling, owing to a layered distribution of biological processes in relation to oxidant availability. Metabolisms from distinct biogeochemical layers are diverse and may differently imprint the sedimentological record. Paired carbon isotope compositions of organic matter and carbonates, which are commonly used to characterize these ecological dynamics, can thus vary from one stratified environment to another. Changes in the organic/inorganic carbon sources and mass balance can further complicate the isotopic message in stratified environments. Better understanding of these multifaceted carbon isotope signals requires further evaluation of how the processes occurring in redox-stratified water columns are transferred to the sediments. We therefore characterized and compared the isotopic signatures of dissolved inorganic carbon (DIC), carbonate, and organic matter reservoirs at different depths in the water column and upper sediments of four stratified Mexican

lakes that follow a gradient of alkalinity and salinity. Comparing these systems shows strong diversity in the carbon isotope signals of the water column and sediments. Differences in inorganic carbon isotope signatures arise primarily from the size of the DIC reservoir, buffering the expression of redox-dependent biological processes as alkalinity increases. Combining this isotopic dataset with water column physicochemical parameters allows us to identify oxygenic photosynthesis and aerobic respiration in the four lakes studied, while anoxygenic photosynthesis is evidenced in only two of them. Sedimentary organic matter does not originate from the same water column layers in the four lakes, highlighting the ecological variability that can stem from different stratified water columns and how it is transferred or not to the sedimentary record. The least alkaline lake shows higher isotopic variability and signatures typical of methanogenesis in the sediment porewaters. This metabolism, however, does not leave diagnostic isotopic signatures in the sedimentary archives (organic matter and carbonates), underlining the fact that even when alkalinity does not strongly buffer the inorganic carbon reservoir, a comprehensive picture of the active biogeochemical carbon cycling is not necessarily transferred to the geological record.

Published by Copernicus Publications on behalf of the European Geosciences Union.

## 1 Introduction

The carbon cycle and biogeochemical conditions prevailing at the surface of the Earth are intimately bound through biological (e.g., photosynthesis) and geological processes (e.g., volcanic degassing and silicate weathering). The analysis of carbon isotopes in organic matter and carbonates ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{org}}$  and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{carb}}$ ) in the rock record has been used to reconstruct the evolution of the biosphere and the oxygenation of the Earth's surface (e.g., Hayes et al., 1989; Karhu and Holland, 1996; Schidlowski, 2001). Coupling  $\delta^{13}\text{C}_{\text{org}}-\delta^{13}\text{C}_{\text{carb}}$  has frequently been used to infer the burial rate of organic C and thus the redox balance of the atmosphere and hydrosphere (e.g., Karhu and Holland, 1996; Aharon, 2005; Krissansen-Totton et al., 2015; Mason et al., 2017). It has also been used to deduce the presence of metabolisms like anoxygenic chemoautotrophic or methanotrophic bacteria (e.g., Hayes et al., 1999; Bekker et al., 2008; Krissansen-Totton et al., 2015). Coupling  $\delta^{13}\text{C}_{\text{org}}-\delta^{13}\text{C}_{\text{carb}}$  has also been used to discuss ocean stratification and its effect on inorganic and organic C geochemical signatures in sediments (e.g., Logan et al., 1995; Aharon, 2005; Bekker et al., 2008; Ader et al., 2009). Stratification favors the expression and recording of different layers of the water column, with potentially very distinct isotopic signatures. As the oceans were redox stratified during most of the Earth's history (Lyons et al., 2014; Havig et al., 2015; Satkoski et al., 2015), processes affecting the C cycle were likely different from those occurring in most modern, well-oxygenated environments. This change of conditions could impact the  $\delta^{13}\text{C}_{\text{org}}$  signal at various scales, from changes in diversity and relative abundance of microbial carbon and energy metabolism (e.g., Wang et al., 2016; Iñiguez et al., 2020; Hurley et al., 2021) to larger ecological interactions (e.g., Jiao et al., 2010; Close and Henderson, 2020; Klawonn et al., 2021) and global C dynamics (e.g., Ridgwell and Arndt, 2015; Ussiri and Lal, 2017).

Modern stratified lakes have been used as analogues of ancient redox-stratified systems to better understand the C cycle in the sedimentary isotopic record (e.g., Lehmann et al., 2004; Posth et al., 2017; Fulton et al., 2018). Several recent studies have investigated the C cycle in modern stratified water columns (e.g., Crowe et al., 2011; Kuntz et al., 2015; Posth et al., 2017; Schiff et al., 2017; Havig et al., 2018; Cadeau et al., 2020; Saini et al., 2021; Petrash et al., 2022), where many biogeochemical and physicochemical parameters can be directly measured, together with the main C reservoirs. However, investigations of such Precambrian analogues do not necessarily include sediment data and generally focus on a single environment without integrating views from several systems.

In this study, we measured the concentrations and isotopic compositions of dissolved inorganic carbon (DIC) and particulate organic carbon (POC) throughout the water column of four modern redox-stratified alkaline crater lakes, located in the Trans-Mexican Volcanic Belt (Ferrari et al., 2012). We

also measured the concentrations and isotopic compositions of the sedimentary organic carbon and carbonates as well as porewater DIC from surficial sediments ( $\sim 10$  cm) at the bottom of the lakes. The four lakes share similar geological and climatic contexts but have distinct solution chemistries along a marked alkalinity–salinity gradient (Zeyen et al., 2021) – as well as distinct planktonic communities (Iniesto et al., 2022). We therefore seek to evaluate how these environmental and ecological differences are recorded in the C isotope signatures in the water columns (DIC–POC) and sedimentary archives (organic matter–carbonates). The four lakes are closed lakes in endorheic basins (Alcocer, 2021; Zeyen et al., 2021), which facilitates the identification of external environmental constraints (e.g., evaporation, C sources) and their influence on processes occurring within the water columns. Depth profiles of the main physicochemical parameters together with trace and major element concentrations were measured to pinpoint the dominant biogeochemical processes occurring in the water columns and link them to specific C isotopes signatures.

First, we constrain the main DIC sources and external controls on the lakes' alkalinities. Next, we describe the influence of the inter-lake alkalinity gradient on the inorganic C cycle and stratification of the lakes and how it is recorded in surficial sediments. Then, by combining POC and DIC data, we identify the sources of organic C to the lakes by describing the main autotrophic reactions occurring in the water columns (e.g., oxygenic and anoxygenic photosynthesis). Finally, we discuss the fate of POC, either recycled (e.g., via methanogenesis) or deposited in the sediments, and how all these processes are recorded (or not) in surficial sediments.

## 2 Setting and context

### 2.1 Geology

The four lakes studied here are volcanic tuff cones and maars formed after phreatic, magmatic, and phreatomagmatic explosions, related to volcanic activity in the Trans-Mexican Volcanic Belt (TMVB, Fig. 1). The TMVB originates from the subduction of the Rivera and Cocos plates beneath the North American plate, resulting in a long ( $\sim 1000$  km) and wide (90–230 km) Neogene volcanic arc spreading across central Mexico (Ferrari et al., 2012). The TMVB harbors a large variety of monogenetic scoria cones and phreatomagmatic vents (maars and tuff cones) as well as stratovolcanoes, calderas, and domes (Carrasco-Núñez et al., 2007; Ferrari et al., 2012; Siebe et al., 2014). Maar crater formation usually occurs when ascending magma meets water-saturated substrates, leading to successive explosions and the excavation of older units (Lorenz, 1986; Carrasco-Núñez et al., 2007; Siebe et al., 2012; Chako Tchamabé et al., 2020).

The first lake, Alberca de los Espinos (1985 m a.s.l.), is located at the margin of the Zacapu tectonic lacustrine basin

in the Michoacán–Guanajuato volcanic field (MGVF) in the central western part of the TMVB (Fig. 1). It lies on andesitic basement rocks and was dated at  $\sim 25 \pm 2$  ka (Siebe et al., 2012, 2014). The other three lakes (La Preciosa, Atexcac, and Alchichica) are all in the same area ( $\sim 50$  km<sup>2</sup>) of the Serdán–Oriental basin (SOB) in the easternmost part of the TMVB (Fig. 1). The SOB is a closed intra-montane basin at high altitude ( $\sim 2300$  m), surrounded by the Los Humeros caldera to the north and the Cofre de Perote–Citlatépetl volcanic range to the east. The basement is composed of folded and faulted Cretaceous limestones and shales, covered by andesitic-to-basaltic lava flows (Carrasco-Núñez et al., 2007; Armienta et al., 2008; Chako Tchamabé et al., 2020). The Alchichica and Atexcac craters was dated at  $\sim 6\text{--}13 \pm 5\text{--}6$  ka (Chako Tchamabé et al., 2020) and  $330 \pm 80$  ka (Carrasco-Núñez et al., 2007), respectively (Table 1). The age of La Preciosa is not known.

## 2.2 Climate and limnology

Alberca is a freshwater lake (0.6 psu) with a temperate to semi-humid climate (Rendon-Lopez, 2008; Sigala et al., 2017). In contrast, lakes from the SOB experience a similar temperate to semi-arid climate (Armienta et al., 2008; Sigala et al., 2017). The current climate of the SOB is dominated by dry conditions, reflected by higher evaporation than precipitation fluxes in Lake Alchichica ( $\sim 1686$  vs.  $392$  mm yr<sup>-1</sup>; Alcocer, 2021). In La Preciosa, Atexcac, and Alchichica, significant evaporation is reflected by a drop in water level, evidenced by the emersion of microbialite deposits (Fig. S1; Zeyen et al., 2021). This evaporation-dominated climate strongly contributes to the relatively high salinity values in these lakes (1.2–7.9 psu), ranging from sub- to hyposaline.

The four lakes are warm monomictic: they are stratified for about 9 months of the year, mixing only when thermal stratification breaks down in the cold of winter (Armienta et al., 2008). They are all closed lakes located in an “endorheic” basin (Alcocer, 2021; Zeyen et al., 2021), meaning that they have no inflow, outflow, or connection to other basins through surficial waters such as streams. The only water input is from precipitation and groundwater inflow (quantified for Lake Alchichica; Alcocer, 2021, and references therein).

The four lakes are alkaline (pH  $\sim 9$ ) but cover a broad range of chemical compositions (including alkalinity, salinity, and Mg / Ca ratio), interpreted as reflecting different concentration stages of an initial alkaline dilute water (Table 1; Zeyen et al., 2021). Variations in concentration stages may be due to differences in climate and, more generally, different hydrological regimes. Microbialite deposits are found in all four lakes (Gérard et al., 2013; Saghai et al., 2016; Iniesto et al., 2021a, b; Zeyen et al., 2021) and increase in abundance from lower to higher alkalinity conditions (Zeyen et al., 2021).

## 3 Method

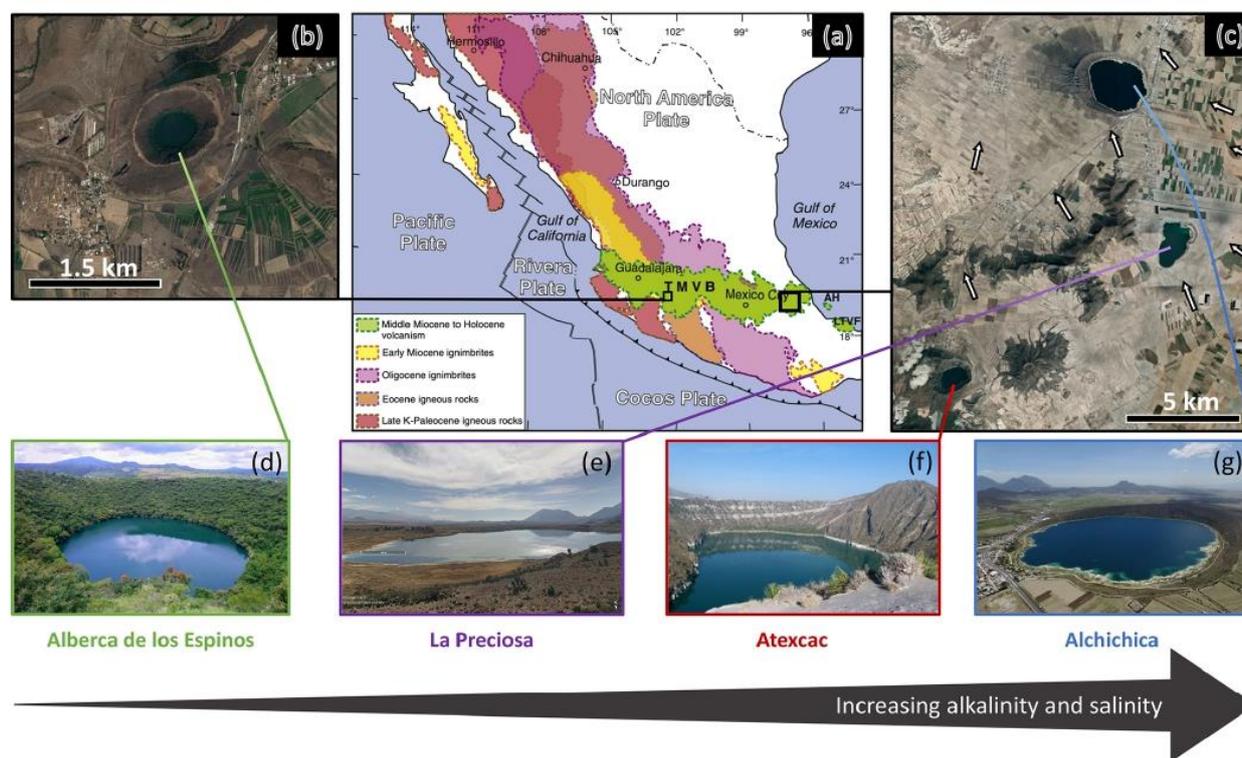
### 3.1 Sample collection

The sediment core from Lake La Preciosa was collected in May 2016. All other samples were collected in May 2019. The depth profiles of several physicochemical parameters were measured in the water columns of the four lakes using an YSI EXO2 Multiparameter probe: temperature, pH, ORP (oxidation reduction potential), conductivity, O<sub>2</sub>, chlorophyll *a*, phycocyanin, and turbidity. Precisions for these measurements were 0.01 °C, 0.1 pH unit, 20 mV, 0.001 mS cm<sup>-1</sup>, 0.1 mg L<sup>-1</sup>, 0.01 µg L<sup>-1</sup>, 0.01 µg L<sup>-1</sup> and 2 % FTU (formazine turbidity unit), respectively. The ORP signal was not calibrated before each profile and is thus used to discuss relative variations over a depth profile. Measurements of the aforementioned parameters served to pinpoint depths of interest for further chemical and isotopic analyses, notably around the redoxcline of the lakes. Water samples were collected with a Niskin bottle. Particulate matter was collected on pre-combusted (2 h at 490 °C) and weighted glass fiber filters (Whatman GF/F, 0.7 µm) and analyzed for particulate organic carbon (POC), major elements, and trace elements. Between 1.5 and 5 L of lake water was filtered before the GF/F filters became clogged. The processed solution was filtered again at 0.22 µm with Filtrapor S filters (pre-rinsed with lake water filtered at 0.7 µm) for analyses of dissolved inorganic carbon (DIC) and major, minor, and trace ions.

Sediment cores were collected using a 90 mm UWITEC corer close to the deepest point of each lake’s water column (Table 1), where anoxic conditions prevail almost all year long. Cores measured between 20 and 85 cm in length. Slices of about 2–3 cm were cut under anoxic conditions, using a glove bag filled with N<sub>2</sub> (anoxia was monitored using a WTW3630 equipped with a FDO O<sub>2</sub> Optode). Interstitial porewater was drained out of the core slices using Rhizons in the glove bag. Sediments were transported back to the laboratory within aluminized foils (Protpack, UK). Sediments were then fully dried in a laboratory anoxic N<sub>2</sub>-filled glove box.

### 3.2 Dissolved inorganic carbon (DIC) concentration and isotope measurements

Of the 0.7 µm filtered lake water, 12 mL was filtered at 0.22 µm directly into hermetic Exetainer<sup>®</sup> tubes to avoid exchange between DIC and atmospheric CO<sub>2</sub>. The DIC concentrations and isotopic compositions were measured at the Institut de Physique du Globe de Paris (IPGP, France), using an Analytical Precision 2003 GC-IRMS (gas chromatography isotope-ratio mass spectrometry), running under He continuous flow, following the protocol described by Assayag et al. (2006). A given volume of the solution was extracted from the Exetainer<sup>®</sup> tube with a syringe, while the same volume of helium was introduced to maintain stable pressure and



**Figure 1.** Geographical location and photographs of the four crater lakes. (a) Geological map from Ferrari et al. (2012), with black squares showing the location of the four studied lakes within the Trans-Mexican Volcanic Belt (TMVB). (b, c) Close up © Google Earth views of Alberca de los Espinos and the Serdán-Oriental basin (SOB). The white arrows represent the approximate groundwater flow path (based on Silva-Aguilera, 2019). (d–g) Photographs of the four lakes (panel d from © Google Image [“enamoredemexicowebiste”], panel e from © Google Earth street view, and panel g from © “Agencia Es Imagen”).

atmospheric- $\text{CO}_2$ -free conditions within the sample tubes. The collected sample was inserted into another Exetainer<sup>®</sup> tube, pre-filled with a few drops of 100 % phosphoric acid ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), and pre-flushed with He gas. Under acidic conditions, DIC quantitatively converts to gaseous and aqueous  $\text{CO}_2$ , which equilibrates overnight within the He-filled head space of the tube. Quantification and isotopic analyses of released gaseous  $\text{CO}_2$  were then carried out by GC-IRMS using internal standards of known composition that were prepared and analyzed via the same protocol. Each measurement represented an average of four injections in the mass spectrometer. Chemical preparation and IRMS analysis were duplicated for all the samples. The  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  reproducibility calculated for the 65 samples was better than  $\pm 0.2\text{‰}$ , including internal and external reproducibility. Standard deviation for [DIC] was  $0.6 \pm 0.9 \text{ mmol L}^{-1}$  on average.

Specific DIC speciation, i.e.,  $\text{CO}_2(\text{aq})$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , and  $\text{CO}_3^{2-}$  activities, was computed using PHREEQC with the full dissolved chemical composition of each sample as an input. It should be noted that these results are calculated from theoretical chemical equilibria and do not necessarily take into account local kinetic effects, which, for example, could lead

to local exhaustion of  $\text{CO}_2(\text{aq})$  where intense photosynthesis occurs.

### 3.3 Particulate organic carbon and nitrogen (POC, PON)

Particulate organic matter from the lake water columns was collected on GF/F filters, dried at room temperature, and ground in a ball mill before and after decarbonation. Decarbonation was performed with 12N HCl vapors in a desiccator for 48 h. Aliquots of dry decarbonated samples (25–70 mg) were weighed in tin capsules. The POC and PON contents and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$  were determined at the Laboratoire Biogéosciences (Dijon, France) using a Vario Micro Cube elemental analyzer (Elementar, Hanau, Germany) coupled with an IsoPrime IRMS (Isoprime, Manchester, UK) in continuous flow mode. The USGS40 and IAEA-600 certified materials used for calibration showed reproducibility better than 0.15 ‰ for  $\delta^{13}\text{C}$ . External reproducibility based on triplicate analyses of samples ( $n = 23$ ) was 0.1 ‰ on average for  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$  (1SD). External reproducibility for POC and PON concentrations

**Table 1.** General information about the lakes studied. Abbreviations: TMVB, Trans-Mexican Volcanic Belt; MGVF, Michoacán–Guanajuato volcanic field; m.a.s.l., meters above sea level. NB: Sampling took place in May 2019, except for the La Preciosa sediments sampled in May 2016.

Lake	General location	Sampling location	Elevation (m a.s.l.)	Lake basement	Age	Max depth (m)	Alkalinity (mmol L <sup>-1</sup> )	Salinity (psu)	pH
Alchichica	Serdán-Oriental basin, eastern TMVB	19°24′51.5″N; 97°24′09.9″W	2320	Limestone, basalts	6–13 ± 5–6 ka	62	~35	7.9	9.22
Atexcac	Serdán-Oriental basin, eastern TMVB	19°20′2.2″N; 97°26′59.3″W	2360	Limestone, andesites, basalts	8.3–5.1 ± 0.1–0.2 ka	39	~26	7.4	8.85
La Preciosa	Serdán-Oriental basin, eastern TMVB	19°22′18.1″N; 97°23′14.4″W	2330	Limestone, basalts	Holocene	46	~13.5	1.15	9.01
Alberca de los Espinos	Zacapu basin, MGVF, central TMVB	19°54′23.9″N; 101°46′07.8″W	1985	Andesite	25 ± 2 ka	30	~7	0.6	9.14

was 0.001 and 0.005 mmol L<sup>-1</sup> on average, respectively (i.e., 3 % and 7 % of measured concentrations).

### 3.4 Geochemical characterizations of the sediments

Sedimentary organic carbon (SOC), sedimentary organic nitrogen (SON), and their isotopic compositions were measured on carbonate-free residues of the first 12 cm of the sediment cores, produced after overnight 1N HCl digestion. Plant debris (mainly found in Alberca and Atexcac) was identified upon initial sediment grinding in an agate mortar and analyzed separately. Aliquots of dried decarbonated samples (~4–70 mg) were weighed in tin capsules. The SOC and SON contents and  $\delta^{13}\text{C}$  were determined at the Laboratoire Biogéosciences (Dijon) using a Vario Micro Cube elemental analyzer (Elementar GmbH, Hanau, Germany) coupled with an IsoPrime IRMS (Isoprime, Manchester, UK) in continuous flow mode. The USGS40 and IAEA-600 certified materials used for calibration had a reproducibility better than 0.2 ‰ for  $\delta^{13}\text{C}_{\text{SOC}}$ . Sample analyses ( $n = 67$ ) were at least duplicated and showed an average external reproducibility of 0.1 ‰ for  $\delta^{13}\text{C}$  (1SD). External reproducibility for SOC and SON contents was 0.1 wt % and 0.03 wt %, respectively.

Carbon isotope compositions of sedimentary carbonates were analyzed at the Laboratoire Biogéosciences (Dijon) using a Thermo Scientific™ DELTA V Plus™ IRMS coupled with a Kiel IV carbonate device. External reproducibility was assessed by multiple measurements of NBS19 standard and was better than  $\pm 0.1$  ‰ ( $2\sigma$ ). Total carbonate concentration was determined by mass balance after decarbonation for SOC analysis.

Mineralogical assemblages of sediments were determined on bulk powders by X-ray diffraction (XRD) at the Laboratoire Biogéosciences (Dijon). Samples were ground in an agate mortar. Diffractograms were obtained with a Bruker D8 ENDEAVOR diffractometer, with CuK $\alpha$  radiation and LYNXEYE XE-T detector, under 40 kV and 25 mA intensity. Mineral identification was based on the COD (“Crystallography Open Database”) and BGMN databases. Mineral abundances were estimated by Rietveld refinement analysis implemented in the Profex software.

Solid sulfide concentrations were determined on dry bulk sediments from Lake Alberca after a wet chemical extraction using a boiling acidic Cr(II) solution, as detailed in Gröger et al. (2009).

### 3.5 Major and trace element concentrations

Dissolved and particulate matter elemental compositions were measured at the Pôle Spectrométrie Océan (Plouzané, France) by inductively coupled plasma–atomic emission spectroscopy (ICP–AES, Horiba Jobin) for major elements and by high-resolution ICP–mass spectrometry using an Element XR (HR-ICP–MS, Thermo Fisher Scientific) for trace elements. Major element measurement reproducibility based

on internal multi-elemental solution was better than 5%. Trace elements were analyzed by a standard sample bracketing method and calibrated with a multi-elemental solution. Analytical precision for trace elements was generally better than 5%. Dissolved sulfate concentrations were analyzed by ion chromatography at the IPGP (Paris, France), with uncertainty lower than 5%.

## 4 Results

### 4.1 Lake Alberca de los Espinos

Stratification of the water column was well defined in Alberca de los Espinos (Fig. 2). Temperature was higher than in the other lakes (decreasing from  $\sim 23^\circ\text{C}$  at the surface to  $16.5^\circ\text{C}$  at depth). Dissolved  $\text{O}_2$  was oversaturated at the lake surface (118%, i.e.,  $7.9\text{ mg L}^{-1}$ ), rapidly decreasing to 0 between  $\sim 5$  and 12 m, while the oxidation reduction potential (ORP) only decreased below 17 m depth. The offset between  $\text{O}_2$  exhaustion and ORP decrease can be explained by the presence of other oxidant species and/or extended chlorophyll *a* peaks (Supplement Text S1). Conductivity decreased from 1.20 to  $1.17\text{ mS cm}^{-1}$  at 16 m before increasing to  $1.27\text{ mS cm}^{-1}$  at 26 m (salinity between 0.58 and 0.64 psu). Chlorophyll *a* (Chl *a*) averaged  $3.1\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ , and showed a profile with at least three distinctive peaks, (i) between 6 and 9.5 m, (ii) around 12.5 m, and (iii) between 16 and 19 m, all reaching  $\sim 4\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ . The turbidity profile showed a pronounced increase from 16 to 19 m. The pH profile showed important variation from 9.15 at the lake surface to 8.75 between 6.5 and 10 m, further decreasing to 7.5 between 16 and 26 m. Based on the temperature profiles, epilimnion, metalimnion, and hypolimnion layers of Lake Alberca de los Espinos in May 2019 broadly extended from 0–5, 5–12, and 12–30 m, respectively (Fig. 2). The conductivity and pH profiles, however, show that different conditions prevail at the top and bottom of the hypolimnion.

Dissolved inorganic carbon (DIC) concentration progressively increased from 6.8 mM at 5 m to 8.7 mM at 26 m. The  $p\text{CO}_2$  calculated for surface waters was near equilibrium with atmospheric  $p\text{CO}_{2\text{atm}}$  but strongly increased with depth, up to  $\sim 40$  times the  $p\text{CO}_{2\text{atm}}$  (Table S2). The  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  first decreased from about  $-2.5\text{ ‰}$  to  $-4.1\text{ ‰}$  between 5 and 10 m, before increasing again up to  $-2\text{ ‰}$  at 25 m. Particulate organic carbon (POC) concentrations reached minimum values of 0.02 mM at 10 m but rose to maximum values in the hypolimnion (0.06 mM). The C:N molar ratio of particulate organic matter (POM) progressively decreased from 8.5 at the surface to less than 6.5 in the hypolimnion. The  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$  had minimum values at 10 and 17 m ( $-28.3\text{ ‰}$  and  $-29\text{ ‰}$ , respectively). Above and below these depths,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$  averaged  $-26.4 \pm 0.5\text{ ‰}$ .

Dissolved sulfates as measured by chromatography were only detectable at 5 m, with a low concentration of  $12\text{ }\mu\text{M}$ ,

while total dissolved S measured by ICP-AES showed values in the hypolimnion higher than in the upper layers ( $\sim 10.3$  vs.  $7.4\text{ }\mu\text{M}$ , Table S4). Dissolved Mn concentrations decreased from 1.5 to  $0.5\text{ }\mu\text{M}$  between 5 and 10 m, then increased to  $2\text{ }\mu\text{M}$  at 25 m. Aqueous Fe was only detectable at 25 m, with a concentration of  $0.23\text{ }\mu\text{M}$  (Table S4). In parallel, particulate S concentrations increased with depth, with a marked increase from 0.1 to  $0.6\text{ }\mu\text{M}$  between 20 and 25 m. Increase in particulate S was correlated with a 25-fold increase in particulate Fe (from 0.2 to  $5.97\text{ }\mu\text{M}$ ). Particulate Mn showed a peak between 17 and 20 m around  $1\text{ }\mu\text{M}$ , contrasting with values lower than  $0.15\text{ }\mu\text{M}$  in the rest of the water column (Fig. 2, Table S5).

In the first centimeters of sediments, DIC concentration in the porewater varied between  $\sim 11$  and  $12\text{ mM}$ , and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  varied between  $+8\text{ ‰}$  and  $+10\text{ ‰}$  (Figs. 3, 4). Surficial sedimentary carbonates corresponded to calcite and had a  $\delta^{13}\text{C}$  around  $-1.5\text{ ‰}$ . Sedimentary organic matter had a  $\delta^{13}\text{C}_{\text{SOC}}$  increasing from  $\sim -29.4\text{ ‰}$  to  $-25.5\text{ ‰}$  and a C:N molar ratio varying between 11.6 and 14.3 (Figs. 3, 4; Table S3).

### 4.2 Lake La Preciosa

Lake La Preciosa was also stratified at the time of sample collection (Fig. 2). Temperature decreased from  $\sim 20^\circ\text{C}$  at the surface to  $16^\circ\text{C}$  at 15 m depth. Conductivity showed the same trend with values between 2.24 and  $2.22\text{ mS cm}^{-1}$  (salinity around 1.15 psu). Dissolved  $\text{O}_2$  was oversaturated at the lake surface (120%, i.e.,  $8.4\text{ mg L}^{-1}$ ), rapidly decreasing to 0 between  $\sim 8$  and 14 m, while the ORP decreased right below 16 m. Chl *a* concentration averaged  $3\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  and recorded the highest peak compared to the other lakes (about  $9\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  at 10 m) before decreasing to  $0.7\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  below 15 m. Turbidity showed a large peak between 16 and 19 m. The pH showed a small decrease from 9 to 8.8 between the surface and 15 m depth. Based on the temperature profiles, epilimnion, metalimnion, and hypolimnion layers of La Preciosa in May 2019 broadly extended from 0–6, 6–15, and 15–46 m, respectively (Fig. 2).

The DIC concentration was constant throughout the water column at 13.3 mM, with an exception at 12.5 m, where it decreased to 11.5 mM (Fig. 3, Table S1). Calculated  $p\text{CO}_2$  at the surface represented about 2 times the atmospheric  $p\text{CO}_{2\text{atm}}$  (Table S2). The  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  decreased from about  $0.5\text{ ‰}$  to  $-0.36\text{ ‰}$  between the surface and the hypolimnion. The POC concentration decreased from  $\sim 0.06\text{ mM}$  in the epilimnion and metalimnion to 0.02 mM in the hypolimnion. Similarly, (C:N)<sub>POM</sub> decreased from  $\sim 11.2$  in the epilimnion and metalimnion to 7.6 in the hypolimnion. The  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$  increased downward from  $\sim -27\text{ ‰}$  to  $-25\text{ ‰}$ , with a peak of  $-23.5\text{ ‰}$  at 15 m.

In the first 10 cm of sediments,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{SOC}}$  values increased downwards from  $\sim -25.5\text{ ‰}$  to  $-23.2\text{ ‰}$  and the C:N molar ratio from 9.8 to 11 (Figs. 3, 4; Table S3). Carbonates corresponded to aragonite and calcite and had a bulk C isotope

composition averaging 2.6‰ (Table S3). Porewaters from the 2016 La Preciosa core were not retrieved.

#### 4.3 Lake Atexcac

Stratification of the Lake Atexcac water column was also very well defined (Fig. 2). Temperature decreased from  $\sim 20.6^\circ\text{C}$  at the surface to reach  $16^\circ\text{C}$  below 20 m. Conductivity showed the same trend with values between 13 and  $12.8\text{ mS cm}^{-1}$  near the surface (salinity around 7.4 psu). Dissolved  $\text{O}_2$  was slightly oversaturated at the lake surface (115 % or  $7.6\text{ mg L}^{-1}$ ), rapidly decreasing to  $0\text{ mg L}^{-1}$  between  $\sim 10$  and 20 m, while ORP signal decreased below a depth of 22 m. Chl *a* averaged  $1\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  and showed a narrow peak centered at around 16 m, reaching  $\sim 2\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ . Turbidity showed a pronounced increase below 20 m, peaking at 23.3 m and returning to surface values at 26 m. The pH remained around 8.85 throughout the water column. Based on the temperature profiles, the epilimnion, metalimnion, and hypolimnion of Atexcac in May 2019 broadly extended from 0–10, 10–20, and 20–39 m, respectively (Fig. 2).

The DIC concentration was around 26 mM throughout the water column, except at 23 m, where it decreased to 24.2 mM (Fig. 3, Table S1). Calculated  $p\text{CO}_2$  was about 5 times higher than the atmospheric  $p\text{CO}_{2\text{atm}}$  (Table S2). The  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  was stable around 0.4‰ in the epilimnion and metalimnion but increased to 0.9‰ at 23 m and reached 0.2‰ minimum values at the bottom of the lake. The POC concentration was  $\sim 0.05\text{ mM}$  in the epilimnion and metalimnion, decreasing to 0.02 mM in the hypolimnion. The C:N molar ratio of POM showed the same depth profile, decreasing from  $\sim 9.6$  in the epilimnion and metalimnion to 6.6 in the hypolimnion (Fig. 3). The  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$  showed minimum values in the epilimnion and metalimnion ( $-29.3\text{ ‰}$  at 16 m) and increased to  $-26.5\text{ ‰}$  in the hypolimnion.

Dissolved sulfate concentration was relatively stable at  $\sim 2.51\text{ mM}$  throughout the water column but increased to 2.64 mM at 23 m. Dissolved Mn concentration was constant at  $1\text{ }\mu\text{M}$  down to 16 m, before dropping to 0 at 23 m and increasing again to  $2.35\text{ }\mu\text{M}$  at 30 m (Fig. 2; Table S4). Similar depth profiles were found for other heavy elements as well, including Cu, Sr, Ba, or Pb among others.

In the first 12 cm of sediments, DIC concentration in the porewater varied between  $\sim 21$  and 26 mM, and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  was around 0‰. Carbonates corresponded to aragonite and calcite and had a bulk C isotope composition between 2.1‰ and 2.6‰ (Table S3). Sedimentary organic matter had a  $\delta^{13}\text{C}_{\text{SOC}}$  averaging  $-26.8 \pm 0.1\text{ ‰}$  and a C:N molar ratio increasing from 8 to 10 (Figs. 3, 4; Table S3).

#### 4.4 Lake Alchichica

The water column of Lake Alchichica showed a pronounced stratification compared to previous years at the same period (Figs. 2, S2; Lugo et al., 2000; Adame et al., 2008;

Macek et al., 2020). Temperature decreased from  $\sim 20^\circ\text{C}$  at the surface to  $15.5^\circ\text{C}$  at depths below 30 m. Conductivity showed the same trend with values between around  $13.8\text{ mS cm}^{-1}$  (salinity decreasing from 7.9 to 7.8 psu). Dissolved  $\text{O}_2$  was slightly oversaturated at the lake surface (112 % or  $7.5\text{ mg L}^{-1}$ ), rapidly decreasing to  $0\text{ mg L}^{-1}$  between  $\sim 10$  and 20 m. The ORP followed a similar trend but decreasing below 30 m only. The offset between  $\text{O}_2$  exhaustion and decrease of the ORP can be explained by the presence of other oxidant species and/or extended Chl *a* peaks (Supplement Text S1). Chl *a* averaged  $2\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ , with a broad peak extending from  $\sim 7$  to 29 m (averaging  $4\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ) and showing a narrow  $6\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  maximum values at 23 m. Then, it decreased to minimum values of  $\sim 0.5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  in the lower water column. The pH remained constant at  $\sim 9.2$  over the whole water column. Based on the temperature profiles, the epilimnion, metalimnion and hypolimnion layers of Lake Alchichica in May 2019 extended from 0–10, 10–20, and 20–63 m, respectively (Fig. 2).

The DIC concentration was around 34.8 mM throughout the water column, except at 10 m where it decreased to 33 mM (Fig. 3; Table S1). Calculated  $p\text{CO}_2$  was about 3 times higher than the atmospheric  $p\text{CO}_{2\text{atm}}$  (Table S2). The  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  decreased from 2‰ to  $\sim 1.5\text{ ‰}$  between 5 and 60 m depth (Fig. 4; Table S1). The POC concentration was  $\sim 0.09\text{ mM}$  in the epilimnion and metalimnion, decreasing to 0.02 mM in the hypolimnion. The  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$  increased from  $-26.5\text{ ‰}$  in the top 30 m to  $-24.1\text{ ‰}$  at 55 m. The C:N molar ratio of POM showed a similar profile with values around 10.5 down to 30 m, progressively decreasing towards 5.9 at 55 m (Fig. 3; Table S1).

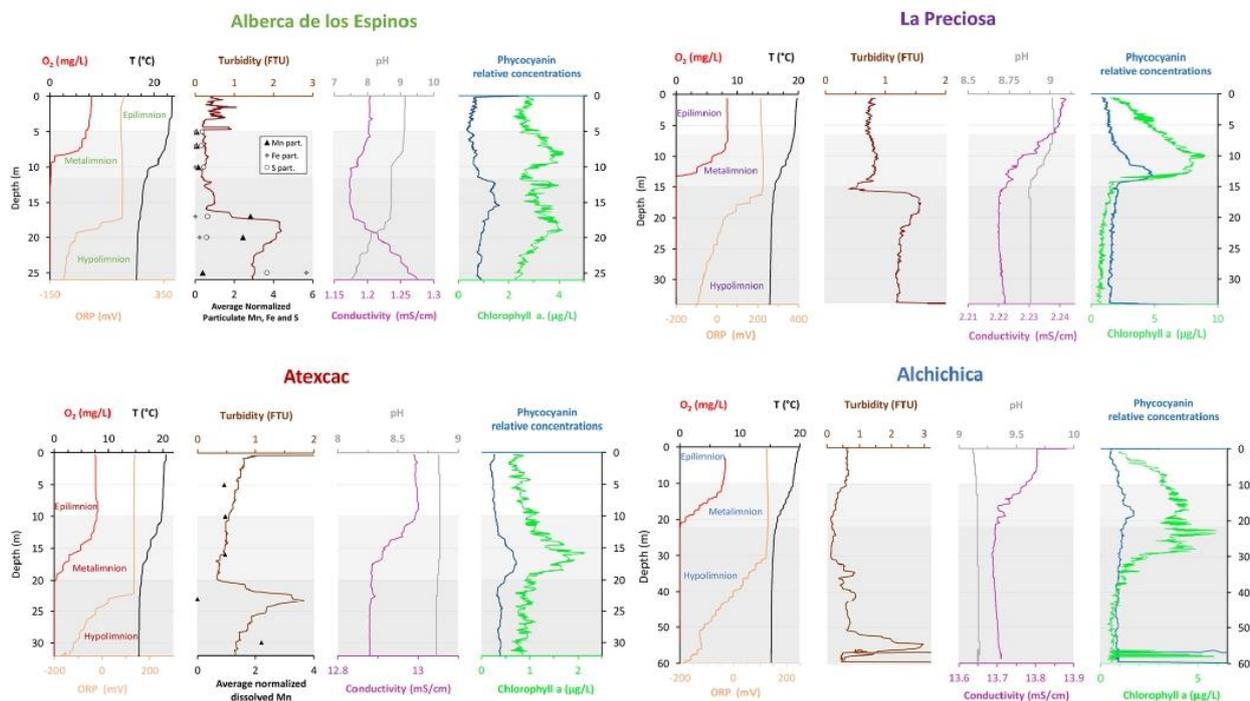
In the first 12 cm of sediments, porewater DIC had a concentration of  $\sim 35.5\text{ mM}$ , and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  decreased from 0.4‰ to  $-0.5\text{ ‰}$ . Solid carbonates were contained within several phases (aragonite, hydromagnesite, huntite, and calcite) and had a bulk C isotope composition around 4.6‰ (Table S3). Sedimentary organic matter had a  $\delta^{13}\text{C}_{\text{SOC}}$  increasing from  $-25.7\text{ ‰}$  to  $-24.5\text{ ‰}$  and a constant C:N molar ratio slightly higher than 10 (Figs. 3, 4; Table S3).

## 5 Discussion

### 5.1 Inorganic carbon: origins and implications of the alkalinity / DIC gradient

#### 5.1.1 Sources of DIC and origin of the inter-lake alkalinity gradient

Salinity and DIC concentration gradually increase from Alberca de los Espinos (0.6 psu, 7 mM) to Alchichica (7.9 psu, 35 mM), while La Preciosa (1.15 psu, 13 mM) and Atexcac (7.44 psu, 26 mM) have intermediate values (Table 1 and S1). This trend matches the alkalinity gradient (with values of  $\sim 8, 15, 32$  and  $47\text{ meq L}^{-1}$ , Fig. S3a) previously de-

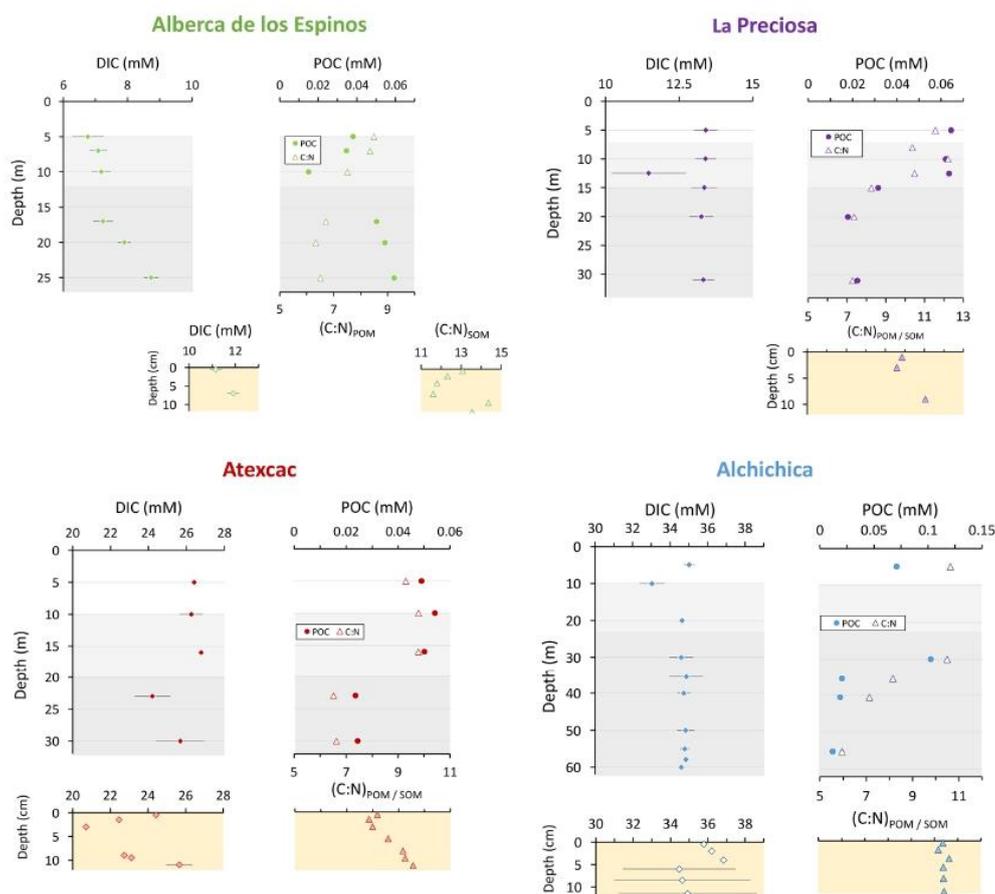


**Figure 2.** Physicochemical parameter depth profiles in Alberca de los Espinos, La Preciosa, Atexcac, and Alchichica in May 2019, including dissolved oxygen concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ ), water temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ), oxidation-reduction potential (ORP, mV), turbidity (Formazin Turbidity Unit), pH, conductivity ( $\text{mS cm}^{-1}$ ), phycocyanin, and chlorophyll *a* pigments ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Absolute values for phycocyanin concentrations were not determined, only relative variations are represented (with increasing concentrations to the right). Discrete concentration values of dissolved Mn in Atexcac and particulate Mn, Fe, and S in Alberca, normalized by their respective averages, are represented. Epilimnion, metalimnion, and hypolimnion layers are depicted for each lake according to temperature profiles. The three layers closely corresponded to oxygen-rich, oxygen-poor, and intermediate zones (except in La Preciosa where the oxycline was slightly thinner than the thermocline layer,  $\sim 5$  vs. 8 m).

scribed for these lakes (Zeyen et al., 2021), consistent with the fact that alkalinity is mainly composed of  $\text{HCO}_3^-$  and  $\text{CO}_3^{2-}$  ions in most natural waters. This alkalinity gradient may result from different concentration stages of an initial dilute alkaline water (Zeyen et al., 2021), ultimately controlled by differences in hydrological regime between the four lakes. In the SOB, the weathering of basaltic and andesitic bedrock (Armieta et al., 2008; Carrasco-Núñez et al., 2007; Lelli et al., 2021) and Cretaceous limestone (with  $\delta^{13}\text{C} \approx 0 \pm 1 \text{‰}$ ; Gonzales-Partida et al., 1993; Armstrong-Altrin et al., 2011) favors the inflow of more alkaline and DIC-concentrated groundwater than in Alberca, which lies on an essentially basaltic basement (Rendon-Lopez, 2008; Siebe et al., 2014; Zeyen et al., 2021). The SOB is currently experiencing higher rates of evaporation than precipitation (Alcocer, 2021), which may play an important role in concentrating solutes and decreasing the water level in La Preciosa, Atexcac, and Alchichica (Anderson and Stedmon, 2007; Zeyen et al., 2021). Substantial “sub-fossil” microbialite deposits emerge well above the current water level in lakes Atexcac and Alchichica, confirming this fall in wa-

ter level ( $\sim 15$  m for Atexcac and  $\sim 5$  m for Alchichica). Scattered patches of microbialites emerge at La Preciosa (suggesting a water level decrease of  $\sim 6$  m). By contrast, emerged microbialites are virtually absent in Lake Alberca de los Espinos (Fig. S1).

Additional local parameters such as variable groundwater paths and fluxes (Furian et al., 2013; Mercedes-Martín et al., 2019; Milesi et al., 2020; Zeyen et al., 2021) most likely play a role in explaining some of the variation in DIC concentration between lakes. La Preciosa’s water composition significantly differs from that of Atexcac and Alchichica, despite a similar geological context and climate (all are located within  $50 \text{ km}^2$ , Fig. 1). Groundwater in the SOB area becomes more saline as it flows towards the center of the basin and through the crater lakes (Silva Aguilera, 2019; Alcocer, 2021). Since groundwater flows through La Preciosa first, its ionic strength (including DIC concentration) increases as it enters Alchichica (Silva Aguilera, 2019; Alcocer, 2021; Lelli et al., 2021). Different regimes of volcanic  $\text{CO}_2$  degassing into these crater lakes may also contribute to variation in the C mass balance and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  values between the four



**Figure 3.** Concentrations in  $\text{mmol L}^{-1}$  (mM) of DIC, DOC, and POC and the sum of all three reservoirs; C:N molar ratios of POM as a function of depth in the water columns; and DIC concentrations in the surficial sediment porewaters and C:N molar ratios of sedimentary OM. Porewaters from La Preciosa's 2016 core were not retrieved.

lakes. Near the lakes from the SOB area, geothermal fluids derived from meteoric waters have been shown to interact with deep volcanic fluids as well as the calcareous basement rocks (Peiffer et al., 2018; Lelli et al., 2021). In the water column of Alberca,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{total}}$  averages  $-4.8\text{‰}$  (Havas et al., 2023a). This isotopic composition is very similar to signatures of mantle  $\text{CO}_2$  (Javoy et al., 1986; Mason et al., 2017), which could buffer the overall C isotope composition of this lake. Alberca is located on top of a likely active normal fault (Siebe et al., 2012), favoring the ascent of volcanic gases.

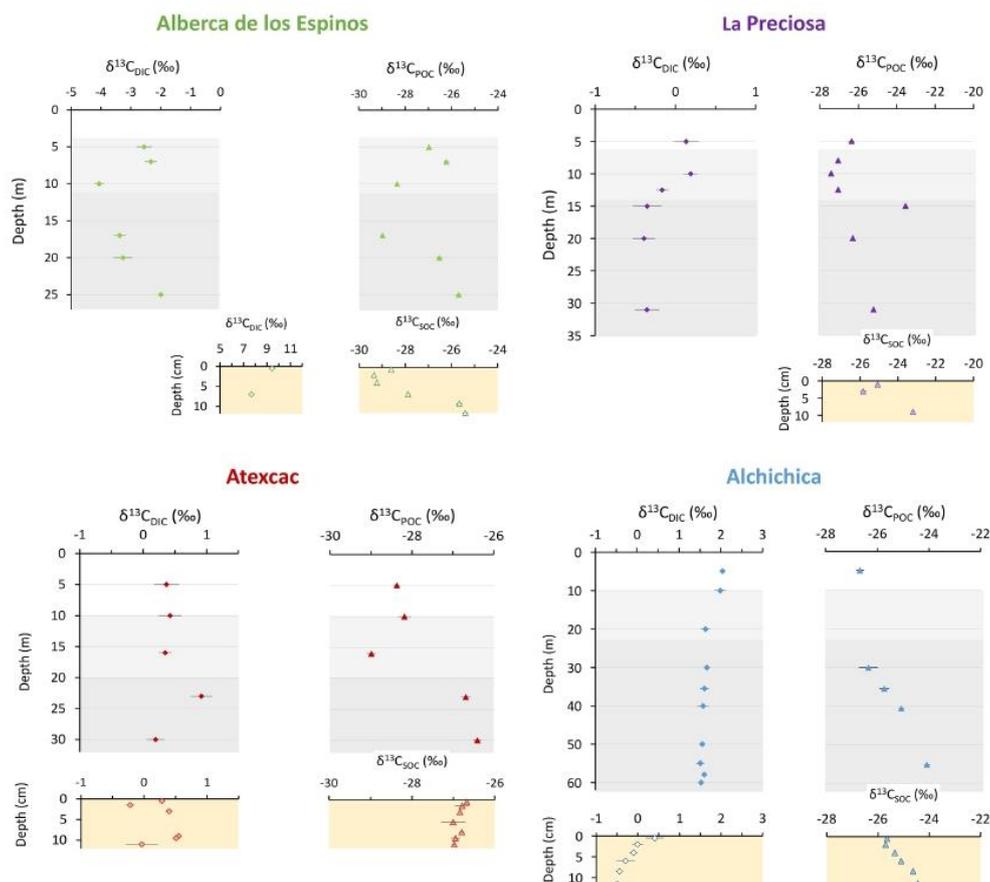
Differences in the remineralization rate of organic carbon (OC) could also contribute to the heterogeneous DIC content among the lakes. However, assuming that all OC from the lakes ultimately remineralized into DIC, it would still represent only a small proportion of the total carbon (9% for Alberca,  $\sim 5\%$  for La Preciosa and Alchichica, and 16% for Atexcac; Havas et al., 2023). From an isotopic mass balance perspective, Lake Alberca exhibits more negative  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  (and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{carb}}$ ), slightly closer to OC signatures, whereas the

$\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  of the three SOB lakes lies very far from OC isotopic signatures (Fig. 4). Dense vegetation surrounds Alberca (Fig. S1), making it the only lake in this study where OC respiration could be a significant source of inorganic C to the water column (potentially influencing the  $P_{\text{CO}_2}$ , [DIC], and pH profiles described above).

In summary, a combination of very local and external environmental factors generates the contrasting water chemistries of the lakes, notably a gradient in their alkalinity and [DIC]. This chemical variability stems from the exact nature of the basement rocks, the distinct groundwater flow paths feeding the lakes, differences in evaporation rates, and potentially different volcanic  $\text{CO}_2$  degassing regimes.

### 5.1.2 Influence of alkalinity on physicochemical stratification in the four lakes

Stratified water columns can sustain strong physicochemical gradients, where a wide range of biogeochemical reactions



**Figure 4.** Isotopic compositions of DIC and POC reservoirs as a function of depth in the water columns, as well as isotopic compositions of the porewater DIC and total organic carbon from the surficial sediments.

impacting the C cycle can take place (e.g., Jézéquel et al., 2016). In the four lakes studied here, the evolution of pH with depth exemplifies the interplay between the alkalinity gradient, the physicochemical stratification of the lakes, and their respective C cycle. The pH shows a stratified profile in Alberca and La Preciosa but remains constant in Atexcac and Alchichica. The decline in pH at the oxycline of La Preciosa is associated with the decrease in POC and chlorophyll *a* concentrations and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  values, reflecting the impact of oxygen respiration (i.e., carbon remineralization) at this depth (Figs. 2–4). In Alberca, the surface waters are markedly more alkaline than the bottom waters, with a two-step decrease in pH occurring at 8 and 17 m (with a total drop of 1.5 pH unit). As in La Preciosa, this pH decrease likely results from high OM respiration, although input of volcanic acidic gases (e.g., dissolved  $\text{CO}_2$  with  $\delta^{13}\text{C} \sim -5\text{‰}$ ) might also contribute to the pH decrease in the bottom waters, reflected by negative  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  signatures and an increase of [DIC] and conductivity in the hypolimnion (Figs. 2 and 4). By contrast, while the same evidence for oxygen respiration

([POC], chlorophyll *a*) can be detected in the other two lakes, it does not impact their pH profile in a similar way (Fig. 2). This result suggests that the acidity generated by OM respiration (and possibly volcanic  $\text{CO}_2$  degassing) is buffered by the much higher alkalinity measured in these two lakes.

External forcings such as lake hydrology and fluid sources thus impact the alkalinity buffering capacity of these lakes and influence the vertical pH profile of the water columns, which is particularly important considering the critical interplay between pH and biogeochemical reactions affecting the C cycle (e.g., Soetaert et al., 2007).

### 5.1.3 Sinks of DIC along the alkalinity gradient

Interplay between pH and sources of alkalinity and DIC in the lakes also has a strong impact on their C storage capacity, as it can result in different fluxes of the C sinks (inorganic and organic C precipitation and sedimentation,  $\text{CO}_2$  degassing).

Alkaline pH can store large quantities of DIC because it favors the presence of  $\text{HCO}_3^-$  and  $\text{CO}_3^{2-}$  species over  $\text{H}_2\text{CO}_3^*$

(the intermediate species between gaseous  $\text{CO}_{2(\text{g})}$  and bicarbonate/carbonate ions, defined here as the sum of  $\text{H}_2\text{CO}_3$  and  $\text{CO}_{2(\text{aq})}$ ). Carbonate and bicarbonate ions represent over 99 % of total DIC in the four lakes (Table S2). In Alberca de los Espinos, the lake with the lowest DIC, the surface water  $p\text{CO}_2$  is slightly lower than atmospheric  $p\text{CO}_{2\text{atm}}$  (Table S2). By contrast, large amounts of  $\text{CO}_2$  degas at the surface of the SOB lakes, as indicated by their elevated surface water  $p\text{CO}_2$ , from 2 to 5 times higher than atmospheric  $p\text{CO}_{2\text{atm}}$  (Table S2). These different  $\text{CO}_2$  degassing potentials are consistent with the notion that higher DIC concentrations favor  $\text{CO}_2$  degassing through higher  $p\text{CO}_2$  (e.g., Duarte et al., 2008). Although Alberca and Alchichica (the two end-members of the alkalinity gradient) have the same surface water pH,  $\text{CO}_2$  degassing is 3 times higher at Alchichica for a given value of gas transfer velocity.

Another important C sink for these lakes is the precipitation of carbonate minerals, found in the microbialites and lake sediments. Lake alkalinity and the resulting mineral saturation index greatly influence the amount of C precipitated from the lake waters. Although the four lakes are supersaturated with aragonite, calcite, and the precursor-phase monohydrocalcite, they present highly contrasted amounts of carbonate deposits (Zeyen et al., 2021). The occurrence of microbialites increases along the alkalinity gradient, with limited presence at Alberca and more massive deposits at Atexcac and Alchichica (Zeyen et al., 2021; Fig. S1). Similarly, surficial sediments contain only 16 wt % for Alberca but from 40 wt % to 62 wt % carbonates for the SOB lakes (Table S3). Thus, the SOB lakes seem to bury more C than Alberca de los Espinos. Nonetheless, the data from May 2019 indicate that Alberca was the only one of the four lakes with a  $p\text{CO}_2$  slightly lower than atmospheric  $p\text{CO}_{2\text{atm}}$ , thus representing a net sink of C. Classifying the three other lakes as net C sources or sinks – notably in order to see the influence of their respective position in the alkalinity gradient – will require a more detailed description of C in and out fluxes, since they all store and emit significant amounts of C (as organic and inorganic C deposits and via  $\text{CO}_2$  degassing, respectively). However, such a C budget is out of the scope of the present study.

#### 5.1.4 Isotopic signatures of inorganic C in the four lakes ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ and $\delta^{13}\text{C}_{\text{Carbonates}}$ )

The DIC isotopic composition of the lakes (between  $\sim -3\text{‰}$  and  $+2\text{‰}$  on average; Table S1) is consistent with the DIC sources described above. The lower  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  in Alberca is consistent with influence of remineralized OC and/or volcanic  $\text{CO}_2$ . The  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  in the SOB lakes suggests groundwater  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  values resulting from the dissolution of the Cretaceous limestone basement.

By controlling DIC speciation ( $\text{H}_2\text{CO}_3 / \text{CO}_{2(\text{aq})}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ), pH also strongly influences  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ . Indeed, there is a temperature-dependent fractionation of up to 10‰ be-

tween the different DIC species (Emrich et al., 1970; Mook et al., 1974; Bade et al., 2004; Table S6). The Mexican lakes present  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  values that are common for lakes with a pH around 9 (Bade et al., 2004), where DIC is dominated by  $\text{HCO}_3^-$ . However, the pH values of the four lakes studied here are too similar to explain the significant difference between their  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  (Fig. 4;  $p = 4.2 \times 10^{-3}$  for La Preciosa and Atexcac, which have the closest  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ ). Part of the variability of  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  among the lakes may result from their distinct evaporation stages, as the mean  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  values of the lakes broadly correlate with their salinity and alkalinity (Fig. S3b). Evaporation generally increases the  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  of residual waters by increasing lake  $p\text{CO}_2$  and primary productivity, which bolsters  $\text{CO}_2$  degassing and organic C burial, both having low  $\delta^{13}\text{C}$  compared to DIC (e.g., Li and Ku, 1997; Talbot, 1990). Accordingly, the  $p\text{CO}_2$  of Alberca is lower than that of the other lakes (Table S2). The  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  in lakes with lower DIC concentrations is expected to be more easily influenced by exchanges with other carbon reservoirs, such as organic carbon (through photosynthesis and respiration), or other DIC sources (e.g., depleted volcanic  $\text{CO}_2$  or groundwater DIC), compared to buffered, high DIC lakes (Li and Ku, 1997). As a result, the low DIC and alkalinity concentration in Alberca features the lowest  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  of the four lakes, likely reflecting organic and/or volcanic C influence and thus higher responsiveness to biogeochemical processes of the inorganic C reservoir. By contrast, the three SOB lakes exhibit  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  with less internal variability, with a maximum amplitude of 0.7‰ within a single water column.

Surficial sedimentary carbonates are in isotopic equilibrium with the  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  of the water columns, within the uncertainty of  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  measurement, and more specifically with the  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  values at the oxycline and thermocline of the lakes (Tables S6 and S7). The  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  at equilibrium with carbonates is estimated by correcting the carbonate C isotope composition ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{Carb}}$ ) by the fractionation value between DIC and the different carbonate mineralogies (Supplement Text S2). Therefore, the  $\delta^{13}\text{C}_{\text{Carb}}$  also follows and reflects the alkalinity gradient, with the lowest  $\delta^{13}\text{C}_{\text{Carb}}$  found in the surficial sediments of Alberca ( $\sim -1.5\text{‰}$ ), intermediate values in La Preciosa and Atexcac ( $\sim 2.5\text{‰}$ ), and the highest values in Alchichica ( $\sim +4.6\text{‰}$ ) (Table S3).

In summary, although all four lakes present the same general structure and environmental conditions (i.e., tropical alkaline stratified crater lakes), external and local factors (e.g., hydrology, fluid sources, and stratification characteristics) result in contrasting water chemistry compositions, which have a critical impact on the physicochemical depth profiles of each lake and their biogeochemical carbon cycle functioning. These external factors represent a first-order control on the size, isotopic composition, and responsiveness to biogeochemical processes of the inorganic C reservoir. Lakes with the highest alkalinity and DIC content will poorly record internal biological processes. Interestingly, C storage in mineral carbonates seems to be significant in watersheds where

**Table 2.** Index for mathematical notations used in the text including C isotopic composition of a reservoir  $X$  ( $\delta^{13}\text{C}_X$ ) and isotopic discrimination between the two carbon reservoirs  $X$  and  $Y$  ( $\Delta^{13}\text{C}_{X-Y}$ ). In the main text, we report organic C isotope discrimination versus both bulk DIC ( $\Delta^{13}\text{C}_{\text{POC-DIC}}$ ) – in a way to facilitate intercomparison studies and because it is the commonly reported raw measured data (Fry, 1996) – and calculated  $\text{CO}_2(\text{aq})$  ( $\varepsilon_{\text{POC-CO}_2}$ ) in order to discuss the intrinsic isotopic fractionations associated with the lakes metabolic diversity. All C isotope values and fractionations are reported relative to the international standard VPDB (Vienna Pee Dee Belemnite).

Symbols	Mathematical expression	Signification
$\delta^{13}\text{C}_X$	$\left( \frac{\left( \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_X}{\left( \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{VPDB}}} - 1 \right) \times 1000$	Relative difference in $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ isotopic ratio between a sample of a given C reservoir and the international standard “Vienna Pee Dee Bee”, expressed in permil (‰). $\delta^{13}\text{C}_{\text{total}}$ represents the weighted average of $\delta^{13}\text{C}$ for all DIC and POC.
$\Delta^{13}\text{C}_{X-Y}$	$= \delta^{13}\text{C}_X - \delta^{13}\text{C}_Y \approx 1000 \ln \alpha_{X-Y}$	Apparent isotopic fractionation between two reservoirs “X” and “Y”. Difference between their measured C isotope compositions approximating the fractionation $\alpha$ in permil.
$\varepsilon_{X-\text{CO}_2}$	$= (\alpha_{X-\text{CO}_2} - 1)1000 \approx \delta^{13}\text{C}_X - \delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}$	Calculated isotopic fractionation between a reservoir “X” and $\text{CO}_2(\text{aq})$ . $\alpha_{X-\text{CO}_2}$ is calculated as $(\delta^{13}\text{C}_X + 1000) / (\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2} + 1000)$ , where $\delta^{13}\text{C}_X$ is measured and $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}$ is computed based on DIC isotopic composition and speciation (see Supplement text S3).

carbonate deposits pre-exist in the geological substratum (here, the Cretaceous limestone basement), providing more alkaline and C-rich sources.

## 5.2 Particulate organic carbon: from water column primary production to respiration recycling and sedimentary organic matter

### 5.2.1 Particulate organic C sources

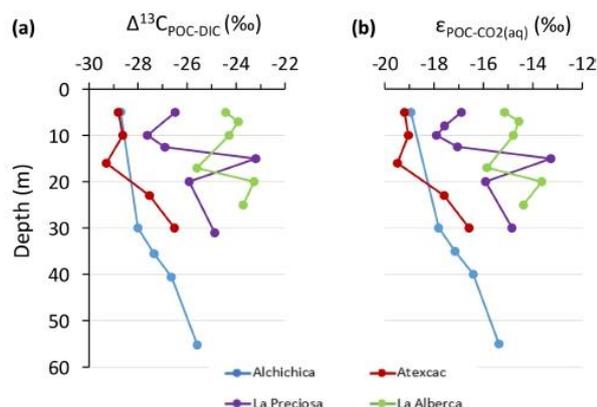
#### *Primary productivity by oxygenic photosynthesis in the upper water column*

The C : N ratios of water column POM and bulk organic matter in the sediments of the four lakes ranged from 6 to 13 (Fig. 3), close to the phytoplankton Redfield ratio but much lower than land-plant ratios. Yet abundant vegetation covers the crater walls of Alberca and, to a lesser extent, of Atexcac, and some plant debris was found in the sediment cores of these two lakes. Its analysis resulted in high C : N ratios (between 24 and 68), typical of plant tissues and significantly higher than those of the bulk sediment and water column organic matter. Thus, the allochthonous organic carbon in these two lakes does not significantly contribute to their bulk organic signal. All four crater lakes are endorheic basins, with no surface water inflow or outflow, supporting the predominantly autochthonous origin of organic carbon sources (Alcocer et al., 2014), from planktonic autotrophic C fixation.

The importance of planktonic autotrophic C fixation as a major source of POC in the four lakes is further supported by the assessment of the isotopic discrimination between DIC and organic biomass, expressed as  $\Delta^{13}\text{C}_{\text{POC-DIC}}$  and  $\varepsilon_{\text{POC-CO}_2}$  (Table 2). The  $\Delta^{13}\text{C}_{\text{POC-DIC}}$  varies between  $\sim -29\text{‰}$  and  $-23\text{‰}$  (corresponding to  $\varepsilon_{\text{POC-CO}_2}$  between

$\sim -19\text{‰}$  and  $-13\text{‰}$ ) throughout the four water columns, within the typical range of planktonic oxygenic phototrophs (Pardue et al., 1976; Sirevag et al., 1977; Thomas et al., 2019). Yet these values exhibit variability – both within a single water column (up to 4.5 ‰) and among the four lakes (up to 6 ‰; Figs. 4 and 5). The  $\Delta^{13}\text{C}_{\text{POC-DIC}}$  variability may reflect several abiotic and biotic factors.

Notably, lower DIC availability in Alberca and La Preciosa probably makes the carboxylation step less limiting during photosynthesis (e.g., O’Leary, 1988; Descolas-Gros and Fontungne, 1990; Fry, 1996), decreasing  $|\varepsilon_{\text{POC-CO}_2}|$  in these lakes (between 14.5 ‰ and 17.7 ‰ at the peak of Chl *a*) compared to Atexcac and Alchichica (Fig. 5a; between 17.5 ‰ and 19.2 ‰). Lower  $\text{CO}_2(\text{aq})$  availability and/or higher reaction rates result in transport-limited rather than carboxylation-limited fixation, with smaller C isotope fractionation between POC and DIC (Pardue et al., 1976; Zohary et al., 1994; Fry, 1996; Close and Henderson, 2020). The isotopic fractionation associated with diffusion is much smaller than with carboxylation, and a higher proportion of the DIC entering the cells is converted into organic biomass (e.g., Fogel and Cifuentes, 1993). We consistently notice a correlation among the lakes between  $\alpha(\text{CO}_2)_{(\text{aq})}$  (or [DIC]) and  $|\varepsilon_{\text{POC-CO}_2}|$  at depths where oxygenic photosynthesis peaks (Fig. 6). Furthermore, Alberca and La Preciosa are considered less oligotrophic than the two other lakes (Lugo et al., 1993; Vilaclara et al., 1993; Havas et al., 2023), with higher chlorophyll *a* contents and thus smaller  $|\varepsilon_{\text{POC-CO}_2}|$  (Fig. 5). Higher water temperatures in Alberca de los Espinos (by  $\sim 3\text{°C}$ ) could also partly contribute to a smaller  $|\varepsilon_{\text{POC-CO}_2}|$  in this lake (Sackett et al., 1965; Pardue et al., 1976; Descolas-Gros and Fontungne, 1990).



**Figure 5.** Isotopic fractionations between POC and DIC in the water columns of the four lakes, expressed as (a)  $\Delta^{13}\text{C}_{x-y}$  and (b)  $\epsilon_{\text{POC-CO}_2}$ . Refer to Table 2 for more detail about the  $\Delta$  and  $\epsilon$  notations.

Unlike  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ , organic carbon isotope signatures do not evolve linearly with the alkalinity/salinity gradient, suggesting other lake- and microbial-specific controls on these signatures. These controls include diffusive or active uptake mechanisms, specific carbon fixation pathways, the fraction of intracellular inorganic carbon released out of the cells, cell size and geometry (Werne and Hollander, 2004, and references therein), and remineralization efficiency. Moreover, an increasing number of isotopic data have evidenced a significant variability of the isotopic fractionation achieved by different purified RuBisCO enzymes ( $\epsilon_{\text{RuBisCO}}$ , Iñiguez et al., 2020) and even by a single RuBisCO form (Thomas et al., 2019). Thus, caution should be paid to the interpretation of the origin of small isotopic variations of the biomass in distinct environmental contexts because RuBisCO alone can be an important source of this variability (Thomas et al., 2019).

#### Primary production in the anoxic hypolimnion

Anoxygenic autotrophs commonly thrive in anoxic bottom waters of stratified water bodies (e.g., Pimenov et al., 2008; Zyakun et al., 2009; Posth et al., 2017; Fulton et al., 2018; Havig et al., 2018). They have been identified at different depths in the four Mexican lakes (Macek et al., 2020; Iniesto et al., 2022). In our samples collected during the stratification period, anoxygenic autotrophs appear to have a distinct impact on the C cycle of Alberca and Atexcac only. Lake Atexcac records a concomitant decrease in [DIC] and increase in  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  in the anoxic hypolimnion at 23 m, below the peak of Chl *a*, suggesting autotrophic C fixation by chemoautotrophy or anoxygenic photosynthesis. The calculated  $\epsilon_{\text{POC-CO}_2}$  at 23 m ( $-17.3\text{‰}$ ) is consistent with C isotope fractionation by purple- and green-sulfur-anoxygenic bacteria (PSB and GSB), while  $\epsilon_{\text{POC-CO}_2}$  in Alberca's hypolimnion ( $\sim -15\text{‰}$ ) is closer to GSB canonical signatures (Posth et al., 2017 and

references therein) (Fig. 5b). In Alberca, anoxygenic primary productivity is suggested by increasing POC concentrations below the oxycline, showing a distinct isotopic signature (Figs. 4 and 5). We also observe a Chl *a* peak in the anoxic hypolimnion of this lake (Fig. 2), which likely represents a bias of the probe towards some bacteriochlorophyll pigments typical of GSB (see Supplement text S4). In Atexcac, C fixation by anoxygenic autotrophs at 23 m causes a shift in the DIC reservoir, while oxygenic photosynthesis at 16 m does not, suggesting that anaerobic autotrophs are the main autotrophic metabolisms in this lake (in terms of DIC uptake). In Alberca, the increase in [POC] to maximum values below the oxycline also supports the predominance of anoxygenic versus oxygenic autotrophy (Fig. 3), similar to other stratified water bodies exhibiting primary production clearly dominated by anoxygenic metabolisms (Fulton et al., 2018).

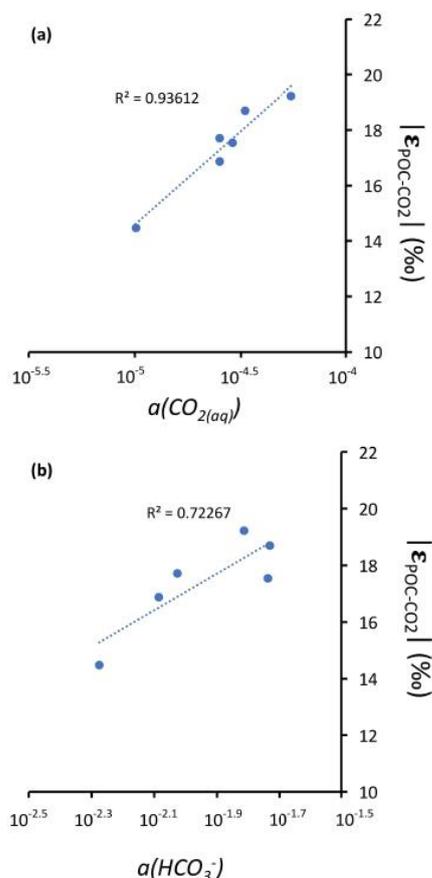
Lastly, at 23 m in Atexcac and 17 m in Alberca, we find a striking turbidity peak precisely where the redox potential and the concentration of dissolved Mn drops (Fig. 2). In Atexcac, the concentration of dissolved metals such as Cu, Pb, or Co also drops at 23 m (Fig. S4). In Alberca, a peak of particulate Mn concentration is detected at 15 m (Fig. 2; data unavailable for Atexcac). This peak is most likely explained by the precipitation of Mn mineral particles, where reduced bottom waters meet oxidative conditions prevailing in the upper waters. These oxidized Mn phases can be used as electron acceptors during chemoautotrophy (Havig et al., 2015; Knossow et al., 2015; Henkel et al., 2019; van Vliet et al., 2021). Even at a low particle density, such phases can catalyze abiotic oxidation of sulfide to sulfur compounds, which in turn can be used and further oxidized to sulfate by phototrophic or chemoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria (van Vliet et al., 2021). Autotrophic sulfur oxidation is also consistent with the small increase in  $[\text{SO}_4^{2-}]$  observed at 23 m in Atexcac (Table S4).

In summary, combined POC and DIC data allowed us to recognize the most representative autotrophic metabolisms in the Mexican lakes. The upper water columns are all dominated by oxygenic photosynthesis. Lower in the water columns, anoxygenic photosynthesis and/or chemoautotrophy were found to have a noticeable impact on POC and DIC reservoirs in Alberca and Atexcac only. Their activity was associated with metal element cycling. More specifically in Alberca, the anoxygenic phototrophs correspond to GSB.

#### 5.2.2 Sinks of particulate organic carbon: respiration and sedimentation

##### Aerobic respiration at the oxycline

At the oxycline of stratified water bodies, aerobic respiration of OM by heterotrophic organisms favors the transition from oxygenated upper layers to anoxic bottom waters. In the water column of the four lakes,  $\Delta^{13}\text{C}_{\text{POC-DIC}}$  (and



**Figure 6.** Cross plots of DIC species activities versus absolute values of calculated C isotopic fractionations between POC and CO<sub>2</sub> at depths of peak oxygenic photosynthesis where data were available (5 and 30 m for Alchichica, 16 m for Atexcac, 10 and 12.5 m for La Preciosa, and 7 m for Alberca). (a) Dissolved CO<sub>2(aq)</sub> activity and (b) bicarbonate activity as functions of |ε<sub>POC-CO<sub>2</sub></sub>| in permil plus linear correlation trends and corresponding R<sup>2</sup>.

ε<sub>POC-CO<sub>2</sub></sub>) show increasing values in the hypolimnion and especially below the chlorophyll *a* peaks (Figs. 2 and 5). The Δ<sup>13</sup>C<sub>POC-DIC</sub> trend correlates with increasing δ<sup>13</sup>C<sub>POC</sub>, decreasing (C:N)<sub>POM</sub> ratios, and decreasing POC concentrations except in Alberca (Figs. 3 and 4). Decreasing POC concentrations near the oxycline and redoxcline are consistent with the fact that part of the upper primary production is degraded deeper in the water columns and/or that there is less primary production in the anoxic bottom waters. Increased δ<sup>13</sup>C<sub>POC</sub> in the hypolimnion of the lakes is consistent with heterotrophic activity and points out that POC at these depths could mainly record secondary production rather than being a residue of sinking degraded OM formed by primary production. Heterotrophic bacteria preferentially grow on available <sup>13</sup>C-enriched amino acids and sugars, thus becoming more enriched than their C source (Williams and Gordon, 1970;

Hayes et al., 1989; Zohary et al., 1994; Briones et al., 1998; Lehmann et al., 2002; Jiao et al., 2010; Close and Henderson, 2020). The decrease in C:N ratios in the POM also reinforces this conclusion, since secondary heterotrophic bacteria biomass generally have C:N between 4 and 5 (Lehmann et al., 2002), whereas residual degraded OM from primary producers would carry higher C:N signatures (van Mooy et al., 2002; Buchan et al., 2014). These latter signatures are not recorded by POM in the lower water columns of the lakes (Fig. 3).

The δ<sup>13</sup>C<sub>DIC</sub> signatures in La Preciosa and Alchichica are consistent with the mineralization of OM, as they exhibit lower values below the oxycline than in surficial waters (Figs. 2 and 4). Similarly to what is observed in several other water bodies and notably stratified water columns such as the Black Sea (e.g., Fry et al., 1991), surface photosynthesis increases δ<sup>13</sup>C<sub>DIC</sub> by fixing light DIC, while respiration transfers light OC back to the DIC pool at depth. Such a decrease in δ<sup>13</sup>C<sub>DIC</sub> can also be seen in the oxycline of Lake Alberca between 7 and 10 m.

#### *Influence of methanogenesis in Lake Alberca de los Espinos*

Alberca shows the least saline and alkaline water column and most peculiar geochemical depth profiles among the four lakes. Notably, its [DIC] and δ<sup>13</sup>C<sub>DIC</sub> (the lowest of the studied lakes) increase from the lower metalimnion to the hypolimnion and further into the first cm of sediment porewaters, with δ<sup>13</sup>C<sub>DIC</sub> reaching almost 10‰ (Figs. 3, 4). The calculated CO<sub>2</sub> partial pressure (P<sub>CO<sub>2</sub></sub>) increases downward from slightly less than 1 × P<sub>CO<sub>2</sub>-atm</sub> near the lake surface up to almost 40× at the bottom of the lake (Table S2).

While the increase of [POC] at depth may contribute to the observed δ<sup>13</sup>C<sub>DIC</sub> increase, by mass balance, it should also lower the [DIC] instead of increasing it. Similarly, the sinking of POC at depth followed by its remineralization into DIC cannot explain the δ<sup>13</sup>C<sub>DIC</sub> trend, since it would lower the δ<sup>13</sup>C<sub>DIC</sub> in the hypolimnion (Fig. 4). Overall, these observations require that a significant source of inorganic <sup>13</sup>C-rich carbon fuels the bottom waters of Alberca de los Espinos. The source of heavy carbon most likely results from methanogenesis, which consumes organic carbon in the sediments and produces <sup>13</sup>C-depleted methane and <sup>13</sup>C-rich carbon dioxide diffusing upward in the water column (i.e., acetoclastic methanogenesis, dominant in lacustrine contexts; Whiticar et al., 1986). Methanogenesis, as an “alternative” OM remineralization pathway, would be favored in Alberca because it is relatively rich in OM (notably with high [DOC], Havas et al., 2023) and depleted in SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Wittkop et al., 2014; Birgel et al., 2015; Cadeau et al., 2020) compared to the other three Mexican lakes. Based on the δ<sup>13</sup>C<sub>SOC</sub> and porewater δ<sup>13</sup>C<sub>DIC</sub>, we can tentatively calculate the methane isotopic signature in Alberca (see Supplement Text S5). The resulting δ<sup>13</sup>C<sub>CH<sub>4</sub></sub> in the first 10 cm of sediments is between

−59‰ and −57‰, which is consistent with the range of isotopic composition of methane after biogenic methanogenesis (Whiticar et al., 1986).

Upward-diffusing methane may be either (i) partly lost from the lake's surface (i.e., escaping the system) by degassing or (ii) totally retained in the water column by complete oxidation (either abiotically by oxygenated surface waters or biologically by methanotrophic organisms). The oxidation of CH<sub>4</sub> in the water column should lead to the formation of <sup>13</sup>C-depleted carbon dioxide that would mix back with the lake DIC (and notably with heavy methanogenic CO<sub>2</sub> produced at depth) and/or <sup>13</sup>C-depleted biomass (as POC or SOC) if it occurs through methanotrophy. Thus, the net effect of combined methanogenesis and methane oxidation is expected to (i) generate a  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  gradient from high to low values between the sediment porewaters and the oxycline as proposed elsewhere (Assayag et al., 2008; Witkop et al., 2014) and (ii) progressively lower sedimentary  $\delta^{13}\text{C}_{\text{SOC}}$  in the case of methanotrophy. Abiotic oxidation of methane by dioxygen is consistent with the observation that  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  decreases from porewaters ( $\sim +10\%$ ) to the oxycline ( $-4\%$ ), reaching minimum values where dissolved O<sub>2</sub> starts to appear (Fig. 2). Microbial anaerobic oxidation of methane (AOM) could occur at the 17 m depth through Mn-oxide reduction (Cai et al., 2021; Cheng et al., 2021) and possibly bacterial sulfate reduction closer to the water-sediment interface, as inferred for the surficial sediments of meromictic Lake Cadagno (Posth et al., 2017). Indeed, we observe a net increase of particulate Fe and S concentrations at a depth of 25 m and a peak of solid sulfide minerals in the surficial sediments (Fig. S5). However,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{SOC}}$  and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$  are far from calculated  $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$ , suggesting that AOM is not a major process in the bottom lake waters and surface sediments (Lehmann et al., 2004) and thus that methanotrophy is not the main CH<sub>4</sub> oxidation pathway in Lake Alberca.

Alternatively, if some portion of the methane escaped oxidation and degassed out of the lake,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  would likely be driven to extreme positive values with time (Gu et al., 2004; Hassan, 2014; Birgel et al., 2015; Cadeau et al., 2020). Methane escape is not consistent with the average  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  in Alberca ( $\sim -3\%$ ; Fig. 4), unless an additional counterbalancing source of DIC to this lake exists. This source of DIC could be volcanic CO<sub>2</sub> degassing (see Sect. 5.1.1). Such a contribution may maintain the lake's average  $\delta^{13}\text{C}_{\text{total}}$  close to a mantle isotopic signature and notably away from extreme positive values if CH<sub>4</sub> escape dominated. It is also possible that volcanic CO<sub>2</sub> degassing is coupled with methanogenesis by CO<sub>2</sub> reduction in addition to the acetoclastic type described above.

Although volcanic CO<sub>2</sub> could be an important source in the C mass balance of Lake Alberca, we note that it cannot explain the very positive  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  in the sediment porewaters alone, thus bolstering the identification of methanogenesis. Importantly, this methane cycle is cryptic to the sediment record, as it is evidenced in the dissolved inorganic C phase

but not in the sedimentary organic matter or carbonates. This is a consequence of the lake's stratified nature, where the location of carbonate precipitation and methane production is decoupled.

#### *Transfer of OM from the water column to the surficial sediments*

The OC content in the first 12 cm of the sediment cores from the four lakes ranges from 1 wt% to 13 wt% (Table S3). These concentrations are relatively elevated considering the predominantly autochthonous nature of OC and the oligotrophic conditions in these lakes (Alcocer et al., 2014; Havas et al., 2023). In Lake Alchichica, the recent OC burial flux in the sediment was estimated to represent between 15 and 26 g yr<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> (Alcocer et al., 2014). These values are within the range observed for small lakes around the world (Mulholland and Elwood, 1982; Dean and Gorham, 1998; Mendonça et al., 2017), though most of them receive allochthonous OM inputs. Different factors can favor the preservation of OM, including lower respiration and oxidation rates due to anoxic bottom waters and scarce benthic biota and/or high sedimentation rates (Alcocer et al., 2014). Anaerobic respiration clearly occurs in the four lakes to some extent, as detailed for Alberca and as seen in the surficial sediment data of the other lakes as well (decreasing  $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$  in Alchichica, increasing C:N ratio in Atexcac and La Preciosa; Table S3). Nonetheless, the anoxic conditions prevailing in the hypolimnion most of the year are significantly more favorable to OM preservation than oxic conditions (Sobek et al., 2009; Kuntz et al., 2015). While the yearly mixing oxidizes most of the water column during the winter, it also generates a bloom of diatoms which fosters OM production (through shuttling up of bio-essential nutrients such as N and Si) and development of anoxia (e.g., Adame et al., 2008). In Alchichica, the large size of some of the phytoplankton was also suggested to favor OM preservation (Adame et al., 2008; Ardiles et al., 2011). Because bacterial sulfate reduction (BSR) is a major remineralization pathway in SO<sub>4</sub>-rich environments (e.g., Jørgensen, 1982), the low sulfate content in Alberca probably favors the preservation of high TOC in the sediments, even though appreciable BSR rates may occur in this lake (see discussion above and Fig. S5), similarly to other sulfate-poor environments due to rapid S cycling (e.g., Vuillemin et al., 2016; Friese et al., 2021). Again, a complete mass balance of these lakes' C fluxes will be required to estimate their net C emission or sequestration behavior.

Although the nature and geochemical signatures of the OM that deposits in the sediments may vary throughout the year, it is interesting to infer from what part(s) of the water column surficial sedimentary OM comes during the stratified seasons. In the three lakes from the SOB,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{SOC}}$  and (C:N)<sub>SOM</sub> signatures of the surficial sedimentary OM lie somewhere between POM signatures from the upper wa-

ter column and from the hypolimnion (Figs. 3, 4). More precisely, in Alchichica, the most surficial  $\delta^{13}\text{C}_{\text{SOC}}$  and  $(\text{C}:\text{N})_{\text{SOM}}$  signatures ( $-25.7\text{‰}$  and  $10.4\text{‰}$ , respectively) are much closer to values recorded in the upper water column ( $\sim -26.5\text{‰}$  and  $10.5\text{‰}$ , respectively), implying that the upper oxygenic photosynthesis production is primarily recorded. It is consistent with previous studies, suggesting that most of the phytoplankton biomass being exported is composed of diatoms (Ardiles et al., 2011). In Lake Atexcac, however,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{SOC}}$  and  $(\text{C}:\text{N})_{\text{SOM}}$  signatures ( $\sim -26.8\text{‰}$  and  $8$ , respectively) are closer to values recorded in the hypolimnion ( $\sim -26.5\text{‰}$  and  $6.5\text{‰}$ , respectively), suggesting that SOM (sedimentary organic matter) records mostly the anaerobic primary production.

In Alberca, surficial  $\delta^{13}\text{C}_{\text{SOC}}$  is markedly more negative (by  $\sim 2\text{‰}$  to  $3\text{‰}$ ) than the deepest and shallowest water column values (Fig. 4) but close to what is recorded at the redoxcline depth of 17 m. However, the  $(\text{C}:\text{N})_{\text{SOM}}$  values are much higher than what is measured anywhere in the water column, which is consistent with OM remineralization by sulfate-reduction and methanogenesis in the sediments of this lake. Therefore, OM biogeochemical signatures in the surficial sediments of Alberca could be strongly influenced by early diagenesis occurring at the water-sediment interface – despite favorable conditions for OM preservation.

In summary, the OM depositing at the bottom of these stratified lakes does not always record geochemical signatures from the same layers of the water columns and can be modified by very early diagenesis. It does not necessarily record the signatures of primary production by oxygenic photosynthesis from the upper column. For example, in Lake Atexcac, sedimentary OM records primary production by anoxygenic photosynthesis, even though POC concentration is highest in the upper water column. This result highlights the diversity of geochemical signatures that can stem from continental environments despite their geographical, geological, and climatic proximity. A deeper understanding of the OM transfer process from water column to sediment will require more detailed analyses and comparison of the different OM pigments and molecules and could have strong implications for the interpretation of the fossil record in deep anoxic time.

## 6 Conclusions and summary

The carbon cycles of four stratified alkaline crater lakes were described and compared based on the concentration and isotopic compositions of DIC and POC in the water columns and surficial ( $\sim 10\text{ cm}$ ) sedimentary carbonates and organic carbon. Overall our study shows the wide diversity of geochemical signatures found in continental stratified environments despite similar geological and climatic contexts. We identify different regimes of C cycling in the four lakes due to different biogeochemical reactions related to slight envi-

ronmental and ecological variations. In more detail, we show the following.

- External abiotic factors, such as the hydrological regime and the inorganic C sources in the lakes, control their alkalinity and, thus, the buffering capacity of their waters. In turn, these differences in buffering capacity constrain variations in pH along the stratified water columns, as well as the inorganic C isotope signatures recorded in the water columns and sediments of the lakes. The  $\delta^{13}\text{C}_{\text{carb}}$  reflects the abiotic factors generating the alkalinity gradient, but it is poorly representative of biological processes in lakes with high alkalinity. The external environmental factors further impact the C mass balance of the lakes with probable consequences on their net C-emitting or C-sequestering status.
- Based on POC and DIC concentrations and isotopic compositions, combined with physicochemical parameters, we are able to identify the activity of oxygenic photosynthesis and aerobic respiration in the four lakes studied. Anoxygenic photosynthesis and/or chemototrophy are also evidenced in two of the lakes, but their POC and DIC signatures can be equivocal.
- Methanogenesis is evidenced in the surficial sediments of the OM-rich Lake Alberca de los Espinos and influences the geochemical signatures lower in the water column. However, it is recorded only in analyses of pore-water dissolved species but not imprinted in the sedimentary archives (OM and carbonates).
- The SOM geochemical signatures of these stratified lakes do not all record the same “biogeochemical layers” of the water column (e.g., anaerobic vs. aerobic metabolisms) and, in some cases, can be greatly modified by early diagenesis.

*Data availability.* The data are publicly accessible at <https://doi.org/10.26022/IEDA/112943> (Havas et al., 2023b).

*Supplement.* The supplement related to this article is available online at: <https://doi.org/10.5194/bg-20-2347-2023-supplement>.

*Author contributions.* RH and CT designed the study in a project directed by PLG, KB, and CT. CT, MI, DJ, DM, RT, PLG, and KB collected the samples in the field. RH carried out the measurements for the C data, DJ carried out the physicochemical parameter probe measurements, and EM provided data for trace and major elements. RH and CT analyzed the data. RH wrote the paper with important contributions from all co-authors.

*Competing interests.* The contact author has declared that none of the authors has any competing interests.

*Disclaimer.* Publisher's note: Copernicus Publications remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

*Acknowledgements.* The authors thank Anne-Lise Santoni, Elodie Cognard, Théophile Cocquerez, and the GISMO platform (Biogéosciences, Université Bourgogne Franche-Comté, UMR CNRS 6282, France). We thank Céline Liorzou and Bleuenn Guéguen for the analyses at the Pôle Spectrométrie Océan (Laboratoire Géo-Océan, Brest, France) and Laure Cordier for ion chromatography analyses at IPGP (France). We thank Nelly Assayag and Pierre Cadeau for their help on the AP 2003 at IPGP. We warmly thank Carmela Chateau-Smith for improving the syntax and clarity of the manuscript.

*Financial support.* This research has been supported by the Agence Nationale de la Recherche (grant no. ANR-18-CE02-0013-02).

*Review statement.* This paper was edited by Tina Treude and reviewed by two anonymous referees.

## References

- Adame, M. F., Alcocer, J., and Escobar, E.: Size-fractionated phytoplankton biomass and its implications for the dynamics of an oligotrophic tropical lake, *Freshw. Biol.*, 53, 22–31, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01864.x>, 2008.
- Ader, M., Macouin, M., Trindade, R. I. F., Hadrien, M.-H., Yang, Z., Sun, Z., and Besse, J.: A multilayered water column in the Ediacaran Yangtze platform? Insights from carbonate and organic matter paired  $\delta^{13}\text{C}$ , *Earth Planet. Sc. Lett.*, 288, 213–22, <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2009.09.024>, 2009.
- Aharon, P.: Redox stratification and anoxia of the early Precambrian oceans: Implications for carbon isotope excursions and oxidation events, *Precambrian Res.*, 173, 207–222, <https://doi.org/10.1016/j.precamres.2005.03.008>, 2005.
- Alcocer, J.: Lake Alchichica Limnology, Springer Nature, <https://doi.org/10.1007/978-3-030-79096-7>, 2021.
- Alcocer, J., Ruiz-Fernández, A. C., Escobar, E., Pérez-Bernal, L. H., Oseguera, L. A., and Ardiles-Gloria, V.: Deposition, burial and sequestration of carbon in an oligotrophic, tropical lake, *J. Limnol.*, 73, 223–235, <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2014.783>, 2014.
- Anderson, N. J. and Stedmon, C. A.: The effect of evapoconcentration on dissolved organic carbon concentration and quality in lakes of SW Greenland, *Freshw. Biol.*, 52, 280–289, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2006.01688.x>, 2007.
- Ardiles, V., Alcocer, J., Vilaclara, G., Oseguera, L. A., and Velasco, L.: Diatom fluxes in a tropical, oligotrophic lake dominated by large-sized phytoplankton, *Hydrobiologia*, 679, 77–90, <https://doi.org/10.1007/s10750-011-0853-7>, 2012.
- Armienta, M. A., Vilaclara, G., De la Cruz-Reyna, S., Ramos, S., Cenicerros, N., Cruz, O., Aguayo, A., and Arcega-Cabrera, F.: Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes, *J. Volcanol. Geotherm. Res.*, 178, 249–258, <https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2008.06.019>, 2008.
- Armstrong-Altrin, J. S., Madhavaraju, J., Sial, A. N., Kasper-Zubillaga, J. J., Nagarajan, R., Flores-Castro, K., and Rodríguez, J. L.: Petrography and stable isotope geochemistry of the cretaceous El Abra Limestones (Actopan), Mexico: Implication on diagenesis, *J. Geol. Soc. India*, 77, 349–359, <https://doi.org/10.1007/s12594-011-0042-3>, 2011.
- Assayag, N., Rivé, K., Ader, M., Jézéquel, D., and Agrinier, P.: Improved method for isotopic and quantitative analysis of dissolved inorganic carbon in natural water samples, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20, 2243–2251, <https://doi.org/10.1002/rcm.2585>, 2006.
- Assayag, N., Jézéquel, D., Ader, M., Viollier, E., Michard, G., Prévot, F., and Agrinier, P.: Hydrological budget, carbon sources and biogeochemical processes in Lac Pavin (France): Constraints from  $\delta^{18}\text{O}$  of water and  $\delta^{13}\text{C}$  of dissolved inorganic carbon, *Appl. Geochem.*, 23, 2800–2816, <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2008.04.015>, 2008.
- Bade, D. L., Carpenter, S. R., Cole, J. J., Hanson, P. C., and Hesslein, R. H.: Controls of  $\delta^{13}\text{C}$ -DIC in lakes: Geochemistry, lake metabolism, and morphometry, *Limnol. Oceanogr.*, 49, 1160–1172, <https://doi.org/10.4319/lo.2004.49.4.1160>, 2004.
- Bekker, A., Holmden, C., Beukes, N. J., Kenig, F., Eglinton, B., and Patterson, W. P.: Fractionation between inorganic and organic carbon during the Lomagundi (2.22–2.1 Ga) carbon isotope excursion, *Earth Planet. Sc. Lett.*, 271, 278–291, <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2008.04.021>, 2008.
- Birgel, D., Meister, P., Lundberg, R., Horath, T. D., Bontognali, T. R. R., Bahniuk, A. M., de Rezende, C. E., Vasconcelos, C., and McKenzie, J. A.: Methanogenesis produces strong  $^{13}\text{C}$  enrichment in stromatolites of Lagoa Salgada, Brazil: a modern analogue for Palaeo/Neoproterozoic stromatolites?, *Geobiology*, 13, 245–266, <https://doi.org/10.1111/gbi.12130>, 2015.
- Briones, E. E., Alcocer, J., Cienfuegos, E., and Morales, P.: Carbon stable isotopes ratios of pelagic and littoral communities in Alchichica crater-lake, Mexico, *Int. J. Salt Lake Res.*, 7, 345–355, <https://doi.org/10.1007/BF02442143>, 1998.
- Buchan, A., LeClerc, G. R., Gulvik, C. A., and González, J. M.: Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms, *Nat. Rev. Microbiol.*, 12, 686–698, <https://doi.org/10.1038/nrmicro3326>, 2014.
- Cadeau, P., Jézéquel, D., Leboulanger, C., Fouilland, E., Le Floc'h, E., Chaduteau, C., Milesi, V., Guélard, J., Sarazin, G., Katz, A., d'Amore, S., Bernard, C., and Ader, M.: Carbon isotope evidence for large methane emissions to the Proterozoic atmosphere, *Sci. Rep.*, 10, 18186, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75100-x>, 2020.
- Cai, C., Li, K., Liu, D., John, C. M., Wang, D., Fu, B., Fakhræe, M., He, H., Feng, L., and Jiang, L.: Anaerobic oxidation of methane by Mn oxides in sulfate-poor environments, *Geology*, 49, 761–766, <https://doi.org/10.1130/G48553.1>, 2021.
- Carrasco-Núñez, G., Ort, M. H., and Romero, C.: Evolution and hydrological conditions of a maar volcano (Atexcac crater, Eastern Mexico), *J. Volcanol. Geotherm. Res.*, 159, 179–197, <https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2006.07.001>, 2007.
- Chako Tchamabé, B., Carrasco-Núñez, G., Miggins, D. P., and Németh, K.: Late Pleistocene to Holocene activity of Alchichica maar volcano, eastern Trans-Mexican

- Volcanic Belt, *J. South Am. Earth Sci.*, 97, 102404, <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2019.102404>, 2020.
- Cheng, C., Zhang, J., He, Q., Wu, H., Chen, Y., Xie, H., and Pavlostathis, S. G.: Exploring simultaneous nitrous oxide and methane sink in wetland sediments under anoxic conditions, *Water Res.*, 194, 116958, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116958>, 2021.
- Close, H. G. and Henderson, L. C.: Open-Ocean Minima in  $\delta^{13}\text{C}$  Values of Particulate Organic Carbon in the Lower Euphotic Zone, *Front. Mar. Sci.*, 7, 540165, <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.540165>, 2020.
- Crowe, S. A., Katsev, S., Leslie, K., Sturm, A., Magen, C., Nomosatryo, S., Pack, M. A., Kessler, J. D., Reeburgh, W. S., Roberts, J. A., González, L., Douglas Haffner, G., Mucci, A., Sundby, B., and Fowle, D. A.: The methane cycle in ferruginous Lake Matano: Methane cycle in ferruginous Lake Matano, *Geobiology*, 9, 61–78, <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2010.00257.x>, 2011.
- Dean, W. E. and Gorham, E.: Magnitude and significance of carbon burial in lakes, reservoirs, and peatlands, *Geology*, 26, 535–538, [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(1998\)026<0535:MASOCB>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(1998)026<0535:MASOCB>2.3.CO;2), 1998.
- Descolas-Gros, C. and Fontugne, M.: Stable carbon isotope fractionation by marine phytoplankton during photosynthesis, *Plant Cell Environ.*, 13, 207–218, <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1990.tb01305.x>, 1990.
- Duarte, C. M., Prairie, Y. T., Montes, C., Cole, J. J., Striegl, R., Melack, J., and Downing, J. A.:  $\text{CO}_2$  emissions from saline lakes: A global estimate of a surprisingly large flux, *J. Geophys. Res.-Bioge.*, 113, G4, <https://doi.org/10.1029/2007JG000637>, 2008.
- Emrich, K., Ehhalt, D. H., and Vogel, J. C.: Carbon isotope fractionation during the precipitation of calcium carbonate, *Earth Planet. Sc. Lett.*, 8, 363–371, [https://doi.org/10.1016/0012-821X\(70\)90109-3](https://doi.org/10.1016/0012-821X(70)90109-3), 1970.
- Ferrari, L., Orozco-Esquivel, T., Manea, V., and Manea, M.: The dynamic history of the Trans-Mexican Volcanic Belt and the Mexico subduction zone, *Tectonophysics*, 522/523, 122–149, <https://doi.org/10.1016/j.tecto.2011.09.018>, 2012.
- Fogel, M. L. and Cifuentes, L. A.: Isotope Fractionation during Primary Production, in: *Organic Geochemistry, Topics in Geobiology*, edited by: Engel, M. H. and Macko, S. A., Springer US, Boston, MA, 73–98, [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2890-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2890-6_3), 1993.
- Friese, A., Bauer, K., Glombitza, C., Ordoñez, L., Ariztegui, D., Heuer, V.B., Vuillemin, A., Henny, C., Nomosatryo, S., Simister, R., Wagner, D., Bijaksana, S., Vogel, H., Melles, M., Russell, J. M., Crowe, S. A., and Kallmeyer, J.: Organic matter mineralization in modern and ancient ferruginous sediments, *Nat. Commun.*, 12, 2216, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22453-0>, 2021.
- Fry, B.:  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  fractionation by marine diatoms, *Mar. Eco. Prog. Ser.*, 134, 283–294, <https://doi.org/10.3354/meps134283>, 1996.
- Fry, B., Jannasch, H. W., Molyneux, S. J., Wirsén, C. O., Muramoto, J. A., and King, S.: Stable isotope studies of the carbon, nitrogen and sulfur cycles in the Black Sea and the Cariaco Trench, *Deep-Sea Res.*, 38, S1003–S1019, [https://doi.org/10.1016/S0198-0149\(10\)80021-4](https://doi.org/10.1016/S0198-0149(10)80021-4), 1991.
- Fulton, J. M., Arthur, M. A., Thomas, B., and Freeman, K. H.: Pigment carbon and nitrogen isotopic signatures in euxinic basins, *Geobiology*, 16, 429–445, <https://doi.org/10.1111/gbi.12285>, 2018.
- Furian, S., Martins, E. R. C., Parizotto, T. M., Rezende-Filho, A. T., Victoria, R. L., and Barbiero, L.: Chemical diversity and spatial variability in myriad lakes in Nhecolândia in the Pantanal wetlands of Brazil, *Limnol. Oceanogr.*, 58, 2249–2261, <https://doi.org/10.4319/lo.2013.58.6.2249>, 2013.
- Gérard, E., Ménez, B., Couradeau, E., Moreira, D., Benzerara, K., Tavera, R., and López-García, P.: Specific carbonate–microbe interactions in the modern microbialites of Lake Alchichica (Mexico), *ISME J.*, 7, 1997–2009, <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.81>, 2013.
- Gonzales-Partida, E., Barragan-R, R. M., and Nieva-G, D.: Analisis geoquimico-isotopico de las especies carbonicas del fluido geotermico de Los Humeros, Puebla, México, *Geofis. Int.*, 32, 299–309, <https://doi.org/10.22201/igeof.00167169p.1993.32.2.563>, 1993.
- Gröger, J., Franke, J., Hamer, K., and Schulz, H. D.: Quantitative Recovery of Elemental Sulfur and Improved Selectivity in a Chromium-Reducible Sulfur Distillation, *Geostand. Geoanal. Res.*, 33, 17–27, <https://doi.org/10.1111/j.1751-908X.2009.00922.x>, 2009.
- Gu, B., Schelske, C. L., and Hodell, D. A.: Extreme  $^{13}\text{C}$  enrichments in a shallow hypereutrophic lake: Implications for carbon cycling, *Limnol. Oceanogr.*, 49, 1152–1159, <https://doi.org/10.4319/lo.2004.49.4.1152>, 2004.
- Hassan, K. M.: Isotope geochemistry of Swan Lake Basin in the Nebraska Sandhills, USA: Large  $^{13}\text{C}$  enrichment in sediment-calcite records, *Geochemistry*, 74, 681–690, <https://doi.org/10.1016/j.chemer.2014.03.004>, 2014.
- Havig, J. R., Hamilton, T. L., McCormick, M., McClure, B., Sowers, T., Wegter, B., and Kump, L. R.: Water column and sediment stable carbon isotope biogeochemistry of permanently redox-stratified Fayetteville Green Lake, New York, USA, *Limnol. Oceanogr.*, 63, 570–587, <https://doi.org/10.1002/lno.10649>, 2018.
- Havig, J. R., McCormick, M. L., Hamilton, T. L., and Kump, L. R.: The behavior of biologically important trace elements across the oxic/euxinic transition of meromictic Fayetteville Green Lake, New York, USA, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 165, 389–406, <https://doi.org/10.1016/j.gca.2015.06.024>, 2015.
- Havas, R., Thomazo, C., Iniesto, M., Jézéquel, D., Moreira, D., Tavera, R., Caumartin, J., Muller, E., López-García, P., and Benzerara, K.: The hidden role of dissolved organic carbon in the biogeochemical cycle of carbon in modern redox-stratified lakes, *Biogeosciences*, in press, 10.5194/egusphere-2023-23, 2023a.
- Havas, R., Thomazo, C., Iniesto, M., Jezequel, D., Moreira, D., Tavera, R., Caumartin, J., Muller, E., Lopez Garcia, P., and Benzerara, K.: Carbon isotopes and alkalinity gradient for biogeochemical processes in modern stratified lakes v. 2, Version 1.0., Interdisciplinary Earth Data Alliance (IEDA) [data set], <https://doi.org/10.26022/IEDA/112943>, 2023b.
- Hayes, J. M., Popp, B. N., Takigiku, R., and Johnson, M. W.: An isotopic study of biogeochemical relationships between carbonates and organic carbon in the Greenhorn Formation, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 53, 2961–2972, [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(89\)90172-5](https://doi.org/10.1016/0016-7037(89)90172-5), 1989.

- Hayes, J. M., Strauss, H., and Kaufman, A. J.: The abundance of  $^{13}\text{C}$  in marine organic matter and isotopic fractionation in the global biogeochemical cycle of carbon during the past 800 Ma, *Chem. Geol.*, 161, 103–125, [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(99\)00083-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(99)00083-2), 1999.
- Henkel, J. V., Dellwig, O., Pollehne, F., Herlemann, D. P. R., Leipe, T., and Schulz-Vogt, H. N.: A bacterial isolate from the Black Sea oxidizes sulfide with manganese(IV) oxide, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 116, 12153–12155, <https://doi.org/10.1073/pnas.1906000116>, 2019.
- Hurley, S. J., Wing, B. A., Jasper, C. E., Hill, N. C., and Cameron, J. C.: Carbon isotope evidence for the global physiology of Proterozoic cyanobacteria, *Sci. Adv.*, 7, eabc8998, <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc8998>, 2021.
- Iniesto, M., Moreira, D., Benzerara, K., Muller, E., Bertolino, P., Tavera, R., and López-García, P.: Rapid formation of mature microbialites in Lake Alchichica, Mexico, *Environ. Microbiol. Rep.*, 13, 600–605, <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12957>, 2021a.
- Iniesto, M., Moreira, D., Reboul, G., Deschamps, P., Benzerara, K., Bertolino, P., Saghāi, A., Tavera, R., and López-García, P.: Core microbial communities of lacustrine microbialites sampled along an alkalinity gradient, *Environ. Microbiol.*, 23, 51–68, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15252>, 2021b.
- Iniesto, M., Moreira, D., Benzerara, K., Reboul, G., Bertolino, P., Tavera, R., and López-García, P.: Planktonic microbial communities from microbialite-bearing lakes sampled along a salinity-alkalinity gradient, *Limnol. Oceanogr. Ino.*, 67, 12233, <https://doi.org/10.1002/lno.12233>, 2022.
- Iñiguez, C., Capó-Bauçà, S., Niinemets, Ü., Stoll, H., Aguiló-Nicolau, P., and Galmés, J.: Evolutionary trends in RuBisCO kinetics and their co-evolution with  $\text{CO}_2$  concentrating mechanisms, *Plant J.*, 101, 897–918, <https://doi.org/10.1111/tbj.14643>, 2020.
- Javoy, M., Pineau, F., and Delorme, H.: Carbon and nitrogen isotopes in the mantle, *Chem. Geol.*, 57, 41–62, [https://doi.org/10.1016/0009-2541\(86\)90093-8](https://doi.org/10.1016/0009-2541(86)90093-8), 1986.
- Jézéquel, D., Michard, G., Viollier, E., Agrinier, P., Albéric, P., Lopes, F., Abril, G., and Bergonzini, L.: Carbon Cycle in a Meromictic Crater Lake: Lake Pavin, France, in: *Lake Pavin: History, Geology, Biogeochemistry, and Sedimentology of a Deep Meromictic Maar Lake*, edited by: Sime- Ngando, T., Boivin, P., Chapron, E., Jezequel, D., and Meybeck, M., Springer International Publishing, Cham, 185–203, [https://doi.org/10.1007/978-3-319-39961-4\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-39961-4_11), 2016.
- Jiao, N., Herndl, G. J., Hansell, D. A., Benner, R., Kattner, G., Wilhelm, S. W., Kirchman, D. L., Weinbauer, M. G., Luo, T., Chen, F., and Azam, F.: Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean, *Nat. Rev. Microbiol.*, 8, 593–599, <https://doi.org/10.1038/nrmicro2386>, 2010.
- Jørgensen, B. B.: Mineralization of organic matter in the sea bed—the role of sulphate reduction, *Nature*, 296, 643–645, <https://doi.org/10.1038/296643a0>, 1982.
- Karhu, J. A. and Holland, H. D.: Carbon isotopes and the rise of atmospheric oxygen, *Geology*, 24, 867, [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(1996\)024<0867:CIATRO>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(1996)024<0867:CIATRO>2.3.CO;2), 1996.
- Klawonn, I., Van den Wyngaert, S., Parada, A. E., Arandia-Gorostidi, N., Whitehouse, M. J., Grossart, H.-P., and Dekas, A. E.: Characterizing the “fungal shunt”: Parasitic fungi on diatoms affect carbon flow and bacterial communities in aquatic microbial food webs, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 118, e2102225118, <https://doi.org/10.1073/pnas.2102225118>, 2021.
- Knossow, N., Blonder, B., Eckert, W., Turchyn, A. V., Antler, G., and Kamysny, A.: Annual sulfur cycle in a warm monomictic lake with sub-millimolar sulfate concentrations, *Geochem. Trans.*, 16, 7, <https://doi.org/10.1186/s12932-015-0021-5>, 2015.
- Krissansen-Totton, J., Buick, R., and Catling, D. C.: A statistical analysis of the carbon isotope record from the Archean to Phanerozoic and implications for the rise of oxygen, *Am. J. Sci.*, 315, 275–316, <https://doi.org/10.2475/04.2015.01>, 2015.
- Kuntz, L. B., Laakso, T. A., Schrag, D. P., and Crowe, S. A.: Modeling the carbon cycle in Lake Matano, *Geobiology*, 13, 454–461, <https://doi.org/10.1111/gbi.12141>, 2015.
- Lehmann, M. F., Bernasconi, S. M., Barbieri, A., and McKenzie, J. A.: Preservation of organic matter and alteration of its carbon and nitrogen isotope composition during simulated and in situ early sedimentary diagenesis, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 66, 3573–3584, [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(02\)00968-7](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(02)00968-7), 2002.
- Lehmann, M. F., Bernasconi, S. M., McKenzie, J. A., Barbieri, A., Simona, M., and Veronesi, M.: Seasonal variation of the  $\delta\text{C}$  and  $\delta\text{N}$  of particulate and dissolved carbon and nitrogen in Lake Lugano: Constraints on biogeochemical cycling in a eutrophic lake, *Limnol. Oceanogr.*, 49, 415–429, <https://doi.org/10.4319/lno.2004.49.2.0415>, 2004.
- Lelli, M., Kretzschmar, T. G., Cabassi, J., Doveri, M., Sanchez-Avila, J. I., Gherardi, F., Magro, G., and Norelli, F.: Fluid geochemistry of the Los Humeros geothermal field (LHGF – Puebla, Mexico): New constraints for the conceptual model, *Geothermics*, 90, 101983, <https://doi.org/10.1016/j.geothermics.2020.101983>, 2021.
- Li, H.-C. and Ku, T.-L.:  $\delta^{13}\text{C}$ – $\delta^{18}\text{C}$  covariance as a paleohydrological indicator for closed-basin lakes, *Palaeogeogr. Palaeoclimatol.*, 133, 69–80, [https://doi.org/10.1016/S0031-0182\(96\)00153-8](https://doi.org/10.1016/S0031-0182(96)00153-8), 1997.
- Logan, G. A., Hayes, J. M., Hieshima, G. B., and Summons, R. E.: Terminal Proterozoic reorganization of biogeochemical cycles, *Nature*, 376, 53–56, <https://doi.org/10.1038/376053a0>, 1995.
- Lorenz, V.: On the growth of maars and diatremes and its relevance to the formation of tuff rings, *Bull. Volcanol.*, 48, 265–274, <https://doi.org/10.1007/BF01081755>, 1986.
- Lugo, A., Alcocer, J., Sanchez, M. R., and Escobar, E.: Trophic status of tropical lakes indicated by littoral protozoan assemblages, *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, 25, 4441–4443, <https://doi.org/10.1080/03680770.1992.11900159>, 1993.
- Lugo, A., Alcocer, J., Sánchez, M. del R., Escobar, E., and Macek, M.: Temporal and spatial variation of bacterioplankton abundance in a tropical, warm-monomictic, saline lake: Alchichica, Puebla, Mexico, *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, 27, 2968–2971, <https://doi.org/10.1080/03680770.1998.11898217>, 2000.
- Lyons, T. W., Reinhard, C. T., and Planavsky, N. J.: The rise of oxygen in Earth’s early ocean and atmosphere, *Nature*, 506, 307–315, <https://doi.org/10.1038/nature13068>, 2014.
- Macek, M., Medina, X. S., Picazo, A., Peštová, D., Reyes, F. B., Hernández, J. R. M., Alcocer, J., Ibarra, M. M.,

- and Camacho, A.: Spirostomum teres: A Long Term Study of an Anoxic-Hypolimnion Population Feeding upon Photosynthesizing Microorganisms, *Acta Protozool.*, 59, 13–38, <https://doi.org/10.4467/16890027AP.20.002.12158>, 2020.
- Mason, E., Edmonds, M., and Turchyn, A. V.: Remobilization of crustal carbon may dominate volcanic arc emissions, *Science*, 357, 290–294, <https://doi.org/10.1126/science.aan5049>, 2017.
- Mendonça, R., Müller, R. A., Clow, D., Verpoorter, C., Raymond, P., Tranvik, L. J., and Sobek, S.: Organic carbon burial in global lakes and reservoirs, *Nat. Commun.*, 8, 1694, <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01789-6>, 2017.
- Mercedes-Martín, R., Ayora, C., Tritlla, J., and Sánchez-Román, M.: The hydrochemical evolution of alkaline volcanic lakes: a model to understand the South Atlantic Pre-salt mineral assemblages, *Earth-Sci. Rev.*, 198, 102938, <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2019.102938>, 2019.
- Milesi, V. P., Debure, M., Marty, N. C. M., Capano, M., Jézéquel, D., Steefel, C., Rouchon, V., Albéric, P., Bard, E., Sarazin, G., Guyot, F., Virgone, A., Gaucher, É. C., and Ader, M.: Early Diagenesis of Lacustrine Carbonates in Volcanic Settings: The Role of Magmatic CO<sub>2</sub> (Lake Dziani Dzaha, Mayotte, Indian Ocean), *ACS Earth Space Chem.*, 4, 363–378, <https://doi.org/10.1021/acsearthspacechem.9b00279>, 2020.
- Mook, W. G., Bommerson, J. C., and Staverman, W. H.: Carbon isotope fractionation between dissolved bicarbonate and gaseous carbon dioxide, *Earth Planet. Sc. Lett.*, 22, 169–176, [https://doi.org/10.1016/0012-821X\(74\)90078-8](https://doi.org/10.1016/0012-821X(74)90078-8), 1974.
- Mulholland, P. J. and Elwood, J. W.: The role of lake and reservoir sediments as sinks in the perturbed global carbon cycle, *Tellus A*, 34, 490–499, <https://doi.org/10.1111/j.2153-3490.1982.tb01837.x>, 1982.
- O’Leary, M. H.: Carbon Isotopes in Photosynthesis, *BioScience*, 38, 328–336, <https://doi.org/10.2307/1310735>, 1988.
- Pardue, J. W., Scalan, R. S., Van Baalen, C., and Parker, P. L.: Maximum carbon isotope fractionation in photosynthesis by blue-green algae and a green alga, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 40, 309–312, [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(76\)90208-8](https://doi.org/10.1016/0016-7037(76)90208-8), 1976.
- Peiffer, L., Carrasco-Núñez, G., Mazot, A., Villanueva-Estrada, R. E., Inguaggiato, C., Bernard Romero, R., Rocha Miller, R., and Rojas, J. H.: Soil degassing at the Los Humeros geothermal field (Mexico), *J. Volcanol. Geotherm. Res.*, 356, 163–174, <https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2018.03.001>, 2018.
- Petrash, D. A., Steenbergen, I. M., Valero, A., Meador, T. B., Paëes, T., and Thomazo, C.: Aqueous system-level processes and prokaryote assemblages in the ferruginous and sulfate-rich bottom waters of a post-mining lake, *Biogeosciences*, 19, 1723–1751, <https://doi.org/10.5194/bg-19-1723-2022>, 2022.
- Pimenov, N. V., Lunina, O. N., Prusakova, T. S., Rusanov, I. I., and Ivanov, M. V.: Biological fractionation of stable carbon isotopes at the aerobic/anaerobic water interface of meromictic water bodies, *Microbiology*, 77, 751–759, <https://doi.org/10.1134/S0026261708060131>, 2008.
- Posth, N. R., Bristow, L. A., Cox, R. P., Habicht, K. S., Danza, F., Tonolla, M., Frigaard, N.-U., and Canfield, D. E.: Carbon isotope fractionation by anoxygenic phototrophic bacteria in euxinic Lake Cadagno, *Geobiology*, 15, 798–816, <https://doi.org/10.1111/gbi.12254>, 2017.
- Rendon-Lopez, M. J.: Limnología física del lago crater los Espinos, Municipio de Jiménez Michoacan, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, INIRENA-UMSNH, 1–107, 2008.
- Ridgwell, A. and Arndt, S.: Chap. 1 – Why Dissolved Organics Matter: DOC in Ancient Oceans and Past Climate Change, in: *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*, 2nd Edn., edited by: Hansell, D. A. and Carlson, C. A., Academic Press, Boston, 1–20, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405940-5.00001-7>, 2015.
- Sackett, W. M., Eckelmann, W. R., Bender, M. L., and Bé, A. W. H.: Temperature Dependence of Carbon Isotope Composition in Marine Plankton and Sediments, *Science*, 148, 235–237, <https://doi.org/10.1126/science.148.3667.235>, 1965.
- Saghai, A., Zivanovic, Y., Moreira, D., Benzerara, K., Bertolino, P., Ragon, M., Tavera, R., López-Archilla, A. I., and López-García, P.: Comparative metagenomics unveils functions and genome features of microbialite-associated communities along a depth gradient: Comparative metagenomics of microbialites from Lake Alchichica, *Environ. Microbiol.*, 18, 4990–5004, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13456>, 2016.
- Saini, J.S., Hassler, C., Cable, R., Fourquez, M., Danza, F., Roman, S., Tonolla, M., Storelli, N., Jacquet, S., Zdobnov, E. M., and Duhaime, M. B.: Microbial loop of a Proterozoic ocean analogue, *bioRxiv*, 2021-08, <https://doi.org/10.1101/2021.08.17.456685>, 2021.
- Satkoski, A. M., Beukes, N. J., Li, W., Beard, B. L., and Johnson, C. M.: A redox-stratified ocean 3.2 billion years ago, *Earth Planet. Sc. Lett.*, 430, 43–53, <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2015.08.007>, 2015.
- Schidlowski, M.: Carbon isotopes as biogeochemical recorders of life over 3.8 Ga of Earth history: evolution of a concept, *Precambrian Res.*, 106, 117–134, [https://doi.org/10.1016/S0301-9268\(00\)00128-5](https://doi.org/10.1016/S0301-9268(00)00128-5), 2001.
- Schiff, S. L., Tsuji, J. M., Wu, L., Venkiteswaran, J. J., Molot, L. A., Elgood, R. J., Paterson, M. J., and Neufeld, J. D.: Millions of Boreal Shield Lakes can be used to Probe Archaean Ocean Biogeochemistry, *Sci. Rep.*, 7, 46708, <https://doi.org/10.1038/srep46708>, 2017.
- Siebe, C., Guilbaud, M.-N., Salinas, S., and Chédeville-Monzo, C.: Eruption of Alberca de los Espinos tuff cone causes transgression of Zacapu lake ca. 25,000 yr BP in Michoacán, México, Presented at the IAS 4IMC Conference, Auckland, New Zealand, 74–75, <https://www.researchgate.net/publication/283927123> (last access: 8 June 2023), 2012.
- Siebe, C., Guilbaud, M.-N., Salinas, S., Kshirsagar, P., Chevrel, M. O., Jiménez, A. H., and Godínez, L.: Monogenetic volcanism of the Michoacán-Guanajuato Volcanic Field: Maar craters of the Zacapu basin and domes, shields, and scoria cones of the Tarascan highlands (Paracho-Paricutin region), Presented at the Pre-meeting field guide for the 5th international Maar Conference, Querétaro, México, 1–37, [https://www.researchgate.net/profile/Pooja\\_Kshirsagar/publication/275951848](https://www.researchgate.net/profile/Pooja_Kshirsagar/publication/275951848) (last access: 8 June 2023), 2014.
- Sigala, I., Caballero, M., Correa-Metrio, A., Lozano-García, S., Vázquez, G., Pérez, L., and Zawisza, E.: Basic limnology of 30 continental waterbodies of the Transmexican Volcanic Belt across climatic and environmental gradients, *Bol. Soc. Geológica Mex.*, 69, 313–370, <https://doi.org/10.18268/BSGM2017v69n2a3>, 2017.

- Silva Aguilera, R. A.: Análisis del descenso del nivel de agua del Lago Alchichica, Puebla, México (Tesis de Maestría), Universidad Nacional Autónoma de México, Coordinación General de Estudios de Posgrado, UNAM, <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3534827> (last access: 6 June 2023), 2019.
- Sirevag, R., Buchanan, B. B., Berry, J. A., and Troughton, J. H.: Mechanisms of CO<sub>2</sub> Fixation in Bacterial Photosynthesis Studied by the Carbon Isotope Fractionation Technique, *Arch. Microbiol.*, 112, 35–38, <https://doi.org/10.1007/BF00446651>, 1977.
- Sobek, S., Durisch-Kaiser, E., Zurbrügg, R., Wongfun, N., Wessels, M., Pasche, N., and Wehrli, B.: Organic carbon burial efficiency in lake sediments controlled by oxygen exposure time and sediment source, *Limnol. Oceanogr.*, 54, 2243–2254, <https://doi.org/10.4319/lo.2009.54.6.2243>, 2009.
- Soetaert, K., Hofmann, A. F., Middelburg, J. J., Meysman, F. J. R., and Greenwood, J.: The effect of biogeochemical processes on pH, *Mar. Chem.*, 105, 30–51, <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2006.12.012>, 2007.
- Talbot, M. R.: A review of the palaeohydrological interpretation of carbon and oxygen isotopic ratios in primary lacustrine carbonates, *Chem. Geol. Isot. Geosci., Sect. 80*, 261–279, [https://doi.org/10.1016/0168-9622\(90\)90009-2](https://doi.org/10.1016/0168-9622(90)90009-2), 1990.
- Thomas, P. J., Boller, A. J., Satagopan, S., Tabita, F. R., Cavanaugh, C. M., and Scott, K. M.: Isotope discrimination by form IC RubisCO from *Ralstonia eutropha* and *Rhodobacter sphaeroides*, metabolically versatile members of “*Proteobacteria*” from aquatic and soil habitats, *Environ. Microbiol.*, 21, 72–80, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14423>, 2019.
- Ussiri, D. A. N. and Lal, R.: Carbon Sequestration for Climate Change Mitigation and Adaptation, Springer International Publishing, Cham, <https://doi.org/10.1007/978-3-319-53845-7>, 2017.
- Van Mooy, B. A. S., Keil, R. G., and Devol, A. H.: Impact of suboxia on sinking particulate organic carbon: Enhanced carbon flux and preferential degradation of amino acids via denitrification, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 66, 457–465, [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(01\)00787-6](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(01)00787-6), 2002.
- van Vliet, D. M., Meijerfeldt, F. A. B., Dutilh, B. E., Villanueva, L., Sinninghe Damsté, J. S., Stams, A. J. M., and Sánchez-Andrea, I.: The bacterial sulfur cycle in expanding dysoxic and euxinic marine waters, *Environ. Microbiol.*, 23, 2834–2857, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15265>, 2021.
- Vilaclara, G., Chávez, M., Lugo, A., González, H., and Gaytán, M.: Comparative description of crater-lakes basic chemistry in Puebla State, Mexico, *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, 25, 435–440, <https://doi.org/10.1080/03680770.1992.11900158>, 1993.
- Vuillemin, A., Friese, A., Alawi, M., Henny, C., Nomosatryo, S., Wagner, D., Crowe, S. A., and Kallmeyer, J.: Geomicrobiological features of ferruginous sediments from Lake Towuti, Indonesia, *Front. Microbiol.*, 7, 1007, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01007>, 2016.
- Wang, S., Yeager, K. M., and Lu, W.: Carbon isotope fractionation in phytoplankton as a potential proxy for pH rather than for [CO<sub>2(aq)</sub>]: Observations from a carbonate lake, *Limnol. Oceanogr.*, 61, 1259–1270, <https://doi.org/10.1002/lno.10289>, 2016.
- Werne, J. P. and Hollander, D. J.: Balancing supply and demand: controls on carbon isotope fractionation in the Cariaco Basin (Venezuela) Younger Dryas to present, *Mar. Chem.*, 92, 275–293, <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2004.06.031>, 2004.
- Whiticar, M. J., Faber, E., and Schoell, M.: Biogenic methane formation in marine and freshwater environments: CO<sub>2</sub> reduction vs. acetate fermentation – Isotope evidence, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 50, 693–709, [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(86\)90346-7](https://doi.org/10.1016/0016-7037(86)90346-7), 1986.
- Williams, P. M. and Gordon, L. I.: Carbon-13: carbon-12 ratios in dissolved and particulate organic matter in the sea, *Deep-Sea Res. Oceanogr.*, 17, 19–27, [https://doi.org/10.1016/0011-7471\(70\)90085-9](https://doi.org/10.1016/0011-7471(70)90085-9), 1970.
- Wittkop, C., Teranes, J., Lubenow, B., and Dean, W. E.: Carbon- and oxygen-stable isotopic signatures of methanogenesis, temperature, and water column stratification in Holocene siderite varves, *Chem. Geol.*, 389, 153–166, <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2014.09.016>, 2014.
- Zeyen, N., Benzerara, K., Beyssac, O., Daval, D., Muller, E., Thomazo, C., Tavera, R., López-García, P., Moreira, D., and Duprat, E.: Integrative analysis of the mineralogical and chemical composition of modern microbialites from ten Mexican lakes: What do we learn about their formation?, *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 305, 148–184, <https://doi.org/10.1016/j.gca.2021.04.030>, 2021.
- Zohary, T., Erez, J., Gophen, M., Berman-Frank, I., and Stiller, M.: Seasonality of stable carbon isotopes within the pelagic food web of Lake Kinneret, *Limnol. Oceanogr.*, 39, 1030–1043, <https://doi.org/10.4319/lo.1994.39.5.1030>, 1994.
- Zyakun, A. M., Lunina, O. N., Prusakova, T. S., Pimenov, N. V., and Ivanov, M. V.: Fractionation of stable carbon isotopes by photoautotrophically growing anoxygenic purple and green sulfur bacteria, *Microbiology*, 78, 757–768, <https://doi.org/10.1134/S0026261709060137>, 2009.

# Micro- and nanoscale techniques for studying biofilm-mineral interactions

Luca Stigliano<sup>a,b,c</sup>, Jeanne Caumartin<sup>c</sup>, and Karim Benzerara<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup>ISTerre Institut des Sciences de la Terre – CNRS/Université Grenoble Alpes 38000  
Grenoble, Grenoble, France

<sup>b</sup>ITES Institut Terre et Environnement de Strasbourg - CNRS/Université de Strasbourg,  
Strasbourg, France

<sup>c</sup>Sorbonne Université, Museum National d'Histoire Naturelle and CNRS, Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC), Paris, France

\*Corresponding author: e-mail address: karim.benzerara@upmc.fr

## Abbreviations

<b>AFM</b>	atomic force microscopy
<b>AFM-IR</b>	atomic force microscopy—infrared spectroscopy
<b>BSE</b>	backscattered electrons
<b>CEMOVIS</b>	cryo-electron microscopy of vitreous sections
<b>CLSM</b>	confocal laser scanning microscopy
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>ECM</b>	extracellular matrix
<b>EDXS</b>	energy dispersive X-ray spectrometry
<b>EELS</b>	electron energy loss spectroscopy
<b>EFM</b>	epifluorescence microscopy
<b>EPS</b>	extracellular polymeric substances
<b>ESEM</b>	environmental scanning electron microscopy
<b>EXAFS</b>	extended X-ray absorption fine structure
<b>FEG-SEM</b>	field emission gun—scanning electron microscopy
<b>FIB</b>	focused ion beam
<b>FISH</b>	fluorescence in situ hybridization
<b>FTIR</b>	Fourier transform infrared spectroscopy
<b>HIM</b>	helium-ion microscopy
<b>HRTEM</b>	high resolution transmission electron microscopy
<b>LC-STEM</b>	liquid cell—scanning transmission electron microscopy
<b>nano-IR</b>	nanoscale infrared spectroscopy

## 2 Micro- and nanoscale techniques

<b>nanoSIMS</b>	nanoscale secondary ion mass spectrometry
<b>OCT</b>	optical coherence tomography
<b>PALM</b>	photoactivated localization microscopy
<b>PCA</b>	principal component analysis
<b>SAED</b>	selected area electron diffraction
<b>SEM</b>	scanning electron microscopy
<b>SERS</b>	surface-enhanced Raman scattering
<b>STED</b>	stimulated emission depletion
<b>STEM</b>	scanning transmission electron microscopy
<b>STORM</b>	stochastic optical reconstruction microscopy
<b>STXM</b>	scanning transmission X-ray microscopy
<b>TEM</b>	transmission electron microscopy
<b>VSI</b>	vertical scanning interferometry
<b>WL-VSI</b>	white light vertical scanning interferometry
<b>XANES</b>	X-ray absorption near-edge structure
<b>XAS</b>	X-ray absorption spectroscopy
<b>XRF</b>	X-ray fluorescence spectroscopy

---

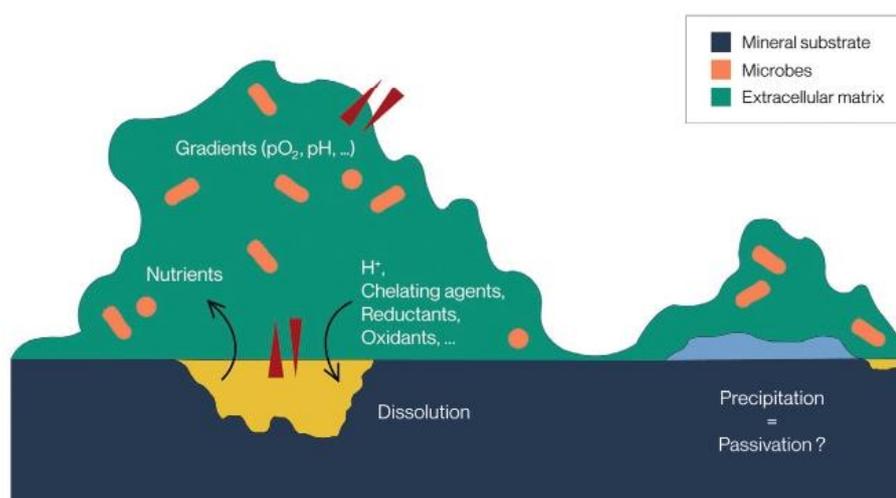
## 1 Introduction

Biofilms are consortia of sessile, prokaryotic and/or eukaryotic microbes adhering to each other with the aid of a self-produced extracellular matrix (ECM) (Costerton, Lewandowski, Caldwell, Korber, & Lappin-Scott, 1995). They are dynamic structures that achieve successive development stages, including cell attachment, maturation and detachment (Battin, Kaplan, Newbold, Cheng, & Hansen, 2003). Water represents about 97% of the total mass of a biofilm (Zhang, Bishop, & Kupferle, 1998), while extracellular polymeric substances (EPS), which are composed of exopolysaccharides, DNA and/or proteins, account for 50–90% of the total organic carbon of biofilms (Flemming, Wingender, Moritz, Borchard, & Mayer, 1999). Such an arrangement of microorganisms as biofilms is very common in the environment (Flemming & Wuertz, 2019). While many studies, for the sake of simplicity, have focused on planktonic cells in order to determine their interactions with their environment, cells in biofilms can have significantly different physiology and gene expression patterns (Jo, Price-Whelan, & Dietrich, 2022; Sauer et al., 2022). Moreover, biofilms in the environment are often comprised of taxonomically and metabolically diverse microorganisms differing in composition from planktonic communities found in the same environment (Iniesto et al., 2022).

Numerous studies have been dedicated to exploring molecular interactions between cells within biofilms (Sauer et al., 2022). In contrast, with the notable exception of the industrially important biocorrosion processes, interactions between microorganisms and their mineral substrate and/or mineral phases contained within biofilms remain poorly characterized. Yet, minerals can be highly reactive even at relatively short timescales and it is increasingly recognized that biofilms play a

central role in the weathering and the formation of numerous rocks (Fig. 1) (Ehrlich, 1996; Templeton & Knowles, 2009), and possibly since the origins of life (Römling, 2022). Some of these interactions between minerals and microorganisms have global impacts, controlling e.g., water quality (Battaglia-Brunet et al., 2012), or CO<sub>2</sub> exchange between the lithosphere and the atmosphere (Wild, Imfeld, & Daval, 2021).

More specifically, biofilms can impact the dissolution of minerals. Mineral dissolution is the release of chemical species from a solid to the surrounding aqueous solution (Noiriel & Daval, 2017). This results in the retreat of the mineral surface (Wild et al., 2016) and/or the formation of etch pits. Etch pits are nm- to μm-scale excavations forming at the mineral surface under specific conditions, including a sufficient undersaturation of the fluid. They grow following the interaction between the fluid and crystal defects such as dislocation lines (Lasaga & Blum, 1986). The chemicals released may sometimes serve as nutrients (Rogers & Bennett, 2004). Diverse parameters control dissolution rates, including the nature of the mineral phase, its crystallographic orientation, temperature, the presence of organic ligands, or the chemical composition of the surrounding solution (e.g. pH, activities of cations and anions composing the mineral phase, oxygen fugacity when O<sub>2</sub>-sensitive chemical species are involved) (Kurganskaya & Luttge, 2021). While



**FIG. 1**

Sketch of biofilm-mineral interactions. Minerals can be dissolved. Dissolution can be enhanced or slowed down by the production of protons, chelating agents, reductants, oxidants by microbes. Microbes can also attach to high-energy sites. Dissolution in turn releases nutrients and drives the onset of chemical gradients (double arrows in red) at the base of the biofilm. Minerals can be precipitated (light blue) within biofilms, which can lead to passivation of the mineral substrate surface underneath the biofilm. Passivation refers to the formation of minerals on top of the mineral substrate (yellow) surface that makes the substrate surface less prone to alteration, reducing its dissolution rate.

## 4 Micro- and nanoscale techniques

mineral dissolution may occur abiotically, biofilms can impact mineral dissolution rates by (i) locally altering the solution chemistry (i.e. creating at the mineral-biofilm interface a micro-environment chemically different to that of the bulk solution) (Wild, Gerrits, & Bonneville, 2022), (ii) producing chelating ligands (Perez et al., 2016), or (iii) physically obstructing fluid access to high-energy sites at the mineral surface due to biofilm coverage (Luttge, 2004). Here, high-energy sites refer to surface sites weakly bonded to the bulk crystal, e.g., caused by lattice defects, thus more prone to dissolution (Meakin & Rosso, 2008). Finally, (iv) by inducing mineral precipitation, biofilms may lower interactions between the solution and the mineral surface, hence reducing dissolution, a process known as passivation. In the environment, microbes may contribute to ~16% of the weathering flux (Wild et al., 2021). This universal process is particularly important to consider when dealing with the formation of soils and their fertility (Uroz, Calvaruso, Turpault, & Frey-Klett, 2009), aging/biodeterioration (Schroer, Boon, De Kock, & Cnudde, 2021) and bioprotection of patrimonial stones (Jroundi et al., 2017), dissolution of enamel by cariogenic biofilms (Xiao et al., 2017) or biocorrosion of industrial pipes (Li et al., 2018). Several major questions remain open about the role of biofilm in mineral dissolution: what are the relative impacts of bio-chemical vs bio-mechanical processes on bio-weathering? How far from cells can interactions be mediated? How chemical heterogeneities within biofilms influence dissolution heterogeneities? Do microbes enhance or slow down mineral dissolution?

Concomitantly or not, biofilms can favour the precipitation of minerals (Benzerara et al., 2011). Mineral precipitation results from the reaction of dissolved species, which combine into a solid phase when present at concentrations exceeding solubility. Extracellular polymers excreted by microorganisms sometimes lower nucleation barriers of the mineral phases, hence favouring the formation and stabilization of the first mineral nuclei (Giuffre, Hamm, Han, De Yoreo, & Dove, 2013). Alternatively, extracellular polymers can interact with growing minerals and inhibit the growth of crystal faces differentially depending on their crystallography (Didymus et al., 1993). Last, cell metabolic activities can locally change the solution chemistry and favour or inhibit mineral precipitation (Görge et al., 2020). Mineral precipitation has been abundantly documented in biofilms and sometimes results in the formation of rocks such as stromatolites (Couradeau et al., 2013), which are among the oldest traces of life known on Earth, back to 3.5 Ga ago (Lepot, 2020).

One special case of interactions between biofilms and minerals concerns nanoparticles. These mineral grains are particularly reactive due to their small size, and their chemistry and reactivity can be altered when they come into contact with biofilms. For example, Gómez-Gómez, Sanz-Landaluce, Pérez-Corona, and Madrid (2020) demonstrated the morphological transformation of tellurium-based nanoparticles within biofilms. Conversely the influx of nanoparticles can alter the biomass and biodiversity of some biofilms.

While biofilms can modify their mineral substrates, mineral surfaces can in turn control the formation and functioning of biofilms. First, mineral surface charges are primary parameters for determining electrostatic interactions during cell

colonization. Surface charge density depends on solution ionic strength, pH and mineral phase, characterized by a specific point of zero charge (pzc), i.e., the pH at which the net surface charge of the mineral is null (Villanueva, Salinas, Copello, & Díaz, 2014). Moreover, some biofilm-forming microbes directly or indirectly transfer electrons with mineral surfaces (Shi et al., 2016) or communicate between each other via conductive minerals (Dong et al., 2020). Last, the precipitation of minerals within biofilms has been suggested to impact biofilm structures and mitigate the diffusion of antibiotics (Keren-Paz et al., 2022).

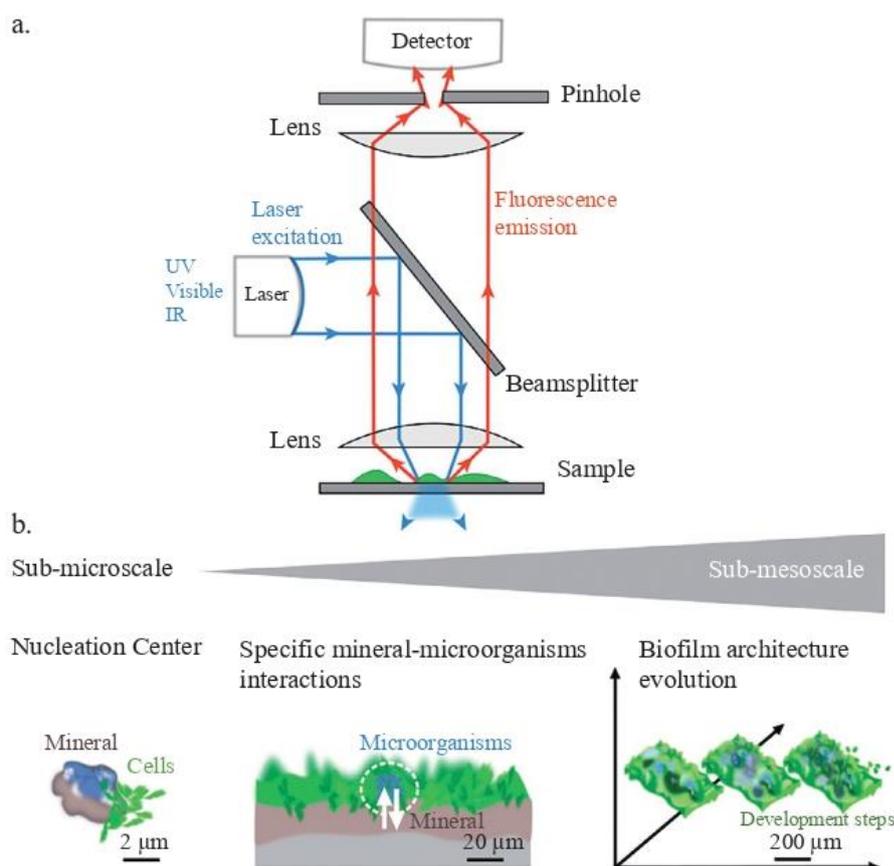
The structure and chemical conditions prevailing within biofilms are expected to be spatially and temporally variable (Jo et al., 2022). In multispecies biofilms, different taxa show spatial segregation, intermixing, or stratification depending on their ecological and metabolic interactions (Nadell, Drescher, & Foster, 2016). Within both multi- and mono-species biofilms, chemical gradients (e.g. O<sub>2</sub> fugacity, redox potential, pH) develop due to endogenous metabolic activity, spatial heterogeneities of cell physiological states and limitation of diffusion by the EPS matrix (Jo et al., 2022). These gradients induce differential gene expression patterns, resulting in physiological heterogeneities. Such heterogeneities develop along the plane but also vertically (Jo et al., 2022). This should result in a variability of mineral reactivity and, therefore, spatially and temporally varying precipitation and/or dissolution rates of minerals.

Overall, to better assess interactions between biofilms and minerals and the role of minerals in the functioning of biofilms, it is crucial to identify the spatial distribution of specific taxa or biological functions within biofilms, characterize the local chemical conditions and the transformations of minerals, directly map where critical reactions (e.g. electron transfers, chemical exchanges, mineral precipitation) occur (Gerbersdorf et al., 2020). Analytical approaches allowing the culturing and characterization of biofilms have been widely reviewed (Azeredo et al., 2017; Rosenberg, Azevedo, & Ivask, 2019). Not one single technique alone can achieve all the mentioned objectives. Many analytical techniques are simple to use on planktonic cells, but require some adjustments to be used on biofilms. Last, it appears difficult to preserve the native state of the structures with conflicting requirements for mineral vs cell and organic polymer characterization. Here, we focus on some techniques developed to characterize interactions between biofilms and minerals or, although promising, are still at an early stage of development. In particular, we start with light microscopies (optical coherence tomography, confocal laser scanning microscopy) allowing relatively large-scale 3D investigation of biofilms. Then we focus on atomic force microscopy (AFM) and vertical scanning interferometry (VSI), which provide important topographic information about both the mineral surfaces and biofilms, down to the atomic scale. We then review the use of electron microscopies (scanning electron microscopy, focused ion beam milling, transmission electron microscopy) to get versatile information about morphology and chemistry of cells and minerals down to the nanoscale. Finally, we review the use of some spectroscopies, which provide further chemical information about biofilm-mineral assemblages.

## 6 Micro- and nanoscale techniques

## 2 Confocal laser scanning microscopy (CLSM) to image biofilm-minerals assemblages in situ, at the submicrometer scale

CLSM is a standard technique for imaging the architecture of biofilms (Fig. 2). It collects visible fluorescence in three dimensions, emitted by samples that are auto-fluorescent, stained with fluoroprobes, or both. Light is emitted by a sample following its excitation by a laser, and CLSM uses a pinhole to remove out-of-focus light and provides depth selectivity (Fig. 2). The depth resolution is about  $1\ \mu\text{m}$  and the lateral resolution is around  $250\ \text{nm}$ . Several strategies can increase the imaging resolution. For example, the lateral resolution can be as low as  $\sim 140\ \text{nm}$  with Airyscan confocal super-resolution microscopy (Romero, Urban, & Punyasena, 2020).



**FIG. 2**

(A) Principle of CLSM. (B) Diversity of the processes and spatial scales at which mineral-biofilm interactions can be assessed by CLSM.

The nanoscale resolution (down to  $\sim 40\text{nm}$ ) can be reached in biofilms with specific modes of operation, such as stimulated emission depletion (STED) microscopy (Klar, Jakobs, Dyba, Egner, & Hell, 2000) and localization/blink microscopy (PALM, STORM) (Betzig et al., 2006; Rust, Bates, & Zhuang, 2006). CLSM offers many advantages, including versatility in data acquisition (Teng, Li, & Lu, 2020). For example, 2D spatial heterogeneities in a sample can be investigated with point by point scans. Stacking different sections of an object allows its reconstruction in three dimensions. Last, these reconstructions can be recovered in a time-lapse mode, when some temporal dynamics is expected (Shorte & Frischknecht, 2007). However, CLSM is relatively slow (Xi et al., 2011). However, the high amount of laser light received by the sample during its excitation can damage it and cause phototoxicity/photobleaching (Boudreau et al., 2016). Currently, the light sources, the sensitivity of the detectors and the field of view, dynamic range and frame rate of the cameras are improved for this purpose (Bayguinov et al., 2018). The total duration of time-lapse experiments is classically limited to a few hours or days for two main reasons: (1) the acquisition of frequent data can represent huge amounts of data, that is difficult to store, (2) the sample may drift and operating conditions may not be consistent with the preservation of the sample (Kreft, Stenovec, & Zorec, 2005). To overcome these limitations, several studies have designed strict protocols to observe biofilms in 3D at the single-cell scale for more than 5 days (Molina-Santiago et al., 2022).

The use of appropriate fluorescent probes allows characterizing both the organization of microbial communities and the identity of their constituents. Neu and Lawrence (2014) listed the different stains that can be used in the characterization of diverse molecules composing biofilms. Moreover, in biofilm-mineral assemblages, diverse objects can be auto fluorescent and therefore do not require the use of any fluorescent probe. This is the case for pigmented microorganisms that can be visualized and sometimes taxonomically assigned based on their morphology and pigment composition (Boidi et al., 2022). This is also the case for several minerals which exhibit spontaneous light emission when excited by photons (photoluminescence). This process is often related to the presence of trace elements such as rare earth elements (Lenz et al., 2013) or manganese (MacRae & Wilson, 2008), referred to as luminescence activators. The nature of these activators (Gaft & Panczer, 2013) and the type of photoluminescence emitted by them in certain minerals such as fluorite, apatite (Reisfeld, Gaft, Boulon, Panczer, & Jørgensen, 1996) or natural calcite (Gaft, Nagli, Panczer, Waychunas, & Porat, 2008) have been well studied.

Overall, CLSM allows characterizing all three components comprising biofilms, i.e., cells, EPS and minerals in space and time. In particular, it can grasp the overall structure of biofilms, image the distribution of specific microbial taxa and/or specific organic molecules. Last but not least, it can also image chemical gradients within biofilms (Schlafer & Meyer, 2017), providing key information to better depict interactions between biofilms and minerals. For example, Gérard et al. (2013) characterized modern lacustrine microbialites by CLSM. Microbialites are organosedimentary deposits formed by biofilms precipitating minerals, most often carbonate phases. These authors combined the detection of the natural autofluorescence

## 8 Micro- and nanoscale techniques

of microbial pigments such as chlorophyll, carotenoids, and the use of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, labelling DNA in all cells, included non-pigmented ones) and 2,4-bis-[*N,N'*-di(carbomethyl)-aminomethyl]-fluorescein (calcein, labelling  $\text{Ca}^{2+}$  and/or  $\text{Mg}^{2+}$ ). Such coupling enabled them to visualize all the cells in biofilm, i.e., pigmented autotrophs (showing both autofluorescence and DAPI-fluorescence) and non-pigmented heterotrophs (showing DAPI-fluorescence only), as well as Ca- and/or Mg-rich areas corresponding to some mineral phases. However, one difficulty encountered when using multiple stains and/or probing autofluorescent pigments is interferences. For example, DAPI emits at wavelengths between 410 and 490 nm (Kapuscinski, 1995), that can interfere with the autofluorescence of cyanobacteria from natural samples (Gérard et al., 2013). Moreover, mineral autofluorescence can interfere with staining, particularly since mineral phases can also contain organic photoluminescence activators (Pedone, Cercone, & Burruss, 1990). To identify mineral phases within these biofilms at a spatial resolution better than 1  $\mu\text{m}$ , Gérard et al. (2013) correlated CLSM with Raman. Overall, they found evidence of six distinct morphotypes of cyanobacteria by distinguishing their fluorescence spectra and taxonomic specificities. Moreover, they suggested that one group was especially important in mineral precipitation: cells affiliated with the *Pleurocapsales* order showed a systematic heavy encrustation by calcium carbonate (aragonite), suggesting their mediation of mineral precipitation. This specific relationship was later supported by bulk metagenome analyses (Saghai et al., 2015). Last, Couradeau et al. (2013) correlated CLSM observations with electron microscopies to characterize these associations further down to the nm-scale.

Several processes can lead to biomineralization in biofilms, such as local supersaturation due to specific metabolic activities and/or the production of organic molecules promoting heterogeneous mineral nucleation (Benzerara et al., 2011). However, these nucleation centres remain difficult to characterize and localize in EPS. Bontognali et al. (2008) combined CLSM and cryo-SEM on cultures stained with DAPI to characterize the first steps of carbonate nucleation within biofilms of the sulphate-reducing bacterium *Desulfovibrio. brasiliensis*. Previously, it was hypothesized that the first phase of mineralization of some biofilms was due to the passive encrustation of nanobacteria, microorganisms with tiny sizes, but their existence remained poorly supported (Vasconcelos, McKenzie, Bernasconi, Grujic, & Tiens, 1995). Bontognali et al. (2008) distinguished the cells from EPS and carbonates by staining glycoconjugates of EPS using a lectin, Concanavalin-A labelled with tetramethylrhodamine, and bacterial cells with fluorescein-5-isothiocyanate. The 3D reconstruction and cryo-SEM analyses provided several pieces of information about the precipitates inside the biofilm: they were globules without angular surfaces, with a diameter between  $\sim 20$  and 200 nm, resembling purported nanobacteria and they were located within EPS only, and remotely from cells. The possibility offered by the use of CLSM and cryo-SEM to investigate biofilms in their native condition was crucial as it prevented artefactual formation of carbonate nanoforms upon sample preparation. They concluded that nanosized precipitates nucleated in EPS were formed by abiotic processes (i.e. not directly induced by microbial metabolisms) and/or in connection with the presence of organic molecules (Bradley et al., 2017).

Multi-photon microscopy is a second type of laser scanning microscopy used in geobiology. It is based on the principles of non-linear optics (i.e. two (or more)-photon absorption) and requires a very high photon density in time and space, often provided by pulsed lasers (Denk, Strickler, & Webb, 1990). Here, the excitation light (often in the infrared) has a lower frequency than the emitted light. This limits scattering phenomena in the sample, photobleaching, and background signals (Neu & Lawrence, 2015), allowing samples to be imaged to about 1 mm (against  $\sim 200\ \mu\text{m}$  with CLSM) in depth. The increase in the penetration depth is therefore one of the main advantages of this technique (Gu & Sheppard, 1995). The different constituents of biofilms can thus be visualized at depth, by collecting autofluorescence in the sample and/or fluorescence emitted by specific fluorophores (Neu, Woelfl, & Lawrence, 2004). To our knowledge, only a few two-photon microscopy analyses have been so far conducted on microbial biofilms with some focus on mineral-living interactions (Hu et al., 2005; Neu et al., 2010; Neu & Lawrence, 2004; Sforza et al., 2017; Xiao et al., 2017). For example, Sforza et al. (2017) imaged microbialites from Big Pond Lake (Bahamas) with two-photon microscopy, and efficiently estimated the bacterial abundance in microbial mats. However, more analyses may be expected in the future considering that this type of microscopy is often used in the medical field, including imaging calcified biological tissues (Villa, Wang, Huang, Rowe, & Wei, 2013).

Last, the development of cryo-CLSM is also in progress achieving high spatial resolution imaging and preserving the fluorescence signal (Metzger et al., 2016). A first advantage of cryo-CLSM is that the sample is rapidly fixed, which can be crucial when observing fast transformations. Moreover, photobleaching is limited under cryogenic conditions, according to Thomas et al. (2021). Furthermore, cryo-CLSM can be combined with cryo-scanning electron microscopy, resulting in correlative images that combine the sensitivity and specificity of CLSM with the nanometre-scale spatial resolution of electron microscopy (Dahlberg, Perez, & Moerner, 2022). These technologies are therefore promising for imaging, for example, the specific molecular relationships between minerals and microorganisms within a biofilm under native conditions.

---

### **3 Optical coherence tomography (OCT) to in situ characterize the structure of thick biofilms at the micrometre scale over large areas**

OCT is an imaging technique based on the scattering of light from the surface of an object. In practice, a light source with a broad spectrum is sent via dichroic mirrors on a reference arm and on a sampling arm equipped with a lens that focuses light on the sample (Fig. 3). The signal emitted by scattering and reflection of the light source on the sample causes interference with the light emitted by the reference arm, and this interference is collected and numerically recombined (Xi, Marks, Schlachter, Luo, & Boppart, 2006). It provides 3D imaging with a spatial resolution of a few

## 10 Micro- and nanoscale techniques

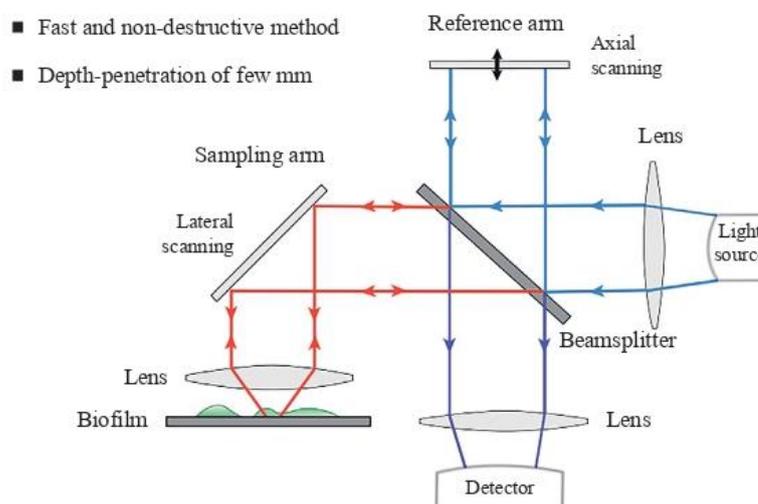


FIG. 3

Principle of OCT. The beam emitted by the source (blue arrows starting from the right) is separated by the dichroic mirror (a mirror, which reflects light and/or transmit it, depending on its wavelength), called beamsplitter (in the middle). The image acquisition is decoupled into a lateral scan by the sampling arm (double red arrows) and an axial scan by the reference arm (double blue arrows). The signals collected by the two arms (dark blue arrows downwards) interfere and are focused by a lens onto the detector (bottom of the figure), which collects these interferences and recombines them numerically.

micrometres and a characterization of the optical properties of the materials. OCT has been used in several scientific fields and notably to image the biofilm structure and fluid-biofilm interactions (Wagner & Horn, 2017). Specifically, the few-mm-depth penetration of OCT allows the detection of voids within biofilms, which cannot be done by CLSM. Moreover, OCT provides many advantages such as a fast, real-time, non-destructive, and in situ method to examine the structure and mechanical properties of a biofilm. Unlike CLSM, which is often used to characterize the structure of biofilms at the micrometre-scale but only reveals the stained and/or autofluorescent parts at a shallower penetration depth, OCT can image the three-dimensional structure of the biofilm on a surface up to  $\text{mm}^2$  without suffering from probe specificity or destruction of the sample. With appropriate thresholding, it is also possible to measure the thickness of the biofilm (Hou et al., 2019).

Wagner, Taherzadeh, Haisch, and Horn (2010) assessed the structure of biofilms grown under laminar, transient, or turbulent flow conditions by both OCT and CLSM. CLSM revealed the microscale structures of the biofilms based on the fluorescence of EPS glycoconjugates and nucleic acids for a depth shallower than  $250\ \mu\text{m}$ . However, voids and cavities were far less conspicuous by CLSM. They concluded that OCT is more reliable than CLSM for measuring these structural parameters at the mesoscale. Applying OCT allowed determining that the

structure of biofilms grown in a turbulent flow was more homogeneous in terms of volumetric porosity than in laminar and transient flows.

Furthermore, new data processing techniques are emerging to better understand and interpret the information obtained by OCT. For example, based on key principles used in CLSM image processing, [Narciso, Pereira, Dias, Melo, and Martins \(2022\)](#) have recently developed a novel software tool with very detailed pixel characterization allowing the automation of 2D OCT image processing, decreasing biases associated with human perception.

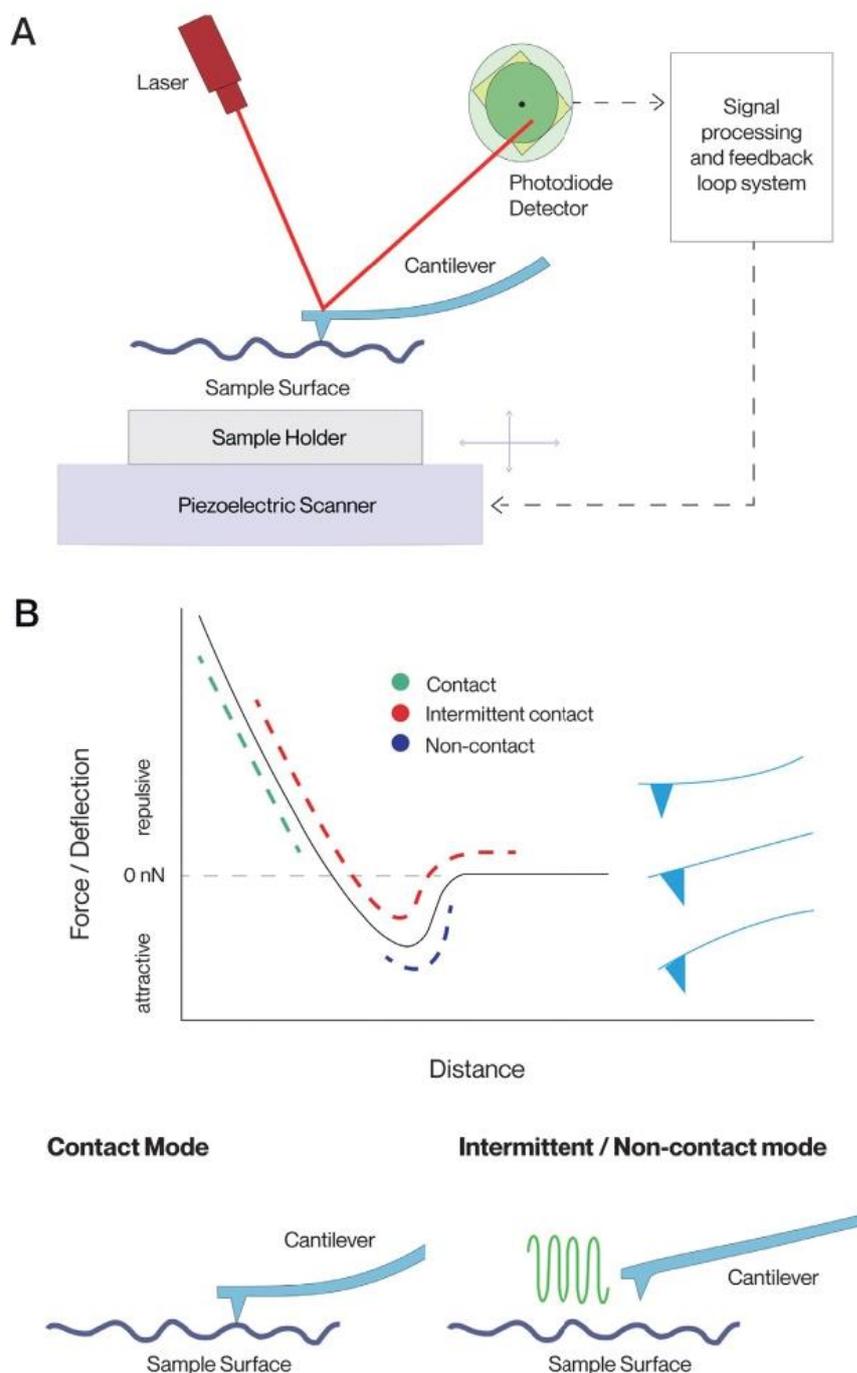
The physical properties of biofilms and their evolution over time can also be studied by OCT ([Mohan, Nigam, & Poddar, 2019](#); [Picioreanu, Blauert, Horn, & Wagner, 2018](#)). For example, [Haisch and Niessner \(2007\)](#) monitored the degradation of a biofilm with a time resolution between 1 s and 1 min. OCT has not yet been used to our knowledge to study interactions between minerals and bacterial biofilms. However, it might be promising for such analyses. For example, [Romeu et al. \(2022\)](#) studied by OCT the impact of nanoparticles (here carbon nanotubes) on the structure of cyanobacterial biofilms, a system close to some already described biofilms involved in the formation of microbialites. Moreover, [Wang et al. \(1999\)](#) used polarization-sensitive-OCT to characterize mineralized tissues such as those comprising teeth. This technique measures the intensity of the interference fringe along two perpendicular polarization directions of the reflected light at each position in the sample and overall allows determining the birefringence as a function of depth. [Ong et al. \(2016\)](#) used OCT to image calcium-containing mineral deposits in arteries. Overall, OCT has been extensively used to study the dissolution of enamel in caries, providing crucial information about mineral density in a tissue and could therefore be of prime interest to the study of biofilm-mineral assemblages.

---

#### **4 Atomic force microscopy (AFM) to image the topography, and mechanical, electrical and chemical properties of biofilm-mineral assemblages at the sub-nanometre scale**

Atomic Force Microscopy (AFM) is a very-high-resolution scanning probe microscopy technique for surface analysis. It essentially consists of: (i) a flexible cantilever with a sharp tip scanning over the sample surface; (ii) a piezoelectric scanner controlling lateral and vertical position of the AFM probe relative to the surface under study; (iii) a laser beam reflected from the back side of the cantilever and directed onto a photodiode detector; (iv) a feedback loop system ([Fig. 4](#)). As the tip scans over the studied surface, attractive or repulsive forces between the tip and the sample cause a deflection of the cantilever. The deflection is measured with the laser reflected from the back side of the cantilever onto the detector. The deflection signal recorded on the photodiode detector, combined with the information about the distance between the cantilever and the surface as controlled by the piezoelectric scanner, are finally converted into a topographic map.

## 12 Micro- and nanoscale techniques

**FIG. 4**

Principle of AFM. (A) Working principle (in constant force mode, i.e. constant deflection). The sharp tip at the end of the cantilever feels the (attractive or repulsive) force from the sample surface and deflects accordingly, causing the laser beam to deviate its path to the

AFM is actually a broad term encompassing several different operating modes, ranging from topography measurements to mechanical, electrical and chemical surface characterizations at the nanoscale. The different topographic modes can be classified based on the specific operating modes such as: (i) 'contact mode', in which the tip is continuously in contact with the surface when raster-scanned across the sample, (ii) 'intermittent contact mode', better known as 'tapping mode', in which the tip continuously oscillates close to the studied surface and perpendicularly to it, intermittently touching it, and (iii) 'non-contact mode', in which the tip oscillates as in 'tapping mode' but without ever getting in direct contact with the surface (Fig. 4). Generally, 'contact mode' is optimal for hard and regular samples, whereas 'intermittent' or 'non-contact modes' are preferable for softer and less regular samples (e.g. biofilm). AFM allows to obtain topography images with 1 Å vertical resolution, 30nm lateral resolution, 10µm vertical scanning range and 100µm<sup>2</sup> field of view. For the study of biofilm-mineral assemblages, the 'force mapping', a non-topographic mode, also appears particularly interesting. In this mode, the force between the AFM tip and the studied surface is measured, providing information about mechanical properties, such as adhesion forces. An extensive description of all AFM operating modes can be found in Eaton and West (2010).

Applying AFM to the study of mineral dissolution and growth has become increasingly popular over the years (Daval, Hellmann, Saldi, Wirth, & Knauss, 2013; Li, Wang, Shen, Pedrosa, & Luttge, 2021; Nagy, Cygan, Hanchar, & Sturchio, 1999; Pollet-Villard et al., 2016). Mineral samples can be imaged under wet conditions, without any sample preparation, allowing the study of the surface dynamics of minerals undergoing dissolution-precipitation processes in situ (Pimentel, Pina, & Gnecco, 2013; Siena et al., 2021; Wang & Putnis, 2020). Meanwhile, AFM has proven to be an equally essential tool for the analysis of microbial systems (Dufrière, 2002; Wright, Shah, Powell, & Armstrong, 2010). However, proper AFM imaging and force

---

photodetector, reaching a point different than the 'setpoint', i.e., the point on the photodetector corresponding to no deflection of the cantilever. The error signal is sent to a feedback loop system that responds by adjusting the cantilever height, through vertical adjustment of the piezoelectric scanner, to move it back to the no deflection configuration. The height adjustment of the piezoelectric scanner is converted into a surface height measurement. The scanner then moves horizontally in the plane to scan other points on the surface. (B) Different topographic operating modes. In 'contact mode', the sharp tip continuously touches the surface while scanning and is therefore always in the repulsive force regime (green dot line). In contrast, in 'non-contact mode', the sharp tip continuously oscillates vertically while moving along the surface and is therefore always in the attractive force regime (blue dot line). Lastly, in 'intermittent contact mode', the sharp tip oscillates and moves along the surface as in 'non-contact mode', but it constantly ranges from one force regime to the other (red dot line).

*Force/Deflection graph adapted from Eaton, P., & West, P. (2010). Atomic force microscopy. Oxford University Press.*

## 14 Micro- and nanoscale techniques

mapping of live cells under physiologically relevant conditions are technically challenging. In fact, since the cells are only weakly bonded to the substrate, the interaction with the scanning tip may provoke cell detachment or damage (Wright et al., 2010). Nevertheless, great progress has been achieved in this respect over the past two decades (Evans et al., 2021; Hu et al., 2020). Additionally, AFM has been extensively applied to monitor biofilm development (Kamaeva, Vasilchenko, & Deryabin, 2014; Oh, Jo, Yang, & Park, 2007; Oh, Lee, Jo, Jung, & Lim, 2009) and biofilm-EPS properties (Breitenbach et al., 2018).

Overall, AFM has great potential in characterizing biofilm-mineral interactions. Recently, Wang et al. (2022) documented how *Vibrio harveyi* J4, an extreme halophilic bacterium, could initiate the calcite-to-protodolomite transformation in Mg-containing solutions. AFM was used in the ‘contact mode’, over observation areas of  $5\ \mu\text{m}^2$  and  $500\ \text{nm}^2$ . This revealed nano-spheroids-hemispheroids (interpreted as protodolomite) over the calcite surface after 3 months of incubation. They suggested that the numerous carboxyl groups with negative charges present in the bacterial EPS may attract  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ions, promoting the precipitation of protodolomite.

AFM has been especially used to investigate biofilm-mediated dissolution of minerals. These studies have been conducted from various experimental perspectives, ranging from *ex situ* observations of incubation experiments (Kirtzel et al., 2020; Saccone et al., 2012) to in situ imaging of batch and flow-through systems (Pokrovsky, Shirokova, Zabelina, Jordan, & Bénézech, 2021). To investigate the impact of fungal biofilm on different mineral surfaces (hornblende, biotite and chlorite) after 6 months of incubation, Saccone et al. (2012) adopted AFM imaging and ‘force mapping’ before and after the removal of the biofilm. The biofilm comprises globular features measuring 10–80 nm in diameter, as shown by images acquired in ‘tapping mode’, and its morphology differed from mineral to mineral. AFM ‘force mapping’ revealed the hydrophobic nature of the hypha (compared with the AFM tip), and of the biofilm to a lesser extent. Additionally, the biofilm altered the hornblende surface underneath, which made the mineral surface significantly more mechanically fragile than a cleaved surface, pointing at the key role that fungal biofilm might play in enhancing silicate weathering. In contrast, in situ AFM imaging was also used to show the potential of biofilms to inhibit mineral weathering, with possible applications in stone heritage protection and consolidation (Jroundi et al., 2017).

Another area where AFM offers considerable insights is bioleaching, i.e., solubilization of metals from insoluble ores mediated by bacteria and archaea. Since bioleaching requires attachment (Bellenberg et al., 2014), AFM in the ‘force mapping’ mode was used to investigate how to favour early microbial attachment and biofilm formation. As an example, Su et al. (2021) showed how the presence of a surfactant increased the mean adhesion forces between *Acidianus manzaensis* YN-25 and chalcopyrite, supposedly by changing the Lewis acid-base interaction and electrostatic force (Su et al., 2021). Finally, the spatial correlation of AFM imaging in ‘topographic mode’ with epifluorescence microscopy (EFM) and CLSM, can provide great insights about bioleaching, including the ability to thoroughly

investigate cell distribution, biofilm formation and EPS production (Zhang et al., 2014; Zhang, Neu, Blanchard, Vera, & Sand, 2019). As an example, by correlating AFM and EFM, Zhang et al. (2014) showed that *F. acidiphilum* cells attach to pyrite substrates preferentially along cracks and macro-steps, with subsequent formation of a monolayer biofilm.

## 5 Vertical scanning interferometry (VSI) to quantify dissolution rates of mineral substrates covered by biofilms

Biofilms can positively and/or negatively impact the dissolution rates of the mineral substrates on which they grow. However, this effect remains to be properly quantified and the parameters controlling the impact type (i.e. enhancement or inhibition) and magnitude of this effect to be determined. Like AFM, white light vertical scanning interferometry (WL-VSI, commonly known as VSI) proves as a particularly interesting tool for this purpose. VSI is an interference microscopy technique using the low coherence of white light to obtain areal surface topography measurements. In brief, a beam emitted from a white light source is split into two parts with a beam splitter: one beam is reflected by a fixed reference mirror, the other by the surface under examination. The two beams are recombined by the beam splitter to interfere with each other on a detector. A CCD sensor detects the resulting interference fringe pattern, and the corresponding signal is digitized to generate a topography map of the surface investigated (Fig. 5). State-of-the-art VSI allows to obtain topography images with a subnanometric vertical resolution, a 360 nm lateral resolution, a 1 mm vertical scanning range and a  $\sim 1 \text{ mm}^2$  field of view (extendable up to  $1 \text{ cm}^2$  in 'stitching mode'). More details regarding VSI basic principles are provided elsewhere (Wyant, 2002).

VSI is widely used in mineral reactivity studies in order to (i) quantify crystal dissolution (or growth) rates through direct measurements of the surface normal retreat (or advance), as well as (ii) characterize the resulting surface morphology (Luettge, Bolton, & Lasaga, 1999). In this regard, VSI is also suitable for studying microbially-mediated alteration of minerals, as it allows to localize the biofilm-forming microbes, while quantifying any changes in surface topography (Davis & Lüttge, 2005) (Fig. 6).

When compared to AFM (topographic mode), VSI offers a larger field of view, which makes it more appropriate for studying the spatial heterogeneity of biofilm-mineral interactions. In contrast, due to the limited lateral resolution, VSI cannot detect the nanometric surface features that can be resolved with AFM. The complementary use of VSI and AFM is therefore particularly advised for the quantitative characterization of scale-dependent phenomena (e.g. mineral surface roughness and biofilm spatial distribution). Additionally, the higher vertical scanning range of VSI allows to study crystal macro-steps, inaccessible with AFM. It is crucial to investigate such surface macro-features as they provide high-energy sites that might

## 16 Micro- and nanoscale techniques

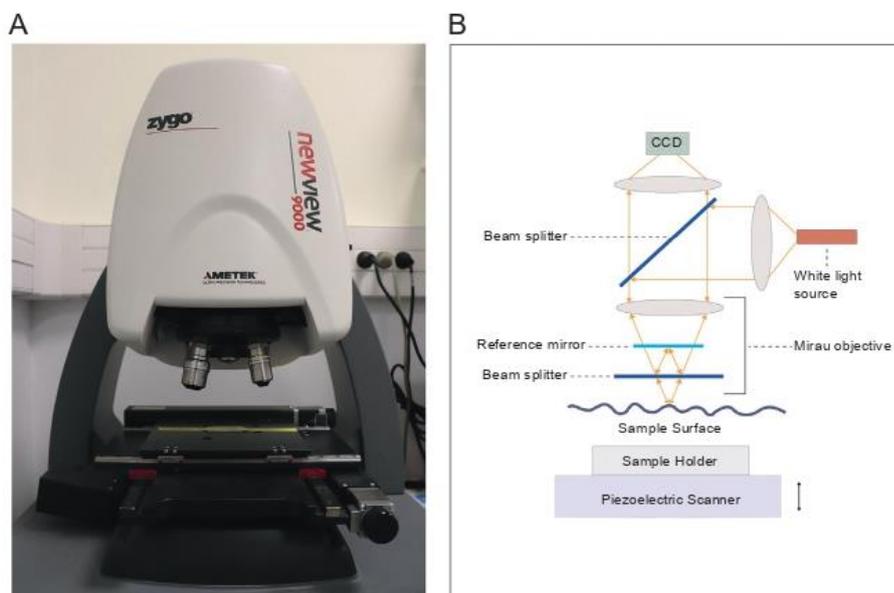


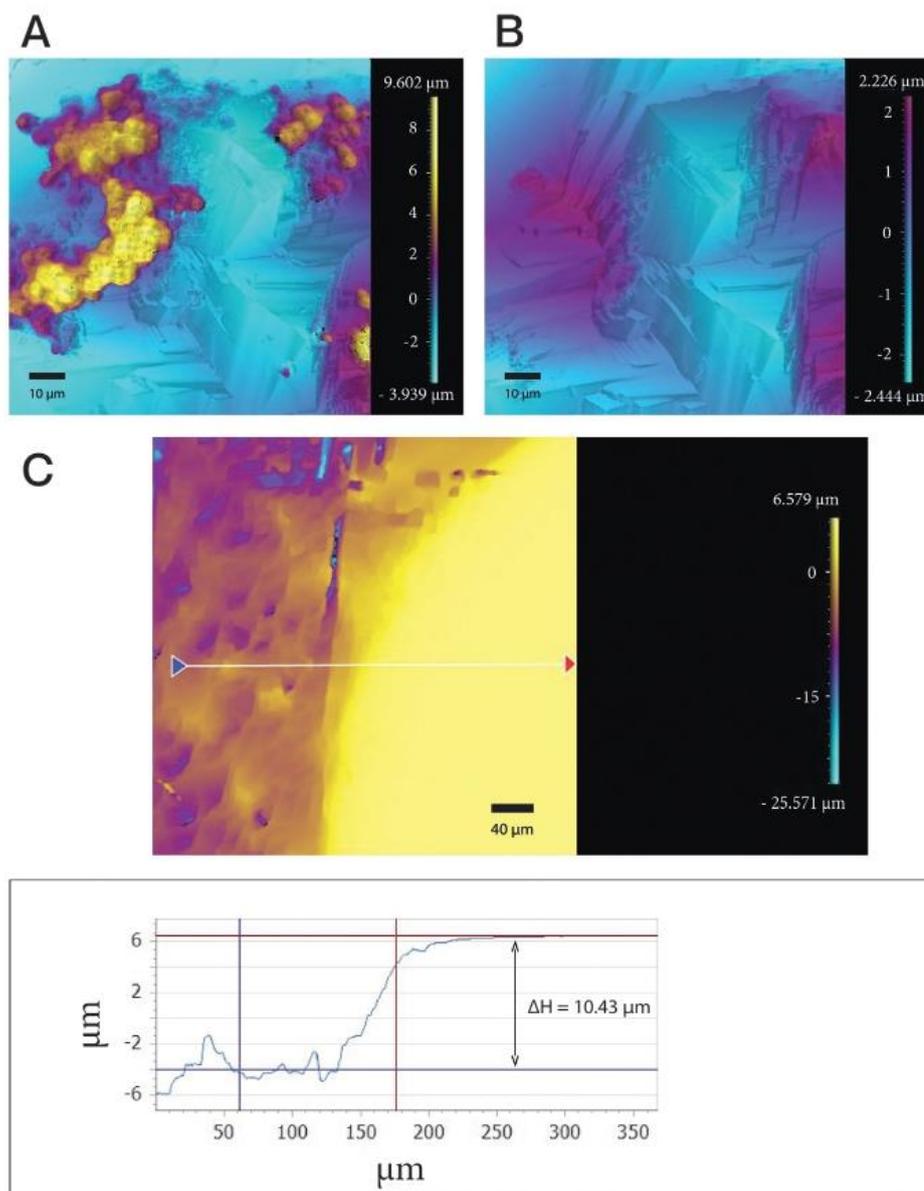
FIG. 5

(A) VSI apparatus, showing two Mirau objectives (10 $\times$ , 50 $\times$ ). Samples have to be placed on the working table aligned with the selected objective. The objective remains fixed, while the working table can move horizontally to find the desired location on the sample surface and vertically to find fringes on the surface, as controlled by the piezoelectric scanner. (B) Simplified scheme of VSI working principle with a Mirau objective. In this configuration, a beam is split into two beams, one reflected by a reference mirror built in the Mirau objective, the other reflected by the sample surface. Both beams are reflected back and will interfere with each other, producing an interferogram, which can be converted into a surface topography map.

Panel B: Adapted from Wu, D., Liang, F., Kang, C., & Fang, F. (2021). Performance analysis of surface reconstruction algorithms in vertical scanning interferometry based on coherence envelope detection.

Micromachines, 12(2), Art. 2. doi: 10.3390/mi12020164

favour microbial attachment (Davis & Lüttge, 2005). Lastly, AFM may be detrimental to the biofilms because of the invasive nature of the tip it uses to probe the sample. By contrast, VSI is non-invasive and non-destructive. In return, since VSI is optimized for non-biological opaque and/or thick (relatively to vertical scanning range) samples, great care must be taken in some specific cases, when interpreting potential microbe-mineral interactions. For example, Waters et al. (2009) used VSI to study the attachment of *Shewanella* MR1 on different substrates and showed how an optical artifact was generated when reflective surfaces were used, with the bacteria appearing as rod-shaped pits instead of cells attached on the surface (Waters et al., 2009). The authors interpreted such artifacts as the result of conflicting interferometric information between the light reflected from the top of the transparent bacterium and the light reflected from the surface underneath the cell. Interestingly,

**FIG. 6**

Example of VSI application to microbe-mineral interaction studies: topography data of a calcite surface colonized by a biofilm of *Chroococidiopsis thermalis* PCC 7203 cells after dissolution under alkaline conditions, before (A) vs after (B) physical removal of the cells. (A) Topography data of the calcite surface partially covered by the cells. The highest height values (i.e. mostly in the yellow color range) and arranged in circular shapes refer to the cells, whereas the lowest height values (i.e. mostly in the blue color range) refer to the calcite substrate surface. (B) Topography data of the calcite surface after physical removal of the cells. (C) Corresponding calcite surface normal retreat,  $\Delta H$ , measured as the relative height difference between an unreacted (reference) area and a dissolved area.

they suggested that, by modifying the VSI software recognition program, it may be possible to acquire separate heights data from the top of the cells and from the substrate underneath them. In principle, this would allow to directly track the dissolution of the substrate underneath the cells, without having to physically remove the cells. While this phenomenon could represent an opportunity, in other cases, the generation of such optical artifacts might lead to misinterpretations of the VSI output. Therefore, in the case of ambiguous results, validation of the final interpretations with AFM is recommended.

All so-far published geomicrobiology studies using VSI addressed mineral bio-dissolution and not bio-precipitation, although the latter should also be feasible. Regarding bio-dissolution, VSI was used to compare the effects on Fe-silicate dissolution of: (i) siderophores-only (high-affinity iron-chelating organic molecules); (ii) EPS-only; (iii) *Bacillus* sp., a siderophore- and EPS-producing microorganism, which necessitates Fe only as a micronutrient (Buss, Lüttge, & Brantley, 2007). The authors documented an increase in surface roughness whenever siderophores were present, alone or in *Bacillus* sp. biofilms. This was attributed to etch-pit growth, resulting from siderophore-promoted dissolution. Hence, it was concluded that the etch-pits formed in the presence of *Bacillus* sp. cells may be caused by siderophores concentrated in biofilms. Similarly, VSI was applied to assess the impact of *Shewanella oneidensis* MR-1 surface colonization on the dissolution of different carbonate phases (calcite —CaCO<sub>3</sub> vs dolomite —(Ca,Mg)CO<sub>3</sub>) through surface retreat measurements (Davis, Nealson, & Lüttge, 2007). The presence of *S. oneidensis* MR-1 cells was found to influence carbonate dissolution via two pathways with competing effects: (i) inhibition of dissolution and etch-pits growth through covering of mineral reactive sites by the cells; (ii) enhancement of dissolution through carbonate material excavation during irreversible attachment of the cells to the mineral surface. For calcite substrates, which are more soluble and faster-dissolving than dolomite substrates, inhibition prevailed, resulting in a biotic dissolution rate 40–70% lower than in the corresponding abiotic case. For dolomite, the enhancement due to carbonate material excavation by the cells during surface colonization prevailed, which led to an overall higher dissolution rate compared with the abiotic control. More recently, Wild et al. (2021) used VSI to estimate fungal contribution to silicate weathering rates in natural soils by measuring local depressions of the mineral surface right underneath the hyphae. In this case, they showed a local increase in olivine weathering, which they attributed to fungal hyphae of *Verticillium* sp.

The main current limitation in the application of VSI to biofilm-mineral interaction studies, is the requirement of a dry environment during acquisition of topography images, i.e., *ex situ* characterizations. In fact, the presence of any fluid other than air in between the objective and the sample would affect the optical path of the beam reflected from the sample surface. However, this limitation may be overcome by adding a 'compensating filter' in the path of the beam reflected from the reference mirror. This filter needs to be ad-hoc designed with a refractive index and a thickness that could compensate for the presence of an aqueous solution and a reactor cap in the

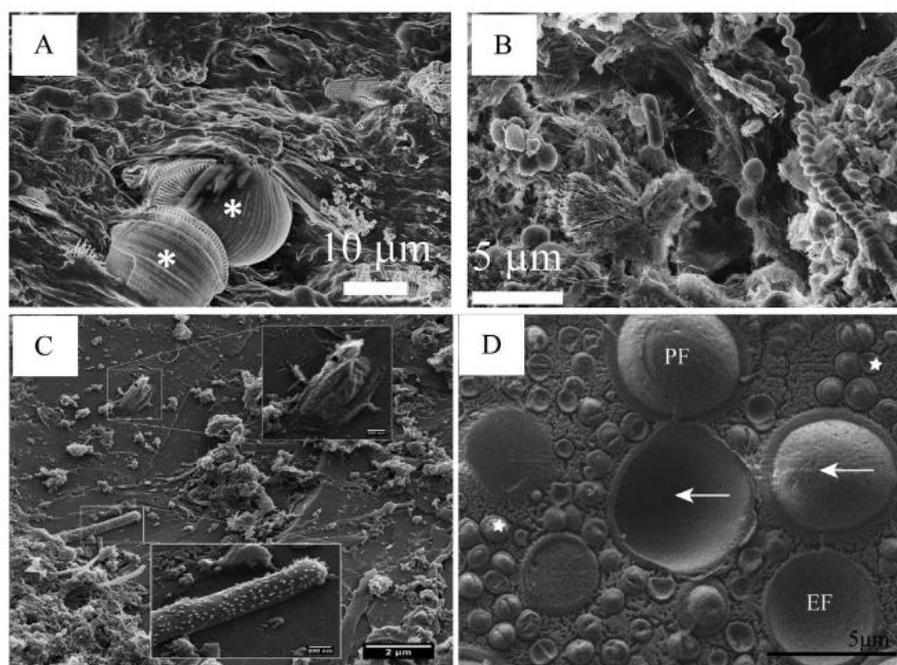
path of the beam reflected from the sample surface (Larimer et al., 2019; Larimer, Suter, Bonheyo, & Addleman, 2016). Such technical modification, although technically challenging, would make VSI in situ observations of biofilm-mineral interactions feasible.

## 6 Analyses of biofilm-mineral interactions down to the nanometre scale by scanning electron microscopy and helium ion microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) has been extensively used to investigate biofilms down to the nanometre scale. The reader is referred to several reviews for more details (Arunachalam & Davoodbasha, 2021; Erdman, Bell, & Reichelt, 2019; Henning & Adhikari, 2017), including some related to the study of biofilms (Azeredo et al., 2017; Perez, Lors, & Erable, 2022). In SEM, a primary electron beam is accelerated to a variable energy (generally between 1 or less keV and up to 30 keV) and focused on the sample down to  $\sim 1$  nm probe. The interaction between the electron beam and the sample generates multiple signals that can be simultaneously detected: (i) low energy secondary electrons (SE), the intensity of which primarily depends on topographic features and therefore provide surface-sensitive nanoscale morphological information; (ii) backscattered electrons (BSE) with an energy close to the primary electrons, with an intensity depending on the average electron density of the target, therefore providing some chemical contrast; (iii) X-rays emitted by fluorescence, detected by energy dispersive X-ray spectrometry (EDXS), the energy of which depends on the chemical elements composing the sample. EDXS provides a qualitative and semi-quantitative chemical analysis of the sample. For example, Debric et al. (2022) identified numerous mineral phases formed by microorganisms in microbialites based on the quantification and segmentation of million-pixel EDXS maps; (iv) various additional signals, such as luminescence visible light, Auger electrons, diffracted backscattered electrons, that can be also used as sources of crystallographic or chemical information. Overall, the study of biofilm-mineral interactions can exploit these diverse signals to the fullest. Moreover, some studies have shown the interest of using immunolabelling with electron-sensitive tags such as gold or silver, allowing to directly detect specific taxa (Gérard, Guyot, Philippot, & López-García, 2005; Schmidt, Eickhorst, & Mussmann, 2012; Ye, Nielsen, Joseph, & Thomas, 2015) or specific molecules (Goldberg, 2008) by SEM. In some cases, silver nanoparticles used for fluorescence in situ hybridisation (FISH) can also induce surface-enhanced Raman scattering (SERS) allowing further spectroscopic analysis of the targeted cells (Berg et al., 2020). Alternatively, a correlative approach between SEM and/or TEM and confocal laser scanning microscopy has been developed (Li et al., 2017). A few studies also advocated for the use of staining to better contrast diverse polymers, although it was also mentioned that some staining may induce transformation/dissolution of e.g., mineral sensitive phases (McCutcheon & Southam, 2018).

The spatial resolution achieved for the different signals generated by SEM is different, varying between 1 nm for SE and few hundreds of nanometres for X-rays, depending on the sample and primary electron energy. Several important limitations need to be considered when using SEM to investigate biofilm-mineral interactions: first, penetration depth is limited, from a few angstroms to a few micrometres in depth, depending on, e.g., the acceleration voltage, the considered signal, the electron density of the sample. In order to detect structures at different depth, the experimenter can vary the acquisition modes using e.g., BSE or SE imaging and/or changing the acceleration voltage. In any case, the interface between a biofilm and a mineral substrate might not be reachable unless the biofilm exists as a monolayer of cells. Then, one solution is to investigate cross-sections perpendicular to the substrate surface. Alternatively, some authors have physically removed biofilms to observe their impact on mineral surfaces. However, this approach should be carefully designed to limit artefactual modifications of the mineral surfaces. For example, [Buss, Brantley, and Liermann \(2003\)](#) tested different protocols to chemically or physically remove cells from mineral surfaces without altering the mineral surface underneath. A second limitation arises from the need to operate conventional SEM under high vacuum. As a result, biofilm samples need to be, first of all, dehydrated. Since simple air-drying induces severe artefacts (e.g. collapse, shrinking and/or wrinkling of the cells) ([Nation, 1983](#)), numerous protocols have been tested to mitigate these damages ([Fig. 7](#)). Among them, a combination of chemical fixation (e.g. glutaraldehyde, formaldehyde, or a combination of the two cross-link proteins and lipids to physically stabilise samples), ethanol dehydration and critical point drying has been favoured ([Montesinos, Esteve, & Guerrero, 1983](#); [Schädler, Burkhardt, & Kappler, 2008](#)). Yet, in several instances, this sample preparation technique has been shown to induce significant loss of mass from the biofilms and some textural transformations ([Dohnalkova et al., 2011](#)), and simple air-drying may sometimes be preferred ([Hynninen, Külaviir, & Kirsimäe, 2018](#)). Moreover, chemicals used in these protocols may modify mineral phases ([Li et al., 2016](#)). Several studies have compared different preparation protocols and also SEM vs environmental scanning electron microscopy (ESEM). Some studies concluded that ESEM was the best SEM for investigation of biofilms ([Little, Wagner, Ray, Pope, & Scheetz, 1991](#); [Weber, Delben, Bromage, & Duarte, 2014](#)) as it allows the analysis of hydrated samples with no prior deposition of a conductive layer. However, other authors noted that the spatial resolution with ESEM is more limited than with conventional SEM and that biofilms were excessively damaged by the electron beam during the observation, hence requiring only short exposure times ([Vila et al., 2017](#)).

Last, the use of cryo-approaches has been advocated as a particularly efficient way to nicely preserve biofilms structures ([Fig. 7](#)). In cryogenic preparations, samples are quickly frozen as a thin layer of vitrified water ([Dubochet & McDowell, 1981](#)). Cooling can be achieved by cryoplunging into liquid ethane for samples thinner than 10  $\mu\text{m}$  ([Kuo, 2007](#)) or freezing at high pressure in liquid ethane for samples with a thickness up to several hundreds of micrometres ([Hrubanova, Nebesarova, Ruzicka, & Krzyzanek, 2018](#)). This sample preparation reduces the diffusion of charges and molecular fragments produced by beam damages and preserves the

**FIG. 7**

(A) SEM image in the secondary electron mode of a biofilm at the surface of a microbialite from Lake Alchichica, which was air dried without fixation. Two diatoms (stars) clearly appear in the bottom part. Some round objects are visible as well but everything is molded by a continuous smooth film. (B) SEM image in the secondary electron mode of a microbialite from Lake Alchichica, which was fixed, dehydrated and dried by CPD. Fibrous minerals can be observed on the left and on the right. Cells (bacilli and cocci) are clearly visible with some long threads between cells. (C) Helium ion microscopy image of a biofilm found in sediments close to a hot spring vent in the Himalaya. Both insets show viral particles, appearing as tiny rugosities at the surface of dead host cells: the scale bars in insets are 200 nm. (D) Cryo-SEM image of mixed bacterial—*Staphylococcus epidermidis*/yeast—*Candida albicans* biofilm with a freeze-etching time of 7 min at  $-96^{\circ}\text{C}$ . Stars indicate cells of *S. epidermidis*, arrows cells of *C. albicans*.

Panel C: From Sharma, A., Schmidt, M., Kiesel, B., Mahato, N. K., Cralle, L., Singh, Y., Richnow, H. H., Gilbert, J. A., Arnold, W., & Lal, R. (2018). Bacterial and archaeal viruses of himalayan hot springs at manikaran modulate host genomes. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3095. doi: 10.3389/fmicb.2018.03095. Panel D: From Hrubanova, K., Nebesárova, J., Ruzicka, F., & Krzyzanek, V. (2018). The innovation of cryo-SEM freeze-fracturing methodology demonstrated on high pressure frozen biofilm. *Micron*, 110, 28–35. doi: 10.1016/j.micron.2018.04.006.

native hydrated state of biofilms. A first approach described by Vila et al. (2017) consists of performing cryofixation before freeze-drying. Then, samples can be analysed in a conventional SEM at room temperature. These authors showed that cryo-based preparation of biofilms preserved the ECM and the cells much better than a room temperature glutaraldehyde-based protocol. By analysing cyanobacteria-dominated biofilms precipitating Mg-carbonates (hydromagnesite), McCutcheon

and Southam (2018) also concluded that cryofixation, followed by cryo-substitution before resin embedding, was the best protocol. Last, cryo-SEM observations on plunge-frozen (Kuo, 2007) or high-pressure frozen (Hrubanova et al., 2018) samples appear to be the best approach for preserving the architecture of the biofilms (Alhede et al., 2012) and assemblages of biofilm with minerals such as nanoparticles of zero-valent Fe (Wille et al., 2017). However, the use of low voltages to keep electron doses low limits the versatility of achievable analyses, e.g., EDXS mapping. Future developments in this regard and/or correlation with chemically sensitive cryo-compatible analyses, such as cryo-micro-XRF (Gräfenstein et al., 2022; Rumancev et al., 2020) or cryo-NanoSIMS (Jensen et al., 2016), will be crucial for investigating biofilm-mineral interactions under close to native conditions.

Last, scanning helium-ion microscopy (HIM), an imaging technique close to SEM in terms of capabilities, appears promising for future studies of biofilm-mineral assemblages (Schmidt, Byrne, & Maasilta, 2021). This microscopy uses helium ions instead of electrons as a primary beam and provides several advantages over SEM: a spatial resolution better than SEM (down to 0.24 nm), a higher surface sensitivity, a larger depth of field (i.e. the distance between the nearest and the furthest objects that are in focus), and an efficient way to image non-conductive samples based on using a charge-compensating electron flood gun. Nordhoff et al. (2017) and Byrne, Schmidt, Gauger, Bryce, and Kappler (2018) studied the precipitation of Fe-mineral phases by bacteria using both HIM and FEG-SEM and confirmed the clear advantages of HIM. Sharma et al. (2018) studied field-collected microbial mats by HIM and demonstrated the possibility of revealing diverse virus morphotypes infecting bacteria (Fig. 7).

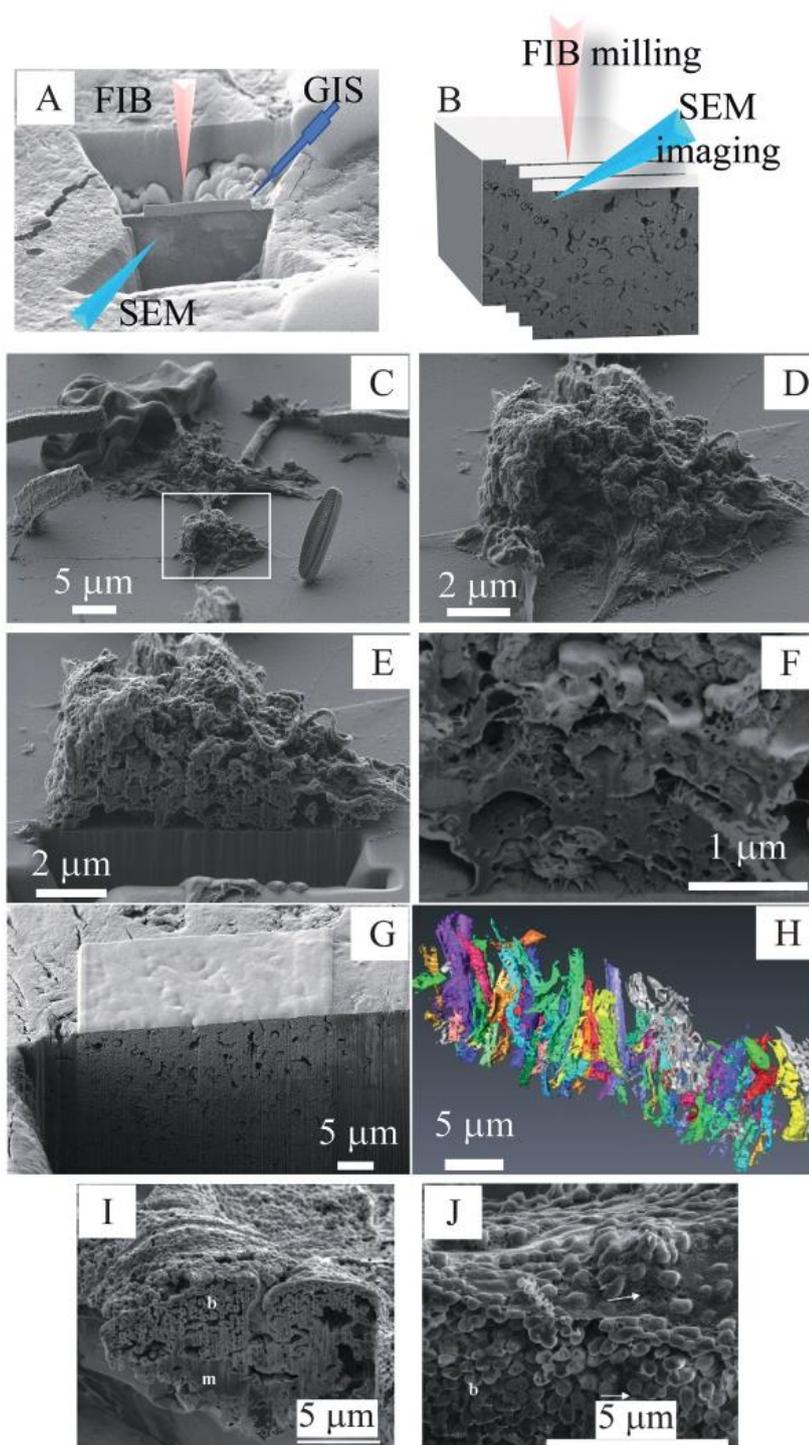
However, they also mentioned one current disadvantage: the lack of analytical detectors for elemental quantification, such as EDXS. To compensate for this issue, Lybrand et al. (2019) combined HIM and SEM to capture both high-resolution images and elemental maps on the same areas of fungi weathering silicate minerals. Alternatively, LeTourneau et al. (2018) combined HIM and NanoSIMS to study the development of biofilms.

Moreover, Schmidt et al. (2021) noted recent analytical developments aiming at collecting secondary ions sputtered from the samples when scanned with the primary ion beam, in an ion microprobe (e.g. NanoSIMS) fashion. This offers the capability of elemental imaging with low detection limits, such as Fe mapping in cells (Lovrić et al., 2022). Similarly, ionoluminescence, i.e., the emission of light in the visible range following helium ion bombardment, could be used for specific applications, possibly including labelling (Sato, Sato, & Ogawa, 2018).

---

## 7 Focused ion beam milling for TEM sample preparation and 3D nanoscale investigation of biofilm-mineral interactions

Focused ion beam milling uses an ion primary beam, usually  $\text{Ga}^+$ , accelerated at a variable energy (between, e.g. 1 and 30 keV) and focused on the sample down to a few-nanometre-sized spots (Fig. 8A). Depending on the energy and intensity of the primary beam, different types of beam-sample interactions occur: sample can be

**FIG. 8**

(A) Cutting of a TEM lamella by FIB. Slice and view analysis of a biofilm grown on a coverslip by FIB-SEM. The  $\text{Ga}^+$  ion beam is focused over a nm-sized spot (red beam).

(Continued)

## 24 Micro- and nanoscale techniques

milled by ion sputtering; secondary electrons (as well as secondary ions) can be generated and used to produce images; last, metallic layers can be deposited by locally cracking with the ion beam a gaseous organometallic precursor introduced over the sample by a gas injection system. The ion gun used for FIB milling is usually coupled with an electron gun within the same microscope (FIB-SEM), providing a dual beam system that allows both ion beam milling and SEM imaging.

Multiple reviews detail the principles of focused ion beam milling and its application to biology and Earth science (Grandfield & Engqvist, 2011; Heaney, Vicenzi, Giannuzzi, & Livi, 2001; Kizilyaprak, Daraspe, & Humbel, 2014). Overall, FIB-SEM provides valuable information down to the nm-scale about the morphology and ultrastructure of biofilm-mineral assemblages as well as an accurate assessment of the total volume of objects. One significant advantage is that the milling capabilities offer a unique opportunity to excavate and image deep regions of a biofilm in contrast to SEM.

A first use of FIB consists of preparing electron-transparent lamellae cut across micrometre-sized features and selected with SEM (Fig. 8A). These lamellae can then be studied at higher spatial resolution by transmission electron microscopy and/or any high-resolution technique that can make use of such lamellae, such as scanning transmission X-ray microscopy (STXM), nano-IR, or nanoSIMS (Carpenter et al., 2013; Phan et al., 2022; Weber et al., 2010; Zeyen et al., 2015). FIB milling is particularly interesting to slice biofilm-mineral assemblages as it is not affected by the issues

**FIG. 8—Cont'd**

The electron beam is focused on the FIB excavated lamella for SEM imaging (light blue beam). The gas injection system (GIS) allows depositing e.g., a platinum strap observed at the top of the lamella. (B) Sketch of FIB tomography. Slices are serially cut by FIB and imaged by SEM. (C) Low magnification ion image of microorganisms colonizing a coverslip incubated in an aquarium. Several diatoms are visible on the image (e.g. in the lower right). (D) Ion image of a cluster of cells mixed with minerals as outlined in (C). (E) Ion image of the same cluster after FIB slicing. A trench has also been excavated in the coverslip substratum. (F) Back-scattered electron imaging of the section of the cell cluster. Fibrous objects (likely EPS) can be observed. (G) Ion image of a wall excavated by FIB milling after deposition of a rectangular platinum strap at the surface of a microbialite sample (see Zeyen et al., 2015 for more details). Some platinum was redeposited on the vertical wall below the strap as shown by the brighter appearance. Slices are milled and the wall is imaged successively so that the block is fully imaged, allowing 3D reconstruction. (H) 3D reconstruction obtained from the slice and view analysis of the block shown in (G). Here the microbial filaments appearing in dark on (G), embedded in brighter minerals were segmented and colored. (I) and (J) FIB-SEM images of a biofilm grown on leaves. The biofilm is marked as (b), while (m) shows an unidentified solid mass. A fibrillar-like extracellular matrix and bacterial cells are shown by arrows.

From Wallace, P. K., Arey, B., & Mahaffee, W. F. (2011). *Subsurface examination of a foliar biofilm using scanning electron- and focused-ion-beam microscopy*. *Micron*, 42(6), 579–585. doi: 10.1016/j.micron.2011.02.003.

faced by ultramicrotomy such as shattering at soft-hard interfaces, or compressions of the cell structures. Among several issues, FIB milling can induce amorphization at the surface of milled minerals, with the thickness of the amorphous layer depending on beam energy (Obst, Gasser, Mavrocordatos, & Dittrich, 2005). To limit this problem, samples can be first milled at relatively high currents before a final polishing stage using low currents and beam energies. This cleaning stage also minimizes the ‘curtaining’ effect, which produces vertical grooves or striations at the lamella surface, especially in heterogenous samples. Overall, it is possible to preserve cell-mineral interfaces at least in some cases. For example, early on, Benzerara, Menguy, Guyot, Vanni, and Gillet (2005), Benzerara, Yoon, Menguy, Tyliczszak, and Brown (2005) produced an electron-transparent lamella cut across a fungus cell grown over a silicate grain. This lamella was then investigated by high-resolution TEM and STXM, evidencing the formation and dissolution of minerals triggered by this cell and the onset of a chemical microenvironment. Carlut et al. (2010) studied the weathering of basalts by sulphate-reducing bacteria using FIB milling to prepare ultrathin sections. They suggested that some iron minerals (magnetite) were altered at distance by the cells, following metabolically induced chemical shifts in the solution. They also showed that deposition of platinum at the top of the sample before milling was accompanied by significant deposition of an organic polymer that is initially part of the organometallic precursor and showed a specific XANES signature (see Section 9). Since then, FIB milling has been applied for numerous mineral-biofilm interaction studies (Couasnon et al., 2019; Johannessen, McLoughlin, Vullum, & Thorseth, 2020; Templeton et al., 2009; Toner et al., 2009; Welikala, Al-Saadi, Gates, Panter, & Raman, 2022). Currently, efforts are invested in cryo-approaches aiming to preserve cells under as-native-as-possible conditions. For example, Hayles and De Winter (2021) provided numerous tips about how to cryo-FIB samples with appropriate adaptations necessary for running under cryo conditions as well as a list of studies that used FIB for milling biological samples. Parmenter and Nizamudeen (2021) presented a detailed protocol allowing to successfully cut TEM lamellae across biological samples by cryo-FIB. Melia et al. (2021) cut a TEM lamella across a plunge-frozen biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* that they subsequently studied at high resolution by cryo-TEM.

Alternatively, FIB-SEM can be used to slice and view samples and therefore observe with greater detail what is contained within objects (Fig. 8B–H). For example, Li et al. (2020) imaged the interface between a biofilm of sulphate-reducing bacteria and the bacterially-corroded carbon steel coupon on which they grew. Similarly, Wallace, Arey, and Mahaffee (2011) produced beautiful images of biofilms growing on leaves by FIB-SEM (Fig. 8I and J). They mentioned that samples should be embedded in resins to improve the preservation of fine ultrastructural details. Although their samples were affected by the curtaining effect, they did not clean striations as they did not interfere with their observations. Furthermore, this slice and view approach can be conducted in a systematic manner to obtain a 3D reconstruction of a biofilm with a nanoscale resolution (Fig. 8H). In this case, a block usually measuring  $\sim 1000 \mu\text{m}^3$  is prepared. Then, sections as thin as 3 nm are milled away, and the freshly uncovered plane is imaged. By repeating this multiple times,

## 26 Micro- and nanoscale techniques

one can generate a 3D dataset. In this way, Berleman et al. (2016) evidenced EPS microchannels in resin-embedded and ruthenium red-stained biofilms of *Myxococcus xanthus* with a voxel size of  $10 \times 13 \times 20 \text{ nm}^3$ . Several alternative approaches have been conducted to obtain tomograms on biological samples (McGlynn et al., 2018). Keren-Paz et al. (2022) imaged in 3D biofilm-calcite assemblages using microCT X-ray analyses, allowing them to reconstruct the 3D volume of a sample measuring  $\sim 1.5 \text{ mm}$  laterally and few hundreds of micrometres in thickness with a voxel size of  $0.87 \mu\text{m}$ . While this approach has a lower spatial resolution, it can be interesting for characterizing larger volumes of samples. Interestingly, Schmid et al. (2014) compared tomographies provided by FIB-SEM, TEM, CLSM and STXM applied on the same Fe-oxide mineralizing bacteria. They detailed advantages and disadvantages of each technique. As mentioned before, dehydration and chemical processing of the samples can cause some artifacts. Cryo-FIB has been employed for 3D reconstruction of biological samples. For example, Kumar, Rechav, Kaplan-Ashiri, and Gal (2020) imaged in 3D high-pressure-frozen diatoms using cryo-FIB with a lateral pixel size between 12.0 and 18.0 nm, and a slice thickness of 12.0 or 16.25 nm. They also mapped elemental distributions by EDXS on one block section. Varsano and Wolf (2022) and Lei et al. (2022) recently reviewed the use of cryo-imaging in 3D for biological and biomaterial studies.

Ga-based FIB shows several limitations: there can be significant ion implantation into the sample, and the ablation rates remain relatively limited, preventing the milling of large volumes at least in a fast manner. Several recent studies have used an inductively coupled plasma generated from noble gases such as argon or xenon in an apparatus called plasma FIB (pFIB). This achieves much higher ablation rates and therefore removes larger volumes of materials in a shorter time. Moreover, there is reduced ion implantation. Based on this, Dumoux et al. (2022) showed that they could generate 3D volumes of cryo-prepared photosynthetic bacteria with a resolution better than 50 nm. More than a dozen cells were analysed in their dataset acquired in  $\sim 2.5 \text{ h}$ . Additionally, Berger et al. (2022) produced 20 high-quality 250-nm-thick lamellae per day by pFIB in an unsupervised process. Lamellae were cut across eukaryotic cells before being analysed by cryo-TEM tomography, providing resolutions better than  $4.9 \text{ \AA}$ .

## 8 Transmission electron microscopy (TEM) to study biofilm-mineral interactions

In transmission electron microscopy (TEM), electrons accelerated at relatively high voltages (usually between 80 kV and up to 300 kV or more) are condensed onto thin samples (usually  $< 100 \text{ nm}$  thick), transmitted through the specimen, then pass through the objective and projector lenses to form a highly magnified image. Following interactions between electrons and the sample, a variety of signals are generated such as unscattered electrons, elastically or inelastically scattered electrons, X-rays, or visible photons. Overall, TEM provides images of cells and polymers as well as

elemental mapping (EDXS), elemental speciation (by electron energy loss spectroscopy or EELS), and determination of mineral structures and crystallographic orientations down to the atomic scale (Miot, Benzerara, & Kappler, 2014; Pósfai, Kasama, & Dunin-Borkowski, 2013). TEM can also be operated in the scanning transmission electron microscopy (STEM) mode, in which a beam of electrons is focused to form a probe that is raster-scanned across the sample under investigation (Nellist, 2019). More details regarding TEM basic principles and technical details can be found elsewhere (Inkson, 2016). Overall, TEM counts numerous applications in the field of Earth science as it has been a choice technique to characterize finely the crystallography of mineral phases and evidence crystal defects and/or nanoscale chemical heterogeneities, indicative of the conditions under which they form (Elsass, 2006). In parallel, it has been a choice technique for structural biologists, who, by imaging a large collection of single particles, managed to determine the 3D structure of proteins with a near atomic resolution (Yip, Fischer, Paknia, Chari, & Stark, 2020). Because of the intrinsically different nature of their targets, the latter scientific community uses TEM quite differently, mostly based on low electron dose imaging of cryogenized samples. In parallel, cell biologists have also improved sample preparation, for example with cryo-EM of vitreous sections (CEMOVIS), in order to provide a detailed ultrastructural picture of cells at the submicrometre level (Miot, Maclellan, Benzerara, & Boisset, 2011). All these applications are relatively cutting-edge and require a specific expertise. As a result, since the study of biofilm-mineral interactions requires the characterization of both mineral and organic phases, the need for a double expertise as well as a trade-off appears: going to low dose and cryo- to better preserve cells and organic polymers assemblages, or favouring higher doses to achieve sufficient signal-to-noise and get meaningful chemical and structural analyses of solids. Studies in the field of geomicrobiology are usually performed by multi-analytical room temperature TEM analyses and sometimes by cryo-TEM. Great progress has been made over the past few years in developing efficient protocols to preserve geobiological specimens (i.e. biofilm structure, mineral precipitate structure, and redox state) during sample preparation (McCutcheon & Southam, 2018). Because TEM analyses require thin samples, much effort has been invested in sample sectioning, such as ultramicrotomy, although this tool remains challenging for bio-geological samples including hard and soft objects (Miot et al., 2014; Obst et al., 2005). Another approach consists of dispersing cells from biofilms, but in that case all spatial arrangement is lost. As detailed before, an alternative approach is the use of Focused Ion Beam (FIB) milling. Last, the correlation of TEM with other analytical tools, such as epifluorescent microscopy and NanoSIMS, is another promising route (Loussert-Fonta et al., 2020).

Despite these issues, TEM has become one of the most important techniques to study mineral-microbe interactions, at least for planktonic cells (Balogh-Brunstad, Smart, Dohnalkova, Saccone, & Smits, 2020). The versatility offered by its different modes, along with the possibility of correlating it with chemical and mineralogical analyses at high spatial resolution, makes it a powerful tool to study biomineralization (Daye, Higgins, & Bosak, 2019). For instance, Gorlas et al. (2022) used the

different pieces of information provided by TEM to show how the mineralization of iron sulphides helps *Thermococcales* to survive under extreme conditions. More specifically, they used selected area electron diffraction (SAED) and high resolution TEM (HRTEM) to observe the formation of a matrix of aggregated spherules of euhedral nanocrystals of pyrite and greigite. In addition, they used STEM, coupled with EDXS, to show how the biofilm-forming cells were surrounded by a mineral matrix mainly composed of iron phosphates. Lastly, they used cryo-TEM, coupled with point EDXS analyses, to visualize single cells and the corresponding elemental composition. TEM has commonly been applied with equal success to bioweathering studies (Benzerara, Menguy, et al., 2005; Bonneville et al., 2009; Breitenbach et al., 2022). As an example, it is worth mentioning how the application of FIB-TEM/HRTEM + EDXS enabled to unravel the enhancing contribution given by fungal biofilm to olivine dissolution (Gerrits et al., 2021). In the abiotic control, a 25-nm thick continuous amorphous layer, inhibiting dissolution, i.e., a passivating layer, was evidenced. By contrast, this passivating layer was absent when crystals were incubated with *Knufia petricola* A95. In the latter case, the surface right underneath the fungal biofilm remained mostly crystalline and was strongly etched and weathered, indicating enhanced olivine dissolution. Benzerara, Menguy, et al. (2005), Benzerara, Yoon, et al., 2005 correlated TEM imaging, SAED, EDXS and EELS analyses with synchrotron-based scanning transmission X-ray microscopy (STXM) to measure speciation of Fe, C, Ca, C and O by XANES spectroscopy in an environmental assemblage of fungi grown on pyroxene crystals. They also suggested enhanced mineral dissolution together with calcium carbonate precipitation associated with the extracellular polymers produced by the microorganisms. Similarly, Bonneville et al. (2009, 2011) combined high resolution TEM, SAED, EDXS and STXM analyses to show accelerated alteration of some silicates by fungi. They observed that mechanical distortion of the crystal structure followed Fe oxidation and allowed enhanced chemical alteration (Bonneville, Bray, & Benning, 2016). By contrast, using a similar approach, Ward et al. (2013) surprisingly did not detect any measurable alteration of silicates by the cyanobacterium *Hassallia byssoidea*.

Besides, TEM has been used to document the mechanisms by which some rocks-inhabiting cyanobacteria can live in hyperarid deserts by extracting structurally ordered water from gypsum crystals, inducing a phase transformation from gypsum ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) to anhydrite ( $\text{CaSO}_4$ ) (Huang et al., 2020).

Considering the prevalence of water in biofilm-mineral assemblages, the ability to make direct observations of geobiological samples under physiologically and/or environmentally relevant conditions (i.e. wet conditions) is an undeniable advantage. Liquid cell scanning transmission electron microscopy (LC-STEM) potentially makes this possible (Han & Porter, 2020). Recently, Couasnon et al. (2020) developed a LC-STEM system to study the role played by bacterial cell surface charges and exopolymers in extracellular Mn mineralization. They imaged cells of two mutants of *Escherichia coli* (i.e. *E. coli* K12 MG1655, carrying an MGF- $\Delta traD$  plasmid responsible for the production of proteinaceous F pili that promote cell surface contact, and *E. coli* 1094 2K7, characterized by enhanced production of cellulose around the bacterial cell) in a time-resolved mode by LC-STEM. They documented that

homogeneous Mn-mineralization was favoured by the mutant characterized by enhanced surface contact (and hence biofilm production) due to the high density of negatively functional groups, which provided binding sites for cation adsorption. By contrast, the other mutant, which produced more cellulose around its cells, had lower nucleation sites at the cell surface and showed reduced growth of Mn-mineral islands. One general limitation of LC-STEM experiments is the unlikelihood of keeping cells physiologically active while exposed to a very high cumulative electron dose (significantly higher than  $10^{-5} \text{ e}^- \text{ A}^{-2}$ ). Nonetheless, the ability offered by LC-STEM systems to visualize geobiological samples in aqueous media at the submicrometric scale is certainly a major step forward in the direction of investigating biofilm-mineral interactions under more relevant conditions.

## 9 Characterizing chemical element distribution and speciation in biofilm-mineral assemblages by spectroscopies

The mapping of chemical elements can be achieved by SEM-EDXS. However, the detection sensitivity remains limited and the speciation of the elements (e.g. redox state, type of bonding with same or other elements) cannot generally be determined. STEM-EDXS offers further insight with a similar detection limit but at a higher spatial scale. Moreover, SAED and EELS provide additional sources of information about the mineral phase and the speciation of the elements. However, in this case, the analysis remains limited to a small volume of sample. Several other techniques provide chemical information (concentration and/or speciation) at the micrometre to submicrometre-scale: synchrotron-based X-ray fluorescence and X-ray spectroscopy, as well as vibrational spectroscopies such as Raman spectroscopy and micro- and nano-IR spectroscopy.

The application of vibrational spectroscopies (Raman and IR) to the study of biofilms has been recently reviewed by [Sportelli, Kranz, Mizaikoff, and Cioffi \(2022\)](#). In Raman microspectroscopy, a laser (e.g. in the UV, green or near infrared) is focused on the sample, down to a spot of  $\sim 1 \mu\text{m}$ . Most light is scattered by the sample elastically, contributing to the Rayleigh scattering. However, a small part of the light can be scattered inelastically by the so-called Raman effect. Most often, one measures light scattered at higher wavelength (Stokes scattering) as it is more intense. The Raman shift away from the excitation wavelength is characteristic of the vibrational modes of molecules and allows fingerprinting molecules and in some cases mineral structures. Raman spectroscopy has been extensively used in Earth sciences to characterize and map mineral phases at the microscale ([Nasdala & Schmidt, 2020](#)). It has also been used to characterize organic molecules and microorganisms ([De Gelder, De Gussem, Vandenabeele, & Moens, 2007](#); [Singh et al., 2022](#)). Interestingly, Raman can be operated under wet conditions, allowing minimal sample preparation and preservation of native conditions and therefore appears very appropriate for the study of mineral-biofilm assemblages. However, the Raman signal is usually relatively weak and can be overwhelmed by fluorescence, especially when pigmented microorganisms are present. For the first issue, surface enhanced Raman

## 30 Micro- and nanoscale techniques

spectroscopy (SERS) has been developed. It consists of mixing samples with metal (e.g. gold and/or silver) nanoparticles, resulting in a significant increase of the Raman signal for molecules adsorbed on nanoparticles (Akanny, Bonhommé, Bessueille, Bourgeois, & Bordes, 2021). For the fluorescence issue, some authors have used a photo-bleaching pre-step (Wei, Chen, & Liu, 2015). However, Pätzold, Keuntje, and Anders-von Ahlften (2006) showed that this procedure could also alter the Raman spectrum. Alternatively, time-resolved Raman can be used in some cases when fluorescence has a much longer life-time than the Raman signal (Wei et al., 2015).

Infrared spectroscopy measures the absorption of light, usually in the near-IR region ( $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ ). In this range, absorption bands are usually related to fundamental vibrations and rotational-vibrational structure of molecules and can be used as fingerprints of specific organic and inorganic functional groups. For example, lipids, proteins, polysaccharides have well-defined vibrational modes in the infrared range (Ojeda & Dittrich, 2012). A variety of mineral phases can also be identified by infrared spectroscopy (Farmer, 1974). While standard laboratory FTIR microscopes provide spatial resolutions of several micrometres (Kazarian & Chan, 2006), there are now several systems that can achieve unprecedented spatial resolutions. For example, Cheeseman et al. (2021) used synchrotron-based FTIR to map biofilms with a pixel size of 500 nm. The penetration depth of infrared light was lower than  $2\text{ }\mu\text{m}$ . By collecting thousands of spectra on the biofilms of three different species and analysing them by principal component analysis (PCA), they were able to show clear differences between the FTIR spectra of the three species, especially based on signals related to polysaccharides. Alternatively, AFM-IR, which combines atomic force microscopy (AFM) and infrared (IR) spectroscopy, has been increasingly used recently to investigate IR absorption down to the 50-nm scale (Schwartz, Jakob, & Centrone, 2022). This technique consists of irradiating a sample with a tunable IR laser. When the wavelength of the IR laser corresponds to some absorption band of the sample, the absorbed light is converted into heat and some induced thermal expansion of the probed area, which is detected by an AFM tip. As a proof of concept, Dazzi et al. (2012) showed that the light absorption of a single *E. coli* cell at different wavenumbers as measured with AFM-IR was consistent with FTIR spectra measured on *E. coli* biofilms. Barlow et al. (2016) also showed good agreement between AFM-IR and FTIR spectra of 200-nm-thick *P. protegens* monolayer biofilms. While these spectacular advances in spatial resolutions open promising perspectives in the study of biofilm-mineral assemblages, one limitation as encountered for other techniques, such as electron microscopy, is that IR absorption by water is very high and therefore samples may have to be dried beforehand.

Apart from vibrational spectroscopies, synchrotron-based X-ray spectroscopy also provides a powerful way to investigate the spatial distribution of chemical elements as well as determine their speciation. X-ray fluorescence micro- or nano-probes illuminate samples with a focused X-ray beam that can be as small as 50 nm. When the incident photon energy exceeds the binding energy of electrons in atoms, there is an increase in X-ray absorption followed by X-ray fluorescence emission upon deexcitation. The energy of the emitted X-rays is characteristic of the chemical elements and

their intensity is related to the atomic content of the probed volume (Lider, 2018). The detection limit can be very low allowing to map elements at trace concentrations at the single cell scale (Kemner et al., 2004; Zhu, Zhang, Li, Zhang, & Fan, 2017). This method has also been used to map the distribution of chemical elements in biofilms (Glass et al., 2018; Majumdar et al., 2012; Wilke et al., 2015). XRF offers specific advantages compared with other techniques: a limited sample preparation with the possibility to study samples under ambient environmental conditions, including wet conditions; simultaneous multi-elemental analyses; long penetration depth, which depending on the excitation beam and the mass absorption of the sample can reach several tens or hundreds of micrometres. This can be exploited to conduct three-dimensional analyses using tomography, although these techniques have not yet been widely applied on biofilms (Majumdar et al., 2012; Rumancev et al., 2020); a relatively high spatial resolution, now approaching few tens of nanometres; a high sensitivity. Last the tunability of the synchrotron X-ray beam offers the possibility to conduct X-ray absorption spectroscopy (XAS) analyses such as X-ray absorption near edge structure spectroscopy (XANES) or extended X-ray absorption fine structure spectroscopy (EXAFS), which inform about the speciation of specific elements (e.g. oxidation state) and local structures (Templeton & Knowles, 2009). For example, Chevrier et al. (2022) identified and mapped iron storage within bacteria at the single-cell scale. Templeton, Spormann, and Brown (2003) used EXAFS on biofilms of *Burkholderia cepacia* grown on goethite (FeOOH) substrates and incubated in solutions containing varying concentrations of lead. They demonstrated the formation of a Pb-phosphate phase within the biofilms, which was unexpected since there was no phosphate in the incubation solution, suggesting some recycling within the biofilm. Even more impressively, X-ray fluorescence, and grazing-angle X-ray absorption spectroscopy can be used to probe the contact zone between biofilms and their mineral substrate at the angstrom to nanometre scale, using long-period X-ray standing waves. By collecting fluorescence yield spectra as a function of the incidence angle, it is then possible to probe the vertical distribution of elements. This was applied by Templeton, Trainor, Traina, Spormann, and Brown (2001) on biofilms to see the vertical distribution of Pb. They showed that high energy sites on mineral substrates on which biofilms were grown were not passivated (i.e. kept the same reactivity) despite cell attachment. Similarly, Wang et al. (2016) determined whether the surface of the mineral substrates or *S. oneidensis* biofilms were the dominant sinks for zinc and lead depending on their concentrations in the solution as well as the mineralogical identity of the substrate. As for other already mentioned techniques, cryogenic setups for the analysis of biological samples with XRF have been recently developed (Kapishnikov et al., 2017). For example, Rumancev et al. (2020) showed the possibility to map trace elements with high sensitivity in thin frozen hydrated biological specimens, obtaining a scan of  $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$  with a 400 nm pixel size in  $\sim 10$  min. The application of this approach to biofilms and the increasing acquisition rates of XRF maps offer great perspectives for the characterization of both the organic and the inorganic components under native conditions and over large areas in biofilm-mineral assemblages.

In conclusion, there is a wide diversity of techniques available to characterize mineral-biofilm interactions (Table 1). The choice of using one instead of another

**Table 1** Summary of the analytical techniques that can be used to study biofilm-mineral assemblages at the micro- and nanoscale.

Technique	Lateral resolution	Sample depth-penetration	Field of view	Main information provided on mineral-living interactions	Advantages	Limitations
CLSM	250 nm down to tens of nm	200 $\mu\text{m}$	$\text{mm}^2$ up to $\text{cm}^2$ with stitching	Cellular compartments/ specific molecules imaging via staining, specific mineral-taxa relations detection. Chemical gradients	High lateral resolution, several channels visualization, versatile, 3D-reconstruction, time-lapse imaging	Low penetration depth, long-time acquisitions, phototoxicity, staining
Multi-photon LSM	0.7 $\mu\text{m}$	1 mm	<1 $\text{mm}^2$	Molecular relationships between mineral and microorganisms	Deep samples imaging, less photobleaching than CLSM	Limited access to the machine; complex operation
OCT	Few $\mu\text{m}$	Few mm	Few $\text{mm}^2$	3D biofilm structure reconstruction, bulk-biofilm interactions imaging over time	Large area imaging, fast, no-staining, real-time, non-destructive, long-time experiment	Effects of shades, low spatial resolution
AFM	30 nm	10 $\mu\text{m}$	100 $\mu\text{m}^2$	Biofilm-minerals topography imaging, mechanical properties assessment of biofilm-mineral assemblages	Ultra-high-resolution, in situ imaging of biofilm-minerals assemblages under wet conditions	Low vertical scanning range, tip could be invasive for biofilm integrity
VSI	360 nm	1 mm	$\text{mm}^2$ up to $\text{cm}^2$ with stitching	Biofilm-minerals topography imaging, dissolution/precipitation rates of minerals, biofilm coverage assessment	High-resolution, large field of view, non-invasive for biofilm integrity	Limited lateral resolution, optical artefacts, in situ imaging of biofilm-minerals assemblages under wet conditions only possible with ad-hoc design of an optical compensating filter

## ARTICLE IN PRESS

SEM	1 nm at best, depends on detected signal	Few hundreds of nm	100 $\mu\text{m}^2$ up to $\text{cm}^2$ with stitching	Surface biofilm morphological information; qualitative and semi-quantitative elemental composition of biofilm-mineral assemblages	Imaging with high-resolution	Drying and coating of samples, limited penetration-depth, high-vacuum required
HIM	0.24 nm	Few nm	100 $\mu\text{m}^2$	Same as SEM except for chemical analyses	Ultra-high spatial resolution, high surface sensitivity, non-conductive samples imaging	No elemental quantification
TEM	Atomic scale	<200 nm	Few $\mu\text{m}^2$	Ultrastructural view of cells at the nanoscale; crystallographic orientations imaging; nanoscale chemical biofilm heterogeneities visualization	Ultra-high lateral 2D resolution imaging, elemental speciation	Sample preparation, thin samples required, trade-off needed between low dose/cryo- and high dose
FIB	1 nm	Tens of $\mu\text{m}$	100 $\mu\text{m}^2$	Biofilm/mineral in 3D; sample prep for TEM	High-resolution cross-sectional analyses, 3D sample visualization	Ion beam damages such as amorphization of mineral, sample preparation
Nano-XRF, nano-XAS	~10 nm	10–100 $\mu\text{m}$ , depending on the excitation beam and mass	10 $\mu\text{m}^2$ up to $\text{mm}^2$	Spatial distribution of chemical elements in biofilms mapping; element speciation analysis; three-dimensional tomography analysis	Elemental detection and speciation, limited sample preparation, environmental mapping condition	Beam damages, limited access to the technique; limited speed

## 34 Micro- and nanoscale techniques

depends on the type of information and the spatial resolution required. Correlative approaches combining several of these techniques are increasingly used, involving adapted sample preparation protocols. Last, cryogenic approaches are currently under fast development and will provide the unique opportunity to get quantitative and qualitative information about biofilm-mineral assemblages under as-native-as-possible conditions.

### Acknowledgements

The authors thank several instrumentation facilities at IMPMC that provided information about technical details: Maxime Guillaumet and Keevin Béneut for the Spectroscopy platform; Imène Esteve, Stéphanie Delbrel and Béatrice Doisneau for SEM; Cynthia Travert and Fériel Skouri-Panet for geomicrobiological sample preparation on the GEMME facility. KB is funded by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR), under grant Microbialite, ANR-18-CE0-0013-02. Jeanne Caumartin is funded by a grant from the Interface pour le vivant doctorate program at Sorbonne Université. Luca Stigliano is funded by the grant ERC-2020-COG Mobidic 101001275.

### References

- Akanny, E., Bonhommé, A., Bessueille, F., Bourgeois, S., & Bordes, C. (2021). Surface enhanced Raman spectroscopy for bacteria analysis: A review. *Applied Spectroscopy Reviews*, 56(5), 380–422. <https://doi.org/10.1080/05704928.2020.1796698>.
- Alhede, M., Qvortrup, K., Liebrechts, R., Høiby, N., Givskov, M., & Bjarnsholt, T. (2012). Combination of microscopic techniques reveals a comprehensive visual impression of biofilm structure and composition. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 65(2), 335–342. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00956.x>.
- Arunachalam, K., & Davoodbasha, M. (2021). Imaging bacteria and biofilm by field emission scanning electron microscopy. In M. Nag, & D. Lahiri (Eds.), *Analytical methodologies for biofilm research* (pp. 205–222). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1378-8\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1378-8_9).
- Azeredo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A. R., et al. (2017). Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(3), 313–351. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>.
- Balogh-Brunstad, Z., Smart, K., Dohnalkova, A., Saccone, L., & Smits, M. M. (2020). Micro- and nanoscale techniques to explore bacteria and fungi interactions with silicate minerals. In *Biogeochemical cycles* (pp. 81–101). American Geophysical Union (AGU). <https://doi.org/10.1002/9781119413332.ch4>.
- Barlow, D. E., Biffinger, J. C., Cockrell-Zugell, A. L., Lo, M., Kjoller, K., Cook, D., et al. (2016). The importance of correcting for variable probe-sample interactions in AFM-IR spectroscopy: AFM-IR of dried bacteria on a polyurethane film. *Analyst*, 141(16), 4848–4854. <https://doi.org/10.1039/C6AN00940A>.
- Battaglia-Brunet, F., Crouzet, C., Burnol, A., Coulon, S., Morin, D., & Joulian, C. (2012). Precipitation of arsenic sulphide from acidic water in a fixed-film bioreactor. *Water Research*, 46(12), 3923–3933. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.04.035>.

- Battin, T. J., Kaplan, L. A., Newbold, J. D., Cheng, X., & Hansen, C. (2003). Effects of current velocity on the nascent architecture of stream microbial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(9), 5443–5452. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5443-5452.2003>.
- Baygüinov, P. O., Oakley, D. M., Shih, C.-C., Geanon, D. J., Joens, M. S., & Fitzpatrick, J. A. (2018). Modern laser scanning confocal microscopy: Baygüinov et al. *Current Protocols in Cytometry*, *85*(1), e39. <https://doi.org/10.1002/cpey.39>.
- Bellenberg, S., Díaz, M., Noél, N., Sund, W., Peetsch, A., Guiliami, N., et al. (2014). Biofilm formation, communication and interactions of leaching bacteria during colonization of pyrite and sulfur surfaces. *Research in Microbiology*, *165*(9), 773–781. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.08.006>.
- Benzerara, K., Menguy, N., Guyot, F., Varni, C., & Gillet, P. (2005). TEM study of a silicate-carbonate-microbe interface prepared by focused ion beam milling. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *69*(6), 1413–1422. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2004.09.008>.
- Benzerara, K., Miot, J., Morin, G., Oua-Nguerna, G., Skouri-Panet, F., & Férand, C. (2011). Significance, mechanisms and environmental implications of microbial biomineralization. *Complex, Rendus Geoscience*, *34*(32), 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.crte.2010.09.002>.
- Benzerara, K., Yoon, T. H., Menguy, N., Tylliszczak, T., & Brown, G. E. (2005). Nanoscale environments associated with bioweathering of a Mg-Fe-pyroxene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(4), 979–982. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409029102>.
- Berg, J. S., Khachikyan, A., Tienken, D., Litmann, S., Kuyppers, M. M. M., & Mluecka, J. (2020). An intracellular silver deposition method for targeted detection and chemical analysis of uncultured microorganisms. *Systematic and Applied Microbiology*, *43*(3), 126086. <https://doi.org/10.1016/j.syappm.2020.126086>.
- Berger, C., Dumoux, M., Glen, T., Yee, N. B.-Y., Michels, J. M., Patkóvá, Z., et al. (2022). Plasma FIB milling for the determination of structures in situ (p. 2022.08.01.502333). *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.08.01.502333>.
- Berleman, J. E., Zemla, M., Remis, J. P., Liu, H., Davis, A. E., Worth, A. N., et al. (2016). Exopolysaccharide microchannels direct bacterial motility and organize multicellular behavior. *The ISME Journal*, *10*(11). <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.60>. Art. 11.
- Bezsig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., et al. (2006). Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, *313*(5793), 1642–1645. <https://doi.org/10.1126/science.1127344>.
- Bodí, F., Mlewska, E. C., Fernández, G. C., Flores, M. R., Gérard, E., Fariás, M. E., et al. (2022). Community vertical composition of the laguna negra hypersaline microbial mat, Puna region (Argentinean Andes). *Biology*, *11*(6), Art. 6. <https://doi.org/10.3390/biology11060831>.
- Bonneville, S., Bray, A. W., & Benning, L. G. (2016). Structural Fe(II) oxidation in biotite by an ectonycorhizal fungi drives mechanical forcing. *Environmental Science & Technology*, *50*(11), 5589–5596. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b06178>.
- Bonneville, S., Morgan, D. J., Schmalenberger, A., Bray, A., Brown, A., Banwart, S. A., et al. (2011). Tree-nycorrhiza symbiosis accelerates mineral weathering: Evidence from nanometer-scale elemental fluxes at the hypha-mineral interface. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *75*(22), 6988–7005. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2011.08.041>.
- Bonneville, S., Smits, M. M., Brown, A., Harrington, J., Leake, J. R., Brydson, R., et al. (2009). Plant-driven fungal weathering: Early stages of mineral alteration at the nanometer scale. *Geology*, *37*(7), 615–618. <https://doi.org/10.1130/G25699A1>.
- Bontognali, T. R. R., Vasconcelos, C., Warthmann, R. J., Dupraz, C., Bernasconi, S. M., & McKenzie, J. A. (2008). Microbes produce nanobacteria-like structures, avoiding cell entombment. *Geology*, *36*(8), 663. <https://doi.org/10.1130/G24755A.1>.
- Boudreau, C., Wee, T.-L., Duh, Y.-R., Couto, M. P., Ardakani, K. H., & Brown, C. M. (2016). Excitation light dose engineering to reduce photo-bleaching and photo-toxicity. *Scientific Reports*, *6*(1), 30892. <https://doi.org/10.1038/srep30892>.
- Bradley, J. A., Daulte, L. K., Trivedi, C. B., Bojanowski, C. L., Stamps, B. W., Stevenson, B. S., et al. (2017). Carbonate-rich dendrolitic cones: Insights into a modern analog for incipient microbialite formation, Little Hot Creek, Long Valley Caldera, California. *NPI Biofilms and Microbiomes*, *3*, 32. <https://doi.org/10.1038/s41522-017-0041-2>.
- Breitenbach, R., Gerrits, R., Demyntseva, P., Knabe, N., Schumacher, J., Feldmann, I., et al. (2022). The role of extracellular polymeric substances of fungal biofilms in mineral attachment and weathering. *Npl Materials Degradation*, *6*(1). <https://doi.org/10.1038/s41529-022-00253-1>. Art. 1.
- Breitenbach, R., Silbermagl, D., Toepel, J., Sturm, H., Broughton, W. J., Sassaki, G. L., et al. (2018). Corrosive extracellular polysaccharides of the rock-inhabiting model fungus *Knutzia petricola*. *Extremophiles*, *22*(2), 165–175. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0984-5>.
- Buss, H. L., Brantley, S. L., & Liermann, L. J. (2003). Nondestructive methods for removal of bacteria from silicate surfaces. *Geomicrobiology Journal*, *20*(1), 25–42. <https://doi.org/10.1080/01490450303888>.
- Buss, H. L., Lüttge, A., & Brantley, S. L. (2007). Etch pit formation on iron silicate surfaces during siderophore-promoted dissolution. *Chemical Geology*, *240*(3), 326–342. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2007.03.003>.
- Byrne, J. M., Schmidt, M., Gauger, T., Bryce, C., & Kappler, A. (2018). Imaging organic-mineral aggregates formed by Fe(II)-oxidizing bacteria using helium ion microscopy. *Environmental Science & Technology Letters*, *5*(4), 209–213. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.8B00077>.
- Carlut, J., Benzerara, K., Horen, H., Menguy, N., Janots, D., Findling, N., et al. (2010). Microscopy study of biologically mediated alteration of natural mid-oceanic ridge basalts and magnetic implications. *Journal of Geophysical Research Biogeosciences*, *115*(G4). <https://doi.org/10.1029/2009JG001139>.
- Carpenter, K. J., Weber, P. K., Davison, M. L., Pett-Ridge, J., Haverty, M. L., & Keeling, P. J. (2013). Correlated SEM, FIB-SEM, TEM, and NanoSIMS imaging of microbes from the hindgut of a lower termite: Methods for in situ functional and ecological studies of uncultivable microbes. *Microscopy and Microanalysis*, *19*(6), 1490–1501. <https://doi.org/10.1017/S1431927613013482>.
- Cheeseman, S., Shaw, Z. L., Vongsavivut, J., Crawford, R. J., Dupont, M. F., Boyce, K. J., et al. (2021). Analysis of pathogenic bacterial and yeast biofilms using the combination of synchrotron ATR-FTIR microspectroscopy and chemometric approaches. *Molecules*, *26*(13). <https://doi.org/10.3390/molecules26133890>. Art. 13.
- Chevrier, D. M., Cerdá-Doñate, E., Park, Y., Cacho-Nerin, F., Gomez-Gonzalez, M., Uebe, R., et al. (2022). Synchrotron-based nano-X-ray absorption near-edge structure revealing intracellular heterogeneity of iron species in magnetotactic bacteria. *Small Science*, *2*(3), 2100089. <https://doi.org/10.1002/smssc.202100089>.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, *49*, 711–745. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.1.711>.

- Cousnon, T., Alloyeau, D., Ménez, B., Guyot, F., Ghigo, J.-M., & Gélabert, A. (2020). In situ monitoring of exopolymer-dependent Mn mineralization on bacterial surfaces. *Science Advances*, 6(27), eaaz3125. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz3125>.
- Cousnon, T., Gélabert, A., Ona-Nguema, G., Zama, S., Ménez, B., & Guyot, F. (2019). Experimental assessment of occurrences and stability of lead-bearing minerals in bacterial biofilms. *Chemical Geology*, 505, 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2018.11.023>.
- Couradeau, E., Benzerara, K., Gérard, E., Estève, I., Moreira, D., Tavera, R., et al. (2013). Cyanobacterial calcification in modern microbialites at the submicrometer scale. *Biogeosciences*, 10(8), 5255–5266. <https://doi.org/10.5194/bg-10-5255-2013>.
- Dahlberg, P. D., Perez, D., & Moerner, W. E. (2022). Custom metallic electron microscopy grids reduce sample heating in super-resolved cryogenic correlative light and electron microscopy experiments. *Biophysical Journal*, 121(3), 128a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.11.2068>.
- Daval, D., Hellmann, R., Saldì, G. D., Wirth, R., & Knauss, K. G. (2013). Linking nm-scale measurements of the anisotropy of silicate surface reactivity to macroscopic dissolution rate laws: New insights based on diopside. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 107, 121–134. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2012.12.045>.
- Davis, K. J., & Lüttge, A. (2005). Quantifying the relationship between microbial attachment and mineral surface dynamics using vertical scanning interferometry (VSI). *American Journal of Science*, 305(6–8), 727–751. <https://doi.org/10.2475/ajls.305.6-8.727>.
- Davis, K. J., Neilson, K. H., & Lüttge, A. (2007). Calcite and dolomite dissolution rates in the context of microbe–mineral surface interactions. *Geobiology*, 5(2), 191–205. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2007.00112.x>.
- Daye, M., Higgins, J., & Bosak, T. (2019). Formation of ordered dolomite in anaerobic photosynthetic biofilms. *Geology*, 47(6), 509–512. <https://doi.org/10.1130/G45821.1>.
- Duzzi, A., Prater, C. B., Hu, Q., Chase, D. B., Rabolt, J. F., & Marcott, C. (2012). AFM-IR: Combining atomic force microscopy and infrared spectroscopy for nanoscale chemical characterization. *Applied Spectroscopy*, 66(12), 1365–1384. <https://doi.org/10.1366/12-06804>.
- De Gelder, J., De Gussem, K., Vandenberghe, P., & Moens, L. (2007). Reference database of Raman spectra of biological molecules. *Journal of Raman Spectroscopy*, 38(9), 1133–1147. <https://doi.org/10.1002/jrs.1734>.
- Debrie, J., Prêt, D., Menguy, N., Estève, I., Sams-Jofre, P., Saint Martin, J.-P., et al. (2022). Mapping mineralogical heterogeneities at the nm-scale by scanning electron microscopy in modern Sardinian stromatolites: Deciphering the origin of their laminations. *Chemical Geology*, 609, 121059. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2022.12.1059>.
- Denk, W., Strickler, J. H., & Webb, W. W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951), 73–76. <https://doi.org/10.1126/science.2321027>.
- Didymus, J. M., Oliver, P., Mann, S., DeVries, A. L., Hauschka, P. V., & Westbrook, P. (1993). Influence of low-molecular-weight and macromolecular organic additives on the morphology of calcium carbonate. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 89(15), 2891–2900. <https://doi.org/10.1039/FT9938902891>.
- Dohnalkova, A. C., Marshall, M. J., Arey, B. W., Williams, K. H., Buck, E. C., & Fredrickson, J. K. (2011). Imaging hydrated microbial extracellular polymers: Comparative analysis by electron microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1254–1262. <https://doi.org/10.1128/AEM.02001-10>.
- Dong, G., Chen, Y., Yan, Z., Zhang, J., Ji, X., Wang, H., et al. (2020). Recent advances in the roles of minerals for enhanced microbial extracellular electron transfer. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 134, 110404. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110404>.

- Dubochet, J., & McDowell, A. W. (1981). Vitrification of pure water for electron microscopy. *Journal of Microscopy*, 124(3), 3–4. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1981.tb02483.x>.
- Dufrène, Y. F. (2002). Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *Journal of Bacteriology*, 184(19), 5205–5213. <https://doi.org/10.1128/JB.184.19.5205-5213.2002>.
- Dumoux, M., Glen, T., Ho, E. M. L., Perdigão, L. M. A., Klumpe, S., Yee, N. B.-Y., et al. (2022). Cryo-plasma FIB/SEM volume imaging of biological specimens (p. 2022.09.21.508877). *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.09.21.508877>.
- Eaton, P., & West, P. (2010). *Atomic Force Microscopy*. Oxford University Press.
- Ehrlich, H. L. (1996). How microbes influence mineral growth and dissolution. *Chemical Geology*, 132(1), 5–9. [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(96\)00035-6](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(96)00035-6).
- Elsass, F. (2006). Chapter 12.8. Transmission electron microscopy. In F. Bergaya, B. K. G. Theng, & G. Lagaly (Eds.), *Vol. 1. Developments in clay science* (pp. 939–963). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1572-4352\(05\)01034-2](https://doi.org/10.1016/S1572-4352(05)01034-2).
- Erdman, N., Bell, D. C., & Reichelt, R. (2019). Scanning electron microscopy. In P. W. Hawkes, & J. C. H. Spence (Eds.), *Springer handbook of microscopy* (pp. 229–318). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-00069-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-00069-1_5).
- Evans, C. T., Baldoock, S. J., Hardy, J. G., Payton, O., Pieco, L., & Allen, M. J. (2021). A non-destructive, tunable method to isolate live cells for high-speed AFM analysis. *Microorganisms*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040680>. Art. 4.
- Farmer, V. C. (1974). Vibrational spectroscopy in mineral chemistry. In V. C. Farmer (Ed.), *Vol. 4. The infrared spectra of minerals*. Mineralogical Society of Great Britain and Ireland. <https://doi.org/10.11180/mono-4.1>.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Moritz, R., Borehand, W., & Mayer, C. (1999). Physico-chemical properties of biofilms—A short review. *Biofilms in the Aquatic Environment*, 242, Art. 242.
- Flemming, H.-C., & Wuertz, S. (2019). Bacteria and archaea on earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4). <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0158-9>. Art. 4.
- Gaft, M., Nagli, L., Panzer, G., Waychunas, G., & Porat, N. (2008). The nature of unusual luminescence in natural calcite CaCO<sub>3</sub>. *American Mineralogist*, 93(1), 158–167. <https://doi.org/10.2138/am.2008.2576>.
- Gaft, M., & Panzer, G. (2013). Laser-induced time-resolved luminescence spectroscopy of minerals: A powerful tool for studying the nature of emission centres. *Mineralogy and Petrology*, 107(3), 363–372. <https://doi.org/10.1007/s00710-013-0293-3>.
- Gérard, E., Guyot, F., Philippot, P., & López-García, P. (2005). Fluorescence in situ hybridisation coupled to ultra small immunogold detection to identify prokaryotic cells using transmission and scanning electron microscopy. *Journal of Microbiological Methods*, 63(1), 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.02.018>.
- Gérard, E., Ménez, B., Couradeau, E., Moreira, D., Benzerara, K., Tavera, R., et al. (2013). Specific carbonate–microbe interactions in the modern microbialites of Lake Alchichica (Mexico). *The ISME Journal*, 7(10), 1997–2009. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.81>.
- Gerbersdorf, S. U., Koca, K., de Beer, D., Chennu, A., Noss, C., Risse-Buhl, U., et al. (2020). Exploring flow-biofilm–sediment interactions: Assessment of current status and future challenges. *Water Research*, 185, 116182. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116182>.
- Gerrits, R., Wirth, R., Schreiber, A., Feldmann, I., Knabe, N., Schott, J., et al. (2021). High-resolution imaging of fungal biofilm-induced olivine weathering. *Chemical Geology*, 559, 119902. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2020.119902>.
- Giuffrè, A. J., Hamm, L. M., Han, N., De Yoreo, J. J., & Dove, P. M. (2013). Polysaccharide chemistry regulates kinetics of calcite nucleation through competition of interfacial

- energies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(23), <https://doi.org/10.1073/pnas.1222162110>, Art. 23.
- Glass, J. B., Chen, S., Dawson, K. S., Horton, D. R., Vogt, S., Ingall, E. D., et al. (2018). Trace metal imaging of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea at single-cell resolution by synchrotron X-ray fluorescence imaging. *Geomicrobiology Journal*, 35(1), 81–89. <https://doi.org/10.1080/01490451.2017.1321068>.
- Goldberg, M. W. (2008). Immunolabeling for scanning electron microscopy (SEM) and field emission SEM. *Methods in Cell Biology*, 88, 109–130. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)00407-X](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)00407-X).
- Gómez-Gómez, B., Sanz-Landaluce, J., Pérez-Corona, M. T., & Madrid, Y. (2020). Fate and effect of in-house synthesized tellurium based nanoparticles on bacterial biofilm biomass and architecture. Challenges for nanoparticles characterization in living systems. *The Science of the Total Environment*, 719, 137501. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137501>.
- Görgen, S., Benzerara, K., Skouri-Panet, F., Guggen, M., Chauvat, F., & Cassier-Chauvat, C. (2020). The diversity of molecular mechanisms of carbonate biomineralization by bacteria. *Discover Materials*, 1(1), 2. <https://doi.org/10.1007/s43959-020-00001-9>.
- Gorlas, A., Mariotte, T., Morey, L., Truong, C., Bernard, S., Guigner, J.-M., et al. (2022). Precipitation of greigite and pyrite induced by Thermococcales: An advantage to live in Fe- and S-rich environments? *Environmental Microbiology*, 24(2), 626–642. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15915>.
- Gräfenstein, A., Rumancev, C., Pollak, R., Hämişch, B., Galbierz, V., Schroeder, W. H., et al. (2022). Spatial distribution of intracellular ion concentrations in aggregate-forming HeLa cells analyzed by  $\mu$ -XRF imaging. *ChemistryOpen*, 11(4), e202200024. <https://doi.org/10.1002/open.202200024>.
- Grandfield, K., & Engqvist, H. (2011). Focused ion beam in the study of biomaterials and biological matter. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2012, e841961. <https://doi.org/10.1155/2012/841961>.
- Gu, M., & Sheppard, C. J. R. (1995). Comparison of three-dimensional imaging properties between two-photon and single-photon fluorescence microscopy. *Journal of Microscopy*, 177(2), 128–137. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1995.tb03543.x>.
- Häissler, C., & Niessner, R. (2007). Visualisation of transient processes in biofilms by optical coherence tomography. *Water Research*, 41(11), 2467–2472. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.03.017>.
- Han, Z., & Porter, A. E. (2020). In situ electron microscopy of complex biological and nanoscale systems: Challenges and opportunities. *Frontiers in Nanotechnology*, 2. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnano.2020.606253>.
- Hayles, M. F., & De Winter, D. A. M. (2021). An introduction to cryo-FIB-SEM cross-sectioning of frozen, hydrated Life Science samples. *Journal of Microscopy*, 281(2), 138–156. <https://doi.org/10.1111/jmi.12951>.
- Heaney, P. J., Vicenzi, E. P., Giannuzzi, L. A., & Livi, K. J. T. (2001). Focused ion beam milling: A method of site-specific sample extraction for microanalysis of Earth and planetary materials. *American Mineralogist*, 86(9), 1094–1099. <https://doi.org/10.2138/am-2001-8-917>.
- Henning, S., & Adhikari, R. (2017). Chapter 1—Scanning electron microscopy, ESEM, and X-ray microanalysis. In S. Thomas, R. Thomas, A. K. Zachariah, & R. K. Mishra (Eds.), *Microscopy methods in nanomaterials characterization* (pp. 1–30). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46141-2.00001-8>.
- Hou, J., Wang, C., Rozenbaum, R. T., Gusnamiar, N., de Jong, E. D., Woodstra, W., et al. (2019). Bacterial density and biofilm structure determined by optical coherence tomography. *Scientific Reports*, 9(1), 9794. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46196-7>.
- Hrubanova, K., Nebesárova, J., Ruzicka, F., & Krzyzaneck, V. (2018). The innovation of cryo-SEM freeze-fracturing methodology demonstrated on high pressure frozen biofilm. *Micron*, 110, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2018.04.006>.
- Hu, J., Chen, S., Huang, D., et al. (2020). Global mapping of live cell mechanical features using PeakForce QNM AFM. *Biophysical Reports*, 6, 9–18. <https://doi.org/10.1007/s41048-019-00103-9>.
- Hu, Z., Hidalgo, G., Houston, P. L., Hay, A. G., Shuler, M. L., Abruna, H. D., et al. (2005). Determination of spatial distributions of zinc and active biomass in microbial biofilms by two-photon laser scanning microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 4014–4021. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4014-4021.2005>.
- Huang, W., Ertekin, E., Wang, T., Cruz, L., Dailey, M., DiRuggiero, J., et al. (2020). Mechanism of water extraction from gypsum rock by desert colonizing microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(20), 10681–10687. <https://doi.org/10.1073/pnas.2001613117>.
- Hynninen, A., Kälavirt, M., & Kirsimäe, K. (2018). Air-drying is sufficient pre-treatment for in situ visualization of microbes on minerals with scanning electron microscopy. *Journal of Microbiological Methods*, 146, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.jmimet.2018.02.007>.
- Iniesto, M., Moreira, D., Benzerara, K., Reboul, G., Bertolino, P., Tavera, R., et al. (2022). Planktonic microbial communities from microbialite-bearing lakes sampled along a salinity-alkalinity gradient. *Limnology and Oceanography*, 67(12), 2718–2733. <https://doi.org/10.1002/lno.12333>.
- Inkson, B. J. (2016). 2—Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. In I. G. Hübchen, I. Alpeter, R. Tschuncky, & H.-G. Herrmann (Eds.), *Materials characterization using nondestructive evaluation (NDE) methods* (pp. 17–43). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100040-3.00002-X>.
- Jensen, L. H. S., Cheng, T., Plane, F. O. V., Escrig, S., Comment, A., van den Brandt, B., et al. (2016). En route to ion microprobe analysis of soluble compounds at the single cell level: The CryoNanoSIMS. In *European Microscopy Congress 2016: Proceedings* (p. 455). John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/9783527808465.EMC2016.6793>.
- Jo, J., Price-Wheelan, A., & Dietrich, L. E. P. (2022). Gradients and consequences of heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), Art. 10 <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00692-2>.
- Johannessen, K. C., McLoughlin, N., Vuillum, P. E., & Thorseth, I. H. (2020). On the biogenicity of Fe-oxyl/hydroxide filaments in silicified low-temperature hydrothermal deposits: Implications for the identification of Fe-oxidizing bacteria in the rock record. *Geobiology*, 18(1), 31–53. <https://doi.org/10.1111/gbi.12363>.
- Jroundi, F., Schiro, M., Ruiz-Agudo, E., Eler, K., Martín-Sánchez, I., González-Muñoz, M. T., et al. (2017). Protection and consolidation of stone heritage by self-inoculation with indigenous carbonatogenic bacterial communities. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00372-3>, Art. 1.
- Kamaeva, A. A., Vasilchenko, A. S., & Deryabin, D. G. (2014). Atomic force microscopy reveals a morphological differentiation of Chromobacterium violaceum cells associated with biofilm development and directed by N-hexanoyl-L-homoserine lactone. *PLoS One*, 9(8), e103741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103741>.

## References 41

## Micro- and nanoscale techniques 42

- Kapishnikov, S., Leiserowitz, L., Yang, Y., Cloetens, P., Pereira, E., Awamu Ndonglack, F., et al. (2017). Biochemistry of malaria parasite infected red blood cells by X-ray microcopy. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00921-2>. Art. 1.
- Kapuscinski, J. (1995). DAPI: A DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & Histochemistry*, 70(5), 220–233. <https://doi.org/10.3109/10520299509108199>.
- Kazarian, S. G., & Chan, K. L. A. (2006). Applications of ATR-FTIR spectroscopic imaging to biomedical samples. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(7), 858–867. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.011>.
- Kenner, K. M., Kelly, S. D., Lai, B., Maser, J., O'Loughlin, E. J., Sholto-Douglas, D., et al. (2004). Elemental and redox analysis of single bacterial cells by X-ray microbeam analysis. *Science*, 306(5696), 686–687. <https://doi.org/10.1126/science.1103524>.
- Keren-Paz, A., Mian, H., Karunker, I., Olender, T., Kapishnikov, S., Derssch, S., et al. (2022). The roles of intracellular and extracellular calcium in *Bacillus subtilis* biofilms. *IScience*, 25(6). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104308>.
- Kirtzel, J., Ueberschar, N., Deckert-Gaudig, T., Krause, K., Deckert, V., Gadd, G. M., et al. (2020). Organic acids, siderophores, enzymes and mechanical pressure for black slate bioweathering with the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Environmental Microbiology*, 22(4), 1535–1546. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14749>.
- Kiziljyprak, C., Duraspic, J., & Humber, B. M. (2014). Focused ion beam scanning electron microscopy in biology. *Journal of Microscopy*, 254(3), 109–114. <https://doi.org/10.1111/jmi.12127>.
- Klar, T. A., Jakobs, S., Dyba, M., Egner, A., & Hell, S. W. (2000). Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(15), 8206–8210. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.15.8206>.
- Kreft, M., Stenovec, M., & Zorec, R. (2005). Focus-drift correction in time-lapse confocal imaging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1048(1), 321–330. <https://doi.org/10.1196/annals.1342.029>.
- Kumar, S., Rechav, K., Kaplan-Ashri, I., & Gal, A. (2020). Imaging and quantifying homeostatic levels of intracellular silicon in diatoms. *Science Advances*, 6(42), eaaz7554. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz7554>.
- Kuo, J. (Ed.). (2007). *Vol. 369. Electron microscopy Humana Press*. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-294-6>.
- Kurganskaya, I., & Lutge, A. (2021). Mineral dissolution kinetics: Pathways to equilibrium. *ACS Earth and Space Chemistry*, 5(7), 1657–1673. <https://doi.org/10.1021/acsearthspacechem.1c00017>.
- Larimer, C., Braun, M. R., Powell, J. D., Marshall, M. J., Suter, J. D., & Addleman, R. S. (2019). Rapid nondestructive measurement of bacterial cultures with 3D interferometric imaging. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43839-7>. Art. 1.
- Larimer, C., Suter, J. D., Bonheyo, G., & Addleman, R. S. (2016). In situ non-destructive measurement of biofilm thickness and topology in an interferometric optical microscope. *Journal of Biophotonics*, 9(6), 656–666. <https://doi.org/10.1002/jbio.2015000212>.
- Lasaga, A. C., & Blum, A. E. (1986). Surface chemistry, etch pits and mineral-water reactions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 50(10), 2363–2379. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(86\)90088-8](https://doi.org/10.1016/0016-7037(86)90088-8).
- Lei, C., Wang, Y. H., Zhuang, P. X., Li, Y. T., Wan, Q. Q., Ma, Y. X., et al. (2022). Applications of cryogenic electron microscopy in biomineralization research. *Journal of Dental Research*, 101(5), 505–514. <https://doi.org/10.1177/00220345211053814>.
- Lenz, C., Talla, D., Ruschel, K., Škoda, R., Görze, J., & Nasdala, L. (2013). Factors affecting the Nd<sup>3+</sup> (REE<sup>3+</sup>) luminescence of minerals. *Mineralogy and Petrology*, 107(3), 415–428. <https://doi.org/10.1007/s00710-013-0286-2>.
- Lepot, K. (2020). Signatures of early microbial life from the Archean (4 to 2.5 Ga) eon. *Earth-Science Reviews*, 209, 103296. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2020.103296>.
- LeTourneau, M. K., Marshall, M. J., Cliff, J. B., Bonsall, R. F., Dohalkova, A. C., Mavroui, D. V., et al. (2018). Phenazine-1-carboxylic acid and soil moisture influence biofilm development and turnover of rhizobacterial biomass on wheat root surfaces. *Environmental Microbiology*, 20(6), 2178–2194. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14244>.
- Li, Y., Feng, S., Liu, H., Tian, X., Xia, Y., Li, M., et al. (2020). Bacterial distribution in SRB biofilm affects MIC pitting of carbon steel studied using FIB-SEM. *Corrosion Science*, 167, 108512. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2020.108512>.
- Li, J., Margaret Oliver, I., Cam, N., Boudier, T., Blondeau, M., Leroy, E., et al. (2016). Biomineralization patterns of intracellular carbonatogenesis in cyanobacteria: Molecular hypotheses. *Minerals*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/min6010010>. Art. 1.
- Li, X., Wang, Q., Shen, X., Pedrosa, E. T., & Lutge, A. (2021). Multiscale investigation of olivine (010) face dissolution from a surface control perspective. *Applied Surface Science*, 549, 149317. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2021.149317>.
- Li, Y., Xu, D., Chen, C., Li, X., Jia, R., Zhang, D., et al. (2018). Anaerobic microbially influenced corrosion mechanisms interpreted using bioenergetics and bioelectrochemistry: A review. *Journal of Materials Science & Technology*, 34(10), 1713–1718. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2018.02.023>.
- Li, J., Zhang, H., Mengyu, N., Benzerara, K., Wang, F., Lin, X., et al. (2017). Single-cell resolution of uncultured magnetotactic bacteria via fluorescence-coupled electron microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(12), e00409–e00417. <https://doi.org/10.1128/AEM.00409-17>.
- Lider, V. V. (2018). X-ray fluorescence imaging. *Physics-Uspëkhi*, 61(10), 980. <https://doi.org/10.3367/UFNe.2017.07.038174>.
- Little, B., Wagner, P., Ray, R., Pope, R., & Scheetz, R. (1991). Biofilms: An ESEM evaluation of artifacts introduced during SEM preparation. *Journal of Industrial Microbiology*, 8(4), 213–221. <https://doi.org/10.1007/BF01576058>.
- Loussert-Fonta, C., Touleec, G., Paracattli, A. A., Jeangros, Q., Krueger, T., Escrig, S., et al. (2020). Correlation of fluorescence microscopy, electron microscopy, and NanoSIMS stable isotope imaging on a single tissue section. *Communications Biology*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-1095-x>. Art. 1.
- Lovrić, J., Najafmobar, N., Kurezy, M. E., De Castro, O., Biesemeier, A., von Sydow, L., et al. (2022). Correlative high-resolution imaging of iron uptake in lung macrophages. *Analytical Chemistry*, 94(37), 12798–12806. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c02675>.
- Luetge, A., Bolton, E. W., & Lasaga, A. C. (1999). An interferometric study of the dissolution kinetics of anorthite: The role of reactive surface area. *American Journal of Science*, 299(7–9), 652–678. <https://doi.org/10.2475/ajs.299.7-9.652>.
- Lutge, (2004). *Direct observation of microbial inhibition of calcite dissolution*. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1627-1632.2004>.
- Lybrand, R. A., Austin, J. C., Fedenko, J., Gallery, R. E., Rooney, E., Schroeder, P. A., et al. (2019). A coupled microscopy approach to assess the nano-landscape of weathering. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41357-0>. Art. 1.
- MacRae, C. M., & Wilson, N. C. (2008). Luminescence database. I—Minerals and materials. *Microscopy and Microanalysis*, 14(2), 184–204. <https://doi.org/10.1017/S154319276080829X>.

- Majumdar, S., Peralta-Videa, J. R., Castillo-Michel, H., Hong, J., Rico, C. M., & Gardes-Lorenz, J. L. (2012). Applications of synchrotron  $\mu$ -XRF to study the distribution of biologically important elements in different environmental matrices: A review. *Analytica Chimica Acta*, 755, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.09.050>.
- McCutcheon, J., & Southam, G. (2018). Advanced biofilm staining techniques for TEM and SEM in geomicrobiology: Implications for visualizing EPS architecture, mineral nucleation, and microfossil generation. *Chemical Geology*, 498, 115–127. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2018.09.016>.
- McGlynn, S. E., Chadwick, G. L., O'Neill, A., Mackey, M., Thor, A., Deerinck, T. J., et al. (2018). Subgroup characteristics of marine methane-oxidizing ANME-2 archaea and their syntrophic partners as revealed by integrated multimodal analytical microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(11), e003399–18. <https://doi.org/10.1128/AEM.003399-18>.
- Meakin, P., & Rosso, K. M. (2008). Simple kinetic Monte Carlo models for dissolution pitting induced by crystal defects. *The Journal of Chemical Physics*, 129(20), 204106. <https://doi.org/10.1063/1.3021478>.
- Melia, C. E., Bolla, J. R., Katharios-Lanwermeyer, S., Mihaylov, D. B., Hoffmann, P. C., Huo, J., et al. (2021). Architecture of cell-cell junctions in situ reveals a mechanism for bacterial biofilm inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(31), e2109940118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2109940118>.
- Metzger, M., Konrad, A., Skandary, S., Ashraf, I., Meixner, A. J., & Brecht, M. (2016). Resolution enhancement for low-temperature scanning microscopy by cryo-immersion. *Optics Express*, 24(12), 13023. <https://doi.org/10.1364/OE.24.013023>.
- Miot, J., Benzerara, K., & Kappler, A. (2014). Investigating microbe-mineral interactions: Recent advances in X-ray and electron microscopy and redox-sensitive methods. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 42(1), 271–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-050212-124110>.
- Miot, J., Maclellan, K., Benzerara, K., & Boisset, N. (2011). Preservation of protein globules and peptidoglycan in the mineralized cell wall of nitrate-reducing, iron(II)-oxidizing bacteria: A cryo-electron microscopy study. *Geobiology*, 9(6), 459–470. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2011.00298.x>.
- Mohan, M., Nigam, V. K., & Poddar, R. (2019). Towards characterization of bacterial colonies and biofilms: An approach based on swept source optical coherence tomography. *Optik*, 185, 592–598. <https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2019.03.135>.
- Molina-Santiago, C., Pearson, J. R., Berlanga-Clavero, M. V., Pérez-Lorente, A. I., de Vicente, A., & Romero, D. (2022). A noninvasive method for time-lapse imaging of microbial interactions and colony dynamics. *Microbiology Spectrum*, 10(4), e00939-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00939-22>.
- Montesinos, E., Esteve, I., & Guerrero, R. (1983). Comparison between direct methods for determination of microbial cell volume: Electron microscopy and electronic particle sizing. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(5), 1651–1658. <https://doi.org/10.1128/aem.45.5.1651-1658.1983>.
- Nadell, C. D., Drescher, K., & Foster, K. R. (2016). Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 589–600. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.84>.
- Nagy, K. L., Cygan, R. T., Hanchar, J. M., & Sturchio, N. C. (1999). Gibbsite growth kinetics on gibbsite, kaolinite, and muscovite substrates: Atomic force microscopy evidence for epitaxy and an assessment of reactive surface area. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63(16), 2337–2351. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(99\)00118-0](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(99)00118-0).
- Narciso, D. A. C., Pereira, A., Dias, N. O., Melo, L. F., & Martins, F. G. (2022). Characterization of biofilm structure and properties via processing of 2D optical coherence tomography images in BISCAP. *Bioinformatics*, 38(6), 1708–1715. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btuc002>.
- Nasdale, L., & Schmidt, C. (2020). Applications of Raman spectroscopy in mineralogy and geochemistry. *Elements*, 16(2), 99–104. <https://doi.org/10.2138/gselements.16.2.99>.
- Nation, J. L. (1983). A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft insect tissues for scanning electron microscopy. *Stain Technology*, 58(6), 347–351. <https://doi.org/10.3109/10520298309066811>.
- Nellist, P. D. (2019). Scanning transmission electron microscopy. In P. W. Hawkes, & J. C. H. Spence (Eds.), *Springer handbook of microscopy* (pp. 49–99). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-00069-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-00069-1_2).
- Neu, T. R., & Lawrence, J. R. (2004). One-photon versus two-photon laser scanning microscopy and digital image analysis of microbial biofilms. *Methods in Microbiology*, 34, 89–136. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(04\)34004-3](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(04)34004-3).
- Neu, T. R., & Lawrence, J. R. (2014). Advanced techniques for in situ analysis of the biofilm matrix (structure, composition, dynamics) by means of laser scanning microscopy. In G. Donelli (Ed.), *Microbial biofilms: methods and protocols* (pp. 43–64). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0467-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0467-9_4).
- Neu, T. R., & Lawrence, J. R. (2015). Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales. *Trends in Microbiology*, 23(4), 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.timm.2014.12.010>.
- Neu, T. R., Manz, B., Volke, F., Dynes, J. J., Hitchcock, A. P., & Lawrence, J. R. (2010). Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in biofilm systems. *FEMS Microbiology Ecology*, 72(1), 1–21. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00837.x>.
- Neu, T. R., Woelfl, S., & Lawrence, J. R. (2004). Three-dimensional differentiation of photo-autotrophic biofilm constituents by multi-channel laser scanning microscopy (single-photon and two-photon excitation). *Journal of Microbiological Methods*, 56(2), 161–172. <https://doi.org/10.1016/j.jmimet.2003.10.012>.
- Noirel, C., & Daval, D. (2017). Pore-scale geochemical reactivity associated with CO<sub>2</sub> storage: New frontiers at the fluid–solid interface. *Accounts of Chemical Research*, 50(4), 759–768. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00019>.
- Nordhoff, M., Tominski, C., Halama, M., Byrne, J. M., Obst, M., Kleindienst, S., et al. (2017). Insights into nitrate-reducing Fe(II) oxidation mechanisms through analysis of cell-mineral associations, cell encrustation, and mineralogy in the chemolithoautotrophic enrichment culture KS. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(13), e00752-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00752-17>.
- Obst, M., Gasser, P., Mavrocordatos, D., & Dittrich, M. (2005). TEM-specimen preparation of cell/mineral interfaces by focused ion beam milling. *American Mineralogist*, 90(8–9), 869–874. <https://doi.org/10.2138/am.2005.1743>.
- Oh, Y. J., Jo, W., Yang, Y., & Park, S. (2007). Influence of culture conditions on *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 107(10), 869–874. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2007.01.021>.
- Oh, Y. J., Lee, N. R., Jo, W., Jung, W. K., & Lim, J. S. (2009). Effects of substrates on biofilm formation observed by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 109(8), 874–880. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2009.03.042>.

- Ojeda, J. J., & Dittrich, M. (2012). Fourier transform infrared spectroscopy for molecular analysis of microbial cells. In A. Navid (Ed.), *Microbial systems biology: methods and protocols* (pp. 187–211). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-827-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-827-6_8).
- Ong, D. S., Lee, J. S., Soeda, T., Higuma, T., Minami, Y., Wang, Z., et al. (2016). Coronary calcification and plaque vulnerability. *Circulation Cardiovascular Imaging*, 9(1), e003929. <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.115.003929>.
- Parmentier, C. D., & Nizamudeen, Z. A. (2021). Cryo-FIB-lift-out: practically impossible to practical reality. *Journal of Microscopy*, 281(2), 157–174. <https://doi.org/10.1111/jmi.12953>.
- Pätzold, R., Keunij, M., & Anders-von Ahlfen, A. (2006). A new approach to non-destructive analysis of biofilms by confocal Raman microscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386(2), 286–292. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0663-3>.
- Pedone, V. A., Cercone, K. R., & Burruss, R. C. (1990). Activators of photoluminescence in calcite: evidence from high-resolution, laser-excited luminescence spectroscopy. *Chemical Geology*, 88(1–2), 183–190. [https://doi.org/10.1016/0009-2541\(90\)90112-K](https://doi.org/10.1016/0009-2541(90)90112-K).
- Perez, C., Lora, C., & Erable, B. (2022). Methodological approaches for the structural, chemical, and microbial analysis of microbial biofilms developed on the surface of cementitious materials: Overview and future prospects. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 175, 105485. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2022.105485>.
- Perez, A., Rossano, S., Treera, N., Huguenot, D., Foundrin, C., Vermeij-Carron, A., et al. (2016). Bioalteration of synthetic Fe(III)-, Fe(II)-bearing basaltic glasses and Fe-free glass in the presence of the heterotrophic bacteria strain *Pseudomonas aeruginosa*: Impact of siderophores. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 188, 147–162. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2016.05.028>.
- Phan, V. T. H., Rebois, R., Beck, P., Quirico, E., Bonal, L., & Noguèchi, T. (2022). Nanoscale mineralogy and organic structure in Orgueil (CI) and EET 92042 (CR) carbonaceous chondrites studied with AFM-IR spectroscopy. *Meteoritics & Planetary Science*, 57(1), 3–21. <https://doi.org/10.1111/maps.13773>.
- Pictoreanu, C., Blauert, F., Horn, H., & Wagner, M. (2018). Determination of mechanical properties of biofilms by modelling the deformation measured using optical coherence tomography. *Water Research*, 145, 588–598. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.08.070>.
- Pimentel, C., Pina, C. M., & Gnecco, E. (2013). Epitaxial growth of calcite crystals on dolomite and kumahorite (104) surfaces. *Crystal Growth & Design*, 13(6), 2557–2563. <https://doi.org/10.1021/cg400315g>.
- Pokrovsky, O. S., Shirokova, L. S., Zabelina, S. A., Jordan, G., & Bénézeith, P. (2021). Weak impact of microorganisms on Ca, Mg-bearing silicate weathering. *Npj Materials Degradation*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41529-021-00199-w>. Art. 1.
- Pollet-Villard, M., Daval, D., Fritz, B., Knauss, K. G., Schäfer, G., & Ackerer, P. (2016). Influence of etch pit development on the surface area and dissolution kinetics of the orthoclase (001) surface. *Chemical Geology*, 447, 79–92. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2016.09.038>.
- Pósfai, M., Kasama, T., & Dunin-Borkowski, R. E. (2013). Biominerals at the nanoscale: Transmission electron microscopy methods for studying the special properties of biominerals. In F. Nieto, K. J. T. Livi, & R. Oberli (Eds.), *Minerals at the nanoscale*. Mineralogical Society of Great Britain and Ireland. <https://doi.org/10.1180/EMU-notes.14.1.1>.
- Reisfeld, R., Gaf, M., Boulon, G., Pancez, C., & Jørgensen, C. K. (1996). Laser-induced luminescence of rare-earth elements in natural fluor-apatites. *Journal of Luminescence*, 69(5–6), 343–353. [https://doi.org/10.1016/S0022-2313\(96\)00114-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2313(96)00114-7).

- Rogers, J. R., & Bennett, P. C. (2004). Mineral stimulation of subsurface microorganisms: Release of limiting nutrients from silicates. *Chemical Geology*, 203(1), 91–108. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2003.09.001>.
- Romero, I. C., Urban, M. A., & Panyasena, S. W. (2020). Airyscan superresolution microscopy: A high-throughput alternative to electron microscopy for the visualization and analysis of fossil pollen. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 276, 104192. <https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2020.104192>.
- Romeu, M. J., Lima, M., Gomes, L. C., de Jong, E. D., Morais, J., Vasconcelos, V., et al. (2022). The use of 3D optical coherence tomography to analyze the architecture of cyanobacterial biofilms formed on a carbon nanotube composite. *Polymers*, 14(20). <https://doi.org/10.3390/polym14204410>.
- Römling, U. (2022). Is biofilm formation intrinsic to the origin of life? *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16179>.
- Rosenberg, M., Azevedo, N. F., & Ivask, A. (2019). Propidium iodide staining underestimates viability of adherent bacterial cells. *Scientific Reports*, 9(1). Art. 1 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42906-3>.
- Rumancev, C., Grafenstein, A., Vöpel, T., Stühr, S., von Gundlach, A. R., Senkbeil, T., et al. (2020). X-ray fluorescence analysis of metal distributions in cryogenic biological samples using large-acceptance-angle SDD detection and continuous scanning at the hard X-ray micro/hano-probe beamline P06 at PETRA III. *Journal of Synchrotron Radiation*, 27(Pt. 1), 60–66. <https://doi.org/10.1107/S1600577519014048>.
- Rust, M. J., Bates, M., & Zhuang, X. (2006). Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature Methods*, 3(10), 793–796. <https://doi.org/10.1038/nmeth029>.
- Saccione, L., Gazze, S. A., Duran, A. L., Leake, J. R., Banwart, S. A., Ragnarsdóttir, K. V., et al. (2012). High resolution characterization of ectomycorrhizal fungal-mineral interactions in axenic microcosm experiments. *Biogeochemistry*, 111, 411–425. <https://doi.org/10.1007/s10533-011-9667-3>.
- Saghafi, A., Zivanovic, Y., Zeyen, N., Moreira, D., Benzerara, K., Deschamps, P., et al. (2015). Metagenome-based diversity analyses suggest a significant contribution of non-cyanobacterial lineages to carbonate precipitation in modern microbialites. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00797>.
- Sato, C., Sato, M., & Ogawa, S. (2018). Imaging of immunogold labeling in cells and tissues by helium ion microscopy. *International Journal of Molecular Medicine*, 42(1), 309–321. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3604>.
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burnölle, M., Stewart, P. S., et al. (2022). The biofilm life cycle: Expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10). Art. 10 <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>.
- Schäpfer, S., Burkhardt, C., & Kappler, A. (2008). Evaluation of electron microscopic sample preparation methods and imaging techniques for characterization of cell-mineral aggregates. *Geomicrobiology Journal*, 25(5), 228–239. <https://doi.org/10.1080/01490450802153462>.
- Schlafli, S., & Meyer, R. L. (2017). Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix. *Journal of Microbiological Methods*, 138, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.jmim.2016.03.002>.
- Schmid, G., Zeitvogel, F., Hao, L., Ingino, P., Floetgenmeyer, M., Sierhof, Y.-D., et al. (2014). 3-D analysis of bacterial cell-(iron)mineral aggregates formed during Fe(II) oxidation by the nitrate-reducing Acidovorax sp. Strain BoFeN1 using complementary microscopy tomography approaches. *Geobiology*, 12(4), 340–361. <https://doi.org/10.1111/gbi.12088>.

- Schmidt, M., Byrne, J. M., & Maasilta, I. J. (2021). Bio-imaging with the helium-ion microscope: A review. *Berlin Journal of Nanotechnology*, 12, 1–23. <https://doi.org/10.3762/bjnano.12.1>.
- Schmidt, H., Eickhorst, T., & Musmann, M. (2012). Gold-FISH: A new approach for the in situ detection of single microbial cells combining fluorescence and scanning electron microscopy. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(8), 518–525. <https://doi.org/10.1016/j.syappm.2012.04.006>.
- Schröder, L., Boon, N., De Kock, T., & Chudde, V. (2021). The capabilities of bacteria and archaea to alter natural building stones—A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 165, 105329. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105329>.
- Schwartz, J. J., Jakob, D. S., & Centrone, A. (2022). A guide to nanoscale IR spectroscopy: Resonance enhanced transduction in contact and tapping mode AFM-IR. *Chemical Society Reviews*, 51(13), 5248–5267. <https://doi.org/10.1039/D2CS00095D>.
- Sfoma, M. C., Dye, M., Philippot, P., Somogyi, A., van Zuilten, M. A., Medjoubi, K., et al. (2017). Patterns of metal distribution in hypersaline microbialites during early diagenesis: Implications for the fossil record. *Geobiology*, 15(2), 259–279. <https://doi.org/10.1111/gbi.12218>.
- Sharma, A., Schmidt, M., Kiesel, B., Mahato, N. K., Cralle, L., Singh, Y., et al. (2018). Bacterial and archaeal viruses of Himalayan hot springs at manikaran modulate host genomes. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3095. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03095>.
- Shi, L., Dong, H., Reguera, G., Beyenal, H., Lu, A., Liu, J., et al. (2016). Extracellular electron transfer mechanisms between microorganisms and minerals. *Nature Reviews Microbiology*, 14(10), Art. 10 <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.93>.
- Shore, S. L., & Frischknecht, F. (2007). *Imaging cellular and molecular biological junctions*. Springer.
- Siena, M., Bussetti, G., Recalcati, C., Riva, M., Duo, L., & Guadagnini, A. (2021). Statistical Characterization of Heterogeneous Dissolution Rates of Calcite from In situ and Real-Time AFM Imaging. *Transport in Porous Media*, 140(1), 291–312. <https://doi.org/10.1007/s11242-021-01624-z>.
- Singh, S., Kumbhar, D., Reghu, D., Venugopal, S. J., Rekha, P. T., Mohandas, S., et al. (2022). Culture-Independent Raman Spectroscopic Identification of Bacterial Pathogens from Clinical Samples Using Deep Transfer Learning. *Analytical Chemistry*, 94(42), 14745–14754. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c03391>.
- Sporrelli, M. C., Kranz, C., Mizaikoff, B., & Cioffi, N. (2022). Recent advances on the spectroscopic characterization of microbial biofilms: A critical review. *Analytica Chimica Acta*, 1195, 339433. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339433>.
- Su, G., Li, S., Deng, X., Hu, L., Praburaman, L., He, Z., et al. (2021). Low concentration of Tween-20 enhanced the adhesion and biofilm formation of *Acidithiobacillus mannaensis* YN-25 on chalcopyrite surface. *Chemosphere*, 284, 131403. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131403>.
- Templeton, A., & Knowles, E. (2009). Microbial transformations of minerals and metals: Recent advances in geomicrobiology derived from synchrotron-based X-ray spectroscopy and X-ray microscopy. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 37(1), 367–391. <https://doi.org/10.1146/annurev.earth.36.031207.124346>.
- Templeton, A. S., Knowles, E. J., Eldridge, D. L., Arey, B. W., Dohnalkova, A. C., Webb, S. M., et al. (2009). A seafloor microbial biome hosted within incipient ferromanganese crusts. *Nature Geoscience*, 2(12), <https://doi.org/10.1038/ngeo696>. Art. 12.

- Templeton, A. S., Spormann, A. M., & Brown, G. E. (2003). Speciation of Pb(II) sorbed by Burkholderia cepacia/goethite composites. *Environmental Science & Technology*, 37(10), 2166–2172. <https://doi.org/10.1021/es026081b>.
- Templeton, A. S., Trainor, T. P., Traina, S. J., Spormann, A. M., & Brown, G. E. (2001). Pb(II) distributions at biofilm–metal oxide interfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(21), 11897–11902. <https://doi.org/10.1073/pnas.201150998>.
- Teng, X., Li, F., & Lu, C. (2020). Visualization of materials using the confocal laser scanning microscopy technique. *Chemical Society Reviews*, 49(8), 2408–2425. <https://doi.org/10.1039/C8CS00061A>.
- Thomas, C. I., Urban, N. T., Sun, Y., Colgan, L. A., Tu, X., Yasuda, R., et al. (2021). Cryo-confocal imaging for CLEM mapping in brain tissues. *Microscopy Today*, 29(5), 34–39. <https://doi.org/10.1017/S1551929521001073>.
- Toner, B. M., Santelli, C. M., Marcus, M. A., Wirth, R., Chan, C. S., McCollom, T., et al. (2009). Biogenic iron oxyhydroxide formation at mid-ocean ridge hydrothermal vents: Juan de Fuca Ridge. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73(2), 388–403. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2008.09.035>.
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.-P., & Frey-Klett, P. (2009). Mineral weathering by bacteria: Ecology, actors and mechanisms. *Trends in Microbiology*, 17(8), 378–387. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.05.004>.
- Varsano, N., & Wolf, S. G. (2022). Electron microscopy of cellular ultrastructure in three dimensions. *Current Opinion in Structural Biology*, 76, 102444. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102444>.
- Vasconcelos, C., McKenzie, J. A., Bernasconi, S., Grujic, D., & Tiens, A. J. (1995). Microbial mediation as a possible mechanism for natural dolomite formation at low temperatures. *Nature*, 377(6546), 220–222. <https://doi.org/10.1038/377220a0>.
- Vila, T., Fonseca, B., Da Cunha, M. M. L., Dos Santos, G. R. C., Ishida, K., Barreto-Berger, E., et al. (2017). Candida albicans biofilms: Comparative analysis of room-temperature and cryofixation for scanning electron microscopy. *Journal of Microscopy*, 267(3), 409–419. <https://doi.org/10.1111/jmi.12580>.
- Villa, M. M., Wang, L., Huang, J., Rowe, D. W., & Wei, M. (2013). Visualizing osteogenesis in vivo within a cell–scaffold construct for bone tissue engineering using two-photon microscopy. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 19(11), 839–849. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2012.0490>.
- Villanueva, M. E., Sainas, A., Copello, G. J., & Diaz, L. E. (2014). Point of zero charge as a factor to control biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* in sol-gel derivatized aluminum alloy plates. *Surface and Coatings Technology*, 254, 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2014.05.074>.
- Wagner, M., & Horn, H. (2017). Optical coherence tomography in biofilm research: A comprehensive review: OCT in biofilm research. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(7), 1386–1402. <https://doi.org/10.1002/bit.26283>.
- Wagner, M., Fahrzadeh, D., Haisch, C., & Horn, H. (2010). Investigation of the mesoscale structure and volumetric features of biofilms using optical coherence tomography. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(5), 844–853. <https://doi.org/10.1002/bit.22864>.
- Wallace, P. K., Arey, B., & Mahaffee, W. F. (2011). Subsurface examination of a foliar biofilm using scanning electron- and focused-ion-beam microscopy. *Micron*, 42(6), 579–585. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.02.003>.

- Wang, Y., Gélabert, A., Michel, F. M., Choi, Y., Gescher, J., Ona-Nguema, G., et al. (2016). Effect of biofilm coatings at metal-oxide/water interfaces I: Pb(II) and Zn(II) partitioning and speciation at *Shewanella oneidensis*/metal-oxide/water interfaces. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 188, 368–392. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2016.04.052>.
- Wang, X. J., Milner, T. E., de Boer, J. F., Zhang, Y., Pashley, D. H., & Nelson, J. S. (1999). Characterization of dentin and enamel by use of optical coherence tomography. *Applied Optics*, 38(10), 2092–2096. <https://doi.org/10.1364/ao.38.002092>.
- Wang, L., & Putnis, C. V. (2020). Dissolution and precipitation dynamics at environmental mineral interfaces imaged by in situ atomic force microscopy. *Accounts of Chemical Research*, 53(6), 1196–1205. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.0c00128>.
- Wang, J., Zhao, Y., Li, D., Qi, P., Guo, X., Guo, N., et al. (2022). Extreme halophilic bacteria promote the surface dolomitization of calcite crystals in solutions with various magnesium concentrations. *Chemical Geology*, 606, 120998. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2022.120998>.
- Ward, M. B., Kapitulinová, D., Brown, A. P., Heard, P. J., Chems, D., Cockell, C. S., et al. (2013). Investigating the role of microbes in mineral weathering: Nanometre-scale characterisation of the cell–mineral interface using FIB and TEM. *Micron*, 47, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2012.12.006>.
- Waters, M. S., El-Naggar, M. Y., Hsu, L., Sturm, C. A., Lutjge, A., Udawadia, F. E., et al. (2009). Simultaneous interferometric measurement of corrosive or demineralizing bacteria and their mineral interfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(5), 1445–1449. <https://doi.org/10.1128/AEM.02039-08>.
- Weber, K., Delben, J., Bromages, T. G., & Duarte, S. (2014). Comparison of SEM and VPSEM imaging techniques with respect to *Streptococcus mutans* biofilm topography. *FEMS Microbiology Letters*, 350(2), 175–179. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12334>.
- Weber, P. K., Graham, G. A., Teslich, N. E., Chan, W. M., Ghosal, S., Leighton, T. J., et al. (2010). NanoSIMS imaging of *Bacillus* spores sectioned by focused ion beam. *Journal of Microscopy*, 238(3), 189–199. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2009.03336.x>.
- Wei, D., Chen, S., & Liu, Q. (2015). Review of fluorescence suppression techniques in Raman spectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews*, 50(5), 387–406. <https://doi.org/10.1080/05704928.2014.999936>.
- Welikala, S., Al-Stadi, S., Gates, W. P., Panter, C., & Raman, R. K. S. (2022). Biofilm development on carbon steel by iron reducing bacterium *Shewanella putrefaciens* and their role in corrosion. *Metals*, 12(6), Art. 6 <https://doi.org/10.3390/met12061005>.
- Wild, B., Daval, D., Guyot, F., Knauss, K. G., Pollet-Villard, M., & Imfeld, G. (2016). pH-dependent control of feldspar dissolution rate by altered surface layers. *Chemical Geology*, 442, 148–159. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2016.08.035>.
- Wild, B., Gerrits, R., & Bonneville, S. (2022). The contribution of living organisms to rock weathering in the critical zone. *Npj Materials Degradation*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41529-022-00312-7>. Art. 1.
- Wild, B., Imfeld, G., & Daval, D. (2021). Direct measurement of fungal contribution to silicate weathering rates in soil. *Geology*, 49(9), 1055–1058. <https://doi.org/10.1130/G48706.1>.
- Wilke, R. N., Quéric, N., Hoppert, M., Heller, C., Schropp, A., Schroer, C. G., et al. (2015). Scanning hard X-ray microscopy imaging modalities for geobiological samples. *Geomicrobiology Journal*, 32(3–4), 380–383. <https://doi.org/10.1080/01490451.2014.908982>.
- Wille, G., Hellal, J., Ollivier, P., Richard, A., Burel, A., Jolly, L., et al. (2017). Cryo-scanning electron microscopy (SEM) and scanning transmission electron microscopy (STEM)-in-SEM for bio- and organo-mineral interface characterization in the environment. *Microscopy and Microanalysis*, 23(6), 1159–1172. <https://doi.org/10.1017/S143192761701265X>.
- Wright, M. K., Powell, L. C., & Armstrong, I. (2010). Application of AFM from microbial cell to biofilm. *Scanning*, 32(3), 134–149. <https://doi.org/10.1002/sca.20193>.
- Wyant, J. C. (2002). White light interferometry. *Holography: A Tribute to Yuri Denisyuk and Emmet Leith*, 4737, 98–107. <https://doi.org/10.1117/12.474947>.
- Xi, P., Liu, Y., Ren, Q., Xi, P., Liu, Y., & Ren, Q. (2011). Scanning and image reconstruction techniques in confocal laser scanning microscopy. In *Laser scanning, theory and applications* (NtechOpen). <https://doi.org/10.5772/14545>.
- Xi, C., Marks, D., Schlachter, S., Luo, W., & Boppart, S. A. (2006). High-resolution three-dimensional imaging of biofilm development using optical coherence tomography. *Journal of Biomedical Optics*, 11(3), 034001. <https://doi.org/10.1117/1.2209962>.
- Xiao, J., Hara, A. T., Kim, D., Zero, D. T., Koo, H., & Hwang, G. (2017). Biofilm three-dimensional architecture influences in situ pH distribution pattern on the human enamel surface. *International Journal of Oral Science*, 9(2). <https://doi.org/10.1038/ijos.2017.8>. Art. 2.
- Ye, J., Nielsen, S., Joseph, S., & Thomas, T. (2015). High-resolution and specific detection of bacteria on complex surfaces using nanoparticle probes and electron microscopy. *PLoS One*, 10(5), e0126404. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126404>.
- Yip, K. M., Fischer, N., Paknia, E., Chari, A., & Stark, H. (2020). Atomic-resolution protein structure determination by cryo-EM. *Nature*, 587(7832), Art. 7832. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2833-4>.
- Zeyen, N., Benzerara, K., Li, J., Groleau, A., Balan, E., Robert, J.-L., et al. (2015). Formation of low-T hydrated silicates in modern microbialites from Mexico and implications for microbial fossilization. *Frontiers in Earth Science*, 3. <https://doi.org/10.3389/feart.2015.00064>.
- Zhang, R., Bellenberg, S., Castro, L., Neu, T. R., Sand, W., & Vera, M. (2014). Colonization and biofilm formation of the extremely acidophilic archaeon *Ferroplasma acidiphilum*. *Hydrometallurgy*, 150, 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2014.07.001>.
- Zhang, X., Bishop, P. L., & Kupferle, M. J. (1998). Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water Science and Technology*, 37(4), 345–348. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(98\)00127-9](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00127-9).
- Zhang, R., Neu, T. R., Blanchard, V., Vera, M., & Sand, W. (2019). Biofilm dynamics and EPS production of a thermoacidophilic bioleaching archaeon. *New Biotechnology*, 51, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.02.002>.
- Zhu, Y., Zhang, J., Li, A., Zhang, Y., & Fan, C. (2017). Synchrotron-based X-ray microscopy for sub-100 nm resolution cell imaging. *Current Opinion in Chemical Biology*, 39, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.04.016>.

