



Caractérisation expérimentale des relations entre les bactéries des sols, les phyllosilicates et les solutions : modélisation et rôle des paramètres environnementaux

Clarisse Bolou Bi Balland

► To cite this version:

Clarisse Bolou Bi Balland. Caractérisation expérimentale des relations entre les bactéries des sols, les phyllosilicates et les solutions : modélisation et rôle des paramètres environnementaux. Science des sols. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2010. Français. NNT : 2010NAN10016 . tel-01748206

HAL Id: tel-01748206

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748206>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THESE

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de Nancy-Université en Géosciences

par Clarisse BALLAND BOLOU BI

· Caractérisation expérimentale des relations entre les bactéries des sols, les phyllosilicates et les solutions : Modélisation et Rôle des Paramètres Environnementaux

Soutenue publiquement le 15 Avril 2010

M. Guilhem BOURRIE , Directeur de Recherche, INRA	Rapporteur
M. Oleg POKROVSKY , Chargé de Recherche HDR, CNRS	Rapporteur
Mme Sylvie DOUSSET , Professeur, Université Henri Poincaré	Président
M. Joseph DUFEY , Professeur, Université catholique de Louvain-la-Neuve	Examineur
M. Frédéric GERARD , Chargé de Recherche HDR, INRA	Examineur
M. Stéphane UROZ , Chargé de Recherche, INRA	Examineur
Mme Corinne LEYVAL , Directeur de Recherche, CNRS	Directrice de thèse
Mme Anne POSZWA , Maître de Conférences, Université Henri Poincaré	Co-directrice de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier mon laboratoire d'accueil depuis 5 ans lorsque je suis arrivée pour mon stage de Maîtrise en science de la Terre et de l'Univers en 2005. J'ai tellement aimé travailler ici que j'ai ensuite effectué mon stage de master et ensuite ma thèse.

Ma reconnaissance va en premier lieu à mes directrices de thèse, à Corinne Leyval, pour avoir accepté de diriger ce travail, à Anne Poszwa pour sa confiance et pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail depuis maintenant près de 5 ans en commençant par mon stage de maîtrise jusqu'à la thèse. Je vous remercie pour votre soutien et pour m'avoir fait partager vos expériences.

Je tiens aussi à remercier mes encadrants pendant ces 4 années, M. Christian Mustin qui m'a ouvert les portes de la géomicrobiologie (ce qui n'était pas gagné car, avant mon stage, je savais tous juste ce que bactérie signifiait), et Nathalie Vigier pour la partie isotopie et le monde merveilleux de la salle blanche où j'ai d'ailleurs connu mon mari.

Mes remerciements s'adressent à Mme Sylvie Dousset, Ms. Guilhem Bourrié, Oleg Pokrovsky, Joseph, Dufey, Frédéric Gérard et Stéphane Uroz qui, malgré leurs emplois du temps chargés, se sont intéressés à ce travail et ont accepté de le juger. Soyez assurés de ma profonde reconnaissance.

Je rends hommage à toutes les personnes qui m'ont aidé, de près ou de loin, pour la prise des mesures et la mise en œuvre de mes expériences : Jojo, Christine, David, Hervé, Géraldine et Nadim. Un coucou à mes collègues de bureau qui ont toujours mis une super ambiance et sur qui j'ai toujours pu compter : Brice, Jeanne, Goshia et le petit nouveau Olivier.

Un grand merci à tous mes collègues de travail devenus des amis : Zaz, Paul olivier, Arsène, Emile (un ami très très proche), Elsa, Cécile, Norbert, Jessica, Fabrice, Fabien. J'ai vécu de bons moments au sein du LIMOS, grâce à tous ceux déjà cités et bien d'autres : Thierry (toujours le mot pour rire) , Aurélie, Remy, Patrick, Sylvie Dousset, Sylvie Desobry, Jean Pierre, Colette, je garderai toujours de très bon souvenir.

Un grand merci au personnel administratif du laboratoire, Chantal, Dominique et sans oublier Laetitia.

Un grand merci à mes amis ivoiriens qui m'ont accueilli au sein de leur communauté, la CINA.

Je ne peux terminer sans remercier du fond du cœur ma famille, en particulier mes parents et mon mari qui m'ont toujours soutenu et sans qui je ne serais pas là aujourd'hui, mais aussi mes deux sœurs Alexandra et Mickaëlle ainsi que Fabien et Frédéric et mes cinq neveux et nièces Camille, Maxime, Cécile, Louane et Axel. Merci pour votre amour et votre soutien.

Enfin, je ne saurai terminer ces propos sans dire encore un grand merci à mon mari Émile (MPC), qui m'a accompagné durant toute ma thèse. Spéciale dédicace à toi .

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
-----------------------------------	----------

CHAPITRE 1. ÉTAT DES CONNAISSANCES ET OBJECTIFS DE LA THESE

I. Altération des minéraux	5
I.1 Terminologie et rôle des processus d'altération.....	5
I.1.1 <i>Terminologie de l'altération</i>	
I.1.2 <i>Rôle des processus d'altération à la surface de la Terre</i>	
I.2 Les processus d'altération et leurs agents.....	9
I.2.1 <i>Altération physique</i>	
I.2.2 <i>Altération chimique et biochimique</i>	
I.3 Altération biochimique dans l'évolution des sols.....	13
I.4 Les modèles d'altération chimique et leurs applications.....	15
I.5 Dispositifs expérimentaux d'étude de l'altération des minéraux en conditions biotique et abiotique.....	20
 II. Les bactéries, des agents de l'altération biogéochimiques.....	22
II.1 Les habitats bactériens lithosphériques	23
II.1.1 <i>Dans les sols</i>	
II.1.2 <i>Dans les roches plus ou moins profondes de la croûte terrestre</i>	
II.2 Nutrition des bactéries (source de carbone, d'énergie et d'électrons)....	25
II.2.1 <i>Les éléments</i>	
II.2.2 <i>Classification des bactéries</i>	
II.2.3 <i>Incorporation de ces éléments dans les bactéries</i>	
II.2.4 <i>Dégradation des sources de carbone = source d'énergie</i>	
II.3 Sécrétion d'acides organiques : leurs rôles dans l'altération	31

III. Conclusion et objectifs de cette thèse.....	35
 CHAPITRE 2. MATERIELS, DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX, ET METHODES D'ANALYSES	
 I. Introduction et démarche expérimentale.....	 39
 II. Matériels	 41
II.1 Minéraux employés.....	41
II.2 Les bactéries.....	41
II.2.1 <i>Les souches bactériennes de référence</i>	
II.2.2 <i>Communautés et souches bactériennes isolées des sols</i>	
 III. Dispositifs expérimentaux : microcosmes en microplaques ou réacteurs en flacons (agent d'altération/minéraux/solution).....	 46
III.1. Milieu de culture.....	46
III.2. Dispositifs en réacteurs	47
III.3. Dispositifs en mini réacteurs (microplaques).....	48
III.4. Validation et amélioration du biotest en microplaque.....	51
 IV. Prélèvement et caractéristiques générales des sols échantillonnés.....	 53
II.1 Localisation et caractéristiques générales des sols échantillonnés.....	53
II.2 Cas particulier des sols acides et amendés ou non sur le bassin versant de Senones, sur Grès Vosgien	56
II.3 Prélèvement, préparation des sols et profils des différents sols échantillonnés.....	57

V. Caractérisation de la phase solide.....	59
VI.1 Carbone organique et Azote total des sols.....	59
VI.2 Éléments minéraux échangeables dans les sols et capacité d'échange cationique.....	59
VI.3 Éléments minéraux majeurs totaux dans les sols.....	59
VI. Caractérisation de la phase liquide.....	60
VI.1 Éléments minéraux en solution.....	60
VI.1.1 <i>Analyse totale des cations par ICP-OES</i>	
VI.1.2 <i>Analyse isotopique du magnésium</i>	
VI.1.3 <i>Analyse des protons et fer par spectrophotométrie</i>	
VI.2 Éléments organiques en solution.....	62
VI.2.1 <i>Glucose (spectrophotométrie)</i>	
VI.2.2 <i>Acides organiques (Chromatographie ionique)</i>	
 CHAPITRE 3. IDENTIFICATION, TRAÇAGE ET VARIABILITE DES PROCESSUS D'ALTERATION DES PHYLLOSILICATES PAR DES SOUCHES BACTERIENNES	
 I Identification des processus d'acidolyse et de complexolyse et évaluation des compétences bactériennes.....	65
I.1 Contexte et objectifs.....	65
I.2 Identification des processus d'acidolyse et de la complexolyse par des agents chimiques et bactériens	67
I.3 Détermination des phénotypes d'altération des souches bactériennes.....	73
I.4 Diversité des métabolites (acides organiques) produits par les bactéries...	76
I.5 Synthèse sur la modélisation des processus d'altération et le phénotypage.....	80
 II Variabilité des compétences de lixiviation de fer par des bactéries.....	82
II.1 Contexte et Objectifs.....	82

II.2	Influence de l'état physiologique initial des bactéries - modalités de précultures.....	84
II.3	Influence des sources de carbone et d'énergie (concentration et nature)..	91
II.3.1	<i>Influence de la concentration initiale en glucose</i>	
II.3.2	<i>Influence d'autres facteurs limitants : source d'azote et de phosphore</i>	
II.3.3	<i>Influence de la nature de la source de carbone</i>	
II.4	Influence du contact bactérie/minéral.....	100
II.5	Synthèse sur la variabilité des processus d'altération des minéraux.....	105
III	Traçage isotopique des processus de lixiviation	107
III.1	Contexte et objectifs.....	107
III.2	Évolution du nombre de bactéries, de la consommation du glucose et du pH pendant les expériences.....	109
III.3	Concentrations en Mg dans les expériences de lixiviation chimique et biologique de phlogopite.....	112
III.4	Stoechiométrie de la réaction de lixiviation du Mg, Fe, Al et Si lors de l'altération de la phlogopite.....	114
III.5	Signatures isotopiques du Mg.....	117
III.6	Synthèse sur l'utilisation des isotopes du Mg comme traceurs de processus bactériens d'altération.....	122
IV	Conclusions de ce premier chapitre de résultats.....	125

CHAPITRE 4. DIVERSITE FONCTIONNELLE DE COMMUNAUTES BACTERIENNES ISOLEES DE SOLS DE LORRAINE

I	Effet d'un amendement calco-magnésien sur le potentiel de lixiviation du fer de communautés bactériennes extraites de sols développés sur Grés Vosgien : Influence des saisons et du couvert végétal.....	127
----------	--	------------

I. 1 Contexte et objectifs.....	127
I. 2 Effet d'un amendement calco-magnésien sur les caractéristiques générales de sols acides sous landes	128
I. 3 Les sols sous landes : effet saisonnier sur le nombre de bactéries extraites de chaque horizon, sur leur richesse fonctionnelle et sur leur potentiel d'altération	130
I.3.1 <i>Dénombrement des bactéries</i>	
I.3.2 <i>Richesse fonctionnelle potentielle de dégradation de substrats carbonés des communautés bactériennes</i>	
I.3.3 <i>Potentiel d'altération des phyllosilicates par les communautés bactériennes isolées directement des sols sous landes</i>	
I.3.3 <i>Effet du couvert végétal sur les communautés bactériennes fonctionnelles extraites des sols témoin et amendé</i>	
I. 4 Synthèse intermédiaire sur l'effet d'un amendement calco-magnésien sur la fonction d'altération des communautés bactériennes extraites de sols podzolisés.....	144
 II Potentiel d'altération de phyllosilicates par des bactéries fonctionnelles isolées de sols très contrastés.....	147
II. 1 Caractéristiques générales de divers sols échantillonnés	149
II. 2 Effet d'une occupation agricole sur le potentiel d'altération de phlogopite par les communautés bactériennes.....	152
II. 3 Lien entre les paramètres physico-chimiques du sol et les processus d'altération de phlogopite par les communautés bactériennes.....	154
II. 4 Les communautés fonctionnelles ont-elles des stratégies d'adaptation influençant la lixiviation d'éléments nutritifs lors de l'altération de phlogopite ?.....	159
II. 5 Comparaison du potentiel d'altération de la phlogopite par les communautés ou par les souches bactériennes isolées des mêmes communautés fonctionnelles.....	163
II. 6 Synthèse intermédiaire.....	167
 IV Conclusion.....	170

CHAPITRE 5. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	171
I. La fonction « altération » : Définition, qualité, régulation.....	171
I.1. Physico-chimie de la biolixiviation : du processus à la fonction.....	172
I.2. Écologie microbienne de la biolixiviation : variation fonctionnelle.....	173
I.2.1 <i>Physiologie (métabolisme carboné) versus origine</i>	
I.2.2 <i>Les stratégies : métabolisme carboné versus lixiviation</i>	
I.3. Impact de l'altération des minéraux silicatés par les bactéries sur les cycles biogéochimiques (Fe, Mg, Si ...)......	179
II. Le phénotype fonctionnel établi à partir de la biolixiviation de cations : un critère du bon fonctionnement des sols ?	182
III. Conclusion et perspectives.....	184
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	 188
 LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX.....	 201
 ANNEXE.....	 208

ARTICLE 1 accepté en révision dans *Geochimica et Cosmochimica Acta* :
Dissolution rates of phyllosilicates as a function of bacterial metabolic diversity

ARTICLE 2 en cours de soumission : Characterization of elemental release and Mg isotopic signatures during bacteria-phlogopite interactions

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Depuis leur origine (environ 4 milliards d'années), les microorganismes sont ubiquistes et ont une profonde influence sur l'environnement à la surface de la Terre. Les bactéries et champignons, en association ou non avec les plantes, contribuent en particulier à l'altération et l'érosion des minéraux des roches, à la solubilisation des solutés, à leur transfert dans les eaux, à la formation des sols et à un changement du climat global.

Comprendre l'origine de la qualité chimique des eaux continentales (eaux des sols, rivières, nappes souterraines) permet de répondre à des problématiques multiples et à différentes échelles, parmi lesquelles : (1) calculer des taux d'érosion chimique et mécanique, (2) estimer la fertilité et la pérennité d'écosystèmes, (3) déterminer les sources de pollutions organiques et/ou minérales. La qualité des eaux continentales est le résultat de processus multiples à l'interface entre des solutions, des minéraux, des surfaces biologiques (vivantes et mortes) et des gaz.

Les activités humaines par leurs impacts (comme l'augmentation des gaz à effet de serre, l'acidité des eaux de pluies ou la consommation des énergies fossiles...) peuvent avoir un effet significatif sur l'altération des roches (Brady et al, 1994 ; Konhauser, 2007 et Banwart et al., 2009). Par exemple, les pluies acides augmentent le taux de dissolution des roches dans certains bassins versants et causent l'acidification des eaux.

La compréhension des taux de dissolution des minéraux silicatés a été largement étudiée ces cinquante dernières années (Touray, 1979). Des études simplifiées en laboratoire ont été réalisées pour essayer de mieux comprendre les processus d'altération des minéraux induits par les plantes ou les microorganismes. Cependant, les différences observées entre les taux de dissolution des silicates déterminés en laboratoire et ceux calculés sur le terrain n'ont pas encore été bien expliqués dû en partie (1) à la complexité du milieu et (2) des réactions surtout quand le biologique est impliqué, (3) aux échelles de temps et aux variations climatiques et environnementales (Brantley, 2003 et White et Brantley, 2003).

Certains travaux montrent que les processus biologiques, en particulier ceux induits par les plantes et les microorganismes, ont un effet important sur le cycle biogéochimique global de la plupart des éléments minéraux (nutriments et polluants). De plus, l'altération en particulier des silicates contribuent activement à la régulation du climat terrestre par son influence sur la concentration en dioxyde de carbone (CO₂) atmosphérique (Urey, 1952).

Il a été démontré que les réactions de dissolution sont amplifiées en présence des bactéries au contact ou non avec les surfaces minérale soit (1) par production d'acides organiques ou inorganiques (acidolyse et complexolyse), (2) par production de sidérophores, (3) par modification des conditions pH et redox du milieu, (4) par formation d'un biofilm à la surface des minéraux accentuant l'altération (Berthelin, 1983 ; Robert et Berthelin, 1986; Barker et al. 1998).

Les deux principaux objectifs de ce travail de thèse ont été (1) d'identifier les processus d'altération de minéraux silicatés par les bactéries en utilisant un modèle empirique et (2) de caractériser la variabilité de ces processus et d'identifier les liens entre les principales caractéristiques physico-chimiques du sol, des paramètres environnementaux (type de végétation, saison) et les stratégies développées par les bactéries autochtones isolées de sols naturels. Pour atteindre ces objectifs, une approche physico-chimique de la lixiviation des minéraux et une approche biologique seront combinées pour permettre de modéliser ces processus et de discuter des paramètres les contrôlant.

Ce mémoire de thèse s'organise autour de 5 chapitres correspondant aux principaux objectifs définis :

Le premier chapitre intitulé « Altération des minéraux : processus et agents d'altération » aborde les différents aspects de la problématique de la thèse et il est scindé en 2 parties. Ce chapitre est une synthèse des principaux processus d'altération des minéraux en conditions aérobies dans les sols avec notamment une description des dispositifs développés pour étudier et modéliser ces réactions d'altération. La deuxième partie de ce chapitre présente les connaissances actuelles sur les bactéries des sols, leurs besoins énergétiques et nutritionnels, leur diversité, leurs activités et en particulier le rôle direct ou indirect des bactéries sur la lixiviation des éléments minéraux. Puis, seront présentés les différents objectifs et les démarches de cette thèse.

Le second chapitre traite de la démarche expérimentale employée au cours de ce travail. Il présente ainsi les matériels utilisés, en particulier tout ce qui concerne les cultures des bactéries puis les dispositifs expérimentaux optimisés pour atteindre les objectifs fixés. Ensuite sont abordés les aspects analytiques utilisés ou développés au cours de ce travail de thèse. Ils concernent principalement la caractérisation des phases solides (composition totale) des phases échangeables et liquides (concentrations en ions et acides organiques). Une partie des travaux de cette thèse a été consacrée au traçage des processus d'altération par des isotopes stables du magnésium (Mg).

Le chapitre 3 intitulé " Identification, traçage et variabilité des processus d'altération des phyllosilicates par des souches bactériennes " présente les grands résultats de la première partie de ce travail de thèse. Un modèle de dissolution empirique basé sur l'activité des protons et de ligands a notamment été utilisé pour étudier les interactions entre les souches bactériennes et silicates et pour quantifier les processus impliqués dans l'altération de deux phyllosilicates 2 :1 : la biotite et le phlogopite. Ce modèle a permis de comparer les taux de libération initiaux du fer (et d'autres éléments) lors de l'altération abiotique et bactérienne des deux micas et d'identifier les 2 processus majeurs (acidolyse et complexolyse) impliqués et leur importance relative. Cette approche a permis de mettre en évidence des phénotypes bactériens d'altération selon le métabolisme et les compétences des souches bactériennes utilisées ainsi que la variabilité des réponses bactériennes face à différents changements de paramètres expérimentaux sur l'altération des minéraux silicatés. Les résultats de l'étude menée avec les isotopes du Mg comme traceurs des processus d'altération figurent dans la dernière partie de ce chapitre.

Les résultats de ce chapitre 3 sont présentés dans deux articles scientifiques situés en annexe. Le premier a été accepté avec révisions majeures pour publication dans la revue *Geochimica et Cosmochimica Acta* et le deuxième sur les isotopes du magnésium sera soumis prochainement.

Le chapitre 4 intitulé " Diversité fonctionnelle de communautés bactériennes lixiviantes de cations isolées de sols de Lorraine " utilise le modèle validé dans le chapitre 3 pour étudier les processus d'altération de phyllosilicates par des communautés bactériennes isolées de sols. Le modèle permet de montrer dans cette partie que le potentiel d'altération des silicates par les communautés bactériennes isolées de sols régionaux (Vosges) dépend de leur

origine et en particulier des teneurs en matière organique et en nutriments (cations échangeables) des horizons de sols échantillonnés.

La première partie présente les résultats obtenus sur les effets d'un amendement calco-magnésien sur le potentiel d'altération des minéraux par les communautés bactériennes extraites de sols développés sur Grès Vosgien. La seconde partie traite du potentiel d'altération de phyllosilicates par des bactéries fonctionnelles isolées de sols très contrastés et notamment des stratégies d'altération mises en place dans ces différents sols ou horizons de sol suivant les teneurs en matière organique et en nutriments.

Le cinquième et dernier chapitre synthétise les principaux résultats obtenus dans cette thèse et en particulier la fonction «lixiviation de cations» en insistant sur sa définition, sa qualité et sa régulation et aussi sur le phénotype fonctionnel établi à partir de la biolixiviation de cations comme critère du bon fonctionnement des sols avec l'utilisation de l'approche interdisciplinaire en tant qu'outil d'identification fonctionnel pour évaluer la qualité des sols plus ou moins anthropisés. Quelques perspectives à ce travail ont été développées à plusieurs échelles d'observations.

ÉTAT DES CONNAISSANCES

- **CHAPITRE 1** : Altération des minéraux : rôle, processus, acteurs.
- **OBJECTIFS DE LA THESE**

CHAPITRE 1. ALTERATION DES MINERAUX : ROLE, PROCESSUS, ACTEURS.

La première partie de cette revue bibliographique introduit la notion d'altération des minéraux dans les sols. En particulier elle aborde les processus mis en jeu et les principaux agents d'altération impliqués. La deuxième partie traite des bactéries, notamment de leurs caractéristiques métaboliques et de leur rôle dans l'altération.

I. ALTERATION DES MINERAUX

I.1 Terminologie et rôle des processus d'altération

I.1.1 Terminologie de l'altération

L'altération d'une roche est le changement que subit une roche du fait d'actions externes. Les changements subis peuvent amener à la destruction d'une roche mère cohérente ou à la consolidation de roches meubles (sable transformé en grès). L'altération regroupe deux catégories de phénomènes : (1) la météorisation (« weathering » en anglais) dont l'étymologie souligne le rôle déterminant du climat et (2) la pédogenèse où des processus biologiques s'ajoutent aux phénomènes de météorisation et contribuent à la formation d'un sol. Dans les sols bien différenciés ou en cours de formation, il est très difficile de déterminer la part respective des deux types de phénomènes, l'action biologique étant présente partout sur le globe, mais son intensité variant des zones tropicales humides aux déserts en fonction des paramètres climatiques.

Dans ce travail, le terme « altération » fera référence à l'ensemble des phénomènes de météorisation et de pédogenèse. Plus précisément, l'altération désignera la lixiviation (i.e. le transfert en solution) des cations contenus initialement dans la structure d'un minéral donné. Cette lixiviation aussi appelée dissolution est dite stoechiométrique ou congruente lorsque la composition de la solution finale est la même que celle du minéral qui a été préalablement dissous dans une solution initiale (cas de la calcite). Elle sera non stoechiométrique dans le cas contraire. Lorsque la dissolution s'accompagne de la nucléation d'une nouvelle phase dans la solution, il s'agit du mode incongruent. Lorsque certains éléments seulement sont

solubilisés, les autres constituants formant des phases résiduelles, la dissolution répond à un mode dit sélectif. Les modes sélectif et incongruent peuvent être parfois confondus car ils amènent tous deux à une dissolution non stœchiométrique. Cependant, ils répondent à des mécanismes très différents et doivent être distingués (Touray, 1980). Le tableau 1-1 répertorie ainsi les 3 principaux modes de dissolution qu'il est possible de distinguer : congruent, incongruent et sélectif.

Tableau 1- 1. Principaux modes de dissolution des minéraux

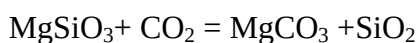
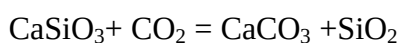
	Sélective	Non sélective
Stœchiométrique	-	Mode congruent
Non stœchiométrique	Mode Sélectif	Mode incongruent

1.1.2 Rôle des processus d'altération à la surface de la Terre

À l'échelle de la planète et des temps géologiques, lorsqu'une roche, quelle que soit sa nature, se retrouve à la surface des continents, elle se retrouve en déséquilibre par rapport aux conditions dans laquelle elle a été formée. On distingue ainsi les minéraux primaires des roches qui n'ont pas subi les effets d'une altération postérieure à leur formation, des minéraux secondaires formés à partir de l'altération et de la transformation des minéraux primaires.

Au contact de l'atmosphère de l'hydrosphère et de la biosphère, la roche subit une fragmentation physique puis l'altération de ses minéraux par les phénomènes de météorisation et pédogenèse définit dans le paragraphe précédent. Ce processus, combiné au processus d'érosion, participe à l'usure des surfaces continentales, au comblement des bassins lacustres ou marins jusqu'à un stade de pénéplaine.

L'érosion des continents, via l'altération des silicates, participe activement à la régulation du climat terrestre par son influence sur la concentration en dioxyde de carbone (CO₂) atmosphérique. Les équilibres réactionnels ci-dessous décrivent les processus d'altération des silicates qui compensent les émissions volcaniques et métamorphiques de CO₂ et régulent ainsi les niveaux de CO₂ atmosphérique au cours des temps géologiques (Urey, 1952).



Dans ces équations, les composés CaSiO_3 et MgSiO_3 représentent les minéraux silicatés contenant du calcium et du magnésium. Les silicates sont des minéraux constitués de tétraèdres et d'octaèdres : (1) assemblés en trois dimensions : tectosilicates (exemple : feldspaths), (2) assemblés en chaîne (exemple : pyroxènes, amphiboles), (3) organisés en feuillets : phyllosilicates (biotite muscovite...) et (4) isolés : inosilicates. On estime que 90 % de la croûte terrestre est constituée de matériaux silicatés. Les silicates sont formés dans diverses conditions (magmatiques, métamorphiques et sédimentaires) et deviennent très instables lorsqu'ils sont exposés à la surface de la terre.

Sur les continents, la dissolution des carbonates joue également un rôle important dans le contrôle de la qualité chimique des rivières et des nappes souterraines (aquifères = réservoir).

À une échelle locale et de manière plus spécifique, l'altération physique et/ou (bio)chimique des minéraux constitutifs d'une roche mère participe à la formation du sol sur lequel la végétation s'installe (Duchaufour, 1978). L'ensemble de cet écosystème influence alors la composition chimique des eaux naturelles (Berner, 2003). L'altération des minéraux permet la libération d'éléments minéraux dans le milieu naturel. Cette étape est très importante pour le bon fonctionnement des écosystèmes terrestres. D'une part, la libération des cations est le premier mécanisme impliqué dans la neutralisation de l'acidité qui va ainsi contribuer au contrôle du pH dans les eaux naturelles. D'autre part, l'altération permet d'accroître la disponibilité d'éléments minéraux essentiels (nutriments) pour les êtres vivants et jusque-là inaccessibles. En effet, le sol constitue une ressource limitée et non renouvelable en éléments essentiels pour la biosphère. Les nutriments sont contenus dans les minéraux altérables dont la quantité dans les sols dépend de la nature de la roche mère et des étapes de pédogenèse ayant amené à la formation de ce type particulier du sol. Cette ressource n'est jamais entièrement disponible pour les êtres vivants. La notion de biodisponibilité caractérise la fraction de nutriments, susceptible d'être prélevée par un organisme vivant. Quantitativement, cette fraction est variable selon l'organisme vivant considéré et ses besoins nutritifs spécifiques. Elle dépend également de l'élément, de sa spéciation et des propriétés physico-chimiques du milieu qui influent sur sa mobilité dans les sols.

La fraction minérale d'un sol est constituée de particules de nature et de taille variables fonction tout d'abord de la nature de la roche mère et du climat. Sous climat tempéré et sur roche silicatée (Figure 1-1), les silicates primaires (hérités) ou secondaires (transformés ou

néoformés) représentent une grande partie de la composition minéralogique des sols. Cependant, le type de silicate (et sa composition minéralogique) est corrélé dans les sols à la fraction granulométrique considérée. Les minéraux primaires sont plus abondants dans la classe des sables alors que les minéraux argileux secondaires sont essentiellement localisés dans la fraction granulométrique la plus fine.

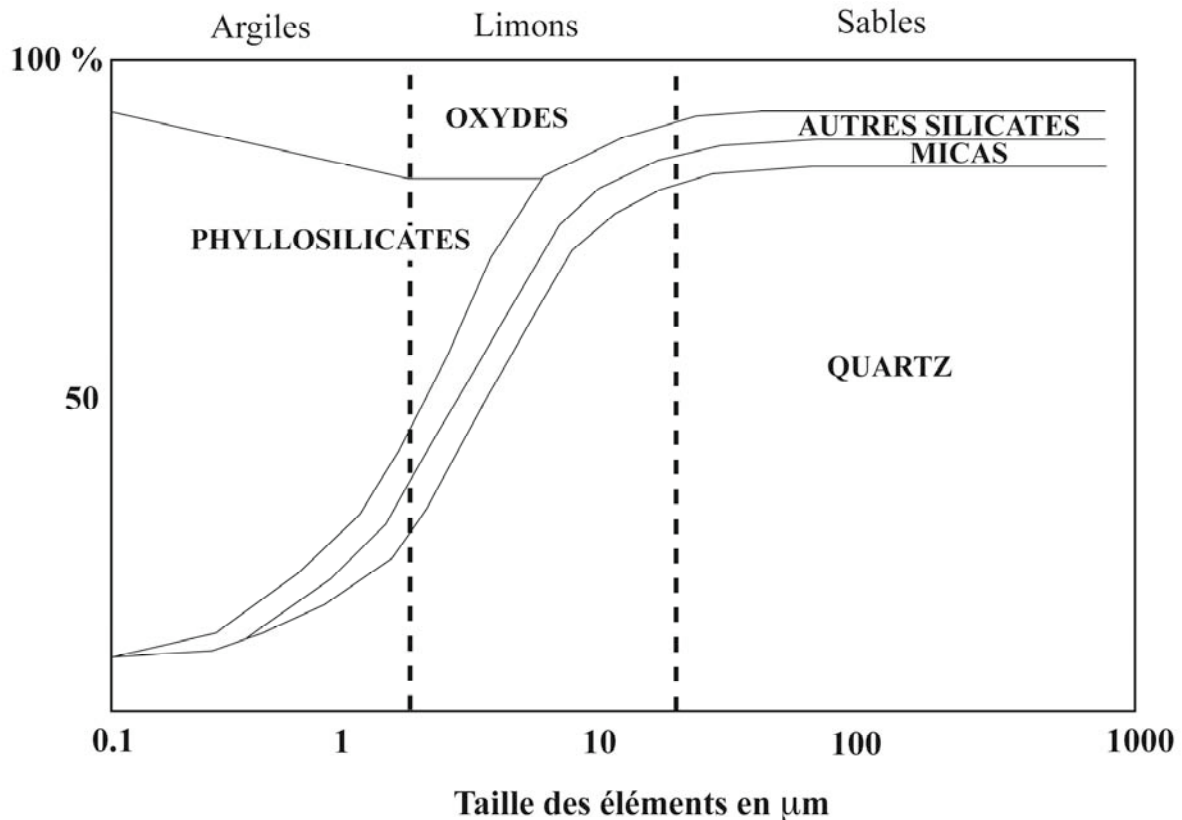


Figure 1- 1. Composition moyenne minéralogique du sol en climat tempéré

La proportion de phyllosilicates dans les sols n'est pas à négliger. Ce sont des minéraux très réactifs des sols qui ont un rôle important dans la rétention des cations sous la forme échangeable et disponible pour les êtres vivants. Ils forment une grande famille minérale au sein de laquelle se côtoient des minéraux primaires de type micas et des argiles secondaires de structure, de texture et de morphologie variées.

Dans les écosystèmes peu anthropisés, la quantité d'éléments provenant de la phase minérale et libérée par altération (flux d'altération) va constituer une des deux sources d'éléments nutritifs avec les dépôts atmosphériques contribuant à la qualité des solutions de

sols. Le flux d'altération est calculé avec certaines d'imprécisions dépendant du choix du modèle de calcul des surfaces minérales exposées aux solutions. Ces flux d'altération sont différents d'un écosystème à l'autre influencés par la roche mère, le climat (précipitations et températures) et aussi par la végétation (Tableau 1-2).

Ainsi, dans les sols formés à partir d'une roche riche en minéraux altérables, l'apport des nutriments proviendra en majorité de l'altération des minéraux du sol alors que dans les sols développés sur roches pauvres (comme les grès), l'apport des nutriments proviendra en majorité des dépôts atmosphériques.

Tableau 1- 2. Exemple de flux d'altération (Ca, K, Mg) et dépôts atmosphériques pour quelques sols.

Site	Sol (WRB 2006)	Roche mère	Flux (Kg/ha/an)		Références
			Altération	Dépôt atmosphérique	
France	cambisol dystrique	tuff volcanique	9,4	10,2	Ezzaïm et al., 1999
Suède	regosol dystrique	sable limoneux	36	10	Van der Salm et al., 1997
Suède	regosol umbrique	grès	52,8	44,4	
Danemark	podzol haplique	grès	32,8	227,2	

Pour résumer, les processus d'altération des minéraux silicatés sont complexes et sont le résultat d'une combinaison de réactions physiques, chimiques et biochimiques, interconnectées et interagissant entre elles. Ces processus contribuent aux cycles biogéochimiques globaux de la plupart des éléments minéraux en particulier à la qualité chimique des eaux, à la fertilité et la pérennité d'écosystèmes mais aussi à la régulation du climat terrestre par son influence sur la concentration en dioxyde de carbone (CO₂) atmosphérique.

I.2 Les processus d'altération et leurs agents

I.2.1 Altération physique

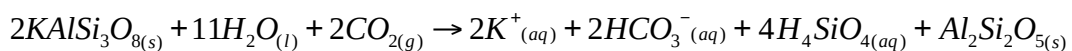
Les processus d'altération physique permettent la fragmentation et la fracturation mécanique de la roche sans changement de sa composition minéralogique. Ils conduisent ainsi

à l'accroissement de surfaces fraîches des minéraux exposées à l'atmosphère, la biosphère et l'hydrosphère (Bricker et al., 1994) et soumises simultanément à des processus d'altération biochimique (paragraphe suivant). Ces processus d'altération physique sont liés aux agents climatiques comme le vent (abrasion) ou le gel (cryoclastie) mais également aux agents biologiques comme les hyphes de champignons, les racines des plantes, les organismes fouisseurs ou constructeurs.

1.2.2 Altération chimique et biochimique

Les processus naturels d'altération chimique au sens strict sont issus de l'action de l'eau, du CO₂ et de leurs composés acides dérivés comme l'acide carbonique (Mulder et al., 1994). Ils provoquent une évolution de la composition chimique des minéraux de la roche mère, qui sont progressivement incorporés dans le profil de sol à des stades diverses de transformation (héritage, transformation, néoformation). La dissolution des minéraux primaires conduit à leur appauvrissement en ions, généralement dans l'ordre suivant de mobilité décroissante aux pH voisins de 7 : Na > Ca > Mg > K > Si > Fe > Al. Cet ordre peut cependant varier en fonction des minéraux cibles. Ces éléments sont libérés dans les solutions au contact des minéraux en voie d'altération; ce qui conduit à la modification de la composition chimique des eaux. Les trois principaux processus d'altération chimique sont l'hydratation, l'hydrolyse et la dissolution des minéraux. En fonction du minéral, l'altération chimique peut être congruente ou incongruente (cf paragraphe 1.1).

Par exemple, la dissolution des calcaires ou des quartzites est congruente et complète, la roche mère est entièrement dissoute et tous les produits de la réaction congruente sont des espèces dissoutes (sous forme ionique). En revanche, les dissolutions incongruentes produisent des espèces dissoutes et de nouveaux solides (transformation ou néoformation de minéraux) plus stables, dans ce nouvel environnement, que le minéral primaire d'origine (Bricker et al., 1994). Ces minéraux secondaires constituent une grande partie de la fraction minérale d'un sol évolué. Par exemple, l'orthose se transforme en kaolinite par la réaction suivante:



On parlera d'altération biochimique lorsque, en plus des agents climatiques comme la pluie et le CO₂ atmosphérique, interviennent directement ou indirectement des agents biologiques.

Tableau 1- 3. Agents chimiques et biochimiques agissant sur l'altération

Agents chimiques et biochimiques		Quelques exemples	
Acides minéraux		HCl, HNO ₃ , H ₂ CO ₃ , HCO ₃ ⁻	
Ligands minéraux		PO ₄ ³⁻	
Ligands	Ligands organiques	Sidérophores	hydroxamate, catécholate...
		Acides organiques	acides oxalique, acide citrique...

Les principaux agents biochimiques sont des produits (Tableau 1-3) issus (1) de la dégradation de matériel organique par les plantes (via les exsudats racinaires) et les microorganismes, (2) de l'activité et (3) de la respiration (CO₂) des microorganismes et des racines (Mulder et al., 1994 et Nihlgard et al. 1994). Le prélèvement préférentiel des cations par les racines engendre un déséquilibre ionique dans les cellules racinaires compensé par l'excrétion de protons par la plante. En plus de ces protons, les plantes et la microflore du sol produisent divers composés et ligands organiques qui peuvent amplifier l'altération des minéraux dans les sols. Ces ligands organiques, principalement des acides aliphatiques, sont produits lors de la décomposition de la matière organique par les champignons et les bactéries, mais sont aussi produits par les plantes qui les sécrètent (Berthelin, 1983; Calvaruso et al., 2006; Robert et Berthelin, 1986; Ullman et al., 1996; Welch et Ullman, 1999). Ces ligands organiques permettent la mobilisation des nutriments dans les sols. Leur concentration varie en fonction de leur environnement et du type de sol. Elles sont en moyenne de l'ordre de 0,001M (Drever et Stillings, 1997).

Dans des conditions de carences nutritives non favorables pour leurs croissances, les plantes développent des stratégies pour altérer les minéraux et rendre disponibles les nutriments absents. Par exemple, 2 stratégies sont connues pour rendre le fer disponible, sous forme assimilable, dans les sols : la production (1) d'acides organiques ou (2) de sidérophores

(Neumann et Römheld, 2000). Les microorganismes (bactéries et champignons) peuvent aussi sécréter ces substances (Kalinowski et al., 2000; Liermann et al., 2000; Uroz et al., 2007; Welch et Ullman, 1999a). La sécrétion des acides organiques est liée à la dégradation d'une source de carbone et au métabolisme de chaque microorganisme (Figure 1-1). Tous ces produits issus de l'activité des organismes vivants, acides et ligands organiques agissent sur l'altération des minéraux: (1) en se fixant sur les surfaces minérales, mobilisant ainsi les éléments et (2) en complexant les éléments en solution déplaçant ainsi les équilibres entre le minéral et la solution et en accélérant indirectement le taux de dissolution des minéraux. Les microorganismes peuvent également accélérer les réactions d'altération en modifiant les conditions redox du milieu (en utilisant les composés carbonés comme donneur et accepteur d'électrons comme dans la réduction dissimilative du fer) ou en produisant à la surface des minéraux des biofilms (formés d'exopolymères plus ou moins hydrophiles) retenant l'eau et augmentant ainsi potentiellement le taux d'altération (Barker et al., 1998). Cependant, certaines substances comme les polysaccharides (pectine, acide glucuronique et alginique produits par certaines bactéries) inhibent au contraire la dissolution des silicates en se liant irréversiblement aux sites réactifs de surface des minéraux en formant des complexes multinucléaires (Golubev et al., 2006; Welch et al., 1999; Welch et Vandevivere, 1994).

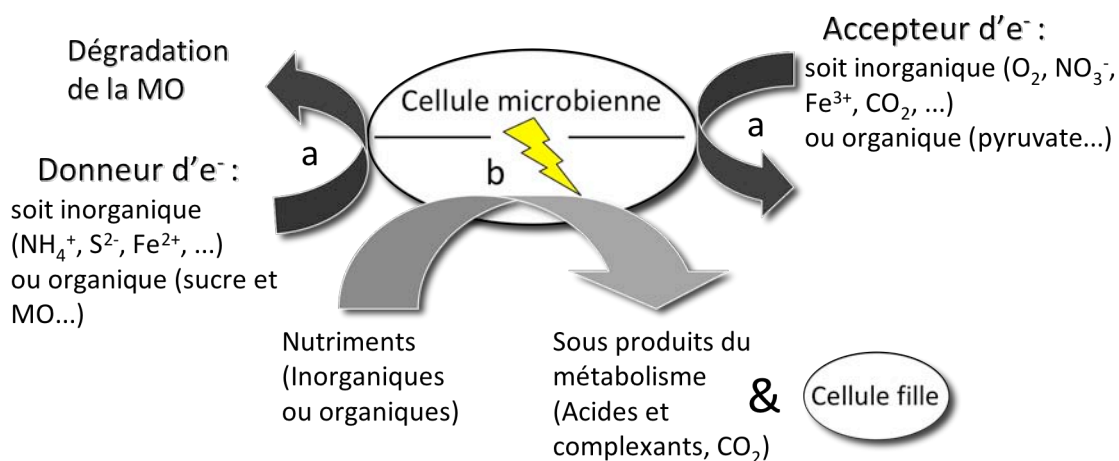


Figure 1- 2. Schéma de l'activité microbienne (a : respiration de la bactérie, b : production d'énergie grâce aux nutriments pour former une cellule fille) d'après Berthelin, 1983. (Cas des organismes aérobies et anaérobies)

Ainsi les processus biologiques (biophysiques ou biochimiques), en particulier ceux induits par les plantes et les microorganismes, ont un effet important sur le cycle

biogéochimique de la plupart des éléments minéraux. Ces organismes via leurs activités métaboliques libèrent des agents altérants minéraux et organiques qui permettent la lixiviation de cations lors de l'altération de minéraux.

I.3 Altération biochimique dans l'évolution des sols

L'altération biochimique à l'échelle du sol progresse de haut en bas des horizons humifères vers la roche mère. Elle est liée à l'évolution de la matière organique et à l'action de ses produits de dégradation. Elle dépend donc de l'activité biologique, du pH et du type d'humus, paramètres eux même liés aux conditions climatiques et à la richesse initiale de la roche mère. On peut distinguer trois grands types d'altération biochimique qui conduisent à des pédogenèses diverses et des profils de sols contrastés : l'hydrolyse neutre, l'acidolyse et la complexolyse (Duchaufour, 1988 ; Robert et Berthelin, 1986, Campy, 2003).

- L'hydrolyse neutre caractérise les milieux avec une capacité d'échange cationique (la quantité de cations qu'un sol peut retenir sur son complexe absorbant pour un pH donné) très importante. C'est notamment le cas pour les milieux calcaires sur lesquels se développent un humus de type mull eutrophe (exemple sur roche carbonatée) ou mésotrophe carbonatée. L'altération est toujours très modérée et de type héritage dominant.

- L'acidolyse caractérise les sols à humus de type mull acide. Les composés organiques solubles complexants sont biodégradés ou insolubilisés dans les horizons de surface. Seuls certains composés non complexant atteignent l'horizon B en particulier les acides minéraux provenant de la minéralisation de la matière organique. Dans ces conditions, une transformation plus ou moins importante de certains minéraux primaires est observée. Par exemple, les micas sont soumis à une perte de leurs ions potassium et à une ouverture de leurs feuillets. Une aluminisation importante des argiles conduit à des vermiculites alumineuses.

- La complexolyse est le type d'altération qui caractérise des milieux très acides et très froids où la faible activité biologique conduit à un humus de type moder ou mor. Les produits de dégradation des matières organiques sont essentiellement des acides carboxyliques simples (acide oxalique ou citrique) ou aromatiques (acide fulvique). Ces composés sont très complexants et ne sont pas facilement dégradables, ce qui leur permet (1) d'atteindre les

horizons minéraux plus profonds et (2) de solubiliser par complexation des éléments (Fe et Al) contenus dans les minéraux primaires. La présence de matière organique ne conduit à aucune néoformation d'argiles, les éléments étant partiellement solubilisés et transportés ou insolubilisés sous forme amorphe. Ce processus est caractéristique d'une pédogenèse de type podzolisation.

Le tableau 1-4 récapitule les types d'altération en fonction des zones climatiques et de quelques types de sols (Campy, 2003).

Tableau 1- 4. Processus d'altération biochimique dominant en fonction des zones climatiques et de quelques types de sols

Climat	Sol	Type d'altération	Formation d'argile	
			Transformations	Néoformation
Boréal	Podzol	Complexolyse	Dégradation, solubilisation	Nulle
Tempéré	Podzol (mor)	Complexolyse	Dégradation, solubilisation	Nulle
	Brun (mull)	Acidolyse	Transformation (dégradation modérée)	Faible
Méditerranéen	Fersiallitique	Hydrolyse neutre	Héritage transformation ménagée	Moyenne (bisiallitisaiton)
Tropical	Milieu Drainé : Ferrugineux tropical	Hydrolyse totale	(Héritage, transformation limités)	Assez forte (monosiallitisaiton)
	Milieu confiné : vertique	Hydrolyse totale	(Héritage, transformation limités)	Forte (bisiallitisaiton)
Équatorial	Ferrallitique	Hydrolyse totale	(Héritage, transformation nuls)	Forte (monosiallitisaiton allitisaiton)

Le sol est la résultante de processus bio-physico-chimiques variables d'un sol à l'autre. Sous climat tempéré, les sols pauvres et acides de type podzol subissent une altération de type complexolyse avec l'action de beaucoup de ligands organiques à des pH bas. Dans les sols brun au s.l., le principal processus biochimique impliqué est plutôt l'acidolyse. L'activité biologique est donc un facteur important expliquant la formation et

l'évolution des sols au même titre que les conditions climatiques et celles du milieu (roches parentales, topographie...).

I.4 Les modèles d'altération chimique et leurs applications

L'altération des minéraux a été très largement étudiée ces 50 dernières années dans des conditions très variées, aussi bien en conditions naturelles notamment dans les sols, qu'en conditions expérimentales contrôlées au laboratoire, en dispositifs ouverts ou fermés. La compréhension des paramètres régissant ces processus et les vitesses de réactions impliquées est essentielle pour comprendre et modéliser les flux d'éléments lixiviés dans les solutions de sols et dans les eaux continentales. À l'échelle d'une parcelle ou d'un bassin versant, ces quantifications permettent de comprendre le fonctionnement d'un écosystème et d'estimer sa pérennité. À une échelle plus globale, elles aident à prédire l'impact d'un changement climatique (augmentation de la concentration en CO₂ atmosphérique) sur l'altération.

Si les principales étapes de la dissolution des minéraux sont assez bien connues, en revanche, les processus qui caractérisent chacune d'elles, les paramètres déterminants ainsi que les facteurs limitant restent plus difficiles à préciser. Au cours d'une lixiviation ou dissolution minérale, la mise en solution des éléments constitutifs du minéral est le résultat de processus physiques (diffusion, adsorption) et chimiques. Trois étapes principales interviennent:

- Étape 1 : le transport en solution des réactifs vers l'interface solide/liquide (par convection, diffusion ou migration);
- Étape 2 : les phénomènes de surface qui incluent l'adsorption des réactifs sur les sites actifs présents à la surface du minéral, la solubilisation des produits de la réaction et la désorption des réactifs et produits;
- Étape 3 : le transport en solution des produits de la réaction hors de l'interface solide/liquide.

Plusieurs paramètres contrôlent la dissolution du minéral en modifiant directement les vitesses relatives du transport des éléments chimiques dans la solution et les réactions chimiques à la surface du minéral. Les quantités de réactants ou de bioréactants produits ainsi que l'abondance des surfaces minérales réactives disponibles limitent le processus de

dissolution dans son intégralité. Si la diffusion ou l'advection des solutés contrôlent la première et la troisième étape, la cristallogénèse et la texture du minéral cible sont déterminantes pour la seconde. Par conséquent, deux modèles sont généralement utilisés pour décrire l'altération chimique suivant l'étape limitante prédominante : le modèle de diffusion et le modèle de réaction de surface (Drever et Stillings, 1997).

- **Modèle de diffusion** : le taux de dissolution est limité par le transport d'éléments minéraux à travers une fine couche (phase liquide ou solide) enrichie ou appauvrie en cations. Ce modèle est rarement utilisé aujourd'hui, sauf lorsque la cinétique de la réaction de surface est très rapide, la dissolution étant alors contrôlée par la diffusion des espèces en solution. Le flux de diffusion J_i d'une espèce i en solution perpendiculairement à une surface peut être alors obtenu à partir de la première loi de Fick : $J_i = - \phi D_i \rho (\delta m_i / \delta x)_t$ où D_i et m_i correspondent respectivement au coefficient de diffusion effectif et à la molalité des espèces i en solution, ρ correspond à la densité de la solution aqueuse et ϕ correspond à la porosité du support par le biais de la diffusion qui se produit (Murphy et al., 1989).

- **Modèle de réaction de surface** : le modèle de réaction de surface est issu de la théorie de l'état transitoire (TST) développée par (Eyring, 1935) puis appliquée aux interactions solide/solution par Lasaga (1998). Cette théorie stipule que dans toute réaction chimique, les réactifs doivent franchir une barrière énergétique appelée complexe activé, avant d'être transformés en produits. Cette théorie fournit un cadre cohérent pour étudier les réactions hétérogènes et elle est appliquée avec succès à la dissolution de certains minéraux (Oelkers, 2001).

Lorsque la réaction de surface est beaucoup moins rapide que le transport en solution alors c'est elle qui contrôle la dissolution et qui est l'étape limitante. Dans certains cas, il se peut qu'aucun des 2 mécanismes ne prédomine. La dissolution est alors contrôlée à la fois par les réactions de surface et le transport des réactifs (cinétique mixte).

La dissolution des minéraux est contrôlée par l'adsorption des protons et la quantité d'hydroxyles et de ligands en solution polarisant et affaiblissant les liaisons oxygène-métal à la surface du minéral (Helgeson et al., 1984; Furrer et Stumm, 1986; Malmström et al., 1996). Plusieurs études ont porté sur l'effet catalytique des acides carboxyliques sur la dissolution

des oxydes et des silicates (Furrer et Stumm, 1986 et Cama et Ganor, 2006). Les auteurs estiment que la vitesse globale de dissolution en présence de ligands est la somme de deux réactions de surface dépendantes : l'acidolyse (« proton-promoted dissolution ») et la complexolyse (« ligand-promoted dissolution »). L'acidolyse prédomine à pH acide (1-4) alors que la complexolyse agit préférentiellement lorsque l'effet des protons est minimal, c'est-à-dire à pH approchant la neutralité (Welch et Ullman, 1999). Un modèle empirique a été proposé pour ajuster le pH et les ligands à la vitesse de dissolution des minéraux (R_w) (Furrer et Stumm, 1986):

$$R_w = k_H (a_{H^+})^n + K_O + k_{OH} (a_{OH})^m + k_{L,M} (a_L)^l \text{ (eq. 1)}$$

Dans cette équation, k est la vitesse de réaction, a_{H^+} , a_{OH} et a_L désignent respectivement l'activité des protons, des hydroxydes et des ligands et n , m et l correspondent à des ordres de réaction (constantes expérimentales).

Ce modèle empirique, où les constantes sont déterminées expérimentalement, est maintenant utilisé dans la plupart des études réalisées sur l'altération des silicates et des oxydes en présence de protons (Acker et Bricker, 1992; Wieland et Stumm, 1992 ; Malmström et al., 1996; Chen et Brantley, 1997; Malmström et Banwart, 1997; White et al., 1999; Malmström et al., 2000; Brantley, 2003; White et Brantley, 2003 et Kalinowski et Schweda, 2007;) et de ligands (Ganor et al., 1995; Stillings et Brantley, 1995; Shillings et al., 1996; Welch et Ullman, 1996 ; Ganor et al., 2001; Golubev et al., 2006; Golubev et Pokrovsky, 2006 et Olsen et Donald Rimstidt, 2008).

Ce modèle permet (1) de caractériser la vitesse et l'ordre de réaction de chaque minéral, (2) de calculer les cinétiques de dissolution des minéraux à partir de la mesure du pH (activité des protons) et de la quantité d'éléments lixiviés en solution et (3) de prédire à moyen terme la lixiviation des éléments lorsque l'état d'équilibre est atteint.

L'ordre de stabilité des minéraux, calculé à partir des cinétiques de dissolution mesurées, suit généralement les tendances d'altération observées dans la nature (Figure 1-3).

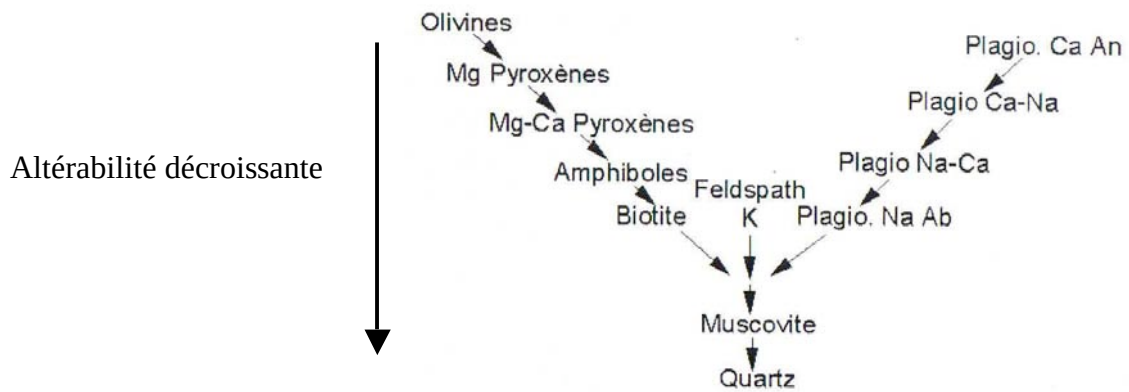


Figure 1- 3. Ordre d'altération des minéraux établi par Goldich en 1938

La dissolution des silicates est généralement supposée être « interface limitée » et accélérée par la présence de protons et d'hydroxyles. Les cations et anions sont libérés en solution et le résidu d'altération se recombine pour former des minéraux secondaires comme les argiles ou les oxydes beaucoup plus stables dans les conditions environnementales du sol. La température, le pH de la solution et la taille des minéraux influencent fortement le taux de dissolution (White et al., 1999). Chaque minéral a également une composition chimique et une structure cristallographique qui le définissent. La dégradation des silicates est ainsi corrélée à la proportion de liaisons Al-O et au taux de substitution dans les tétraèdres (Si) et octaèdres (Al). Par exemple l'anorthite, plagioclase calcique (2 Al pour 8 O), est plus fragile que l'albite, plagioclase sodique (1 Al pour 8 O) (Cours de Minéralogie, Dusauroy Y, UHP Nancy 1).

L'altération des minéraux dépend de leurs conditions de formation, de leur cristallographie et des paramètres environnementaux auxquels ils sont confrontés. Ainsi les olivines formées à haute pression et haute température sont très peu stables lorsqu'elles sont exposées à la surface de la terre et elles s'altèrent très vite contrairement aux biotites. De plus, la nature des minéraux secondaires dépend des minéraux primaires et de leur degré d'altération. Comme indiqués dans le tableau 1-5, les taux de dissolution et les ordres de réaction des quelques minéraux répertoriés sont très différents d'une espèce à l'autre, d'un échantillon à l'autre pour un même minéral voire d'une expérience à l'autre. L'altérabilité du minéral peut être estimée à partir des constantes de dissolution k et de l'ordre de réaction estimé expérimentalement. Plus le taux de dissolution (k) est élevé (cas de la forstérite et de la fayalite), plus les éléments chimiques seront libérés rapidement et en grande quantité.

Pour extrapoler les vitesses de dissolution des minéraux d'un système à un autre, Brantley, (2003) conseille de tenir compte des variables suivantes: (1) les différents processus d'altération, (2) la surface réactive du minéral, (3) la composition du minéral, (4) la température de dissolution, (5) la chimie des espèces dissoutes en solution, (6) l'affinité chimique des espèces dissoutes, (7) le temps de la réaction, (8) les paramètres hydrologiques et enfin (9) les facteurs biologiques.

Cependant, la vitesse d'altération des minéraux dans la nature est généralement cinq ordres de grandeur plus faible que les taux de dissolution des minéraux estimés en laboratoire (White et Brantley, 2003). Les raisons d'un tel écart sont encore à vérifier et à identifier. Ces divergences peuvent être la conséquence de schémas expérimentaux peu comparables, de facteurs externes mal reproduits ou non maîtrisés ou encore d'infimes variations dans la composition des échantillons. De plus, en laboratoire, les taux de dissolution sont calculés loin de l'équilibre chimique, alors que dans la nature, l'altération se produit dans des conditions proches de l'équilibre conduisant à une dissolution plus faible.

Tableau 1- 5. Récapitulatif des taux de dissolution de quelques silicates calculés à partir de l'équation 1 (Brantley, 2003)

Minéral	log K_H	n	pH	Données utilisées	Formule utilisée
Forstérite	-7,0	0,49	< 5,7	Chen et Brantley, 2000	O ₄
Fayalite	-6,0	0,69		Wogelius et Walther, 1992	O ₄
Epidote	-10,7	0,26	2-4	Kalinowski <i>et al.</i> , 1996	O ₁₂ (OH) ₂
Enstatite	-8,6	0,11	2-7	Ferruzzi, 1993	O ₆
Enstatite	-9,3	0,24	1-13	Oelkers et Schott, 2001	O ₆
Diopside	-9,4	0,15	2-10	Knauss <i>et al.</i> 1993	O ₆
Diopside	-9,0	0,12	2-6	Knauss <i>et al.</i> 1993	O ₆
Diopside	-10,5	0,19	1-4	Chen et Brantley, 2000	O ₆
Hornblende	-11,2	0,33	1-5	Frogner et Schweda, 1998	O ₂₂ (OH) ₂
Hornblende	-10,4	0,53	3-5	Frogner et Schweda, 1998	O ₂₂ (OH) ₂
Hornblende	-10,4	0,36	1-5,7	Frogner et Schweda, 1998	O ₂₂ (OH) ₂
Hornblende	-10,9	0,34	1-5,7	Frogner et Schweda, 1998	O ₂₂ (OH) ₂
Glaucophane	-6,1	0,64	3-7	Sverdrup 1990	O ₂₂ (OH) ₂
Muscovite	-11,8	0,14	1-4	Kalinowski et Schweda, 1996	O ₂₀ (OH) ₂
Phlogopite	-10,5	0,40	1-4	Kalinowski et Schweda, 1996	O ₂₀ (OH) ₂
Biotite	-9,5	0,61	1-4	Kalinowski et Schweda, 1996	O ₂₀ (OH) ₂
Chrysolite	-12,2	0,24		Bales et Morgan, 1985	O ₅ (OH) ₂
Talc	-12,5	0,00		Lin et Clemency, 1981	O ₁₀ (OH) ₂

L'utilisation de modèle empirique s'avère nécessaire (1) pour la compréhension des taux de dissolution des minéraux et des processus impliqués, (2) pour le calcul des flux d'éléments lixiviés dans les solutions de sols et dans les eaux continentales et (3) pour la comparaison de plusieurs systèmes notamment quand les organismes vivants sont impliqués. En effet, l'extrapolation d'un système à un autre nécessite beaucoup de précautions et dépend beaucoup des conditions expérimentales.

I.5 Dispositifs expérimentaux permettant l'étude de l'altération des minéraux en conditions biotique et abiotique

Les approches expérimentales en laboratoire et sur le terrain ont été utilisées pour évaluer les taux de dissolution des minéraux silicatés. L'avantage de l'approche en laboratoire sont des conditions chimiques, physiques et biologiques relativement bien contraintes (chaque paramètre comme la température, la composition des minéraux ou des solutions est varié mais bien caractérisé). Cependant, ces taux de dissolution sont difficiles à extrapoler dans la nature.

L'approche de terrain est beaucoup plus complexe. Les taux de dissolution des minéraux sont calculés à partir de minéraux ou d'assemblage de minéraux mal caractérisés, de flux de solutés de composition très changeante avec différent temps de résidence et des variations de climats et des activités biologiques. La durée de l'expérience est le paramètre qui induit le plus de variabilité. De plus, les expériences sont difficilement reproductibles (White et Brantley, 2003). Généralement, les taux de dissolution d'un minéral en laboratoire sont 2 à 5 fois plus rapides que sur le terrain.

L'approche en laboratoire a été choisie dans nos travaux pour permettre à nos expériences d'être le plus reproductibles possible et relativement bien contraintes.

Historiquement, deux types de dispositifs expérimentaux ont été employés pour étudier la dissolution des minéraux en laboratoire : les systèmes fermés et les systèmes ouverts.

Les dispositifs en système fermé (appelé également batch) sont employés majoritairement pour étudier la dissolution de minéraux en conditions abiotiques. Une fraction de minéral est déposée dans un réacteur, contenant une solution saline à une force ionique et à un pH donnés. Les premiers travaux portant sur la dissolution des minéraux et conduits en système fermé ont accordé une importance particulière aux mécanismes initiaux de dissolution qui

sont indépendants du dispositif expérimental (Wollast, 1967 ; Henderson et al., 1975; Touray, 1980). En effet, ces dispositifs ne permettent pas de conduire des expériences sur de longues périodes, car le taux de dissolution du minéral diminue avec le temps. Ceci résulte d'une évolution de la chimie de la solution qui approche un état d'équilibre et de saturation à la surface du minéral.

Pour ces raisons, beaucoup de chercheurs ont abandonné ce système et utilisent des réacteurs chimiques ouverts avec des solutions renouvelées (en anglais « flow-through reactors ») (Acker et Bricker, 1992; Brantley, 2003; Chen et Brantley, 1997; Kalinowski et Schweda, 1996; Malmström et Banwart, 1997; Murakami et al., 2003). Ce dispositif consiste à faire percoler une solution au contact des minéraux. Il permet une lixiviation continue dans des conditions définies de température et de débit tout en restant très loin d'un état de saturation du système et donc loin de l'équilibre.

Les dissolutions de minéraux en présence de bactéries sont étudiées dans les deux systèmes décrits précédemment. Les systèmes fermés en batch ont été les premiers utilisés (Krumbein, 1972; Boyle et Voigt, 1973; Berthelin J., 1976; Berthelin J., 1977; Berthelin, 1983; Robert et Berthelin, 1986; Vandevivere et al., 1994; Welch et Vandevivere, 1994; Bennett et al., 1996). Comme dans les expériences en conditions abiotiques, ces dispositifs permettent d'obtenir des informations sur l'état initial de la dissolution de minéraux par les bactéries.

Sur de longues périodes (plus de 7 jours), dans les expériences où le pH est non tamponné, en l'absence de renouvellement de la solution, les stocks d'éléments nutritifs (Ca, Mg, ...) et de la source énergétique (carbone) diminuent avec le temps jusqu'à épuisement. Une augmentation du pH est alors généralement observée, attribuée à la mort des bactéries. Cela a pour conséquence une modification de la chimie de la solution et une diminution du taux de dissolution des minéraux (Kalinowski et al., 2000; Liermann et al., 2000). Lorsque les bactéries adhèrent à la surface du minéral, l'augmentation du pH peut être restreinte à l'endroit où est fixée la bactérie avec un effet local important sur la dissolution (Barker et al. 1998) alors que dans la solution globale, cela peut être indétectable. L'étude de la dissolution bactérienne des minéraux sur de longues périodes, dans des conditions physico-chimiques constantes, est plutôt réalisée dans des bioréacteurs en système ouvert qui permettent de renouveler les solutions nutritives.

Les différents dispositifs expérimentaux permettent de calculer et de modéliser les taux de dissolution des minéraux silicatés. Cependant, les différences observées entre les taux de dissolution des silicates déterminés en laboratoire et ceux calculés sur le terrain n'ont pas encore été bien expliqués. Ce problème est dû en partie à la complexité du milieu et des réactions, surtout quand le biologique est impliqué, et à la diversité des échelles de temps des conditions climatiques et environnementales. Ainsi, le choix du dispositif est crucial pour étudier des systèmes simplifiés en laboratoire afin de mieux comprendre les processus d'altération des minéraux impliqués par les plantes ou les microorganismes.

II. LES BACTERIES, DES AGENTS DE L'ALTERATION BIOGEOCHIMIQUE

Via les matières organiques et minérales qu'il contient, le sol est une source d'énergie et de nutriments qui permet à de nombreux microorganismes de se développer.

Les bactéries du sol sont traditionnellement divisées en deux catégories : les autochtones et les zymogènes (Van Elsas et al., 2007). En général, les bactéries autochtones sont capables de métaboliser et croître dans des environnements très pauvres en nutriments (stratégie K). Lorsque ces bactéries rencontrent des environnements très riches en nutriments, elles deviennent alors zymogènes et sont capables de métaboliser et croître rapidement (stratégie r).

Dans la nature, les réactions d'altération sont amplifiées par la présence de microorganismes (bactéries et champignons) en contact ou non avec la surface des minéraux. De nombreuses études ont montré l'importance des champignons dans la mobilisation des éléments nutritifs dans les sols et ont aussi mis en évidence les interactions entre les champignons et les bactéries dans l'altération des minéraux (Leyval et Berthelin, 1989; Leyval C. et al., 1990; Gadd, 2006; Uroz et al., 2007).

Dans ce travail de thèse, nous avons choisi d'étudier le rôle des bactéries hétérotrophes sur l'altération, car celles-ci sont ubiquistes dans les sols et dans d'autres environnements oligotrophes. De plus, leur taille et leur métabolisme variable leur permettent une grande diversité de réponse face aux stress environnementaux. Ainsi, l'état des connaissances sur les bactéries en tant qu'agents de l'altération biogéochimique sera détaillé dans cette deuxième partie de la bibliographie.

Comme schématisé sur la figure 1-2, les bactéries obtiennent les éléments nutritifs dont elles ont besoin à partir d'une source organique (présente généralement seulement en surface) et de l'altération des minéraux (dans tout le profil) par des réactions biochimiques. De nombreux travaux ont étudié l'altération des roches par les bactéries et une question revient souvent dans la discussion : ont-elles développé des stratégies spécifiques pour l'altération des minéraux ou est-ce juste une conséquence indirecte de leur métabolisme ? Dans la deuxième partie de ce chapitre, l'habitat et le fonctionnement des bactéries seront décrits puis le lien connu à ce jour entre leur métabolisme et l'altération des silicates sera présenté.

II.1 Les habitats bactériens lithosphériques

II.1.1 Dans les sols

Dans l'ensemble d'un profil de sol représentatif des climats tempérés, la fraction minérale constitue en moyenne 38 % du sol en volume et 95 % de son poids (Duchaufour, 1988). Le reste du volume est occupé par de la matière organique, de l'eau et de l'air. Dans la première partie de ce chapitre, nous avons vu que les minéraux varient en composition et en quantité selon la roche mère source, l'intensité de l'altération, la quantité de matière organique introduite ou générée dans le sol et l'humidité du sol.

Le sol ne constitue pas un environnement homogène. D'une part, les proportions entre fractions solides (minérales et organiques) liquides et gazeuses varient dans chaque horizon avec la profondeur. D'autre part, au sein de chaque horizon, la fraction solide du sol est organisée en agrégats proposant une mosaïque d'habitats avec dans chacun le développement de populations bactériennes spécifiques. Excepté dans le cas de sols hydromorphes (que nous ne décrivons pas dans cette thèse), ces habitats correspondent souvent à un milieu aérobie et oligotrophe (pauvre en nutriments) qui ne favorise pas une grande densité de population, ni une grande activité des microorganismes. Généralement, le nombre de bactéries est de l'ordre de 10^5 à 10^9 cellules par gramme de sol sec dans les horizons de surface. Il diminue rapidement avec la profondeur et la teneur en matière organique métabolisable disponible (Van Elsas, 2003). Contrairement à cette tendance observée dans le sol global, la rhizosphère fournit même en profondeur un environnement où se développe une grande densité de population de microorganismes à croissance rapide (zymogènes) indiquant un métabolisme rapide (Van Elsas et al., 2007). Cette forte croissance est due à des conditions particulièrement favorables liées à la présence des racines de plantes qui amènent via les exsudats racinaires des substrats carbonés facilement dégradables comme les sucres, les acides aminés, les acides organiques... (Figure 1-4).

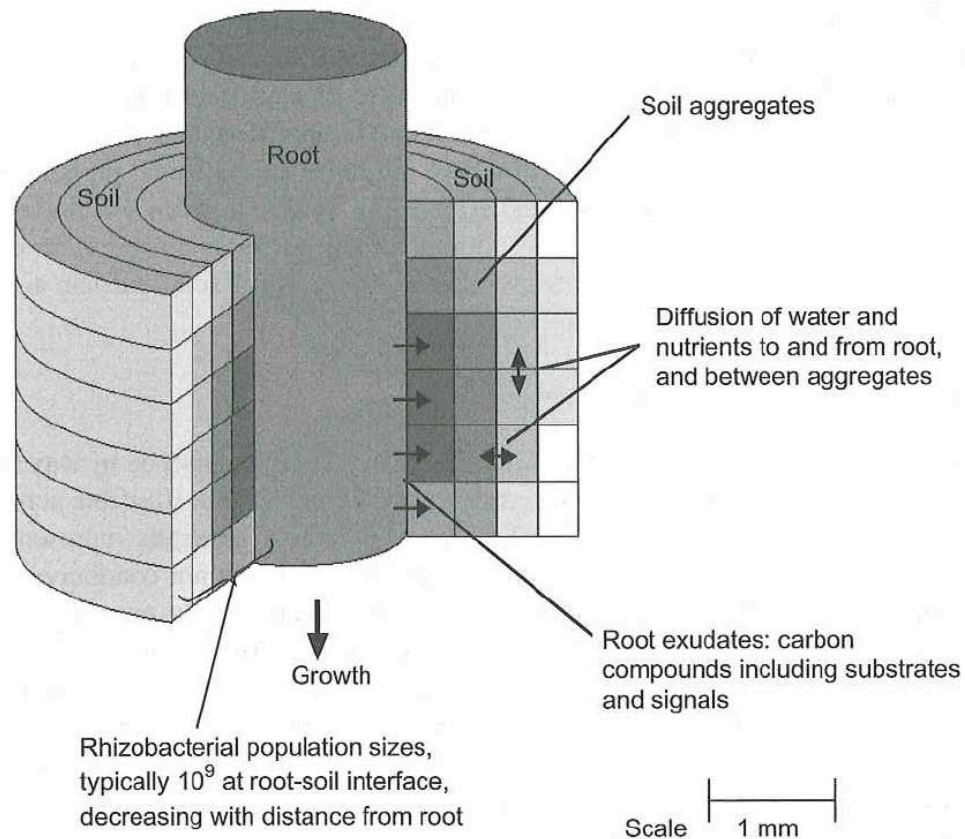


Figure 1- 4. Illustration schématique de l'environnement sol autour des racines en terme de diffusion de substrats carbonés et de nutriments (Van Elsas et al., 2007)

De nombreux travaux (Leyval et al., 1990; Calvaruso et al., 2006; Uroz et al., 2007) ont étudié l'altération des phyllosilicates dans ce milieu très particulier de la rhizosphère des plantes qui se trouve sous l'effet des interactions plantes-microorganismes (rhizobactéries et champignons mycorhiziens). D'une manière générale, dans tous les cas, les résultats montrent que les intensités de mobilisation du fer et du phosphore par les bactéries isolées de la mycorhizosphère sont significativement plus fortes que celles mesurées pour les bactéries isolées du sol non rhizosphérique (sol non adhérent aux racines).

II.1.2 Dans les roches plus ou moins profondes de la croûte terrestre

Le sol qui constitue une couche organo-minéral très mince à la surface des continents, n'est pas le seul milieu favorable au développement des bactéries dans la lithosphère. Elles ont été détectées jusqu'à des profondeurs de 3500 m. La présence de bactéries a été observée

dans des milieux essentiellement minéraux comme les strates perméables de sédiments (Ehlich, 1998), dans la porosité de roches sédimentaires ou dans les roches ignées fissurées sur lesquels elles peuvent former des micro-colonies ou biofilms. Les travaux *in situ* et en laboratoire de Bennett et al., (1996) Bennett et al., (2001); Hutchens et al., (2008) et Rogers et Bennett, (2004) ont montré que pour les roches silicatées, la chimie des minéraux influence fortement le modèle de colonisation du minéral et des roches par les bactéries ainsi que leurs activités métaboliques. Par exemple, la présence de Ca, Al, Fe et P en faible proportion dans les minéraux a un impact significatif sur la structure de la communauté bactérienne dans le système. Dans l'étude de Rogers et Bennett (2004) sur différents minéraux tel que l'anorthoclase, le microcline ou des plagioclases, lorsque les bactéries sont mises en contact avec ces minéraux, elles colonisent préférentiellement ceux contenant du Fe et du P dont les concentrations étaient limitées dans le milieu. Les résultats de ces divers travaux suggèrent que la dissolution des silicates est cristallographiquement contrôlée par la colonisation microbienne et que les activités métaboliques interviennent avant tout au niveau des points faibles structuraux des minéraux. Les bactéries adhérentes à la surface du minéral peuvent créer une zone de réaction où les acides organiques et les métabolites sont concentrés à la surface du minéral et plus précisément sur des sites à haute réactivité (Hiebert et Bennett, 1992).

Depuis leur origine, les bactéries sont ubiquistes et ont une influence importante sur l'environnement à la surface de la Terre. Les bactéries contribuent en particulier à l'altération et l'érosion des minéraux des roches, mais leur environnement a aussi un impact sur leur diversité, leur structure et leur activité métabolique.

II.2 Nutrition des bactéries (sources de carbone, d'énergie et d'électrons)

Les activités bactériennes sont dictées et dirigées essentiellement pour leur survie, leur croissance et leur division. Ceci requiert de l'énergie et une variété de substrats minéraux et organiques puisés dans l'environnement pour la synthèse du matériel cellulaire (Fenchel et al., 1998).

II.2.1 Les éléments

Les nutriments absorbés par les bactéries pour leur développement sont utilisés (1) pour former les constituants essentiels du matériel cellulaire (paroi et cytoplasme), (2) pour participer au bon fonctionnement des enzymes et des systèmes de transports et (3) contribuent à la production d'adénosine triphosphate (ATP) (Pelmont, 1993).

Seuls 12 éléments sont requis en quantités importantes pour les bactéries :

- le carbone, l'oxygène, l'hydrogène et l'azote qui sont les principaux constituants du matériel cellulaire (comme chez tous les êtres vivants),
- le soufre, le phosphore, le potassium, le magnésium, le calcium, le fer, le sodium et le chlore (cités par leur ordre d'importance).

Ces macroéléments ou macronutriments représentent 95 à 97 % du poids sec d'une cellule bactérienne (Pelmont, 1993). En particulier, le magnésium sert de cofacteur pour de nombreuses enzymes comme les kinases. Il forme un complexe avec l'ATP. Il intervient également dans la structure des membranes, la stabilité des parois cellulaires (cation compensateur des charges des peptidoglycanes) et des ponts de liaisons des ribosomes. Le fer est utilisé dans la synthèse de certaines protéines dont les cytochromes, ferredoxines. Il est aussi cofacteur de certaines enzymes (centre Fe-S de la nitrogénase ou des réductases RNR) et de transporteurs d'électrons.

En plus des macroéléments, les bactéries ont besoin d'oligoéléments ou micro-éléments (zinc, manganèse, molybdène, sélénium, cobalt, cuivre, nickel et tungstène) qui aident à la catalyse des réactions cytoplasmiques ou au maintien de la structure des protéines (acides aminés, purines) et des vitamines. Très souvent dans la nature, ces éléments sont présents en quantités suffisantes et ne limitent donc pas le développement cellulaire des bactéries. Leur caractère ubiquiste peut être expliqué par les multiples sources disponibles dans un écosystème continental de surface : (1) l'atmosphère, (2) la matière organique morte, (3) l'eau et (4) les minéraux.

II.2.2 Classification des bactéries

Suivant la nature de la source de carbone utilisée pour leur nutrition, les bactéries se classent en deux groupes :

- les bactéries autotrophes sont capables de synthétiser par elles-mêmes les matières organiques qui les composent à partir d'éléments inorganiques comme le CO₂,
- les bactéries hétérotrophes nécessitent la présence de composés organiques comme source de carbone et d'énergie pour leur croissance et leur reproduction.

Ensuite, deux sources d'énergie sont disponibles pour les organismes :

- l'énergie lumineuse captée pendant la photosynthèse (phototrophes),
- l'énergie provenant de l'oxydation de composés organique ou inorganiques (chimiotrophes).

Enfin, les bactéries ont besoin d'une source d'électrons provenant de deux sources:

- des substances inorganiques réduites. Les bactéries utilisant cette source sont classées dans les lithotrophes,
- des composés organiques. Les bactéries seront qualifiées d'organotrophes.

Malgré la grande diversité métabolique des bactéries, elles peuvent, en général, être classées en 4 catégories nutritionnelles sur la base de leurs sources de carbone, d'énergie et d'électrons :

- Autotrophes photolithotrophes,
- Hétérotrophes photoorganotrophes,
- Autotrophes chimiolithotrophes,
- Hétérotrophes chimioorganotrophes.

Les trois premières classes sont les moins représentées dans les sols. De plus, les bactéries cultivables dans un sol représentent moins de 1% en moyenne de la totalité des bactéries, ce qui rend difficile l'estimation de chaque classe métabolique de bactéries dans les sols avec les techniques actuelles. Aujourd'hui avec l'utilisation des outils moléculaires, il est possible d'avoir une affiliation taxonomique mais pas métabolique.

Les techniques de cultures utilisées, nous permettrons d'étudier plus particulièrement aux bactéries cultivables hétérotrophes et plus spécifiquement celles chimioorganotrophes car,

quantitativement, elles sont majoritaires dans les sols. Ces bactéries utilisent des composés organiques comme source d'énergie, d'éléments (hydrogène, carbone) et d'électrons pour leur biosynthèse. Elles produisent de l'ATP par des réactions chimiques notamment les réactions d'oxydoréduction. Un substrat est réduit au dépend d'un autre qui est oxydé (Figure 1-5).

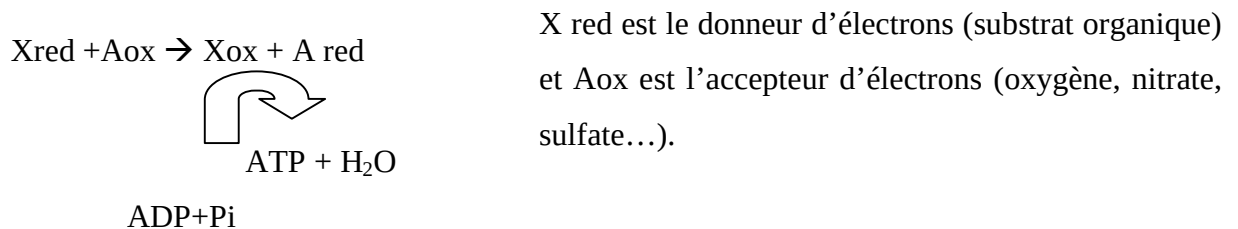


Figure 1- 5. Réaction d'oxydo-réduction permettant la production d'ATP

II.2.3 Incorporation de ces éléments dans les bactéries

Il existe 4 mécanismes qui correspondent chacun à un mode d'incorporation spécifique de composés ou d'éléments :

- la diffusion passive (qui ne concerne que les gaz) et la diffusion facilitée qui ne nécessitent aucun métabolites, ni dépenses d'énergie pour incorporer l'élément. Ce sont des mécanismes réversibles, ainsi la diffusion facilitée peut être aussi impliquée dans l'excrétion de composés de fermentation comme certains acides organiques par les bactéries.

- le transport actif et la « translocation de groupe » permettent le transport des sucres à l'intérieur de la cellule bactérienne (Gottschalk, 1986).

II.2.4 Dégradation des sources de carbone = source d'énergie

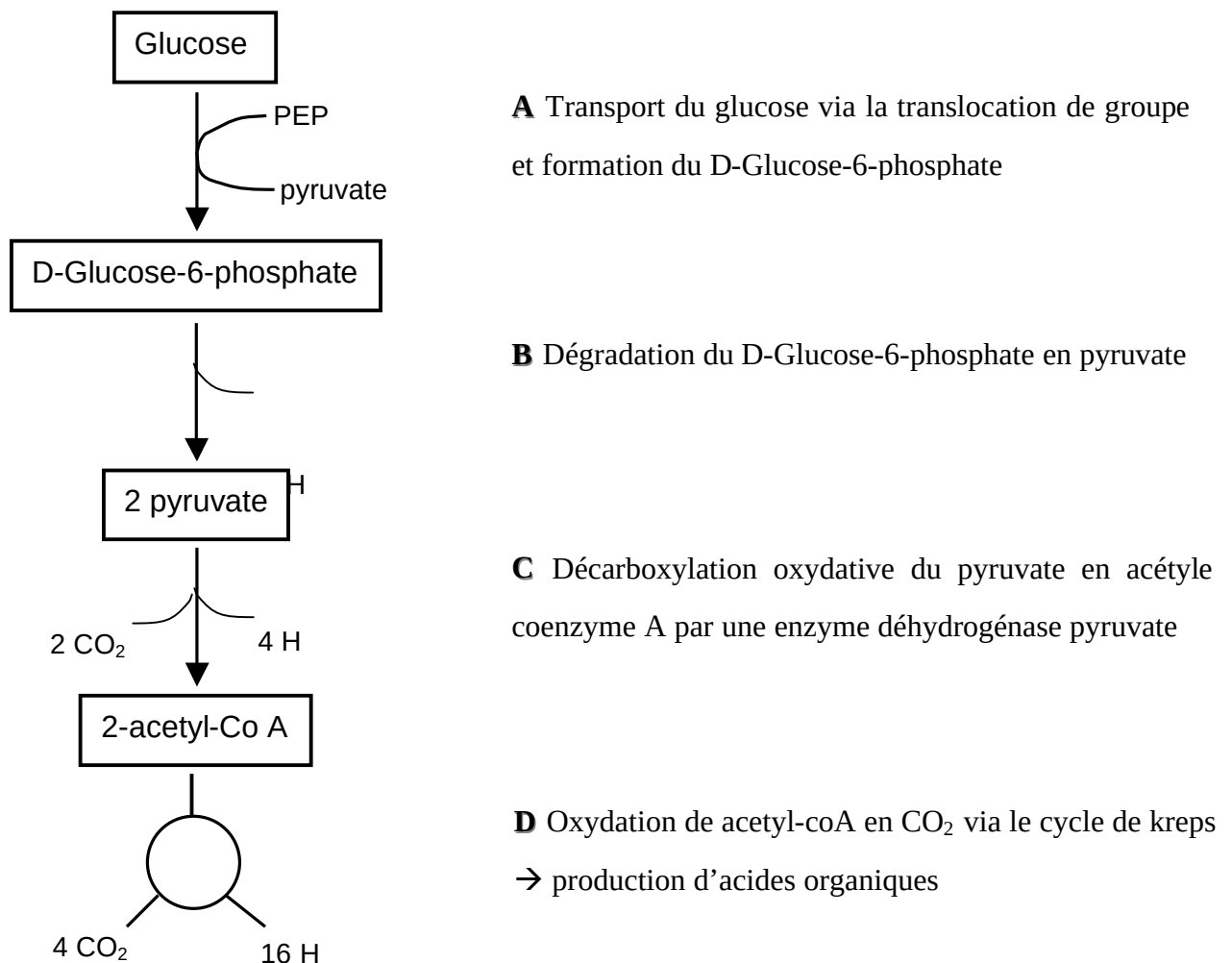
Quatre voies de dégradation du glucose sont possibles : la voie « Entner-Doudoroff » (ou KDPG), la voie « Embden-Meyerhof-Parnas » (ou glycolyse), la voie des pentoses phosphates et la voie des « GDH et PQQ ».

- Voie « Entner-Doudoroff »

Cette voie est spécifique des bactéries. Elle est utilisée par les bactéries aérobies comme les *Pseudomonas*. Elle possède 6 étapes très complexes (non présentés), la première (la phosphorylation du glucose) étant commune à la glycolyse.

- **Voie « Embden-Meyerhof-Parnas » (ou glycolyse)**

La glycolyse se déroule dans le cytoplasme de la cellule bactérienne en aérobiose ou en anaérobiose pour les bactéries chimio-organotrophes. Au cours de cette voie catabolique le glucose (molécule à 6 carbones) est oxydé en deux molécules d'acide pyruvique (3 carbones) comme décrit ci-dessous :



Chez les bactéries aérobies, la voie d'Entner-Doudoroff et la glycolyse sont suivies par le cycle de Krebs qui conduit à une oxydation complète de l'acide pyruvique en CO₂. L'ensemble de ces réactions permet donc une oxydation complète du glucose en CO₂ mais

fait apparaître des métabolites intermédiaires acides qui ne s'accumulent généralement pas (le cycle de Krebs est une voie anaplérotique, c'est-à-dire qu'il fait apparaître des composés intermédiaires). La dégradation du glucose par la glycolyse puis via le cycle de Krebs n'entraîne qu'une faible acidification du milieu de culture lors de l'excrétion de ces produits. Chez les métabolismes fermentaires, l'acide pyruvique n'est pas oxydé complètement.

- **Voie des pentoses phosphates (ou voie de Warburg-Dickens-Horecker)**

Cette voie existe chez tous les eucaryotes et chez la quasi-totalité des bactéries. Elle est indépendante de la présence d'oxygène et se fait aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose dans le cytoplasme. Cette voie est réalisée en 2 étapes : (i) une phase oxydative qui permet la formation de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), source principale d'électrons utilisés dans les réactions biosynthétiques dans la cellule et (ii) une phase non oxydative réversible qui permet la synthèse de ribose. C'est un composant de l'ARN utilisé dans la transcription génétique.

- **Voie des GDH et PQQ**

Cette voie existe chez certaines bactéries de type *Enterobacter* et *Pseudomonas*. Ces bactéries sont capables d'oxyder directement le glucose en acide gluconique à l'aide d'une enzyme la glucose déhydrogénase (GDH). L'acide gluconique est alors converti en acides 2-ketagluconique et 2,5 diketagluconique. La glucose déhydrogénase requiert une quinone pyroquinoline (PQQ) comme cofacteur pour cette activité. Cette voie est largement impliquée dans la solubilisation des minéraux phosphatés (Hee Han et al., 2008).

Les bactéries peuvent croître sur différents substrats carbonés (sucres). Cependant, l'utilisation d'autres substrats que le glucose pour la croissance des bactéries nécessite un changement de l'équipement enzymatique des cellules passant par : (1) la synthèse d'enzymes cataboliques appropriées et des systèmes de transports spécifiques et (2) la formation de voies métaboliques appropriée (voies anaplérotiques) permettant de prélever une partie des composés carbonés nés au cours d'une fermentation pour approvisionner les mécanismes de synthèse conduisant au matériel cellulaire.

Les voies « Entner-Doudoroff » et glycolyse sont les voies majoritaires de dégradation des sucres permettant la formation de métabolites.

Les bactéries ont dû s'adapter à divers environnements plus en moins riches en nutriments en développant des stratégies pour leur survie. Leur métabolisme et leur façon d'acquérir de l'énergie est un paramètre important à prendre en compte qui conditionne leur action sur leur proche environnement. Ainsi, le métabolisme des chimioorganotrophes est subdivisé en deux catégories en fonction des sentiers métaboliques employés pour l'assimilation des composés organiques et la production d'énergie.

- Les organismes oxydatifs emploient un composé inorganique tel que l'oxygène comme capteur final d'électrons. Les sous-produits principaux du métabolisme d'oxydation sont l'eau et de faibles quantités de dioxyde de carbone.

- Par contre, les organismes fermenteurs emploient des capteurs d'électrons finaux organiques, comme le pyruvate et génèrent de grandes quantités de dioxyde de carbone et d'acides comme sous-produits.

Les bactéries sont très diversifiées d'un point de vue taxonomique et métabolique. Elles sont ubiquistes et ont dû s'adapter à leur environnement pour acquérir les nutriments et l'énergie nécessaire à leur survie. La dégradation d'une source de carbone est essentielle pour leur production d'énergie et de sous-produits.

Ces sous-produits du métabolisme : les acides organiques, peuvent-ils avoir un effet sur l'altération des minéraux ?

II.3 Sécrétion d'acides organiques : leurs rôles dans l'altération

L'altération des silicates en présence de bactéries résulte de changements des conditions, dans le milieu, provoqués par les activités de celles-ci. Une partie des bactéries dégrade les composés organiques et produit ainsi du CO₂ et des acides organiques, abaissant le pH dans la solution. Comme expliqué dans le paragraphe précédent, le plus souvent, le produit final de l'oxydation des composés organiques est le dioxyde de carbone. Cependant, certains facteurs environnementaux comme le pH, la température, la concentration en sels ou la présence de certaines substances ont une influence sur l'activité (fonctionnement) d'une enzyme. Dans ce cas, les bactéries sont incapables d'aller jusqu'à une dégradation totale et la formation de CO₂. Différents acides intermédiaires s'accumulent alors dans le milieu comme l'acide fumarique, l'acide citrique, l'acide oxalique et surtout l'acide acétique (Gottschalk,

1986). La production d'acides organiques dépend de la source de carbone et du type bactérien.

Les acides organiques, selon leur nature et leur quantité, peuvent augmenter directement et indirectement la dissolution minérale. La majorité des acides organiques peut, selon les conditions de pH, se dissocier en anions organiques (chargés négativement) et protons. Quelques protons peuvent alors réagir avec les acides organiques à la surface des minéraux (réaction de protonation) causant un affaiblissement des liaisons oxygène-métal. Ceci aboutit à la libération de cations métalliques à la surface. Simultanément, les anions organiques peuvent réagir avec les cations métalliques à la surface des minéraux. Ils déstabilisent également les liaisons oxygène-métal et favorisent la dissolution via la formation et le détachement de complexes métal-chélate. L'oxygène sous-jacent est alors exposé aux réactions de protonation.

Comme présenté dans la figure 1-6, les acides polyfonctionnels comme l'acide citrique et l'acide oxalique amplifient la dissolution des silicates, contrairement aux acides monofonctionnels comme l'acétate (Robert M. et Berthelin J., 1986; Welch et Ullman, 1993).

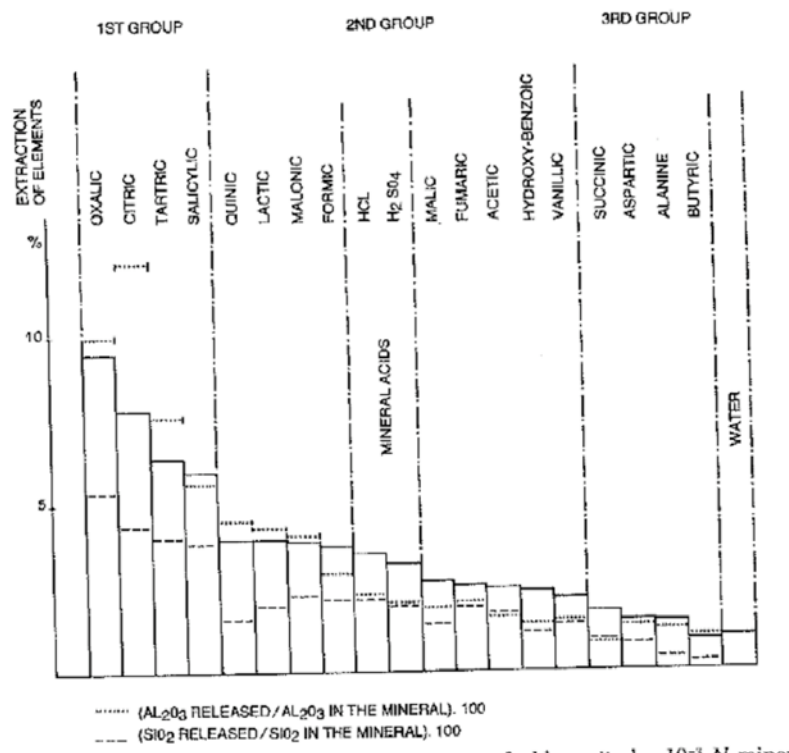


Figure 1-6. Pourcentage d'éléments libérés lors de la lixiviation de phlogopite par 0,001M d'acides organiques à 60°C d'après Robert et Berthelin (1986)

Les acides organiques complexants comme l'acide citrique et oxalique sont produits via le cycle de Krebs. En général, les bactéries utilisant le cycle de Krebs sont complexantes et ont un anabolisme très demandeur en énergie qui requiert une importante quantité initiale de carbone et un catabolisme efficace pour l'altération des minéraux mais peu efficace pour la production de biomasse. Les acides organiques faiblement complexants, comme les acides lactique, acétique et formique sont issus de la fermentation. Les bactéries anaérobies strictes ou facultatives produisent ces acides organiques et sont généralement acidifiantes. Elles ont un anabolisme peu demandeur en énergie qui requiert une faible quantité initiale de source de carbone et un catabolisme peu efficace pour l'altération des minéraux mais très efficace pour la production de biomasse.

Pour résumer, les bactéries par leurs activités métaboliques sont capables de produire des acides organiques et d'influencer la chimie de la solution et donc l'altération des minéraux silicatés. Les acides organiques suivant leur nature et les conditions du milieu (pH, température...) n'ont pas le même impact sur la lixiviation de cations lors de l'altération de minéraux.

III. CONCLUSIONS ET OBJECTIFS DE CETTE THESE

La dissolution des minéraux silicatés a été largement étudiée aussi bien en conditions abiotiques, qu'en conditions biotiques. Il a été démontré que les réactions de dissolution sont amplifiées en présence des bactéries au contact ou non avec la surface minérale soit (1) par production d'acides organiques ou inorganiques (acidolyse et complexolyse), soit (2) par production de sidérophores, soit (3) par modification des conditions pH et redox du milieu, ou encore (4) par formation d'un biofilm à la surface du minéral accentuant l'altération.

Cependant, la distinction entre les actions directes et indirectes (production d'agents altérants) des bactéries lors de l'altération des minéraux est difficile, d'autant plus que la comparaison entre les expériences biotiques et abiotiques s'avère souvent difficile compte tenu des nombreux paramètres qu'il faut considérer comme le pH, la production de métabolites par les bactéries ou le suivi de la biomasse. De plus, les travaux précédents ont été réalisés avec des souches bactériennes pures, des milieux nutritifs, des dispositifs et des minéraux différents, il est donc très difficile de pouvoir comparer les expériences entre elles et de délimiter ces mécanismes. Aucun modèle ne prend en compte, dans les équations empiriques, la diversité des bactéries et leur phénotype d'altération. Il est nécessaire de contraindre leur action dans la nature soit en modélisant les mécanismes (acidolyse ou complexolyse) soit en mesurant leur éventuelle signature isotopique sur les solutions de lixiviation pour observer des « signatures bactériennes » lors de l'altération de silicates. Pour finir, il est nécessaire de déterminer la variabilité de réponse des bactéries vis-à-vis de leur environnement extérieur, c'est-à-dire la nature de la source de carbone, le contact/ non contact avec le minéral et influençant sur le potentiel lixiviant des bactéries.

L'objectif global de ce travail de thèse est d'étudier les interactions entre les bactéries et les minéraux. Nous nous concentrerons sur la caractérisation des processus d'acidolyse et complexolyse conduisant à la lixiviation des cations de minéraux par les bactéries. La combinaison d'une approche physico-chimique de la lixiviation des minéraux et d'une approche biologique nous permettra de modéliser ces processus et de discuter des paramètres les contrôlant. L'outil isotopique confirmera ou non une signature bactérienne d'altération des minéraux par comparaison avec des expériences abiotiques pour simuler l'action des bactéries.

Le choix du dispositif s'avère donc important. Des expériences de lixiviation menées en système fermé ou ouvert ne fourniront pas les mêmes informations sur les processus mis en jeu. Dans ce travail, les mécanismes initiaux de dissolution ont été étudiés sur des expériences courtes pour limiter l'impact des changements de chimie de la solution provoqués par la mort des bactéries, les carences nutritives....

Deux types de dispositifs en système fermé ont été utilisés afin d'observer ces « signatures microbiennes » : (1) les microplaques, permettant de tester de nombreuses souches ou communautés bactériennes. Sur celles-ci sont caractérisés la lixiviation du fer à partir du phlogopite et de la biotite, sur de nombreux répliquats afin d'identifier les mécanismes bactériens d'altération ainsi que leur variabilité à un temps donné; (2) les réacteurs, fournissant un volume plus grand pour les analyses, permettent de suivre l'évolution au cours du temps du taux d'altération de la phlogopite. Des analyses isotopiques du magnésium sur les solutions de lixiviation ont été réalisées à partir de ce type de dispositif.

Pour réaliser les biotests d'altération des minéraux par les bactéries, le phlogopite et la biotite ont été retenus pour la suite de ce travail. Ces minéraux sont ubiquistes dans les sols et sont d'un degré d'altérabilité intermédiaire entre l'olivine (très facilement altérable) et le quartz, la muscovite, ou les smectites qui sont des minéraux très réfractaires selon l'ordre de stabilité des minéraux établi par Goldich (1938). Les expériences d'altération bactérienne de minéraux doivent tenir compte de la nature des minéraux pour que ceux-ci ne soient pas trop facilement altérables et d'un autre côté trop réfractaires pour ainsi pouvoir observer des mécanismes différents.

La biotite correspond au mélange (composition intermédiaire) entre 2 pôles purs l'annite (Fe) et le phlogopite (Mg). Le phlogopite choisi dans nos expériences ne correspond pas exactement au pôle pur car une certaine quantité de fer (1,6 %) est présente dans sa composition. Ces deux minéraux ne présentent pas d'autres impuretés comme certains oxydes de fer, ce qui rend leur utilisation plus facile.

Les sols représentent des microhabitats très hétérogènes et oligotrophes. De plus, ils sont très différents car ils se forment sur des roches mères très contrastées, sous des conditions climatiques et des végétations différentes et bien d'autres facteurs qui influencent localement

leur formation. La rhizosphère des plantes fournit un environnement plus favorable aux microorganismes, dû à la sécrétion par les racines des plantes d'exsudats riches en divers composés carbonés.

Mais, les bactéries doivent souvent s'adapter à des environnements moins favorables et développer des stratégies. Les stratégies nutritionnelles (sources de carbone, d'énergie et d'électrons) des bactéries peuvent alors largement influencer les processus d'altération mis en jeu et leur intensité. Ainsi, chez les bactéries hétérotrophes, la qualité de la source de carbone utilisée en tant que « matière première énergétique » détermine le métabolisme bactérien. Si cette source change, la nature des métabolites excrétés dans le milieu extérieur par les cellules sera affectée et va modifier les mécanismes d'altération et leurs cinétiques. Le sol, en tant que réservoir de multiples sources de carbones plus ou moins dégradables, a donc un rôle clef dans l'orientation des processus d'altération.

Les bactéries n'agissent généralement pas seules, mais en communautés. En effet, il peut exister des synergies entre les bactéries dans un environnement donné contrôlant le processus d'altération des minéraux.

L'étude des processus d'altération des minéraux par des communautés et des souches bactériennes dans différents types de sols très contrastés (pédogenèse, richesse en nutriments, couvert végétal) permettra d'établir un lien entre les différents paramètres physico-chimiques du sol et les stratégies développées par les bactéries et leur variabilité.

Ce travail s'est intéressé aux communautés bactériennes extraites de huit sols (classification WRB 2006) avec trois sols calcaires : (1) leptosol rendzique (rendzine), (2) leptosol rendzique colluvial (rendzine colluviale), (3) cambisol calcique (sol brun calcaire), deux sols développés sur limons (1) luvisol (sol brun lessivé) et (2) luvisol gleyique (sol brun lessivé à pseudogley) échantillonné sous trois couverts végétaux différents (prairie, culture et forêt) et enfin trois sols développés sur grès : (1) cambisol dystrique (sol brun acide), (2) podzol, (3) podzol leptique (sol cryptopodzolique).

Le podzol leptique fait partie d'une étude plus globale sur la restauration possible de la qualité des sols et des eaux ainsi que de la biodiversité (ANR Recover) dans des petits bassins

versants forestiers amendés en 2003 par des épandages calco-magnésien. Les sols naturellement pauvres en nutriments (Ca, Mg) dans les Vosges ont subi des décennies de pluies acides et d'exploitations forestières qui ont encore appauvri ces sols, acidifiés les eaux, diminués la biodiversité et provoqués des dépérissements forestiers.

MATERIELS ET METHODES

- **CHAPITRE 2 :** Matériels, dispositifs expérimentaux et méthodes

I. INTRODUCTION ET DEMARCHE EXPERIMENTALE

De nombreux protocoles expérimentaux ont été utilisés pour étudier au laboratoire les interactions bactérie-silicate en particulier via (1) la quantification des flux d'éléments (Fe, Mg, K, Ca...) lors de la lixiviation de minéraux, roches ou sols par des souches bactériennes, (2) l'identification des cinétiques des principaux processus d'altération, (3) la caractérisation des acides et exopolymères produits par les bactéries et (4) la colonisation des surfaces minérales par les microorganismes. Néanmoins, dans les expériences menées en laboratoire, ces dissolutions bactériennes expérimentales de minéraux sont souvent réalisées en présence de grandes quantités de sources de carbone et de nutriments qui ne reflètent pas les conditions rencontrées dans de nombreux environnements naturels et des sols en particulier (Hutchens et al. 2003).

Les dispositifs expérimentaux utilisés au cours de ce travail ont été optimisés de façon à utiliser un milieu minimal contenant une seule source de carbone et d'avoir la possibilité de contrôler les sources de nutriments de façon précise. Les différentes étapes (Figure 2-1) de cette mise au point méthodologique ont été réalisées sur des souches bactériennes afin:

- de caractériser les voies d'altération microbiennes des minéraux en quantifiant la lixiviation du fer ou du magnésium et les variations de composition isotopique du magnésium,
- de déterminer l'impact des activités microbiennes sur les cinétiques et les rendements de dissolution des silicates en identifiant les agents altérants (complexants organiques ou acides) et leurs quantités produites,
- d'estimer la pertinence de l'utilisation des isotopes du magnésium en tant que traceur discriminatif des processus d'altération biochimiques et strictement chimiques,
- d'étudier la variabilité qualitative et quantitative des processus bactériens de lixiviation (stratégie d'altération) en fonction de différents paramètres expérimentaux comme les conditions de préculture, la concentration et le type de source de carbone....

Ce chapitre précisera les deux grands types de dispositifs spécifiques (microplaques ou réacteurs) utilisés pour répondre à ces objectifs.

Les expériences ont été menées avec des communautés bactériennes fonctionnelles et des souches pures isolées de sols lorrains très divers afin de connaître l'influence des paramètres environnementaux sur les stratégies bactériennes développées lors de l'altération de phyllosilicates 2 :1 et sur leur potentiel de lixiviation de cations.

Les sols sélectionnés, formés à partir de roches mères carbonatées ou acides (grès), sont occupés par des prairies, des forêts ou des cultures. Ils possèdent par conséquent des propriétés physico-chimiques et minéralogiques ainsi que des teneurs en matière organique très variables. Parmi ces sols lorrains, un sol acide carencé en fer et magnésium situé dans les Vosges gréseuses à l'amont du bassin versant de la Moselle a été plus précisément étudié (i) afin d'améliorer nos connaissances sur la disponibilité d'éléments minéraux dans ces écosystèmes pauvres et (ii) afin d'étudier l'impact d'un amendement calco-magnésien récent sur le potentiel d'altération des minéraux par les bactéries.

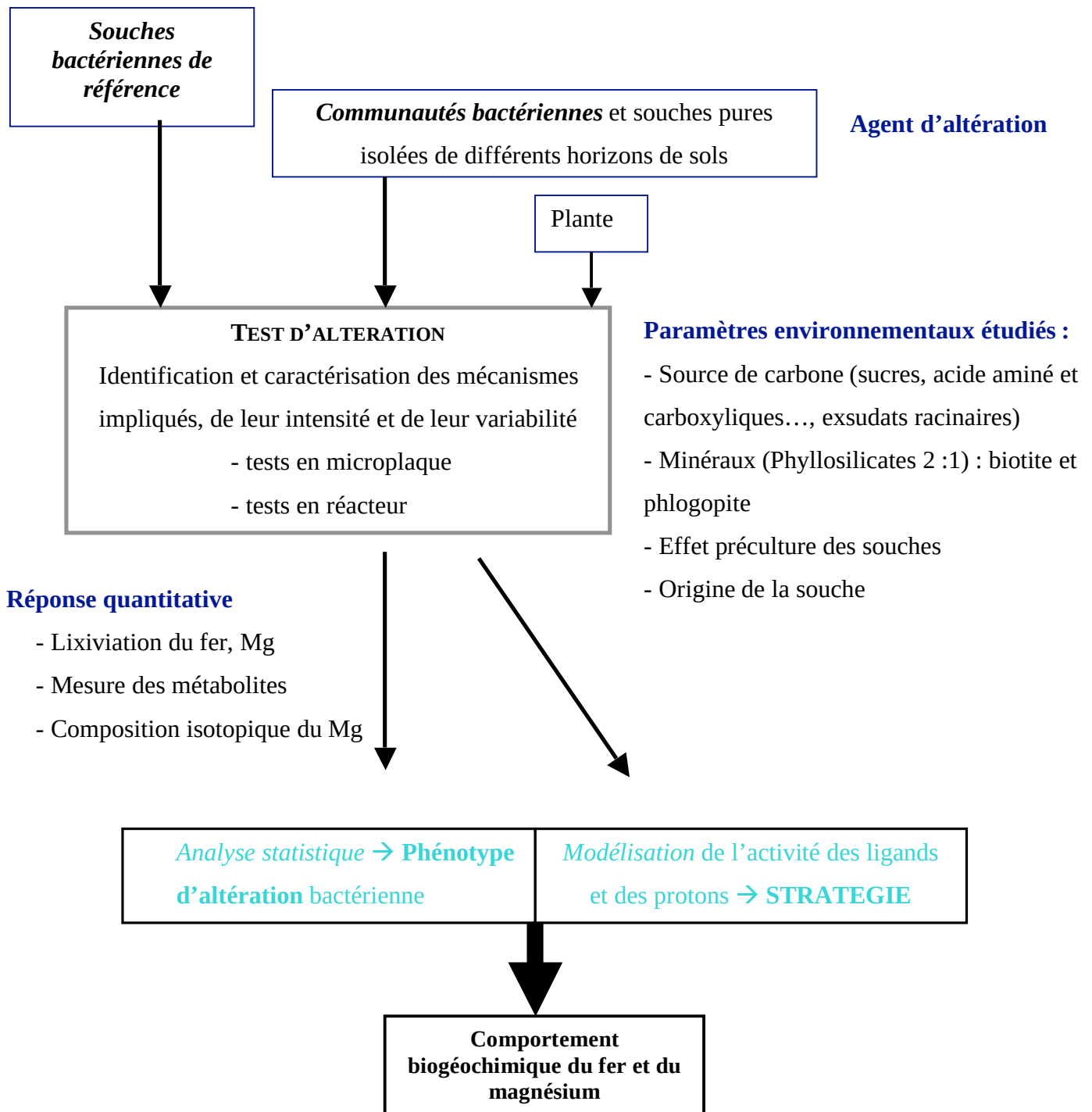


Figure 2- 1. Principales étapes méthodologiques du travail

II. MATERIELS

II.1 Minéraux employés

Les deux micas noirs (phyllosilicates trioctaédriques) utilisés dans cette étude sont un phlogopite (originaire de Madagascar, Vohitrosy) et une biotite (Razes, France, Limousin). Ces phyllosilicates ferro-magnésiens employés appartiennent à la série continue annite-phlogopite (pôle Fe- pôle Mg). Les caractéristiques physico-chimiques de ces 2 micas sont résumées dans le tableau 2-1. Les formules structurales du phlogopite et de la biotite sont respectivement: $K_{1,85} Na_{0,03} Ca_{0,04} [Si_{5,15} Al_{2,33} Fe_{0,52}] [Mg_{5,8} Fe^{2+}_{3,8} Ti_{0,1} \text{---} 0,1] O_{20} (OH)_4$ et $K_{1,7} Na_{0,1} Ca_{0,1} [Si_{5,64} Al_{2,36}] [Mg_{1,3} Fe_{3,8} Ti_{0,4} Mn_{0,4} \text{---} 0,4] O_{20} (OH)_4$. Ces minéraux de tailles pluricentimétriques à l'origine sont broyés, dispersés en milieu ammoniacal, tamisés par voie humide et rincés sous sonication avec de l'eau milliQ pour remobiliser et supprimer les fines particules et récolter des fractions bien définies. Les fractions granulométriques utilisées au cours de ce travail de thèse sont 50-100 et 295-420 μm respectivement pour le phlogopite et la biotite. Avant chaque expérience, les particules minérales sont stérilisées par voie sèche à 180 °C pendant 2 heures.

Ces fractions granulométriques ont été choisies pour avoir une quantité détectable de fer lixiviés au bout de 3 jours d'expériences.

Tableau 2- 1. Composition minéralogique des micas utilisés

	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	FeO	MnO	CaO	MgO	K ₂ O	TiO ₂	Na ₂ O	P ₂ O ₅	SSA*
	<i>g kg⁻¹ d'oxyde</i>											<i>m² g⁻¹</i>
Phlogopite	390	150	52	0,9	n.d	2,5	294	110	11,3	1,3	1,1	0,5 (± 0,3)
Biotite	362,1	204,2	36,8	210,5	3,9	5,8	47,9	92,6	26,8	2,6	6,6	0,1 (± 0,2)

* Surface spécifique analysée par BET : adsorption N₂

II.2 Les bactéries

II.2.1 Les souches bactériennes de référence

Trois souches de bactéries hétérotrophes (gram-négatif) isolées, dans des études antérieures, de la rhizosphère du hêtre, du pin et du blé ont été utilisées comme microorganismes altérant de référence, choisis pour leur capacité à dissoudre les minéraux (Leyval et al., 1990). Toutes ces bactéries sont anaérobies facultatives et leur caractère

(phénotype) acidifiant ou complexant a été démontrés par Raphie (2003). La comparaison de la quantité de protons produits à celle du fer solubilisé a permis d'identifier le mécanisme d'altération prédominant pour chacune des souches :

- ⇒ PA1 (*Pantoea agglomerans*, Souche de laboratoire P1) : bactérie acidifiante (1) et complexante (2)
- ⇒ AR1(*Agrobacterium radiobacter* Souche de laboratoire S200) : bactérie faiblement acidifiante (1)
- ⇒ RA1 (*Rhizobium aquatilis*, Souche de laboratoire H7) : bactérie complexante (2)

Ces études préliminaires ont permis d'identifier avec précision les deux processus mis en jeu lors de la lixiviation bactérienne du fer à partir de minéraux silicatés, c'est-à-dire l'attaque acide (excrétion de protons) et la complexolyse (production de métabolites chélatant) et d'insister sur la nécessité d'étudier l'influence de différents paramètres globaux (source de carbone et d'énergie, cristallogénie...) sur les compétences d'altération de minéraux par les bactéries.

II.2.2 Communautés et souches bactériennes isolées des sols

Protocole d'extraction des bactéries du sol

Les bactéries sont extraites du sol en deux étapes successives : une dispersion physique par mixage d'une suspension de sol suivie d'une séparation par gradient de centrifugation à l'aide d'une substance non-ionique : le Nycodenz[®]. La solution de Nycodenz est fabriquée en mélangeant à chaud 8g de poudre pour 10mL d'eau milliQ. Elle possède une densité de 1,3 qui permet de séparer par centrifugation les particules de sol et des cellules bactériennes dont la densité est voisine de 1. L'efficacité de ce gradient de Nycodenz a été démontré par Bakken (1985) et a depuis été utilisé couramment pour purifier et énumérer les suspensions bactériennes à partir du sol (Bakken et Lindhal, 1995). La procédure d'extraction a depuis été optimisée par ces mêmes auteurs afin d'extraire la plus grande partie des bactéries présentes dans un extrait de sol.

Cinquante millilitres de solution d'extraction stérile (0,1 mM EDTA et 0,1 mM de tampon Tris dans 1 l d'eau milliQ) sont ajoutés à 5 g de sol. Le mélange est dispersé et homogénéisé en utilisant un mixeur-blender (Proline, Premier PMX2), à trois reprises pendant 30 secondes

Il est ensuite placé dans un tube de centrifugation (Nalgene[®] oak ridge centrifuge tube, PC) en polycarbonate. Cinq millilitres de la solution de Nycodenz[®] sont pipetés avec une seringue puis placés délicatement à la base de la suspension de sol à l'aide d'une aiguille. Le tube est centrifugé à 10000 *g* dans un rotor pendulaire pendant 1 heure à 15°C pour établir une barrière de densité. La décélération dans la centrifugeuse doit être la plus faible possible. Le halot contenant les bactéries ou à défaut la totalité du surnageant est ensuite récupéré et transféré pour purification (rinçage et centrifugation 3 fois à l'eau milli-Q stérile) .

Dénombrement et caractérisation des bactéries

⇒ La microflore totale

Cinq cents microlitres de suspension bactérienne issue de l'extraction Nycodenz sont placés dans un tube Eppendorf[®] avec 500 µl de glutaraldéhyde à 2,5 % (ou formaldéhyde 2,5 %) pendant au moins 4 heures pour fixer la suspension et éviter toute évolution de l'échantillon. Dix microlitres d'une solution tamponnée (pH 6) d'acridine orange (22 µM AO, 5 mM EDTA, 0.15 M NaCl, 0.1 M tampon phosphate-citrate) sont ensuite ajoutés au mélange précédent. Après 30 min d'incubation à l'obscurité et température ambiante, ce colorant fluorescent met en évidence l'ADN des cellules bactériennes (coloration verte entre 530-560 nm) par rapport aux particules de sol (qui apparaissent colorées en orange >580nm). Cent microlitres de cette suspension (ou d'une suspension diluée si besoin) sont placés dans une cellule de comptage : cellule de Thoma. La numération est réalisée sur 16 carrés ensuite à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Dialux 20, objectif x40) équipé d'un filtre conventionnel (Ex : BP 460-480, Em : LP510), puis une moyenne est réalisée.

⇒ la microflore cultivable

Elle est déterminée par suspension-dilution pour chaque échantillon de sol à partir des solutions purifiées de cellules issues de l'extraction au Nycodenz d'un horizon de sol. Cette méthode de suspension-dilution en milieu liquide est utilisée pour évaluation du nombre le plus probable (NPP) de bactéries cultivables. Des dilutions successives de suspensions de cellules (10^{-2} , 10^{-3} , ... , 10^{-7}) sont transférées dans des microplaques ou des boîtes de Pétri.

- Chaque microplaque (96 puits) reçoit 3 dilutions réparties chacune sur 24 puits. Chaque puits contient 200 µl de milieu LB (20 g.l⁻¹, Difco) et 20 µl de suspension

bactérienne. Les microplaques sont ensuite incubées 48 h à 24°C. La lecture des microplaques est réalisée, après incubation, par photométrie à 620 nm. Tout puits, dont l'absorbance relative par rapport au blanc est supérieure à 0.1 a.u (unité d'absorbance), est considéré comme positif. Les résultats obtenus pour chaque dilution sont ensuite compilés et traités par un programme informatique (Most Probable Number Calculator, v4.04- USA EPA) afin d'obtenir le NPP de bactéries cultivables,

- Chaque boîte de Pétri contient un milieu de culture LB gélosé (Luria et Bertani LB 20 g.l⁻¹, Difco et 15 g.l⁻¹ d'agar) et reçoit 100 µl de suspension bactérienne. Chaque dilution est réalisée en trois répétitions. Le nombre d'unités formant des colonies (UFC) est ensuite comptabilisé après 48 h ou 72 h si nécessaire d'incubation.

⇒ Test de Gram

La détermination du Gram des souches bactériennes isolées des sols a été réalisée avec le test aminopeptidase (Sigma). Le principe consiste à suspendre une colonie de bactéries dans 200 microlitres d'eau ultrapure stérile avec une bandelette du test. L'ensemble est placé à 37°C pendant 30 mn. Si la suspension devient jaune, cela signifie que la souche bactérienne est Gram négatif. En effet, la L-alanine-aminopeptidase est une enzyme localisée dans la paroi cellulaire des bactéries Gram négatif, qui permet de cliver un acide aminé : L-alanine de divers peptides.

⇒ Caractérisation des communautés bactériennes par le test Biolog-ecoplate®

Une suspension bactérienne d'un volume de 150 µl est injectée dans chaque puits de l'Ecoplate®. Les bactéries sont issues des extractions par gradient de Nycodenz. Après rinçage, des dilutions sont réalisées afin que le nombre de bactéries totales injectées dans un puit soit le même pour chaque échantillon.

Lorsque les bactéries respirent et qu'elles sont donc capables de métaboliser la source de carbone présente, les puits virent au violet. La respiration réduit le tétrazolium, un indicateur coloré inclus dans les sources de carbone. La mesure de cette activité de dégradation des sucres se fait à 24, 48, 72 et 96 h par la lecture de la DO se fait à 590 nm.

⇒ Séquençage des souches bactériennes

Le genre des souches bactériennes a été déterminé par amplification et par séquençage des gènes 16S rRNA par PCR (réaction en chaîne polymérase) dans un volume total en utilisant une série universelle de primers dans un volume total de 50 µl contenant 1x PCR mastermix (Eppendorf ®), 0,1 µM de primers (966 F et 1401 R) et 1 µl d'extrait de cellules (Fleske 1998). Avant d'être séquencés par la compagnie biotechnologique MWG (Courtaboeuf, France), les produits de la PCR (taille des produits de PCR: 433 paires de base) ont été purifiés et concentrés utilisant des minicolonnes (Kit de purification High Pure TM PCR product, Roche diagnostic). Un programme de blast a été utilisé pour comparer les séquences à ceux des bases de données de GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) et obtenir un pourcentage de similarité avec le genre bactérien le plus proche des souches bactériennes séquencées.

III. DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX : MICROCOSMES EN MICROPLAQUES OU REACTEURS EN FLACONS

Toutes les expériences ont été réalisées en conditions aérobies, dans des réacteurs (ou « batch » en flacons) ou des nanocosmes (puits de microplaques), en système clos, c'est-à-dire qu'au cours des expériences, aucun ajout supplémentaire ni aucun renouvellement de solution n'a été effectué. Les dispositifs et le matériel employés sont initialement stériles. Le principe des expériences d'altération est simple : des particules minérales calibrées dispersées dans un milieu de culture contenant une source de carbone sont mises en contact avec un agent d'altération chimique (solution) ou biologique (bactérie). Plusieurs séries d'expériences ont été ainsi réalisées en condition biotique ou abiotique : (1) avec des bactéries (souches pures ou communautés bactériennes), (2) avec des acides organiques (citrique et gluconique) et (3) avec un acide fort (acide nitrique). Les données obtenues ont été utilisées pour modéliser les différents processus chimiques d'altération des micas dans les sols (i.e. acidolyse et complexolyse).

III.1 Milieux de culture

Les pré-cultures des bactéries sont réalisées sur un milieu LB (Luria et Bertani) contenant 10 g de peptone, 5 g d'extrait de levure, 5g de NaCl pour un litre d'eau osmosée. Ce milieu organique traditionnellement utilisé pour la culture de bactéries est riche en éléments nutritifs et non-sélectif. Il permet à la majorité des bactéries cultivables des sols d'y avoir une croissance exponentielle.

Dans certaines expériences afin de tester l'effet des conditions de préculture sur le processus d'altération des minéraux par les bactéries, un milieu minéral de type BH (Bushnell-Hass) a été utilisé. Il contient :

- une solution contenant du glucose rajoutée pour fournir une source d'énergie et de carbone aux bactéries
- un milieu minéral, employé pour les tests d'altération en présence de minéral. C'est un milieu Bushnell-Hass modifié (BHm) dont la composition est la suivante en mg/L : KCl 20 ; NaH_2PO_4 , $2\text{H}_2\text{O}$: 20 ; Na_2HPO_4 , $2\text{H}_2\text{O}$: 22,5 ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:65 ; KNO_3 :100 ; CaCl_2 :20).

Ce milieu est complété par une source de carbone qui fournit l'énergie nécessaire aux bactéries. La plus couramment utilisée est constituée d'un hexose, le glucose additionné en quantité suffisante pour obtenir une concentration finale voisine de 2g/L.

III.2 Dispositifs en réacteurs (« batch »)

L'utilisation des réacteurs en flacons a pour avantage d'offrir un grand volume de solution (100 ml) pour les analyses d'éléments lixiviés, de métabolites produits et pour la mesure du nombre de bactéries planctoniques. Les analyses peuvent être réalisées sur un même réacteur, au cours ou à la fin des expériences alors qu'en microplaque chaque analyse (Fe, pH...) est effectuée sur un puit différent et uniquement en fin d'expérience.

Les réacteurs sont initialement fermés avec du coton cardé et du papier sulfurisé qui laissent passer l'air et protègent des contaminations bactériennes, puis sont stérilisés par autoclavage (110°C, 30 mn) avec le milieu de culture minéral. Chacun des réacteurs reçoit ensuite 3 g de phlogopite stérile. Les dispositifs sont schématisés dans la figure 2-2.

Pour les expériences conduites en conditions biotiques (avec bactéries), 80 ml de milieu de culture (BHm), 10 ml de source de carbone (glucose 20g/L) et 10 ml de suspension bactérienne (10^7 à 10^8 bactéries/ ml) sont mis dans chacun des réacteurs. Les bactéries introduites sont préalablement cultivées dans 2 mL de LB pendant une journée. La suspension de cellules est ensuite rincée trois fois dans l'eau distillée, puis suspendue dans 10 ml de milieu BHm afin d'obtenir 10^8 cellules/ml. Les microplaques sont incubées à 28°C sur une table d'agitation (120 t/mn).

Pour les expériences conduites en conditions abiotiques (sans bactéries), les réacteurs ont été remplis avec 100 ml de milieu BHm. Différents pH, variant de 2 à 5, sont ajustés par ajout d'acides organiques et d'un acide fort minéral. L'acide citrique (10^{-3} et 10^{-2} M) et l'acide gluconique (10^{-3} et 10^{-2} M) ont été utilisés comme modèle d'agents complexants. L'acide nitrique (HNO_3) a été choisi comme acide fort pour modéliser l'altération acide des minéraux.

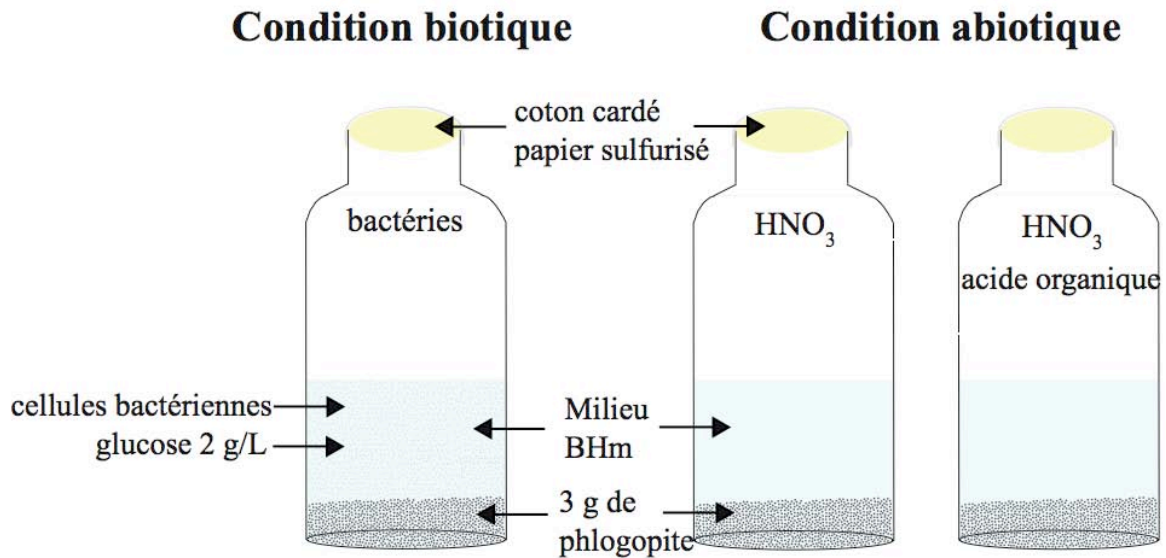


Figure 2- 2. Représentation schématique des réacteurs expérimentaux

III.3 Dispositifs en mini-réacteurs (microplaques)

Les dispositifs en microplaques ont été initialement développés au laboratoire par Rafie (2003) et utilisés ensuite par Uroz et al. (2007). Le principe est le même qu'en réacteur, seules changent les quantités de minéraux, de milieu de culture et de source de carbone utilisées. Le dispositif expérimental est composé d'une microplaque filtrante de 96 puits (Multiscreen® MAGVN22 , Millipore). Chaque puits possède à sa base une membrane de filtration de porosité 0,22 μm (Durapore®, PTFE). Ces microplaques filtrantes sont d'abord stérilisées par irradiation sous UV pendant 2 heures. Puis, chacun des puits reçoit en moyenne 7 mg de phlogopite ou 22 mg de biotite, distribué grâce à un distributeur 96 puits en acier usiné (Millipore, multiscreen column loader, MACL09625), ce qui contraint la quantité de minéraux introduits à l'intérieur des puits de la microplaque. Le revêtement en téflon limite l'adhésion des particules de micas aux puits du distributeur. Ce dispositif composé de 96 mini-réacteurs permet soit d'avoir un grand nombre de répétitions par expérience soit de varier des paramètres pour un même échantillon.

Pour les expériences conduites en conditions biotiques (Figure 2-3), 160 microlitres de milieu de culture (BHm), 20 microlitres de source de carbone (Tableau 2-2) et 20 microlitres de suspension bactérienne sont mis dans chacun des puits de la microplaque. Avant

inoculation, les souches utilisées sont pré-cultivées dans 2 mL de milieu LB pendant une journée. Les culots cellulaires obtenus sont rincés trois fois par centrifugation dans l'eau osmosée (2MΩ), le dernier rinçage est effectué avec le milieu BHm. Les culots cellulaires sont ensuite dispersés dans 1ml de milieu BHm afin d'obtenir une suspension contenant au final 10^8 cellules/ml. Les microplaques sont incubées à 28°C sur une table d'agitation réciproque (New Brunswick, 250 oscillations/min). Pour une même expérience de lixiviation (un inoculum bactérien + un échantillon minéral), il est nécessaire d'utiliser 12 puits pour évaluer simultanément la quantité de fer lixivié (4), l'acidification du milieu (4) et la consommation de la source de carbone (glucose) ou les quantités de métabolites produits (acides carboxyliques simples).

Tableau 2-2. Liste des sources de carbone utilisées dans les expériences biotiques en microplaques. La concentration initiale est de 0,8 g.l⁻¹ de carbone.

CATEGORIE	ORIGINE	SOURCE DE CARBONE	FORMULE
Hexose (sucre commun en C6)	<i>Sucre rhizosphérique Sucre de Malt</i>	D-glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆
		maltose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
Polyol (sucre linéaire en C6)	<i>Exsudat fongique</i>	D-mannitol (6-desoxymannose)	C ₆ H ₁₂ O ₆ C ₆ H ₈ (OH) ₆
Aldopentose (sucre en C5)	<i>Composé du bois</i>	D-xylose	C ₅ H ₁₀ O ₅
Acide carboxylique (mono- ou di-)	<i>Glycolyse</i>	Ac. gluconique	C ₆ H ₁₂ O ₇
	<i>Végétaux</i>	Ac. pyruvique CH ₃ -CO-COOH	C ₃ H ₄ O ₃
		Ac. malique HOOC-CH ₂ -CHOH-COOH	C ₄ H ₆ O ₅
Exsudat racinaire Synthétique*	<i>Griffiths et al., 1998</i>	glucose, fructose, saccharose : 50 mM arginine, sérine, cystéine : 12,5 mM acide succinique, acide malique : 25 mM	

Pour les expériences conduites en conditions abiotiques (sans bactéries), les microplaques sont remplies avec 200 microlitres de milieu BHm. Le pH des solutions, variant de 2 à 7, est ajusté soit avec des acides organiques, soit avec un acide fort minéral. Comme dans les dispositifs en réacteurs, les acides citrique (10^{-3} et 10^{-2} M) et gluconique (10^{-3} , 10^{-2} et 10^{-1} M) sont utilisés comme modèles d'agents complexants. L'acide nitrique (HNO₃) est utilisé comme acide fort pour modéliser l'altération acide des minéraux.

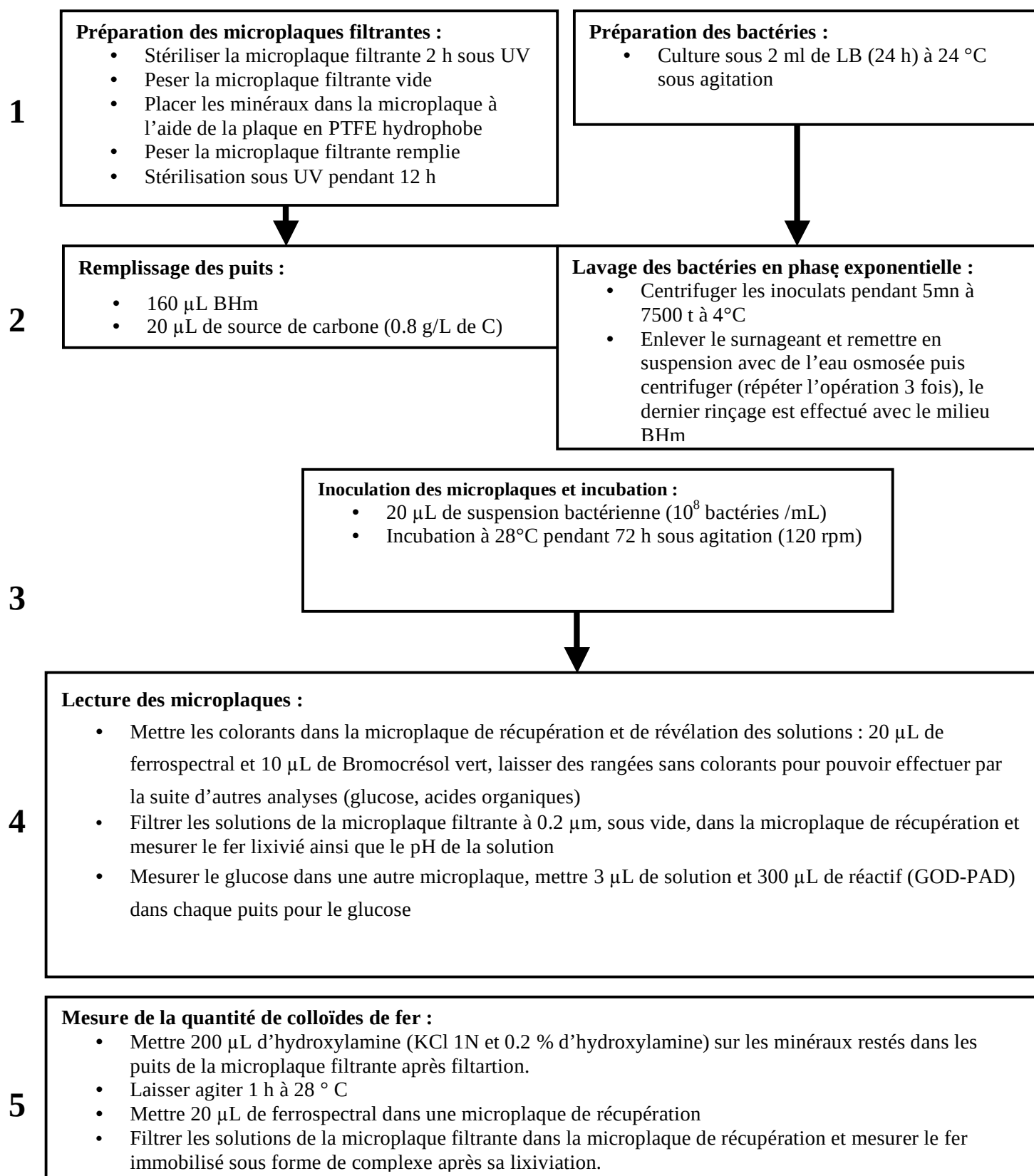


Figure 2-3. Représentation schématique des différentes étapes de préparation, d'incubation et de révélation en microplaques

III.4 Validation et amélioration du biotest en microplaque.

Les deux inconvénients majeurs de l'utilisation des microplaques par rapport aux réacteurs en flacons sont (i) l'évaporation des solutions qui sont contenues dans les puits situés au bord des microplaques ce qui rend impossible toute analyse et (ii) l'absence d'informations concernant la cinétique de la réaction (i.e. quantité suffisante de fer libéré pour être détecté par colorimétrie) et la vitesse d'utilisation des substrats carbonés. En effet, en l'absence de substrats carbonés, les bactéries commencent à décliner, elles ne sécrètent plus de métabolites permettant de maintenir un pH acide dans la solution. Par conséquent, le pH remonte dû au pouvoir tampon du minéral qui consomme les protons et le fer précipite empêchant l'analyse du fer en solution.

Pour remédier à ces problèmes, le biotest en microplaque a dû être optimisé à deux niveaux, d'abord d'un point de vue du temps, puis pour suivre la concentration de la source de carbone et enfin pour la détection éventuelle du fer précipité sous forme d'oxy-hydroxyde de fer dû à une remontée du pH.

Des expériences préliminaires, réalisées avec un suivi dans le temps de 4 jours, ont alors été testées avec quatre souches de bactéries en présence de phlogopite. Pour une durée supérieure de 4 jours, l'évaporation est trop importante dans les puits situés au bord de la microplaque, c'est pour cette raison que les tests ont été réalisés avec une durée inférieure à 4 jours. Quatre expériences en microplaques ont alors été « sacrifiées » chaque jour pour obtenir une cinétique. Les quantités de protons, de fer et de glucose ont été déterminées au cours du temps (Figure 2-4).

Les résultats indiquent que le pH diminue drastiquement le premier jour passant de pH 6,5 à 3 pour la souche PS2 et 5 pour la souche RA1, puis reste constant le deuxième et troisième jour pour l'ensemble des expériences et remonte ensuite dans 3 expériences sur 4 réalisées avec les bactéries. Le glucose diminue régulièrement dans toutes les expériences et est entièrement consommé par deux souches bactériennes. Tant que la source de carbone est disponible pour les bactéries, elles sont capables de produire des métabolites, diminuer le pH et le maintenir. La quantité de fer lixivié de la phlogopite par les bactéries augmentent

progressivement les trois premiers jours et diminuent drastiquement dans les expériences réalisées avec les bactéries qui ont consommé entièrement le glucose et où le pH est remonté. Cette immobilisation du fer est donc un problème majeur dans nos expériences.

Pour éviter ce problème, nous avons choisi d'arrêter les expériences en microplaques à 3 jours. Cependant, en condition de stress, certaines bactéries peuvent consommer le glucose plus rapidement que prévu. Pour cette raison, un test a été réalisé avec l'hydroxylamine utilisé comme faible réducteur sur les particules minérales à la fin des expériences pour solubiliser le fer qui aurait précipité (cf. VI. 1. 3).

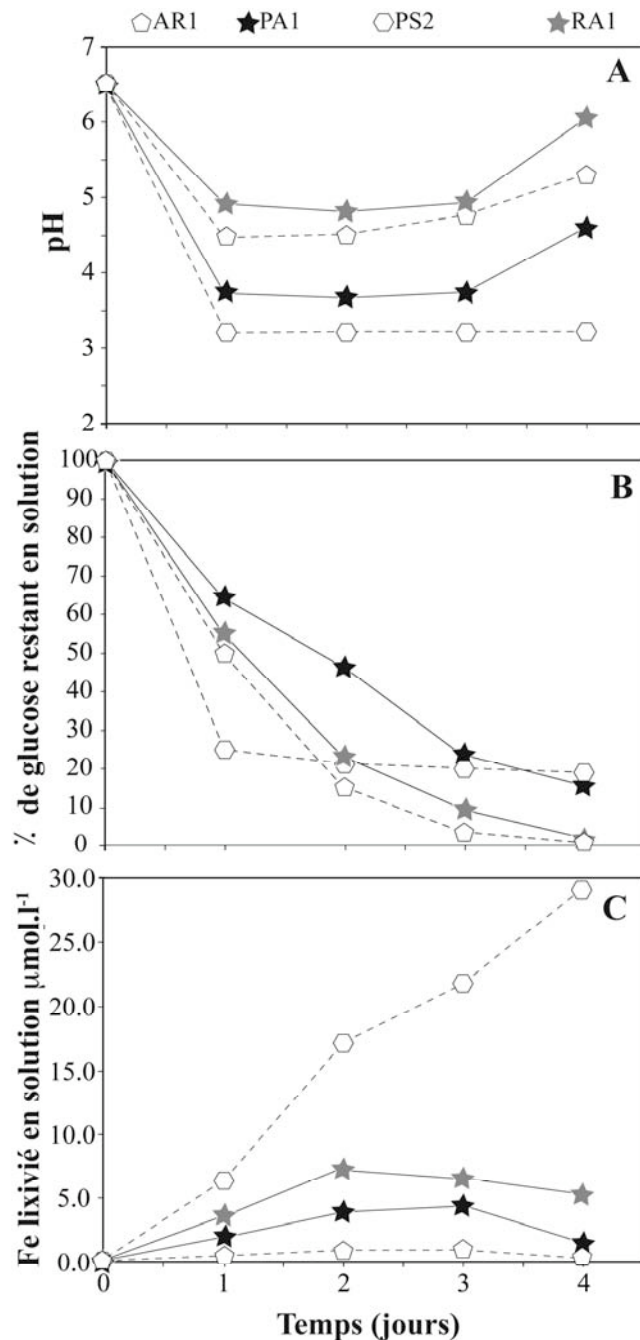


Figure 2- 4. Évolution dans le temps du pH (A), de la consommation de glucose (B) et du fer lixivié (C) lors de l'altération de phlogopite par les bactéries

IV. PRELEVEMENT ET CARACTERISTIQUES GENERALES DES SOLS ECHANTILLONNES

IV.1 Localisation et caractéristiques générales des sols échantillonnés

Les communautés et souches bactériennes étudiées dans ce travail ont été isolées à partir d'horizons de sols prélevés dans le nord-est de la France, en Lorraine, cette région correspondant à la bordure Est du Bassin Parisien d'un point de vue géologique (figure 2-5). Chacun des sols prélevés est caractérisé par une roche, un relief ou une occupation (couverture végétale) spécifique afin d'étudier l'influence de ces différents facteurs environnementaux sur le potentiel d'altération de communautés bactériennes autochtones. Les échantillons de sols ont été prélevés en juin 2008 et mai 2009, c'est-à-dire en début de période de végétation.

Le climat de la région varie de tempéré à continental semi-montagnard d'Ouest en Est. De l'Ouest à l'Est de la Lorraine, la moyenne des précipitations annuelles varie de 900 mm à 1200 mm et la température moyenne annuelle varie de 8 à 10°C. Au total, vingt-neuf échantillons de sols ont été prélevés sur 3 secteurs géomorphologiques (figure 2-5, sites A, B, C) distincts.

Au Nord-ouest, la géologie de la Lorraine est caractérisée par une alternance de marnes et de calcaires qui se traduit par une succession de cuestas plus ou moins marquées. Au Sud-Est, la formation des grès vosgiens s'appuie sur le socle hercynien granitique du massif vosgien pour former les reliefs de moyennes montagnes dit des « Basses Vosges ». Les plus vieux terrains sédimentaires du Permien et Trias inférieur reposant sur le socle granitique sont des formations silico-clastiques gréseuses à conglomérats.

Entre ces deux types de reliefs, des terrains du Lias et Trias moyen à supérieur, peu résistants à l'érosion, déterminent une unité morphologique appelée « Plaine Lorraine ».



Figure 2-5. Carte géologique simplifiée de la Lorraine et lieu de prélèvement des échantillons (Carte A. Poszwa & E. Montarges poster ZAM géologia, Nancy 2009 d'après synthèse de données géologiques, Agence de l'Eau Rhin-Meuse, BRGM, Diren, Ifen). Le site A représente le lieu de prélèvement du sol brun lessivé à pseudogley, le site B représente le lieu de prélèvement de la rendzine, du sol brun lessivé et du sol brun calcaïque et le site C représente le lieu de prélèvement du sol cryptopodzolique, du podzol et du sol brun acide.

Sur huit sols à pédogenèses contrastées soumises à des situations topographiques, des roches mères et des couverts végétaux variés (Figure 2-6), on peut distinguer :

- Quatre sols issus de relief de cuestas: une rendzine, une rendzine colluviale, un sol brun lessivé, un sol brun calcaïque (WRB 2006: leptosol rendzique, leptosol rendzique colluviale, luvisol, brunisol calcaïque respectivement). Ils sont formés sur un calcaire dur du Bajocien à l'exception de la rendzine colluviale sur marnes du lias et colluvions bajocien. La rendzine se situe en bordure de plateau où l'érosion en fait un profil sans cesse rajeuni. Le sol

brun calcique se développe à partir de Terra Fusca, produit d'altération du calcaire. Le sol brun lessivé, localisé en milieu de plateau, se développe à partir de formations superficielles allochtones siliceuses de tailles variables (galets à limons) en mélange avec de la terra fusca,

- un sol développé en plaine : sol brun lessivé à pseudogley (WRB 2006: gleyic luvisol). Il se développe à partir de marnes du Lias sur lesquelles, en position de plateau, est présente une couverture de limons de faible épaisseur,

- trois sols de montagnes : un podzol, un sol brun acide, un sol cryptopodzolique (WRB 2006: podzol, cambisol dystrique, podzol leptique).

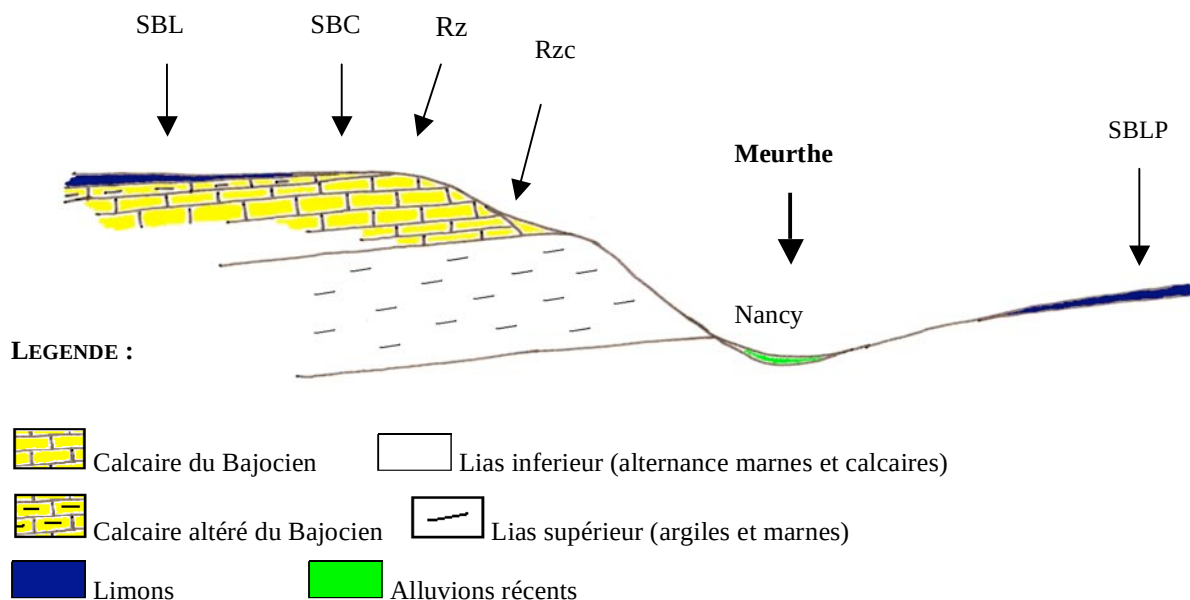


Figure 2- 6. Coupe géologique schématisée du site d'étude A au site B

Le podzol et le sol cryptopodzolique sont développés sur un grès très acide, riche en silice et très pauvre en minéraux primaires altérables appartenant à la formation du Grès Vosgien. Le premier se forme en situation de forte pente, le second en situation de replat en sommet de versant. Le sol brun acide est développé sur un grès Permien de la formation du Grès de Senones. Cette roche contient une matrice argileuse où sont présents des minéraux silicatés primaires tels que feldspaths potassiques et micas.

La rendzine, la rendzine colluviale, le sol brun calcique et le sol brun lessivé ont tous été échantillonnés sous forêt de feuillus (mélange de hêtres et chênes). Le sol brun lessivé à pseudogley a été échantillonné sous 3 végétations différentes : sous prairie, sous culture et sous forêt de feuillus (mélange de hêtres et chênes). Le podzol et le sol brun acide ont été échantillonnés sous forêt de résineux majoritairement, le premier sous pin, avec une strate herbacée d'éricacées et de callunes bien développée, le second sous épicéa. Le sol cryptopodzolique a été échantillonné sous landes représentées majoritairement de graminées, d'éricacées et de callunes et arbustes résineux dispersés.

IV.2 Cas particulier des sols acides et amendés ou non sur le bassin versant de Senones, sur Grès Vosgien

Dans les basses Vosges, les roches mères acides et le climat conduisent à la formation de sols podzolisés, pauvres en nutriments (Ca, Mg). Des décennies de pluies acides et d'exploitations forestières ont encore appauvri ces sols, acidifié les eaux, diminué la biodiversité globale et provoqué des dépérissements forestiers. Des amendements calco-magnésiens (carbonates de calcium et de magnésium, gypse et potasse) ont été réalisés en 2003 sur un petit bassin versant géré par l'ONF afin de suivre la restauration possible de la qualité des sols et des eaux par cette méthode. Les suivis sont réalisés parallèlement sur un bassin versant voisin non amendé, sur même roche (Grès Vosgien) et considéré comme un témoin. Le premier bassin amendé est nommé « Basse des escaliers », le bassin témoin est nommé « Basse du gentil sapin ». Sur chaque bassin versant, deux sites ont été échantillonnés pour étudier l'effet d'un amendement sur le potentiel d'altération des silicates par les communautés bactériennes extraites :

- le premier site est localisé en sommet de versant sous une végétation de landes (Canches flexueuses). Les deux profils de sols sont situés sous la même ligne de crête et sont des sols podzols. Ce type de sols ainsi que la végétation de landes ont été décrits dans le paragraphe précédent et faisaient alors référence aux échantillons prélevés sur le bassin versant témoin. Pour étudier l'effet de l'amendement, les sols sur les deux bassins versants ont été prélevés aux mêmes dates, à quatre périodes différentes (novembre 2007, mai 2008, juillet 2008, juillet 2009),

- le second site est localisé sous une vieille forêt d'épicéas en mélange avec quelques hêtres. La strate herbacée est très peu développée. Les sols sont des cryptopodzols et ont été prélevés en juillet 2009.

IV.3 Prélèvement, préparation des sols et profils des différents sols échantillonnés.

Sur chaque site, tous les horizons pédologiques des sols ont été prélevés à la tarière, à partir de 3 sondages réalisés de façon aléatoire, dans 3 flacons stériles. Les échantillons sont mélangés par la suite au laboratoire par horizon pour avoir un échantillon plus représentatif de l'hétérogénéité du milieu naturel. La tarière a été nettoyée à l'éthanol (95 %) entre chaque échantillonnage. Les échantillons ont été stockés en chambre froide avant les analyses sur les communautés. Pour chaque sondage, des échantillons ont aussi été prélevés dans des sacs plastiques puis séchés à température ambiante et tamisés pour la détermination des caractéristiques physico-chimiques de ces sols.

La liste des horizons échantillonnés à partir des profils des 8 sols est présentée dans le tableau 2-3.

Tableau 2- 3. Liste des horizons échantillonnés

Sol	Horizons de sol	Profondeur (cm)
Sol cryptopodzolique (Podzol leptique)	A1	0-20
	A2	20-30
	Bs	30-70
Sol brun acide (Cambisol dystrique)	A1	0-30
	B	30-60
	C	> 60
Podzol	A1	0-30
	A2	30-40
	Bh	40-50
	Bs	50-70
	C	> 70
Rendzine (Leptosol rendzique)	A1	0-30
	B/C	30-60
Rendzine colluviale (Leptosol rendzique colluvial)	A1	0-30
	B/C	30-60
Sol brun calcaire (cambisol calcaire)	A1	0-15
	B	15-30
	C	> 30
Sol brun lessivé (Luvisol)	A1	0-15
	A2	15-30
	B	> 30
Sol brun lessivé à pseudogley sous prairie (Luvisol gleyique)	A1	0-15
	A2	15-30
	B	30-60

Les caractéristiques physico-chimiques de ces sols sont présentées dans les tableaux 4-1 à 4-4 du Chapitre 4.

V. CARACTERISATION DE LA PHASE SOLIDE

V.1 Carbone organique et azote total des sols

Les teneurs totales en carbone et azote dans la phase solide des sols sont déterminées sur un aliquot d'échantillons finement broyés et préalablement séchés sous atmosphère ambiante, par combustion à 900°C au CHNS-O (Eager 300 Thermo Finnigan).

V.2 Éléments minéraux échangeables dans les sols et capacité d'échange cationique

La capacité d'échange cationique et les éléments échangeables (Fe, Al, Si, Mg, K, Ca et Na) des différents échantillons ont été déterminés selon une méthode utilisée par (Mathieu et Pieltain, 2003). Vingt-cinq ml d'une solution de NH_4NO_3 (1M) sont ajoutés à 1 g de sol, l'ensemble est agité 1h, puis centrifugés à 4500 tr/min pendant 15 min. Le surnageant est enfin filtré à 0.2 μm . Les cations échangeables sont déterminés dans les filtrats par ICP-OES (Varian). Chaque échantillon a été réalisé en triplicat. Les limites de détection sont de l'ordre de 0,05 ppm. Les incertitudes sont inférieures à 5 %.

V.3 Éléments minéraux majeurs totaux dans les sols

La détermination de la teneur en éléments totaux des échantillons de sols a été faite sur les solutions issues de fusion alcaline. Cent mg d'échantillons finement broyés manuellement dans un mortier en agate sont mélangés avec 100 mg de fondant (80% de métaborate de lithium LiBO_2 et 20 % de tétraborate de lithium LiB_4O_7 , spectroflux). Le mélange est porté dans un four à haute fréquence à une température proche de 1000°C. La perle obtenue est ensuite dissoute dans une solution aqueuse à 1 % d' HNO_3 . Les éléments de la solution (Fe, Al, Si, Mg, K, Ca, Na et Sr) sont dosés par ICP-OES (Varian). Les limites de détection sont de l'ordre de 0,05 ppm. Les incertitudes sont inférieures à 5 %.

VI. CARACTERISATION DE LA PHASE LIQUIDE

Toutes les solutions prélevées ont été filtrées à 0,22 microns et sont conservées soit en chambre froide, soit au congélateur avant analyse.

VI.1 Analyse des éléments minéraux présents en solution

VI.1.1 Analyse totale des cations par ICP-OES

Avant analyse, les solutions de lixiviats sont stabilisées par ajout d'une goutte d'acide nitrique concentré (68%, 15N). Les cations totaux sont ensuite dosés par spectrométrie d'émission atomique de type ICP-OES (Jobin-Yvon 238 ou Varian).

VI.1.2 Analyse isotopique du magnésium par MC-ICP-MS

Les mesures de la composition isotopique du Mg en solution ont été réalisées avec un spectromètre de masse à source plasma à multi-collection (MC ICP-MS) basé au CRPG – Nancy (Centre de recherche pétrographique et géochimique, UPR 2300 du CNRS Vandoeuvre-lès Nancy) et avec le Nu-plasma basé à l'ENS de Lyon (Ecole Nationale Supérieure de Lyon).

Afin d'obtenir des mesures précises de la composition isotopique des échantillons, une technique dite du "standard-sample-bracketing" a été utilisée. Cette technique consiste à mesurer une référence avant et après chaque échantillon pour s'affranchir du fractionnement de masse instrumental entre les standards sur l'échantillon. La valeur moyenne des deux standards entourant l'échantillon est utilisée pour recalculer les compositions isotopiques de l'échantillon est noté $\delta^{26}\text{Mg}$ et $\delta^{25}\text{Mg}$.

La solution de référence utilisée pour la méthode « sample-standard-bracketing » est le NIST SRM980_{CRPG}. Cependant, (Carignan et al., 2004; Galy et al., 2003) ont montré une hétérogénéité de ce matériel de référence. En conséquence les résultats sont reportés relativement au DSM3 (Dead Sea Magnesium), nouveau matériel de référence développé par l'université de Cambridge. Les résultats sont tous reportés en deltas, l'unité conventionnelle calculée comme suit

$$\delta^{26}\text{Mg} = [({}^{26}\text{Mg}/{}^{24}\text{Mg})_{\text{échantillon}} / ({}^{26}\text{Mg}/{}^{24}\text{Mg})_{\text{standard}} - 1] * 1000$$

L'analyse isotopique par MC-ICP MS requiert au minimum 50 µg de Mg par échantillon et nécessite au préalable une séparation du magnésium des autres éléments de l'échantillon pour éviter les effets de matrice. Les travaux de Galy et al. (2001) ont en effet mis en évidence un important biais sur la composition isotopique réelle de 0,2 ‰ dû à la présence de Ca, Al, Na dans les échantillons. La séparation du Mg des autres éléments est donc nécessaire.

Les échantillons comme les solutions de lixiviation ont tout d'abord été mises en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ 30%) et d'acide nitrique concentré (68%, 15 N) pour éliminer le glucose. Les échantillons sont ensuite conditionnés dans 0,5 ml de HCl 1M.

Le magnésium de ces échantillons a été purifié dans notre étude par une méthode chromatographique solide-liquide, d'abord sur une résine anionique (Bio-Rad AG[®] MP-1M, 100-200 mesh) pour éliminer les métaux de transition (fer par exemple), puis sur une résine cationique AG50W-X12 (200-400 mesh). Nos échantillons contiennent des quantités de potassium (K) suffisantes pour avoir un effet de matrice, en conséquence il a été nécessaire de réaliser plusieurs passages sur colonne pour séparer le Mg du K (Bolou-Bi et al., 2009). Les éléments lithium et sodium ont élués en premier puis une fraction purifiée de Mg est éluee et collectée dans 5 ml de HCl 2M.

Les travaux de Chang et al., (2003) ont montré qu'un rendement de 85 % entraîne un fractionnement de 0,2‰ du rapport ²⁶Mg/²⁴Mg ce qui correspond à l'incertitude sur les mesures. Nous nous sommes donc assurés que les taux de récupération du Mg de nos échantillons étaient de 100 %.

VI.1.3 Analyse des protons et du fer par spectrophotométrie

Les quantités de fer total libéré en solution (Fe^{2+} et Fe^{3+}) sont déterminées en ajoutant 20 μl de Ferrospectral® (Spectroquant : Ref 1.14761.0001, Merck) à 200 μl d'analytes. Dans un tampon de thioglycolate d'ammonium (pH 3,4), la réaction du Fe(II) avec le Ferrospectral forme un complexe de couleur violette très stable ($\lambda = 565\text{nm}$, $\epsilon_{\lambda} = 27570 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$). La stabilité du complexe et sa grande affinité pour le Fer(II) le rend très compétitif vis à vis des ligands organiques produits par les bactéries. Il permet de mesurer des quantités de fer qui vont de 0,02 mg.l^{-1} à 5 mg.l^{-1} . La lecture est réalisée à 595 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (SAFAS Xenius FLX).

Pendant les expériences, des oxy-hydroxydes de fer peuvent se former. Par conséquent, la concentration de fer en solution est sous-estimée. Le fer amorphe est alors dissous par 200 μl d'un mélange de chlorure de potassium et d'hydroxylamine (KCl 1M et NH_2OH 0,2%) à pH 5 placé sur les résidus de filtration (particules minérales et bactéries) pendant 1 heure (Jeanroy, 1983). Puis, les solutions obtenues sont filtrées et 20 μl du colorant ferrospectral® sont rajoutés pour la quantification du fer amorphe lixivié. Le mélange de chlorure de potassium et d'hydroxylamine est un réducteur faible qui solubilise uniquement les oxy-hydroxydes de fer amorphes.

L'effet est négligeable sur les particules minérales fraîches (avant expérience) avec des surfaces exemptes d'oxy-hydroxyde de fer. Cette méthode a été testée en ajoutant le réactif aux particules minérales fraîches pendant une heure, aucune trace de fer n'a été détectée pour la phlogopite et une quantité près de la limite de détection a été mesurée pour la biotite (0,02ppm).

Pour la détermination du pH, 10 μl de bromocrésol vert (1 g.l^{-1} , Sigma) sont ajoutés à 200 μl d'analytes. La lecture est réalisée à 2 longueurs d'ondes : 440 et 620 nm sur le lecteur de microplaque (SAFAS Xenius FLX). Le colorant utilisé permet de mesurer des pH qui vont de 3 à 6,5.

VI.2 Éléments organiques en solution

VI.2.1 Glucose (spectrophotométrie)

La consommation du glucose par les bactéries au cours des expériences a été déterminée en mesurant le glucose restant en solution. Trois cents μl de GOD-PAP (kit

enzymatique, BioLabo) sont ajoutés à 3 µl d'analytes. Le principe est basé sur l'oxydation du glucose par une enzyme appelée GOD (glucose oxydase) en acide gluconique et eau oxygénée (H_2O_2) qui réagissent en présence respectivement de 4-amino-antipyrine (PAP) et de peroxydase (POD) avec le chloro-4-phénol pour former une quinonéine rouge. Après 20 min à l'obscurité, l'absorbance du complexe coloré proportionnelle à la concentration est mesurée à une longueur d'onde de 520 nm sur le lecteur de microplaque (SAFAS Xenius FLX).

VI.2.2 Acides organiques (Chromatographie ionique)

Les solutions avant analyse sont conservées au congélateur à $-18^{\circ}C$. La détermination et la quantification des acides organiques produits par les bactéries ont été réalisées à l'aide d'une chromatographie ionique équipée d'un détecteur conductimétrique (ICS 3000, Dionex Corp.) et d'une colonne analytique (AS 11 HC, Dionex corp.).

L'échantillon est élué avec une solution de KOH dont la concentration varie de 0,9 mM à 60 mM, avec le temps à un débit de 1,3 ml/min. Les solutions de références utilisées sont le formate de sodium, D- acide gluconique, butyrate de sodium, le sel d'acide pyruvique de sodium, citrate de sodium tribasique, oxalate de sodium, propionate de sodium, acétate de sodium, le sel d'acide succinique disodium, le sel DL- acide malique disodium (Sigma-Aldricht) et L-lactate de sodium et le sel d'acide malonique disodium (fluka). L'incertitude sur les mesures est proche de 0,5 % pour tous les acides organiques. La limite de détection est de 0,1 ppm.

RESULTATS

- **CHAPITRE 3 :** Identification, traçage et variabilité des processus d'altération des phyllosilicates par des souches bactériennes
- **CHAPITRE 4 :** Diversité fonctionnelle de communautés bactériennes isolées de sols de Lorraine

CHAPITRE 3 : Identification, traçage et variabilité des processus d'altération des phyllosilicates par des souches bactériennes

I. IDENTIFICATION DES PROCESSUS D'ACIDOLYSE ET DE COMPLEXOLYSE ET EVALUATION DES COMPETENCES BACTERIENNES

I.1 Contexte et objectifs

La dissolution des phyllosilicates est généralement considérée comme un processus de surface comportant deux étapes principales: l'adsorption du réactant (H^+ , OH^- , ou ligands) sur la surface du minéral puis l'hydrolyse d'une liaison X-O du minéral et la diffusion de l'élément X (Fe, Mg, Al, Si) en solution (Furrer et Stumm 1986; Cama et Ganor 2006). Si ces étapes dépendent grandement de la concentration en réactants au voisinage de la surface du minéral, elle dépend également de l'accessibilité et de la réactivité des sites de surface ainsi que de la taille des particules.

La structure 2 :1 en feuillet (TOT) confèrent aux micas une anisotropie réactionnelle qui dépend de la distribution des sites réactifs entre les surfaces basales et latérales. Bien que majoritairement exprimées (surface plus développée), les faces basales (001) terminées par les oxygènes des feuillets tétraédriques [Si_3AlO_{10}], ont une réactivité peu importante. À l'inverse, les faces latérales (211), moins exprimées, présentent de nombreux groupes hydroxyles très réactifs provenant des feuillets trioctaédriques (brucitiques) [$Mg_3(OH)_6$]. Les surfaces latérales des micas sont donc plus réactives que les surfaces basales (Turpault et Trotignon, 1994).

Le taux d'altération des phyllosilicates (R_w) résulte de la combinaison de plusieurs réactions de surfaces élémentaires et « indépendantes ». Ces réactions impliquent des protons, les hydroxyles ou les ligands et caractérisent respectivement les processus d'acidolyse ou d'alcalinolyse (« proton- or hydroxyl- promoted processes ») et de complexolyse (« ligand-promoted process »). Les deux premières réactions prédominent à pH acide (1 à 4) ou basique (entre 9 et 12) alors que la dernière est surtout efficace pour des pH proches de la neutralité (pH 5-8) lorsque l'effet des protons ou des hydroxyles est minimal (Welch et Ullman 1993; Raulund-Rasmussen et al., 1998). Ces réactions élémentaires impliquées dans l'altération des phyllosilicates sont additives et pH dépendante, et ont amené différents auteurs (Furrer et Stumm 1986; Malmström et Banwart 1997) à proposer le modèle empirique suivant pour décrire le taux de dissolution (R_w), loin de l'équilibre, d'un phyllosilicate :

$$R_w = k_H (a_{H^+})^n + K_O + k_{OH} (a_{OH^-})^m + k_{L,M} (a_L)^l$$

où k désigne le taux de dissolution apparent, a_{H^+} , a_{OH^-} et a_L l'activité des protons, des hydroxydes et des ligands et les constantes n , m et l sont les ordres de réaction, déterminés expérimentalement.

Ce modèle, très efficace pour quantifier l'impact des agents chimiques sur la dissolution des minéraux n'a jamais été utilisé pour évaluer l'efficacité d'agents biologiques (comme les bactéries) dans l'altération de minéraux silicatés.

Comme cela a été précisé dans le chapitre bibliographique, un certain nombre d'études montre que les bactéries peuvent amplifier la dissolution et favoriser la lixiviation des cations soit (1) directement par contact avec le minéral via de forts gradients locaux de réactants, soit (2) indirectement via des perturbations chimiques globales (pH, redox...) induit en solution par les bactéries. En particulier, les bactéries hétérotrophes sont connues pour accumuler (absorber et adsorber) des éléments et des molécules de la solution ou excréter des protons par fermentation ou par respiration. De plus, les activités cataboliques et anaboliques des bactéries hétérotrophes produisent de nombreux métabolites secondaires comme les acides organiques ou des complexants spécifiques (sidérophores) qui peuvent favoriser aussi la lixiviation des cations minéraux. Il était donc intéressant d'identifier et d'évaluer le potentiel « altérant » des bactéries du sol vis-à-vis des phyllosilicates 2 : 1 en se référant au modèle empirique proposé.

Les objectifs de cette partie du travail sont tout d'abord d'étudier la lixiviation de cations et l'influence respective des propriétés cristallographiques du minéral et métaboliques des bactéries sur le processus d'altération de deux micas (phlogopite et biotite). Les données obtenues à partir d'expériences chimiques et biochimiques d'altération seront interprétées à l'aide du modèle de dissolution présentés ci-dessus. La prédominance relative des processus d'acidolyse et de complexolyse pourra être ensuite étudiée en fonction de la diversité métabolique bactérienne, estimée par les acides organiques produits. L'optimisation d'un dispositif de mini-réacteurs (plaques de microtitration) a permis de tester de façon optimale (reproductibilité, sensibilité) différentes modalités d'altération chimique abiotique (protons et acides organiques) ou biochimiques (diverses souches bactériennes). En complément, des trois souches rhizosphériques de référence AR1 (*Agrobacterium radiobacter*), PA1 (*Pantoea agglomerans*), RA1 (*Rhizobium aquatilis*), neuf souches bactériennes supplémentaires, isolées de différents horizons de sol d'un podzol (sur Grès Vosgien dans le Val de Senones), ont par ailleurs été utilisées. L'analyse par PCR-séquençage (ADNr16S) a permis de les identifier

comme suit : *Pseudomonas sp.* (PS1 et PS2), *Burkholderia sp.* (B1, B2 et B3), *Paracoccus sp.* (PC1) et *Bacteroidetes sp.* (BE1).

Les résultats acquis et présentés ci-dessous sont également valorisés dans un article accepté dans la revue Geochimica et Cosmochimica Acta et en cours de review après une première phase de correction (Annexe 1).

I.2 Identification des processus d'acidolyse et de la complexolyse par des agents chimiques et bactériens

Dans cette étude, l'identification des processus impliqués et de leur intensité a pu être obtenu grâce à une série d'expériences réalisées en micro-réacteurs où la seule source de fer et de magnésium est constituée des micas.

Dans toutes les expériences, biotiques ou abiotiques, menées en micro-réacteurs, les concentrations d'équilibre en protons s'établissent assez rapidement (0 à 12 heures) et se maintiennent durant 72 heures. Durant cette période, le taux de dissolution peut être considéré comme constant et comme représentatif d'un taux initial de dissolution (R_{w0}). Dans les expériences biotiques, ce taux diminue vraiment si une carence carbonée apparaît, c'est-à-dire si la source de carbone et d'énergie vient à manquer (Chapitre 2, III. 3). En se basant sur le modèle cinétique proposé précédemment et en se limitant au domaine acide, la quantité d'élément lixivié durant l'intervalle Δt ($\Delta t \leq 72h$) s'exprime de la manière suivante :

$$[Fe|Mg]/\Delta t = r_{w0} = r_{H^+} + r_L = k_H(a_{H^+})^n + k_L(a_L)^1$$

En l'absence de ligands organiques ou de microorganismes « actifs », r_{w0} et par conséquent le taux d'élément lixivié ne dépendent que du pH (acidolyse) :

$$\text{Log}(r_{w0}) = \text{Log}(k_{H^+}) - n \cdot \text{pH}$$

Les relations entre l'acidité de la solution de lixiviation et le taux de fer libéré (r_{Fe}) lors de l'altération bactérienne ou chimique du phlogopite et de la biotite sont représentées sur la figure 3-1.

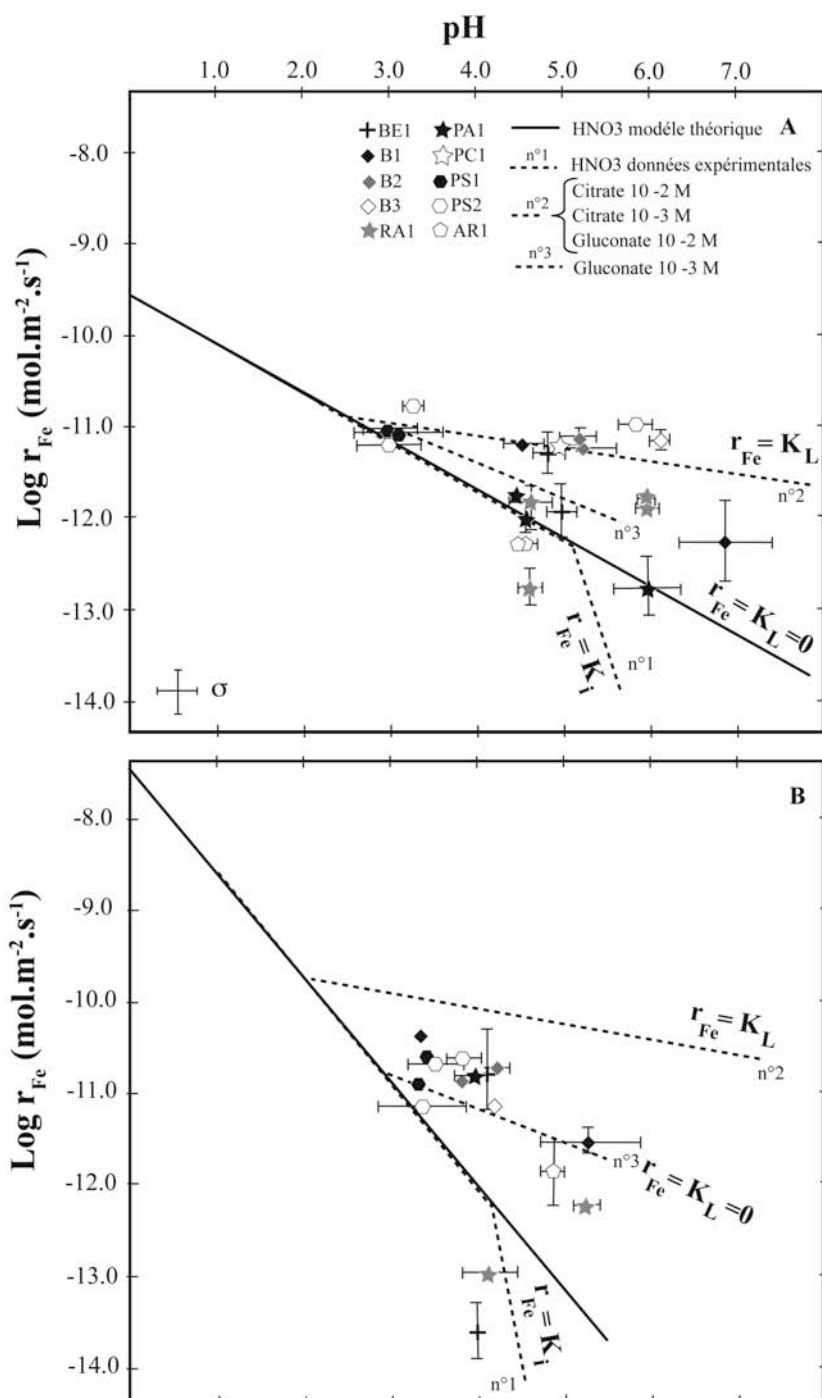


Figure 3- 1. Taux de libération du fer en solution ($\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) en fonction du pH pour le phlogopite (A) et la biotite (B).

Les droites représentent les résultats obtenus avec les expériences abiotiques permettant de définir les domaines d'acidolyse, de complexolyse et d'immobilisation. L'ordonnée à l'origine et la pente de la droite d'acidolyse permet de calculer les constantes de dissolution apparentes (K_{H^+}) et les ordres de réaction (n) pour les 2 minéraux.

Chaque point représente la moyenne et l'écart type réalisés sur 4 répétitions.

Ainsi, la détermination expérimentale des taux de solubilisation par acidolyse et une transformation logarithmique des variables (r_{Fe} , H^+) permet d'identifier et de quantifier avec précision, pour toute expérience, la part effective des processus d'acidolyse et de complexolyse dans l'altération. Tout écart à la droite d'acidolyse indique un effet « complexolyse » s'il s'agit d'une expérience abiotique ou un effet « vital » s'il s'agit en revanche d'une expérience

biotique. Cette représentation est bien plus informative que la simple représentation : concentration à l'équilibre versus pH (Figure 3-2).

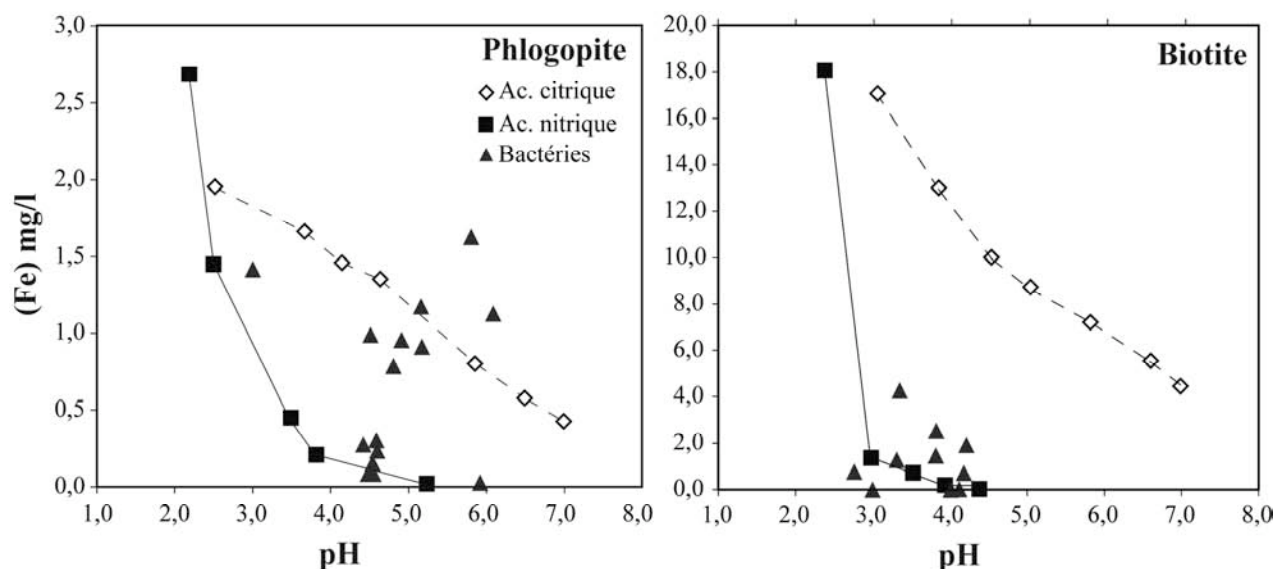


Figure 3- 2. Représentation classique des concentrations de fer en solution en fonction du pH des résultats sur lixiviation du fer lors de l'altération de phlogopite et biotite. Chaque point représente la moyenne réalisée sur 4 répétitions.

Les tests d'altérations des minéraux ont été réalisés en microréacteurs avec comme indicateur l'analyse du magnésium et du fer. La sensibilité du colorant utilisé (Xylidyl blue) pour le dosage par colorimétrie du Mg était mauvaise (0,5 ppm à 4 ppm); de plus, ce colorant n'est pas sélectif et les métabolites secondaires (acides organiques) produits par les bactéries interféraient avec les mesures. Pour ces raisons, le fer a été choisi comme traceur du processus d'altération des minéraux, le colorant utilisé (ferrospectral) permet la mesure de concentrations allant de 0,02 ppm à 5 ppm.

Dans les résultats présentés dans les figures $\log(r_{Fe})$ versus pH et par souci de clarté, les expériences réalisées en conditions abiotiques sont illustrées seulement par des droites de régression correspondantes (en trait plein pour les dissolutions par des acides forts minéraux et en pointillés pour celles par des acides organiques).

Acidolyse simple : dissolution avec un acide fort : l'acide nitrique (HNO_3) :

Les droites de corrélation entre le pH et $\log(r_{\text{Fe}})$ dans le cas des expériences abiotiques avec HNO_3 permettent d'obtenir une référence « acidolyse » pour chaque fraction minérale. Elles montrent que plus le pH est bas (1-4), plus le fer est libéré en solution et surtout que le taux de dissolution du phlogopite est plus élevé que celui de la biotite. Les résultats suivent le modèle empirique précédemment décrit [$r_{\text{Fe}} = K_{\text{H}^+} (a_{\text{H}^+})^n = r_{\text{Fe}}^{\text{H}}$]. Une fois normalisés par rapport à la surface spécifique des fractions granulométriques utilisées, les constantes de dissolution apparente par les protons (K_{H^+}) du phlogopite et de la biotite sont respectivement de $3,4 \cdot 10^{-9}$ et $3,6 \cdot 10^{-8} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-2}$. L'ordre de réaction (n) varie de 0,428 à 1,385 pour le phlogopite et la biotite respectivement. Ces données sont cohérentes (Tableau 3-1) avec celles de la littérature (Acker et Bricker, 1992 ; Kalinowski et Schweda 1996; Malmöström et Banwart, 1997, Turpault et Trotignon, 1994).

Tableau 3- 1. Constante de dissolution apparente et ordre de réaction de phlogopite et de biotite

Minéraux	Constante de dissolution apparente (K_{H^+}) $\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	ordre de réaction (n)	Références
Phlogopite	$3,4 \cdot 10^{-9}$	0,43	cette étude
	$3,2 \cdot 10^{-11}$	0,40	Kalinowski et Schweda, 1996
	$3,6 \cdot 10^{-8}$	1,385	cette étude
Biotite	$7,9 \cdot 10^{-12}$	0,34	Acker et Bricker, 1992
	$7,9 \cdot 10^{-11}$	0,40	Malmöström et Banwart, 1996
	$6,3 \cdot 10^{-9}$	0,90	Turpault et Trotignon, 1994
	$3,2 \cdot 10^{-11}$	0,61	Kalinowski et Schweda, 1996

À partir de pH 4-5 et jusqu'à pH 7, le taux de libération du fer diminue fortement et paraît sous-estimé par rapport au modèle d'acidolyse théorique. Cela est dû à une diminution importante de la solubilité du fer à partir de pH 4-5 qui tend alors à précipiter sous forme d'oxy-hydroxyde de fer. Le taux de libération théorique du fer à des pH supérieurs à 5 peut être obtenu par extrapolation de la droite modèle.

Toutefois, une simple extraction ménagée au chlorhydrate d'hydroxylamine à pH 5 (agent réducteur) sur les résidus d'altération permet de quantifier le fer contenu dans les

colloïdes et précipités amorphes, sans altérer le mica. Ainsi, la quantité de fer libéré par acidolyse pour des $\text{pH} > 4$ n'est plus sous-estimée.

L'utilisation du fer comme traceur du processus d'altération des minéraux permet donc de distinguer 3 processus communs dans les interactions bactérie-silicate : acidolyse, complexolyse et immobilisation (précipitation, fixation).

Complexolyse simple : dissolution en présence d'acides organiques complexants (citrate, gluconate):

Les données issues des expériences abiotiques en présence d'acides organiques à différents pH montrent une autre relation entre le pH de la solution de lixiviation et le taux de libération du fer (r_{Fe}) lors de l'altération du phlogopite et de la biotite. Ces données suivent le modèle empirique précédemment décrit [$r_{\text{Fe}} = K_{\text{H}^+} (\text{a}_{\text{H}^+})^n + K_{\text{L}} (\text{a}_{\text{L}})^l = r_{\text{Fe}}^{\text{H}} + r_{\text{Fe}}^{\text{L}}$]. Pour un même pH d'équilibre, la présence d'acides organiques (citrique et gluconique) accroît sensiblement le taux de lixiviation du fer par rapport à celui obtenu par acidolyse simple. Cette tendance est accentuée d'un facteur de 10 à 100 lorsque le pH s'approche de la neutralité, l'action des ligands prédomine alors sur les protons ($r_{\text{Fe}}^{\text{H}} \ll r_{\text{Fe}}^{\text{L}}$). En revanche pour les pH très acides, le taux de dissolution n'est plus affecté par la présence de ligands. Le taux de libération apparent du fer par les ligands (r_{Fe}^{L}) dépend de la nature et de l'activité des ligands mais aussi du pH. Les résultats montrent en particulier que l'acide citrique, tri-carboxylique (pK_a : 3,13 ; 4,76 ; 6,4) est un agent de lixiviation des cations plus efficace que l'acide gluconique mono-carboxylique (pK_a 3,86). Une concentration de 1 à 10 mM d'acide citrique influence fortement la lixiviation du fer, alors qu'il faut au moins 10 mM d'acide gluconique pour commencer à voir un effet significatif.

On peut remarquer aussi qu'en dessous de pH 2-3, les taux de lixiviation du fer (r_{Fe}) ne dépendent plus des acides employés, minéraux ou organiques. En deçà d'un certain pH (noté B sur la figure 3-2), les taux de libération sont égaux au r_{Fe}^{H} du minéral. En dessous de ce pH (noté B sur la figure 3-2), l'acidolyse prédomine largement et l'apport du ligand organique devient négligeable. Ce point particulier indique la limite supérieure de prédominance du processus d'acidolyse sensu stricto (**domaine I uniquement limité par la droite d'acidolyse**). Sa position dépend des constantes d'acidité (K_a) du ligand, mais surtout du nombre de sites réactifs du minéral accessible au ligand. Il existe une valeur limite r_{Fe}^{L} qui ne dépend plus de

l'activité du ligand, mais de la saturation des sites réactifs par le ligand ou de la compétition proton/ligand. Les taux de lixiviation du fer mesurés expérimentalement pour les concentrations les plus élevées en acides organiques, donne une bonne estimation de cette valeur limite pour chaque minéraux : pour le phlogopite $r_L^* \# 10^{-11} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-2}$ et pour la biotite $r_L^* \# 10^{-10} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-2}$, la biotite est donc plus sensible à la présence de ligands.

Pour des pH supérieurs au point B (pH de 3-5), les deux processus (acidolyse et complexolyse) sont impliqués (domaine II). Plus on s'éloigne de la droite d'acidolyse, plus l'effet du ligand est important. On doit aussi définir un troisième domaine (Domaine III) sous la droite d'acidolyse où le r_{Fe} est contrôlé par la solubilité du fer et les processus d'immobilisation (précipitation, néoformation de minéraux secondaires...). Ce domaine définit les limites physico-chimiques d'immobilisation spontanée du fer dans les conditions de l'expérience. Un schéma résumant les positions respectives de ces trois domaines est représenté dans la figure 3-3.

Ainsi le domaine I n'est représenté que par la droite d'acidolyse à des pH inférieurs à 2-3, le domaine 2 est représenté par les deux processus additifs l'acidolyse et la complexolyse et le domaine 3 représente le domaine de précipitation du fer sous la droite d'acidolyse pour des pH supérieurs à 4.

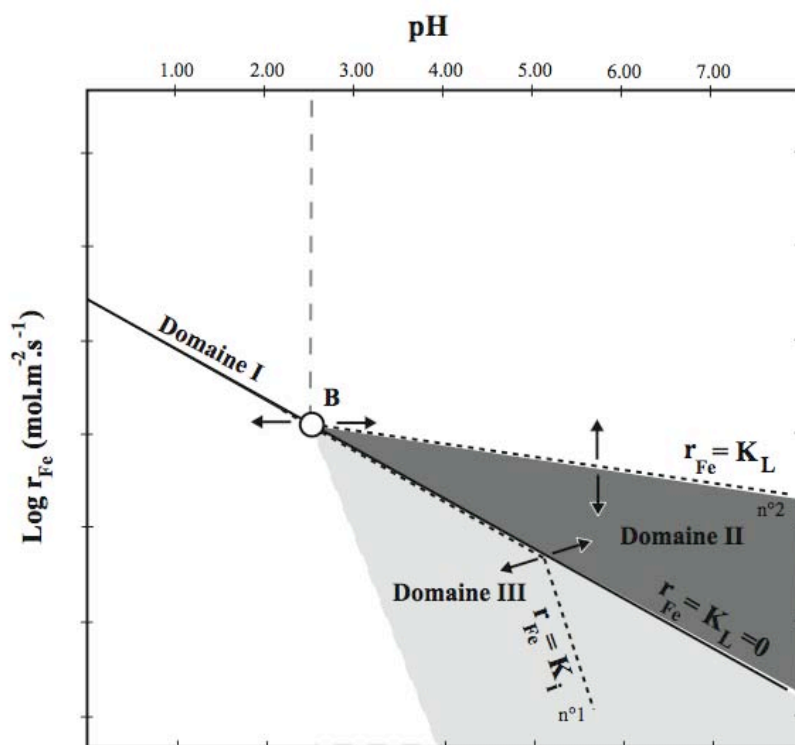


Figure 3- 3. Schéma représentatif des domaines où agissent des processus distincts

Dissolution acido-complexante (intégrée) en présence de souches bactériennes :

Dans les expériences biotiques réalisées avec différentes souches bactériennes avec plusieurs réplicats (Figure 3-1), le pH final (à 72h) des solutions de lixiviation du fer varie de 3 à 7. Une variabilité de réponse pour une même souche bactérienne est observée par exemple RA1. On observe des valeurs différentes de pH et donc de r_{Fe} en présence d'une même souche. Cela peut s'expliquer par un temps de latence plus important de la souche qui ne crée pas les mêmes conditions au sein du réacteur.

Peu de valeurs (r_{Fe} , pH) finales se situent sur la droite d'acidolyse (domaine I). Seules les activités des souches bactériennes de *Pseudomonas* PS1 et PS2 permettent d'amener le pH suffisamment bas (valeur minimale de 3), entraînant une très forte libération du fer ($r_{Fe} = 10^{-11} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-2}$) contenu dans la biotite. Ces souches sont des bactéries qui lixivient les cations par acidolyse principalement. En revanche, le grand nombre de valeurs (r_{Fe} , pH) situé dans le domaine II (biotite et phlogopite), montrent que les souches produisent également des acides organiques qui influencent favorablement le taux de libération du fer ($r_{Fe} = 10^{-12}$ à $10^{-11} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-2}$). Un grand nombre de souches bactériennes (B1, B2, B3, PC1, BE1, PA1) est situé dans le domaine II. De plus, l'activité de certaines souches (B2, B3 et PS2) provoque une lixiviation du fer plus importante que la valeur limite de complexolyse, prédite par le modèle d'altération en présence d'acide citrique. Cette lixiviation du fer est clairement le résultat d'un processus de complexolyse très intense. Ainsi, la limite supérieure du domaine II, définie par l'acide citrique, doit être étendue et définie pour d'autres métabolites. Par exemple, d'autres substances sécrétées par les bactéries comme les catéchols et les hydroxamates à la base des sidérophores (Liermann et al., 2000) pourraient favoriser les taux de dissolution du fer. La présence de composés très complexants dans les suspensions pourrait expliquer les taux de lixiviation du fer observés en présence des souches B2, B3 et Ps2 à des pH neutres (5-7) où la disponibilité du fer est réduite. Cependant, leur présence n'a pas été détectée et quantifiée dans ces expériences.

Pour les souches bactériennes AR1 et RA1 en présence de phlogopite et RA1 et BE1 en présence de biotite, le taux de libération du fer est inférieur aux valeurs expérimentales obtenues avec HNO_3 . Ces bactéries n'ont pas augmenté significativement la lixiviation du fer et l'ont au contraire immobilisé. Leur action « altérante » se situe donc dans le domaine III.

I.3 Détermination des phénotypes d'altération des souches bactériennes

Nous avons vu précédemment que le modèle permettait d'identifier pour les altérations biologiques de minéraux, les processus (acidolyse, complexolyse et immobilisation) contrôlant la libération et le devenir du fer en solution à partir de deux paramètres : l'activité des protons et le taux de libération du fer. Il est alors possible de distinguer des phénotypes d'altération de souches bactériennes en construisant un diagramme ternaire paramétré suivant la contribution de chacun de ces processus au taux globales de lixiviation du fer (r_{Fe}) : $r_T = r_H + r_L = r_a + r_c + r_i$

Ainsi le diagramme ternaire **A-C-I** de la figure 3-4 propose la représentation de chaque souche étudiée en fonction des composantes **Acidolyse** ($r_T = K_{H^+} (a_{H^+})^n$), **Complexolyse** (si $r_T > K_{H^+} (a_{H^+})^n$) et **Immobilisation** (si $r_T < K_{H^+} (a_{H^+})^n$). On suppose que tous les processus altération étudiés sont toujours décomposables selon ces 3 paramètres (A,C,I). Ce mode de représentation ACI est défini par :

* $A = r_H/r_T$; avec r_H représentant le taux de libération du fer dû uniquement à l'activité des protons et r_T le taux global de lixiviation du fer

* $C = 1 - (r_H/r_T) - r_i/r_T$ avec r_i représentant le taux de libération du fer suite à la solubilisation des colloïdes de fer grâce au chlorhydrate d'hydroxylamine.

* $I = r_i/r_T$.

En présence de phlogopite (diagramme ACI figure 3-4 A), 4 combinaisons ou groupes de processus d'altération sont ainsi mis en évidence.

- Le groupe 1 [$A_{0,1}$; $C_{0,9}$; $I_{0,3}$] rassemble les souches bactériennes B2, B3 (*Burkholderia sp.*) et PS2 (*Pseudomonas sp.*) en présence desquelles la lixiviation du fer est due exclusivement à la complexolyse. Comme discutées dans le paragraphe précédent, ces bactéries aérobies sont les souches les plus efficaces pour lixivier le fer contenu dans le phlogopite. Sans qu'on puisse apporter la preuve d'une production de sidérophores, en terme d'acides organiques, ces bactéries produisent principalement de l'acide gluconique (0,1 à 2 mM).

- Le groupe 2 [$A_{0,8}$; $C_{0,1}$; $I_{0,1}$] est représenté uniquement par la souche PS1 (*Pseudomonas sp.*) qui entraîne une acidification importante du milieu (jusqu'à pH 3). Ce

processus exclusivement d'acidolyse conduit à une importante lixiviation du fer. Les acides organiques produits sont alors tous dissociés et agissent comme des acides forts.

=> **Ces groupes complexolyse (I) et acidolyse (II) sont associés au plus fort taux de dissolution du fer du phlogopite ($r_{Fe} = 10^{-11} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-2}$) mais via des processus très distincts.**

- Le groupe 3 [$A_{0,7}$; $C_{0,6}$; $I_{0,1}$] est formé des souches AR1 (*Agrobacterium sp.*), PA1 (*Pantoae sp.*), PC1 (*Paracoccus sp.*) et RA1 (*Rhanella sp.*) peu efficaces pour lixivier le fer ($r_{Fe} = 10^{-12} - 10^{-13} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-2}$). Ces souches, anaérobies facultatives, produisent des quantités importantes d'acides organiques simples (mono-carboxylique) peu complexants comme les acides lactique ou acétique (1 à 2 mM) qui ont un impact modéré sur l'altération du phlogopite.

- le groupe 4 [$A_{0,1}$; $C_{0,8}$; $I_{0,8}$] est formé des souches BE1 (*Bacteroidetes sp.*) et B1(*Burkholderia sp.*) qui acidifient très peu le milieu (pH final de 5 à 6,5) et produisent peu d'acides organiques comme l'acide formique (0,1 mM). Ainsi, le fer lixivié ne peut être maintenu en solution et précipite sous la forme d'oxydes amorphes.

=> **Dans ces 2 derniers groupes sont regroupés les agents bactériens qui ont peu d'effet sur la lixiviation du fer. Ces bactéries produisent soit majoritairement des acides simples peu complexants, soit des acides plus complexants mais en trop faibles quantités.** Les bactéries formant le groupe 3 acidifient toutefois plus le milieu (pH 4,5) que les souches du groupe 4 ce qui leur permet de maintenir le fer en solution.

En présence de biotite (diagramme ACI figure 3-4 B), seuls 2 groupes ont été mis en évidence.

- Le groupe 1 [$A_{0,1}$; $C_{0,8}$; $I_{0,4}$] est formé de pratiquement toutes les souches bactériennes B1, B2, B3, PS1, PS2, PA1. La lixiviation du fer est due exclusivement à la complexolyse via la grande production d'acides organiques complexants (2 à 7 mM).

- Le groupe 2 [A_1 ; $C_{0,7}$; I_0] est représenté par les souches AR1, BE1 et RA1 pour lesquels, la lixiviation du fer est due exclusivement à l'acidolyse. Une forte production d'acides organiques monofonctionnels (1 à 13 mM) entraîne une forte acidification du milieu.

Cependant, l'impact de ce bas pH sur la lixiviation fer lors de l'altération de la biotite reste modéré ($r_{Fe} = 5 \cdot 10^{-12} - 10^{-13} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-2}$).

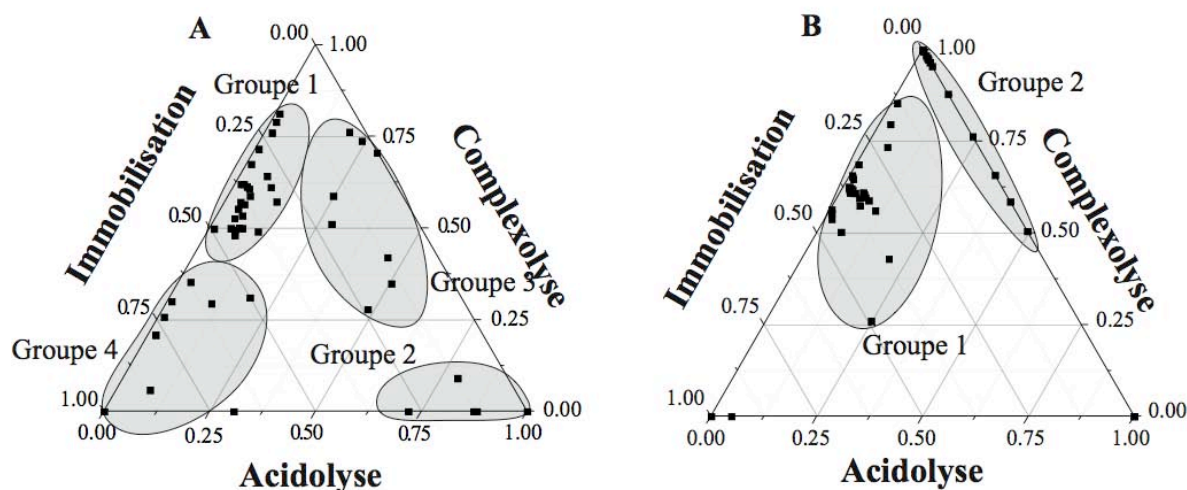


Figure 3- 4. Diagramme ternaire A-C-I représentant la contribution de l'acidolyse, de la complexolyse et de l'immobilisation à la lixiviation du fer dans les expériences biotiques d'altération de phlogopite (A) et de biotite (B)

La comparaison des deux diagrammes amène quelques résultats intéressants :

Quatre phénotypes d'altération ont pu être mis en évidence en présence de phlogopite contre deux en présence de biotite, bien que les souches bactériennes utilisées et les conditions expérimentales soient les mêmes. En particulier, certaines souches bactériennes changent de groupe (acidolyse → complexolyse pour PS1) ou ont leurs activités renforcées (acidolyse de RA1). Il semblerait que, sans parler de stratégie d'altération, les processus impliqués et l'efficacité d'une souche dépendraient du minéral cible. En effet, les acides organiques et les protons sont produits en plus grande quantité par les bactéries en présence de biotite qu'en présence de phlogopite.

Pour expliquer ce phénomène, on peut envisager soit des processus de dissolution différents pour les deux micas ou une « adaptation fonctionnelle » des bactéries au minéral. En effet, les processus de précipitation sont très présents en présence de phlogopite. Des réactions plus complexes et la balance Fe/Mg dans les sites octaédriques peuvent être à l'origine de l'apparition de composés secondaires insolubles contenant du fer. La répartition du magnésium

au sein des sites octaédriques crée une balance réactionnelle oxyde/vermiculite qui peut changer la stoechiométrie de la réaction (Acker et Bricker, 1992).

Néanmoins, dans les expériences réalisées avec les bactéries, les acides organiques sont produits en plus grande quantité en présence de biotite qu'en présence de phlogopite. Ces résultats complètent ceux de nombreux travaux (Zobell, 1943; Van Loosdrecht et al., 1990; Bennett et al., 1996; Gleeson et al., 2006) qui ont montré que la composition chimique et la structure du minéral influençaient les processus d'altération des bactéries notamment leur physiologie et leur colonisation à la surface du minéral. Toutefois, les résultats indiquent des changements de processus d'altération minéral- et souche- dépendant. Les variations observées dans cette étude pourraient être expliquées par une répartition et une disponibilité différente des éléments nutritifs à la surface des minéraux, plus ou moins stimulante pour la production de métabolites et pour les processus d'altération biologique des minéraux. La qualité (complexante) et la quantité d'acides organiques produits sont donc primordiales.

I.4 Diversité des métabolites (acides organiques) produits par les bactéries

Pour répondre à cette question, dix acides organiques (les plus sécrétés par les bactéries) et leur concentration ont donc été suivis par chromatographie ionique à la fin des expériences en conditions biotiques. Les concentrations d'anions organiques en solution mesurées démontrent que toutes les bactéries sécrètent une grande quantité d'acides organiques (acides mono-, di- ou tri- carboxyliques) résumé dans le tableau 3-2. Les acides mono-carboxyliques sont par ordre d'importance décroissante : acide gluconique, acide formique, acide acétique, acide lactique, acide pyruvique et acide butyrique. Les acides di- ou tri-carboxyliques produits sont constitués d'acide succinique et oxalique et très occasionnellement d'acide fumarique et d'acide citrique.

Tableau 3- 2. Concentrations d'acides organiques (ppm) mesurés en solution dans les expériences biotiques

(AR1 : *Agrobacterium radiobacter* ; B1, B2 et B3 *Burkholderia sp.* ; PA1 : *Pantoea agglomerans* ; PS1 et PS2 : *Pseudomonas sp.* ; RA1 : *Rhanelia aquatilis*)

Mineral	Souche bactérienne	Acide gluconique	Acide lactique	Acide acétique	Acide formique	Acide butyrique	Acide succinique	Acide oxalique	Acide citrique
Phlogopite	RA1	-	3,3	-	-	-	15,2	2,4	-
	B1	14,6	6,2	12,3	0,1	-	-	-	-
	B2	23,1	8,6	0,2	0,1	-	-	-	-
	PA1	-	91,3	-	1,0	-	5,3	4,0	-
	PS2	8,1	4,2	97,9	24,8	-	1,2	14,9	-
	PS2	240,5	-	-	0,2	4,4	-	-	-
	RA1	19,1	-	139,9	7,2	11,6	61,8	13,7	3,4
Biotite	BE1	3,5	1,0	4,0	137,6	-	-	0,7	-
	B1	105,6	-	4,2	5,2	1089,6	-	15,0	-
	B2	703,4	-	12,6	36,4	-	-	0,7	-
	B2	534,7	-	9,1	27,9	-	-	0,5	-
	B3	320,4	-	11,3	23,9	259,3	-	1,9	-
	PC1	7,6	-	2,3	68,3	-	-	0,6	-
	PS1	388,5	-	11,7	121,4	174,8	-	2,9	1,3
	PS2	165,0	6,7	5,2	2,1	165,9	-	2,3	0,2
	PS2	1428,6	-	-	84,3	185,8	-	4,8	1,5
	RA1	-	-	32,9	-	-	-	-	-

Le métabolisme bactérien influence la dissolution du minéral et la libération de fer à travers la production d'acides organiques. Ces métabolites produits résultent d'une oxydation partielle du glucose conduisant à la formation de composés intermédiaires au détriment de la production de dioxyde de carbone.

Les conditions de carence et de stress imposées par la présence du minéral, comme seul source de fer et magnésium ne permet pas d'obtenir une dégradation totale de la source de carbone (glucose). Ces conditions non optimales doivent être assez proches de celles rencontrées dans les sols par les bactéries. Des déficiences enzymatiques conduits les bactéries à accumuler puis à expulser des acides intermédiaires divers : par exemple des acides lactique, acétique, formique ou pyruvique pour les bactéries anaérobies facultatives (*Rhanelia aquatilis*, *Pantoea agglomerans* et *Agrobacterium radiobacter*) ou de l'acide gluconique pour les bactéries aérobies (Gottschalk, 1986). La nature des acides organiques produits dépend donc de la souche utilisée et du temps d'incubation. Cette diversité est illustrée par les profils

métaboliques de la souche RA1 (anaérobie facultative) et PS2 (aérobie) présentés dans la figure 3-5.

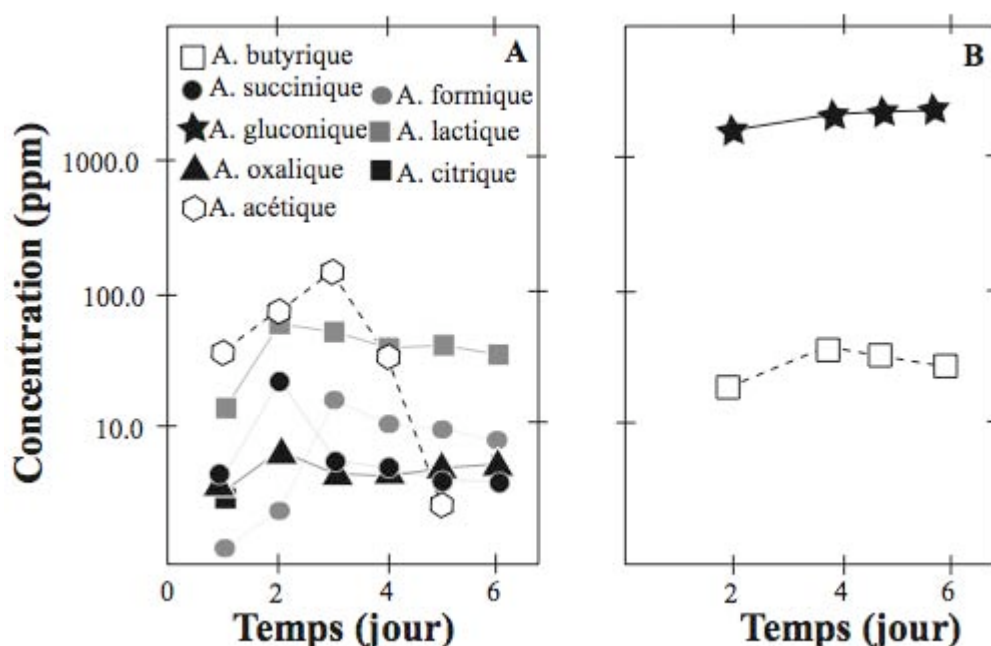


Figure 3- 5. Profils métaboliques de la souche bactérienne RA1 (A) et PS2 (B). Chaque point représente une mesure réalisée sur un échantillon moyen.

Les quantités de carbone métabolisé, qui correspondent aux quantités d'acides organiques produits par les bactéries normalisées à la quantité de glucose consommé (rendement de conversion), sont bien corrélées aux quantités de fer libéré (Figure 3-6).

Même si dans nos expériences, il n'est pas possible de dresser un bilan complet des flux de carbone intra- et extra-cellulaire (production de métabolites ou de biomasse, respiration, émission de CO₂ ...), le « rendement apparent » (taux de conversion/taux d'altération) ne dépend pas du minéral, mais d'une « stratégie métabolique » de la bactérie. En effet, dans la figure 3-6, les deux pentes sont quasi-identiques et proches de $\frac{1}{2}$. Ce qui signifie qu'un triplement (2,8-3,1) de la quantité de métabolites produit pour une même quantité de carbone consommé accroît d'un ordre de grandeur le taux d'altération des minéraux silicatés. Autrement dit, une bactérie qui dissimile plus le carbone (excrétion de carbone) et produit donc moins de biomasse s'avère beaucoup plus efficace à lixivier les éléments qu'une bactérie ayant une stratégie opposée.

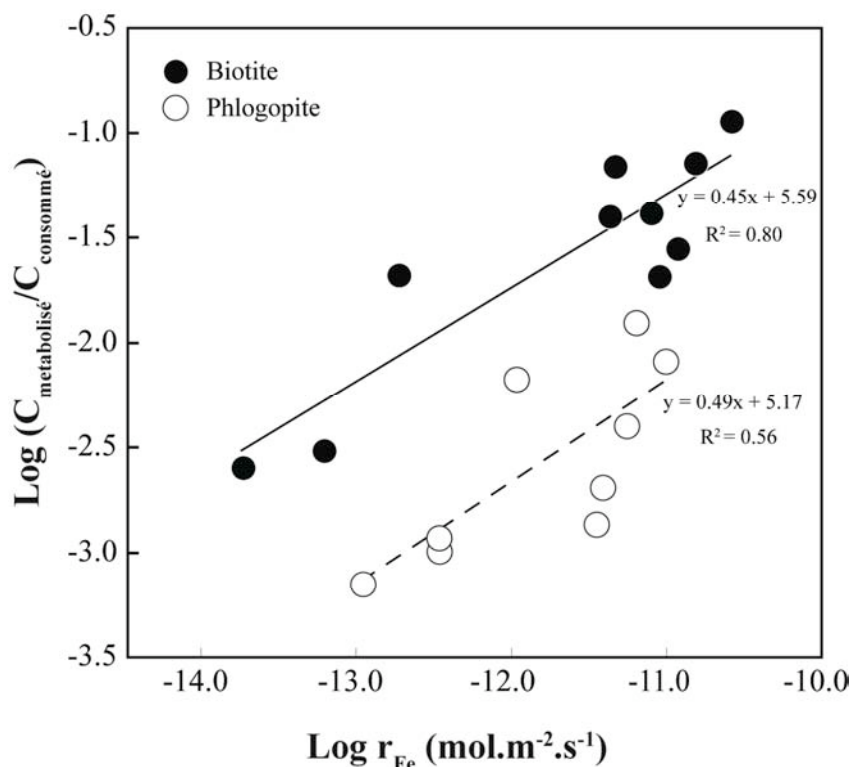


Figure 3-6. Pourcentage de carbone métabolisé en fonction du taux de libération du fer. Chaque point représente une mesure réalisée sur un échantillon moyen.

De plus, pour l'ensemble des expériences biotiques réalisées en micro-réacteurs, une corrélation ($r^2 = 0,57$) est observée entre le log du carbone métabolisé normalisé au glucose consommé et le pH (figure 3-7). En effet, il a été clairement démontré que la production de protons est liée à la production de métabolites secondaires (acides organiques et CO_2) par les bactéries et donc par conséquent à la lixiviation du fer (Vandevivere et al., 1994; Welch et Ullman, 1999; Wu et al., 2008).

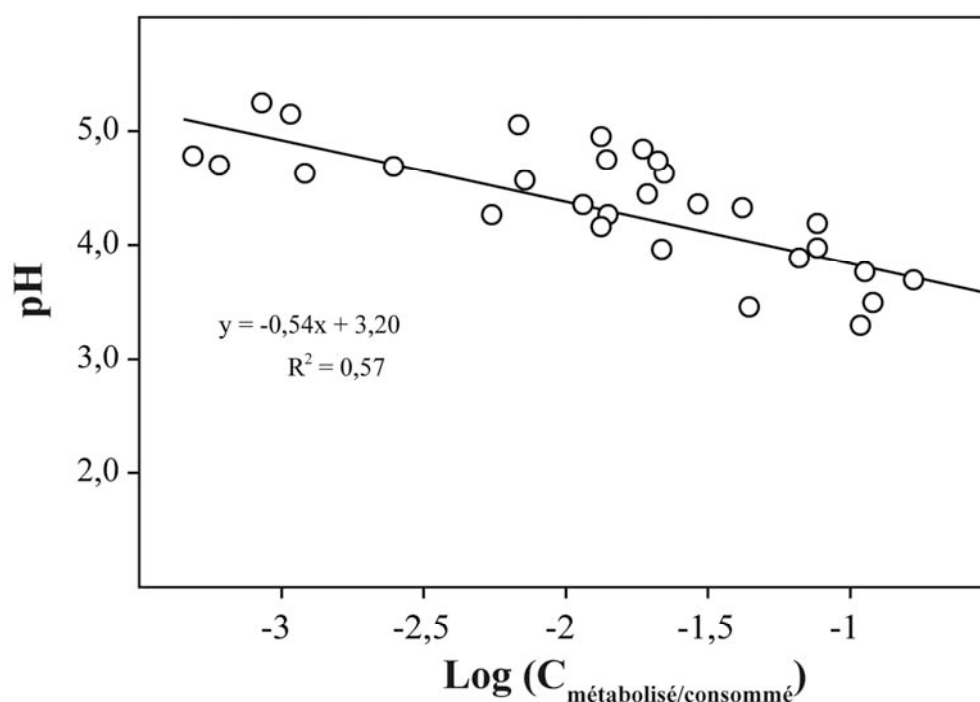


Figure 3- 7. Pourcentage de carbone métabolisé en fonction du pH. Chaque point représente une mesure réalisée sur un échantillon moyen.

I.5 Synthèse sur la modélisation des processus d'altération et le phénotypage

La modélisation des résultats issus d'expériences en microplaques a permis de réaliser une étude comparative des taux de libération initiaux du fer à partir de phlogopite et de biotite en conditions abiotique et biotique. Dans les expériences biotiques, les bactéries amplifient l'altération des minéraux et notamment la lixiviation du fer grâce à une production de protons ou de ligands organiques plus ou moins complexants. Les proportions relatives de ces agents d'altération issus du métabolisme bactérien déterminent les combinaisons effectives de processus de complexolyse, d'acidolyse et d'immobilisation du fer signant l'activité altérante des bactéries. Grâce à l'utilisation d'un modèle empirique de dissolution ($\log(r_{Fe}) f(pH)$), trois domaines d'altération peuvent alors être différenciés suivant le processus qui y prédomine :

- le domaine (I) d'acidolyse *sensu stricto* pour des pH inférieurs à 3, le processus d'acidolyse bactérien est alors contraint par la cinétique d'altération du minéral par les protons (r_{H^+}).

- le domaine II plus étendu pour des pH compris entre 3 et 6 et dans lequel l'acidolyse et la complexolyse se combinent. La limite supérieure de ce domaine est déterminé à la fois par la force des ligands employés et la quantité de sites réactifs.

- le domaine III regroupant l'ensemble des processus pouvant conduire à l'immobilisation du fer. Il est défini par les limites de solubilité du fer en solution, de stabilité de phases minérales secondaires néoformées (e.g. oxyde de fer) et des équilibres de sorption/désorption des éléments par rapport aux biomasses bactériennes.

La combinaison du modèle et d'un diagramme ternaire permet de différencier efficacement les processus bactériens impliqués de la lixiviation du fer lors de l'altération du phlogopite et de la biotite. Cette approche permet également d'identifier et de définir des phénotypes bactériens d'altération en fonction du métabolisme et des compétences pour l'altération des souches bactériennes. En général, les résultats présentés ici montrent que les souches bactériennes aérobies, préalablement isolées d'un sol acide pauvre en nutriments (Podzol), sont les plus efficaces pour lixivier le fer contenu dans les deux micas. À l'inverse, les bactéries anaérobies facultatives (AR1, PA1, RA1) isolées de la rhizosphère des plantes semblent moins efficaces. Néanmoins pour une même souche, l'intensité d'altération du minéral peut changer, mais le processus impliqué reste le même. Les travaux de Uroz et al., (2007) ont également montré une variation dans l'intensité d'altération de micas par des bactéries isolées de la mycorrhizosphère et du sol global. L'altération bactérienne du phlogopite et de la biotite semble ainsi dépendante de la souche bactérienne et de sa production de protons et de métabolites en termes de quantité et qualité.

Cette approche loin d'être exhaustive, est basée sur des expériences réalisées dans des conditions contrôlées de laboratoire (température, oxygénation...), avec une seule source de carbone, avec des souches pures bactériennes.... Or dans la nature, les paramètres environnementaux sont nombreux et plus variables et les interactions des bactéries avec le milieu ou d'autres êtres vivants sont complexes. Ces interactions complexes doivent être simulées expérimentalement pour valider nos premières conclusions.

II. VARIABILITE DES COMPETENCES DE LIXIVITION DE FER PAR DES SOUCHES BACTERIENNES

II.1 Contexte et Objectifs

La dissolution de minéraux par des souches bactériennes étudiés expérimentalement en laboratoire est réalisée souvent dans des conditions qui ne reflètent pas celles de la plupart des environnements continentaux naturels.

Les horizons de sol organiques de surface ainsi que la rhizosphère des plantes représentent des environnements favorables pour le développement des bactéries dû à la présence de substrats carbonés facilement dégradables (comme les sucres, les acides aminés ou les acides organiques) produit via les exsudats racinaires. Cependant, les sols considérés sur toute leur profondeur correspondent majoritairement à un environnement aérobie et oligotrophe pauvre en nutriments qui ne favorise pas le développement d'une population bactérienne importante. En effet, la densité bactérienne diminue avec la profondeur conjointement à la baisse de la teneur en carbone du sol (Ehrlich 2001). **Or en laboratoire, les expériences biotiques d'altération des minéraux sont souvent réalisées en présence de grandes quantités de substrats carbonés et de nutriments (Hutchens et al., 2003).**

De plus dans les sols, les conditions physico-chimiques peuvent changer rapidement au cours du temps conduisant les bactéries à s'adapter et à développer des stratégies pour leur survie. En particulier, les variations climatiques ou de végétation entraînent des variations dans la qualité et la disponibilité des sources de carbone et d'énergie. Ces variations forcent les cellules microbiennes à réadapter leurs voies enzymatiques afin de satisfaire leur croissance via (1) la synthèse d'enzymes cataboliques appropriées et des systèmes de transports spécifiques, ou (2) la formation des voies anaplérotiques appropriées. Cependant, ces variations naturelles et temporelles sont difficilement abordables en laboratoire.

Pour résumer, l'étude de l'altération bactérienne des minéraux en conditions contrôlées utilise souvent des sources de carbone abondantes et facilement dégradables par rapport à des conditions naturelles. Ces conditions particulières peuvent induire des

voies métaboliques bactériennes différant en intensité et en efficacité de celles existant dans les sols et par conséquent avoir un effet également sur les processus de lixiviation des éléments lors de l'altération des micas par les bactéries.

L'objectif de cette partie est donc de tester en laboratoire l'influence de certains paramètres comme (1) l'état physiologique initial imposés par les conditions de préculture des souches, (2) la concentration et la nature de la source de carbone ainsi que (3) l'adhésion des bactéries au minéral, sur les processus d'altération des minéraux par les bactéries. Cette étude vise à mieux contraindre et expliquer les variabilités expérimentales observées dans et entre les expériences et de les délimiter dans le modèle empirique.

Trois types d'expériences ont ainsi été réalisées en présence des souches bactériennes RA1 et PS2. Comme précédemment, le potentiel d'altération des minéraux est déterminé à partir de la densité cellulaire (DO à 600nm), de la consommation du glucose et des quantités de fer, de magnésium, de protons et d'acides organiques libérés en solution.

Des réacteurs (100 ml) sont utilisés, en premier lieu, pour tester l'effet du changement des conditions de préculture des bactéries sur leur potentiel d'altération des minéraux. La préculture peut avoir un effet sur l'activité métabolique des bactéries (temps de latence, adaptation au milieu) et par conséquent sur leur action vis-à-vis du minéral (nature et quantité d'acides organiques produits). Pour réaliser cette étude, les flacons ont été inoculés avec des bactéries précultivées dans 4 milieux différents : un milieu organique riche et non sélectif de type LB, le milieu LB dilué 10 fois, un milieu minéral de type Bushnell Hass supplémenté d'une source de carbone (glucose à 2 g.l⁻¹, BH+glc) et enfin ce milieu dilué 10 fois (BH+glc dilué).

Les deux autres séries d'expériences sont réalisées en micro-réacteurs type microplaques en milieu BHm pour (1) tester l'effet de la concentration et de la nature de la source de carbone sur l'activité des souches sélectionnées et (2) évaluer l'incidence du contact/semi-contact/non-contact bactérie-minéral sur le potentiel d'altération du phlogopite.

II.2 Influence de l'état physiologique initial des bactéries - modalités de précultures

L'évolution du nombre de bactéries planctoniques (DO_{600} nm), de la consommation du glucose, de l'évolution du pH et des quantités de fer lixivié au cours des expériences d'altération de phlogopite en réacteurs est illustrée dans la figure 3-8.

Les résultats indiquent qu'une préculture dans le milieu LB dilué est plus favorable à un développement cellulaire important des deux souches en présence du minéral qu'une préculture dans le milieu LB.

En revanche, après une préculture en milieu minéral (BH ou BH dilué), les deux souches n'ont pas la même croissance. L'absence d'une composante en matière organique azotée dans le milieu pénalise fortement RA1.

Ces tendances en terme de croissance sont bien corrélées à celle de la consommation de glucose : plus la croissance est importante, plus le glucose est consommé rapidement dans le réacteur.

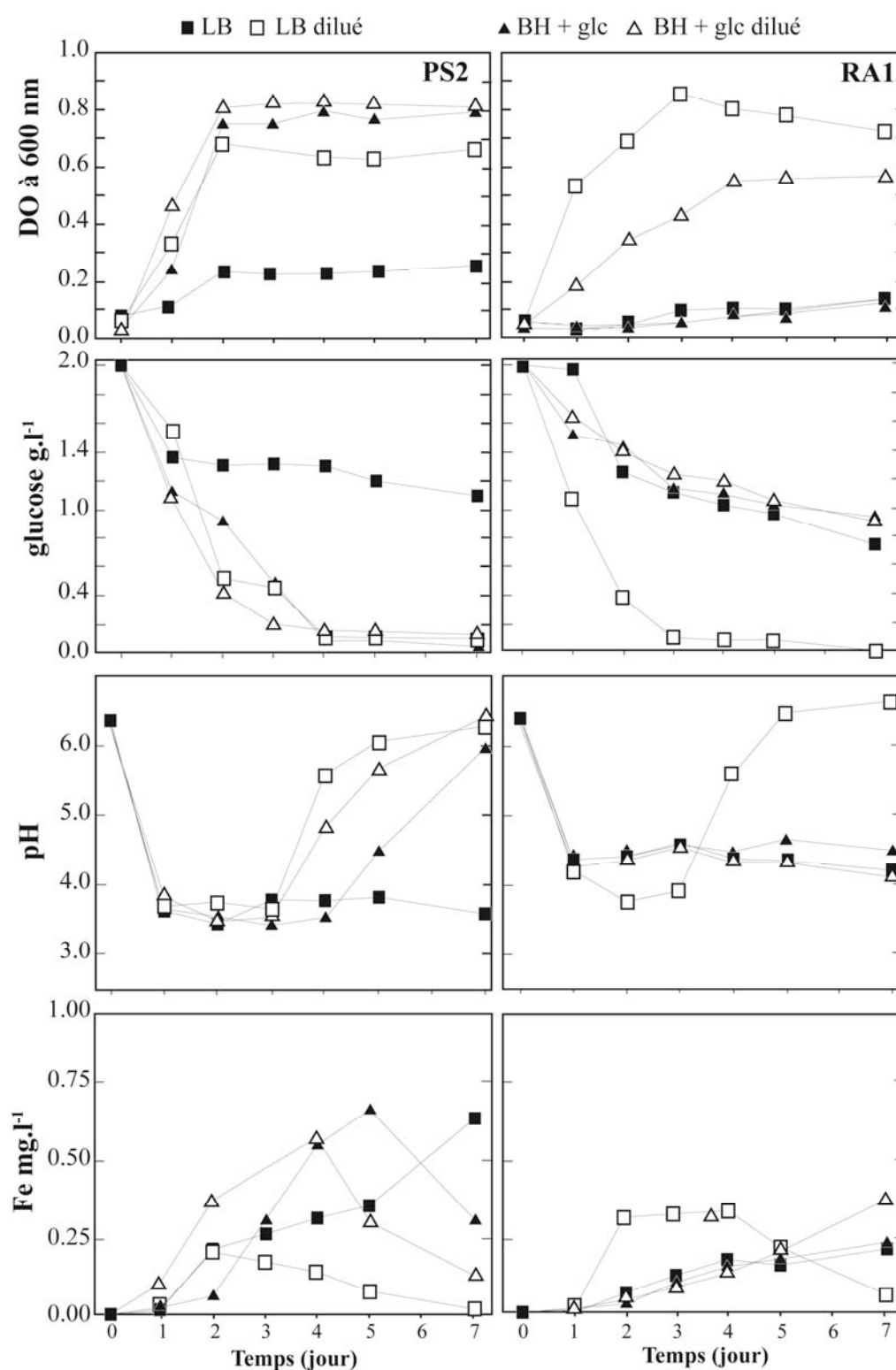


Figure 3- 8. Évolution de la densité bactérienne, de la concentration en glucose, du pH et de la quantité fer lixivié lors de l'altération de phlogopite dans les réacteurs après préculture des souches PS2 et RA1 dans 4 milieux différents (LB, LB dilué, BHm + glc, BHm + glc dilué). Chaque point représente une mesure unique.

Dans les milieux de précultures appauvris en substrats carbonés (BH+glc ; LB dilué; BH+glc dilué), les bactéries PS2 ont une croissance plus importante (DO_{600} nm de 0,6 à 0,8 à 7 jours) et le glucose est entièrement consommé au bout de 4 jours. En revanche, les bactéries RA1 ont une très faible croissance (DO_{600} nm de 0,05 à 0,15) dans le réacteur ainsi qu'une faible consommation de glucose (glucose restant : 0,8 g.l⁻¹ à 7 jours). Le comportement physiologique des 2 souches est donc complètement différent de celui observé après préculture avec le milieu LB « riche ».

Quelles que soient les conditions de préculture, le pH (initialement de 6,5) diminue rapidement pendant le premier jour et se maintient aux alentours de 3,5 et 4 respectivement pour les souches PS2 et RA1. À partir de 3 ou 4 jours, le pH remonte dès que la teneur en glucose dans le milieu descend en dessous de 0,1 g.l⁻¹. C'est le cas pour la souche RA1 initialement cultivée dans du LB dilué et la souche PS2 précultivée dans des milieux « pauvres » (BH+glc ; LB dilué; BH+glc dilué). Dans ces incubations, le glucose a été entièrement consommé en fin d'expérience. Pour les autres expériences, le pH reste relativement constant jusqu'au septième jour, parallèlement à des teneurs en glucose toujours élevées et diminuant très légèrement au cours des expériences. Ces résultats indiquent que la cinétique de dégradation du glucose et par conséquent les conditions de préculture conditionnent la diminution du pH, mais que l'intensité de celle-ci dépend de la souche. Le maintien d'un pH acide en solution, déjà observée précédemment (cf. 1.3) est directement lié à l'utilisation de la source de carbone par les bactéries.

De même, les quantités de fer lixivié (Figure 3-8) sont aussi corrélées positivement aux variations du pH et aux quantités d'acides organiques détectés en solution.

Pour la souche PS2, entre 1 et 3 jours lorsque le pH est minimum (~ 3,7), les quantités de fer en solution atteignent 0,25 ; 0,15; 0,5 et 0,5 mg.l⁻¹ respectivement pour les bactéries précultivées sur LB, LB dilué, BH+glc et BH+glc dilué. Dans toutes les modalités de préculture, cette souche produit de l'acide gluconique et de l'acide oxalique (Figure 3-9). Lorsque la préculture se fait dans le milieu LB riche, des concentrations constantes dans le temps de l'ordre de 25 et 5 mg.l⁻¹ d'acides gluconique et oxalique sont observées et permettent une lixiviation importante et durable du fer. Dans les modalités de préculture en milieu

« pauvres », avec l'augmentation du pH au bout de quelques jours, les concentrations de fer en solution diminuent. Conjointement, les concentrations en acides gluconique et oxalique qui atteignaient respectivement 100 et 5 mg.l⁻¹ au bout de quelques jours ne sont plus détectables en fin d'expérience. Après préculture sur milieu LB dilué, cette atténuation de la production d'acides gluconique et oxalique est observée dès 2 jours, parallèlement à une augmentation de pH et diminution du fer en solution. En revanche, la souche produit alors de l'acide propionique en très grande quantité. Cet acide carboxylique simple, issu de la fermentation du glucose, n'a aucun effet sur la lixiviation du fer du phlogopite.

Pour la souche RA1, les quantités de fer lixivié sont en général moins importante que pour la souche RA1. De plus, la relation "source de carbone-préculture-lixiviation" est totalement différente. C'est après une préculture dans le milieu LB dilué que la lixiviation du fer (0,3 mg.l⁻¹) est la plus importante entre 2 et 4 jours ; 0,15 à 0,2 mg.l⁻¹ pour les autres conditions de préculture. Simultanément, une grande quantité d'acide oxalique (environ 7 mg.l⁻¹) est libérée. Dans les autres conditions, au même instant, seulement 3 mg.l⁻¹ d'acide oxalique sont produits.

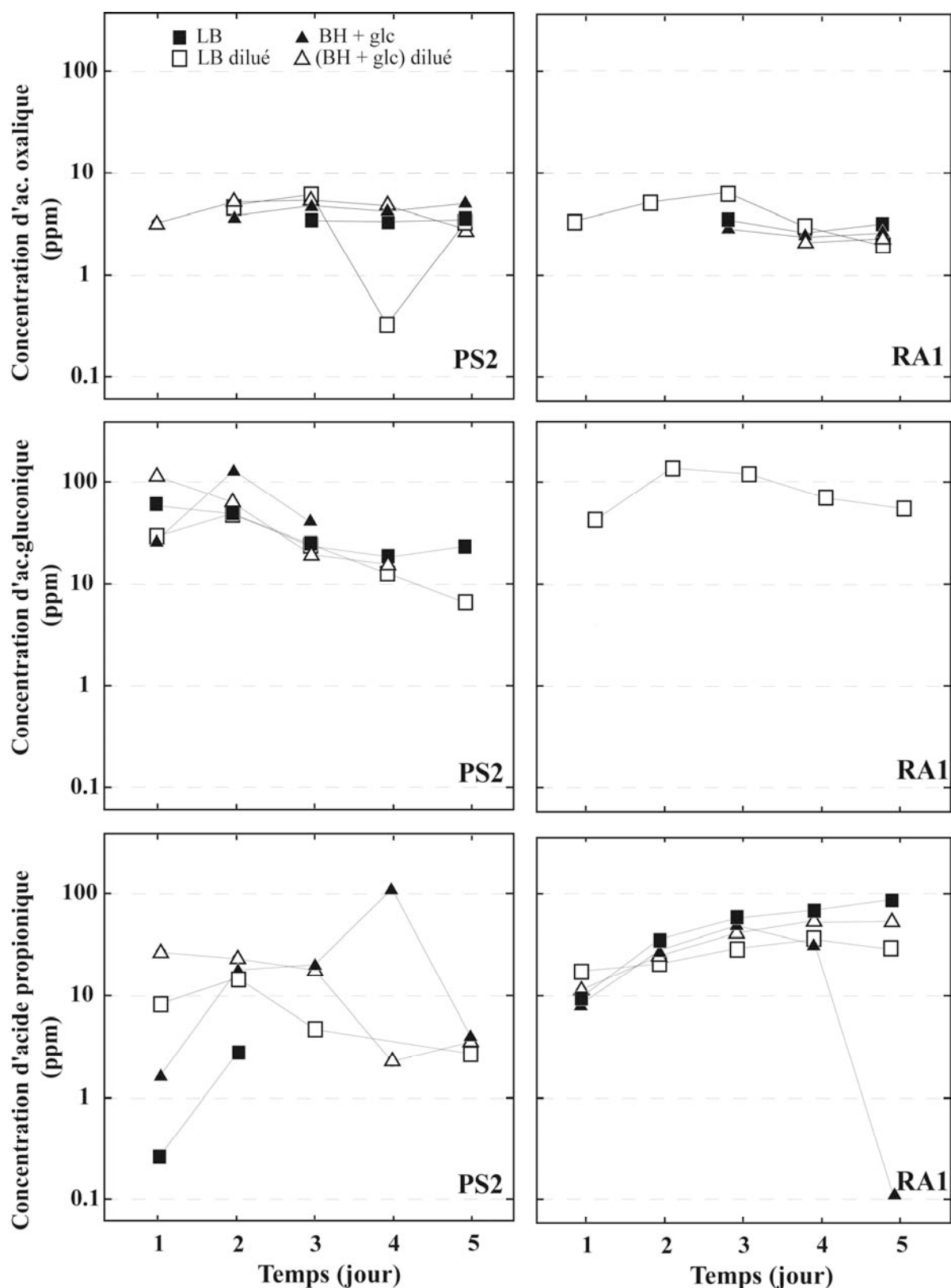


Figure 3- 9. Évolution de la concentration des acides oxalique, gluconique et propionique lors de l'altération de phlogopite par PS2 et RA1. Chaque point représente une mesure unique.

Après 4 jours, le glucose a été entièrement consommé et les bactéries ne produisent plus ou peu d'acides organiques ou consomment ceux produits précédemment (Figure 3-10). Le pH remonte progressivement et les quantités de fer en solution diminuent; des précipités se forment.

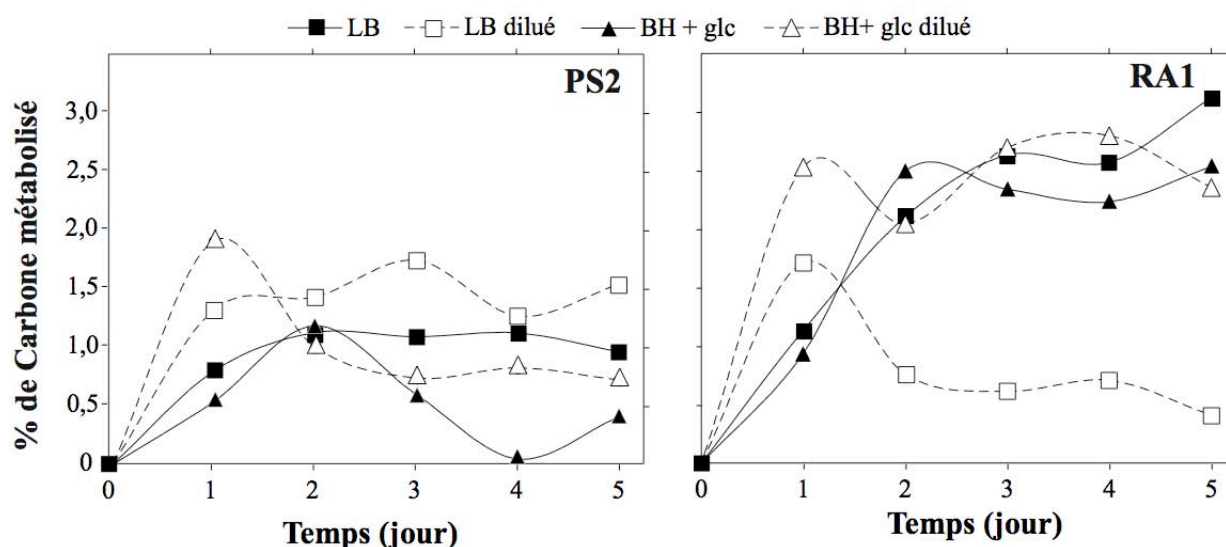


Figure 3- 10. Pourcentage de carbone métabolisé au cours du temps. Chaque point représente une mesure unique.

Le phénotype d'altération identifié après 3 et 7 jours d'incubation pour les souches bactériennes est représenté sur la figure 3-11 en fonction des conditions de préculture. À 3 jours, c'est l'acidolyse qui prédomine, quelles que soient la souche et les conditions de préculture testées. En revanche, à 7 jours, le processus impliqué semble changer pour PS2 préalablement cultivée sur milieux pauvres et avec la souche RA1 précultivée sur milieu LB dilué. Toutefois ce changement de phénotype est un artéfact. Il n'est pas causé par un quelconque changement dans le métabolisme des bactéries, mais provient de la carence énergétique qui ne permet pas de maintenir le pH à son niveau initial. Néanmoins, l'influence des conditions de préculture sur le phénotype est assez sensible.

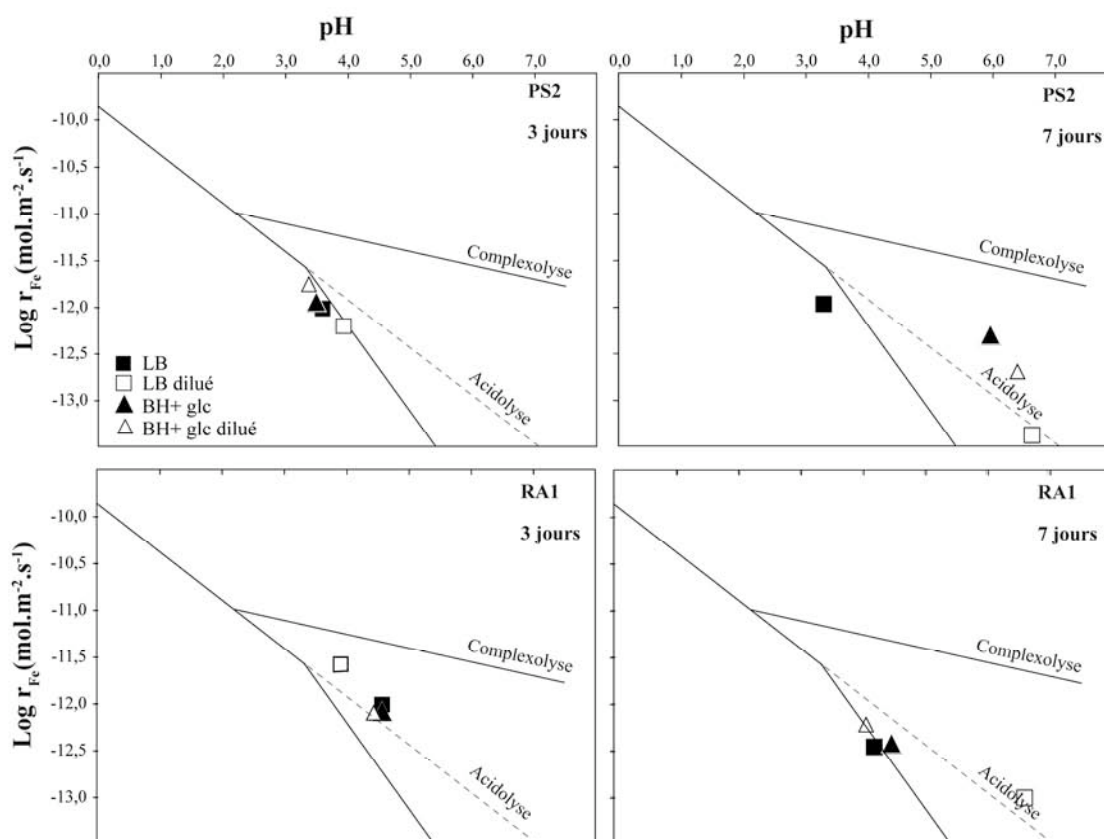


Figure 3- 11. Taux de fer libéré en solution à 3 et 7 jours en fonction du pH en présence de souches PS2 et RA1 soumises à différents types de précultures. Chaque point représente une mesure unique.

Pour conclure, la préculture est un paramètre important à prendre en compte car elle agit sur la physiologie des bactéries (nombre de bactéries, consommation du glucose, sécrétion de protons et d'acides organiques) et sur leur potentiel de lixiviation du fer lors de l'altération de phlogopite. Cependant nos résultats suggèrent que ces changements physiologiques ne modifient pas les processus d'altération mis en jeu dans la mesure où les conditions ne deviennent pas limitantes e.g. une carence nutritive entraînant une stagnation ou un déclin de l'activité bactérienne. Les résultats obtenus sont cohérents avec ceux de Hutchens et al., (2003) qui ont également mis en évidence un effet direct de la préculture sur les caractéristiques physiologiques des bactéries et donc indirectement sur leur capacité à altérer les minéraux. Toutefois, il est démontré ici que les paramètres croissance, consommation du glucose, production de protons et d'acides organiques sont liés entre eux et dépendent de la souche bactérienne utilisée. En revanche, la croissance et le nombre de bactéries ne sont pas corrélés

avec la quantité de fer lixivié : une forte croissance n'implique pas une lixiviation intense du fer. La lixiviation du fer par les acides organiques est tout d'abord fonction de la nature de l'acide organique et ensuite de sa concentration ce qui est cohérent avec nos précédents travaux.

L'avantage de cette étude est bien de faire la part entre activité et croissance dans les processus d'altération des minéraux. Une souche opportuniste, même si ses compétences pour l'altération des minéraux sont démontrées, n'est peut-être pas la plus active et efficace *in situ*. De plus, cette activité n'est pas constante dans le temps et doit être mesurée après un temps relativement court (3 jours) pour garantir une certaine robustesse aux études comparatives.

Ainsi, compte tenu des résultats obtenus avec les différents types de préculture (i.e. pas d'incidence sur les processus), les bactéries seront précultivées dans du milieu LB pour obtenir une densité bactérienne suffisante pour mener les expériences d'altération.

II.3 Influence des sources de carbone et d'énergie (concentration et nature)

II.3.1 Influence de la concentration initiale en glucose

Des expériences en réacteurs ont été réalisées avec des particules de phlogopite et du glucose à différentes concentrations (2, 5, 10 g.l⁻¹) en présence de la souche bactérienne RA1. L'évolution du nombre de bactéries planctoniques (DO₆₀₀ nm), de la consommation du glucose, du pH et des quantités de fer lixivié au cours des expériences d'altération de phlogopite en réacteurs est illustrée dans la figure 3-12.

Quelle que soit la concentration initiale de glucose du milieu, la vitesse de consommation du glucose par les bactéries est constante entre le premier et le septième jour. Cependant, pour les plus basses teneurs initiales (2 g.l⁻¹), le glucose est entièrement consommé au bout de 4 jours. Les courbes de croissance se superposent assez bien (Figure 3-12). La durée de cette phase dépend de l'âge des bactéries et de la composition du milieu. C'est le temps nécessaire à la bactérie pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat (il n'y a pas de phase de latence si le repiquage sur le milieu est identique au précédent). Le nombre de bactérie inoculé initialement étant le même, la croissance est assez similaire dans les trois

modalités. Une concentration en glucose élevée ne semble donc pas favoriser la croissance des bactéries planctoniques. Elle n'influence pas non plus le pH qui reste constant et proche de 5. En revanche, les quantités de fer lixivié sont d'autant plus importantes que la concentration initiale de carbone est grande. À 6 jours, les quantités de fer lixivié sont de l'ordre de 0,45 et 0,9 mg.l⁻¹ pour des concentrations initiales en glucose de 5 et 10 g.l⁻¹ respectivement. Pour l'expérience réalisée avec 2 g.l⁻¹, une fois la source d'énergie entièrement consommée le pH remonte (vers 6,5) et le fer lixivié précipite.

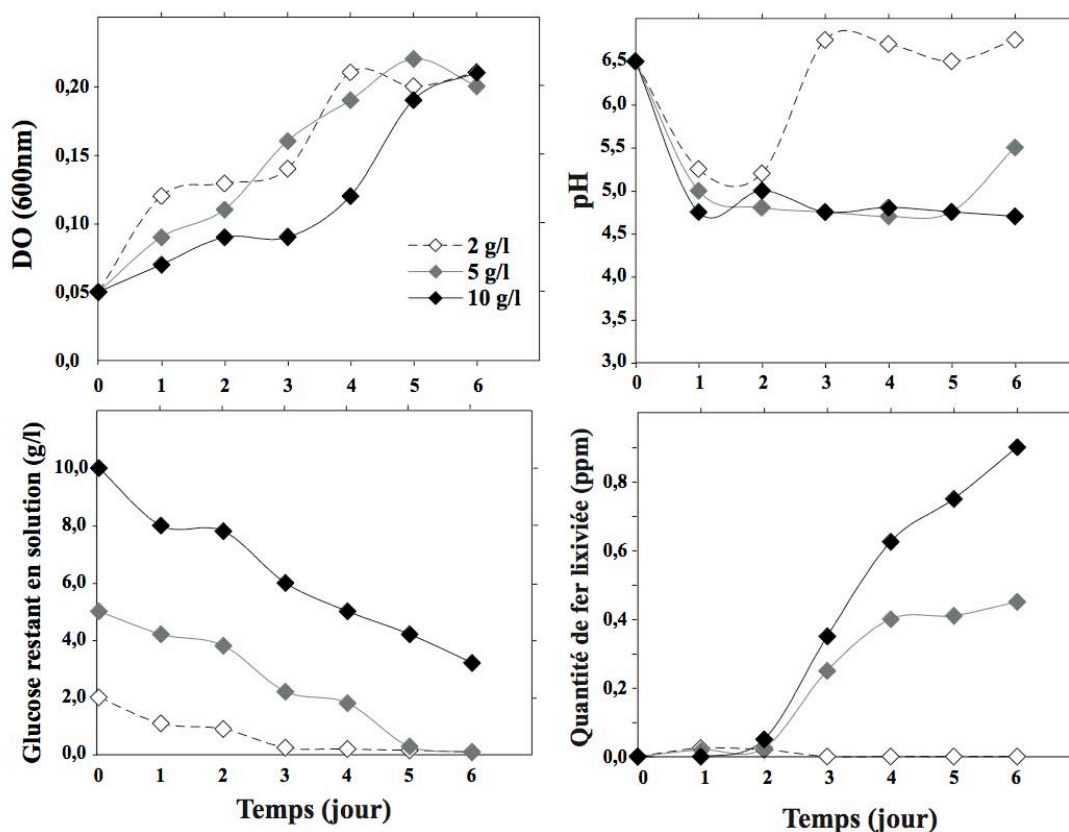


Figure 3- 12. Évolution au cours du temps de la densité cellulaire (DO_{600nm}), du pH, du glucose et de la quantité de fer lixivié pour des concentrations initiales de glucose de 2, 5 et 10 g.l⁻¹ en présence de la souche bactérienne RA1 et de phlogopite. Chaque point représente une mesure unique.

La production d'acides organiques en solution par les bactéries est proportionnelle à la quantité de glucose consommé (Figure 3-13). Autrement dit, plus les bactéries consomment du glucose, plus elles produisent des acides organiques en solution et augmentent ainsi la lixiviation du fer lors de l'altération de phlogopite. D'un point de vue de leur nature, ces acides

organiques restent cependant les mêmes dans toutes les conditions d'expériences (Figure 3-13). Ce phénomène s'appelle le métabolisme de débordement (ou « overflow metabolism » en anglais) : en conditions aérobies, en présence d'un excès de source d'énergie, beaucoup de produits finaux partiellement oxydés (acétate, pyruvate, succinate) sont excrétés en plus grande quantité dans le milieu de culture (Teixeira de Mattos et Neijssel 1997).

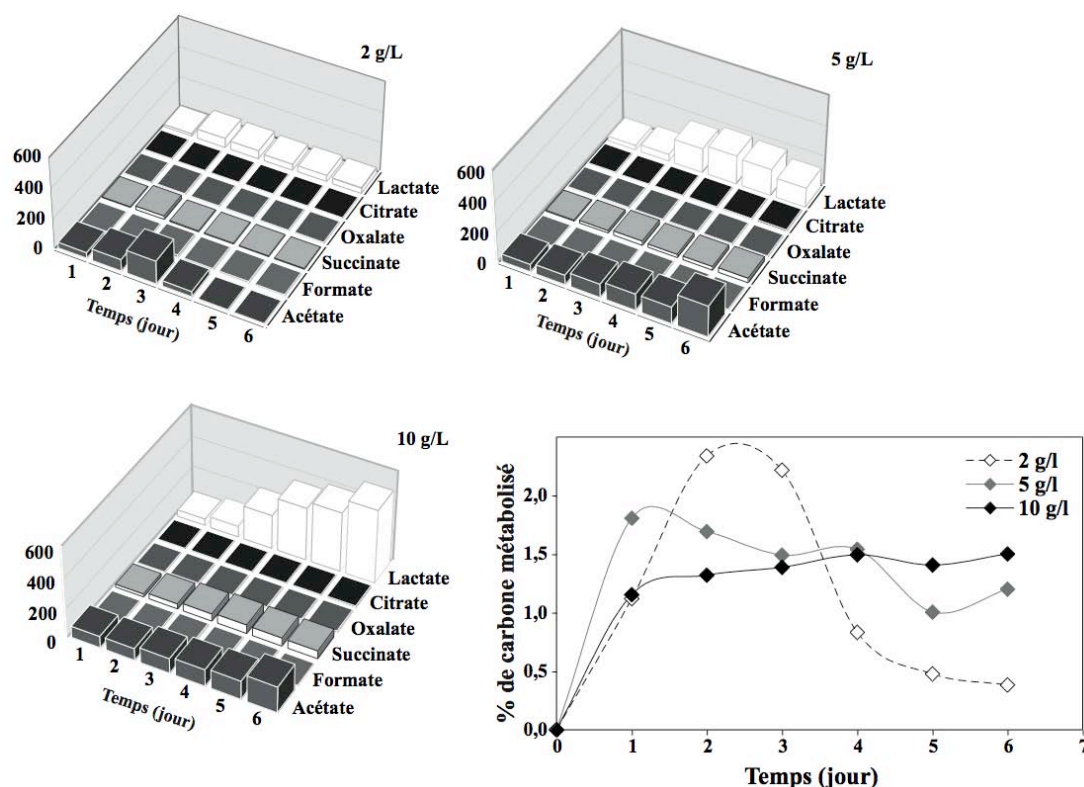


Figure 3- 13. Concentration (mg.l⁻¹) des acides organiques produits par la souche bactérienne RA1 pour des concentrations de glucose initiales de 2, 5 et 10 g.l⁻¹ et % de carbone métabolisé par les bactéries au cours du temps. Chaque point représente une mesure unique.

En termes de processus, après 3 jours d'expériences, toutes les modalités montrent une altération du phlogopite dominée par la complexolyse (Figure 3-14) via les produits sécrétés par la souche RA1. Les concentrations initiales de glucose semblent donc n'avoir aucun effet sur le processus impliqué.

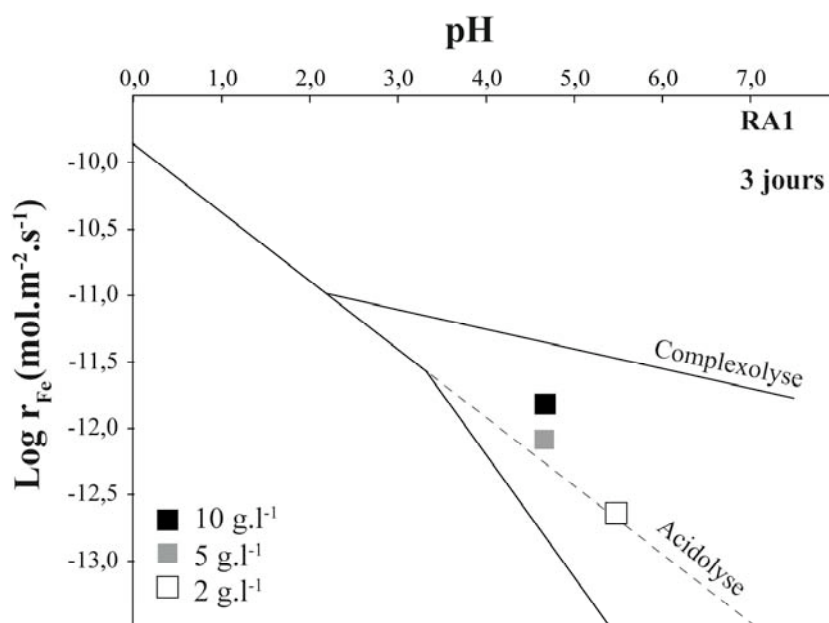


Figure 3- 14. Évolution du phénotype de la souche RA1 en fonction de la concentration initiale en glucose. Taux de dissolution du fer en fonction du pH. Chaque point représente une mesure unique.

II.3.2 Influence d'autres facteurs limitants : source d'azote et de phosphore

En plus de la source de carbone et d'énergie, des nutriments essentiels comme l'azote (NO_3^-) et le phosphore (PO_4^{3-}) peuvent aussi être des facteurs limitant l'activité des bactéries (Figure 3-15). Afin de vérifier cette hypothèse, les quantités de nitrates et de phosphates disponibles dans le milieu au cours des expériences ont été suivies par chromatographie ionique. Leurs concentrations initiales étaient d'environ 61 mg.l⁻¹ de NO_3^- et 24 mg.l⁻¹ de PO_4^{3-} . Les concentrations en nitrates diminuent fortement les 2 premiers jours jusqu'à 20 mg.l⁻¹ dans toutes les expériences puis restent stables pour les expériences réalisées à une concentration initiale de 5 et 10 g/l de glucose. En revanche, elles continuent à diminuer jusqu'à 5 mg.l⁻¹ pour les expériences réalisées à 2 g/l. Les concentrations en phosphates mesurées montrent une évolution similaire à celles des nitrates : elles diminuent progressivement jusqu'à 15 mg.l⁻¹ les premiers jours puis se stabilisent dans les expériences réalisées à une concentration initiale de 5 et 10 g/l de glucose et diminuent continuellement jusqu'à 5 mg.l⁻¹ pour les expériences réalisées à 2 g/l. Ces résultats suggèrent que pour les expériences réalisées à une concentration initiale de 2 g/l de glucose, les apports en azote et phosphore deviendraient rapidement limitants si les expériences duraient quelques jours de plus. Cette carence en azote et phosphore pourrait alors influencer sur le métabolisme des bactéries et la qualité des acides organiques produits. En effet, Teixeira de Mattos et Neijssel (1997) indiquent que lorsque le glucose est limitant, la souche

bactérienne *E. coli* produit en majorité de l'acide acétique et de l'éthanol, mais que lorsque d'autres nutriments sont limitants, cette souche bactérienne produit d'autres acides organiques comme l'acide lactique et le succinique qui demandent moins d'énergie (Linton et al., 1988).

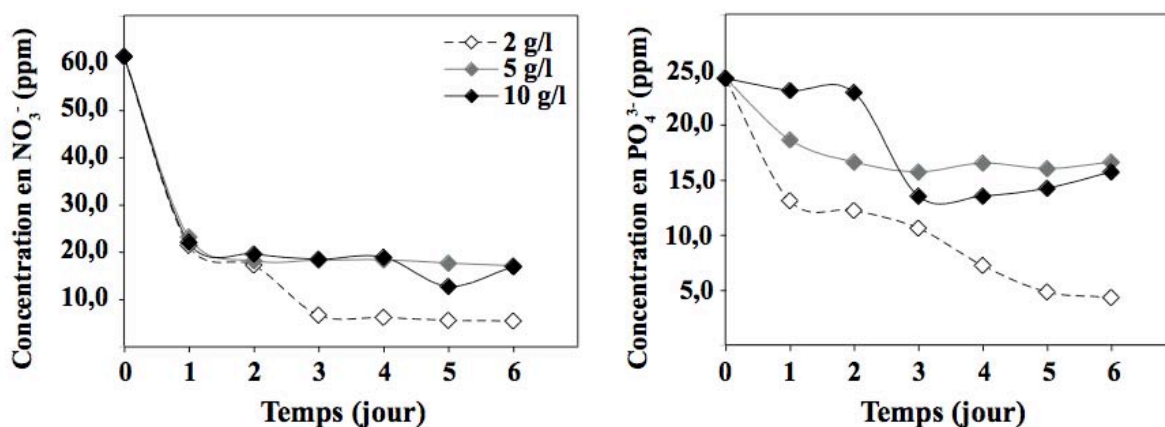


Figure 3- 15. Concentrations en nitrates (NO_3^-) et phosphates (PO_4^{3-}) au cours du temps dans les expériences réalisées avec RA1 à différentes concentrations initiales de glucose en présence de phlogopite. Chaque point représente une mesure réalisée sur un échantillon moyen.

En conclusion, pour conserver toute leur signification, les expériences d'altération comparatives doivent être menées pendant un temps très court : de manière optimale 2 à 3 jours maximums. L'obtention d'un quasi-équilibre dynamique est alors garantie et rend légitime les approches comparatives.

II.3.3 Influence de la nature de la source de carbone

Nous avons vu précédemment que la quantité initiale de carbone introduite dans le réacteur n'influait pas le processus de lixiviation bactérien du fer mais juste son intensité. En revanche, la nature de la source de carbone pourrait potentiellement influencer le métabolisme de la bactérie et sa capacité à lixivier les éléments lors de l'altération de phlogopite (Gottschalk, 1986). Des expériences en mini réacteurs (microplaques) ont ainsi été réalisées pour étudier les variations de l'altération bactérienne du phlogopite et de la biotite lorsque différents sucres et produits carbonés sont utilisés comme source de carbone (glucose,

xylose, maltose, mannitol, acide gluconique, acide malique, acide pyruvique et exsudat racinaire synthétique). Toutes ces sources de carbone ont la même concentration initiale de carbone ($0,8 \text{ g.l}^{-1}$ de carbone, correspondant à une concentration en glucose de 2 g.l^{-1}) et les expériences sont réalisées en présence de 14 souches bactériennes : BS1 : *Bacillus subtilis*, BP1 : *Burkholderia phenazinium*, PA1 : *Pantoea agglomerans*, RA1 : *Rhizobium aquatilis*, AR1 : *Agrobacterium radiobacter*, PS1, PS2 : *Pseudomonas sp.*, B1, B2, B3, B4 et B5 : *Burkholderia sp.*, BE1 : *Bacteroidetes sp.* et PC1 : *Paracoccus sp.* À l'exception de BS1, BP1, B4 et B5, ces souches sont Gram négatif. La capacité de ces souches bactériennes à dégrader des sources de carbone proposées a été également testée en microplaque BIOLOG[®] MT2 pour savoir si ces souches étaient capables d'utiliser les différents substrats carbonés. Toutes les souches employées ont été capables d'utiliser les différents substrats carbonés comme source d'énergie.

Dans toutes les modalités, le pH, les métabolites produits et les quantités de fer lixivié lors de l'altération de phlogopite et biotite ont été mesurés après 72 h d'expérience. Des témoins ont été réalisés pour chacune des expériences, notamment pour vérifier si, en présence uniquement de la source de carbone et notamment en présence d'acides organiques (sans bactéries), le fer pouvait être lixivié. Tous les témoins n'indiquent aucune libération de fer en solution en présence d'acides organiques.

La figure 3-16 représente le taux de libération du fer en fonction du pH pour toutes les expériences en présence de phlogopite et de biotite. Parmi toutes les sources de carbone utilisées, les sucres (hexose, polyol et aldopentose) en C6 ou C5 induisent une acidification importante du milieu accompagnant une lixiviation significative du fer quels que soient le minéral et la souche étudiés. La quantité de protons produits est très variable et dépend de la souche bactérienne. À l'inverse, l'utilisation d'acides organiques comme source d'énergie par les bactéries n'engendre qu'une acidification limitée du milieu, bien que la lixiviation du fer demeure efficace (r_{Fe} élevé) pour les deux minéraux. Lors de l'altération des deux micas, les deux processus sont bien marqués et se différencient plus en fonction de la nature de la source de carbone (sucres ou acides organiques) que des souches bactériennes employées.

Ainsi en présence de sucres, l'acidolyse est le processus dominant expliquant la lixiviation du fer pour la quasi-totalité des souches bactériennes. Ce processus conduit à des pH variant de 3 à

5 et un taux de libération du fer (r_{Fe}) qui varie de 5.10^{-14} à 5.10^{-11} mol.m⁻².s⁻¹. À l'inverse, la complexolyse est le processus dominant impliqué par les souches bactériennes utilisant les acides organiques comme source de carbone. Ce processus conduit à un pH de l'ordre de 6,5 et un taux de libération du fer (r_{Fe}) qui varient de 5.10^{-14} à 10^{-11} mol.m⁻².s⁻¹.

Toutefois, dans l'altération de la biotite en présence de sucres, l'acidolyse bien qu'efficace est toujours renforcée par une petite contribution de la complexolyse quelle que soit la souche bactérienne considérée, qui réduit les possibilités de précipitation.

Pour le phlogopite en présence de sucres, la contribution acidolyse-complexolyse est plus subtil. Même si les particules de phlogopite peuvent être altérées microbiologiquement par une acidolyse *sensu stricto*, l'altération est souvent accompagnée par une immobilisation importante du fer (sauf en présence de xylose).

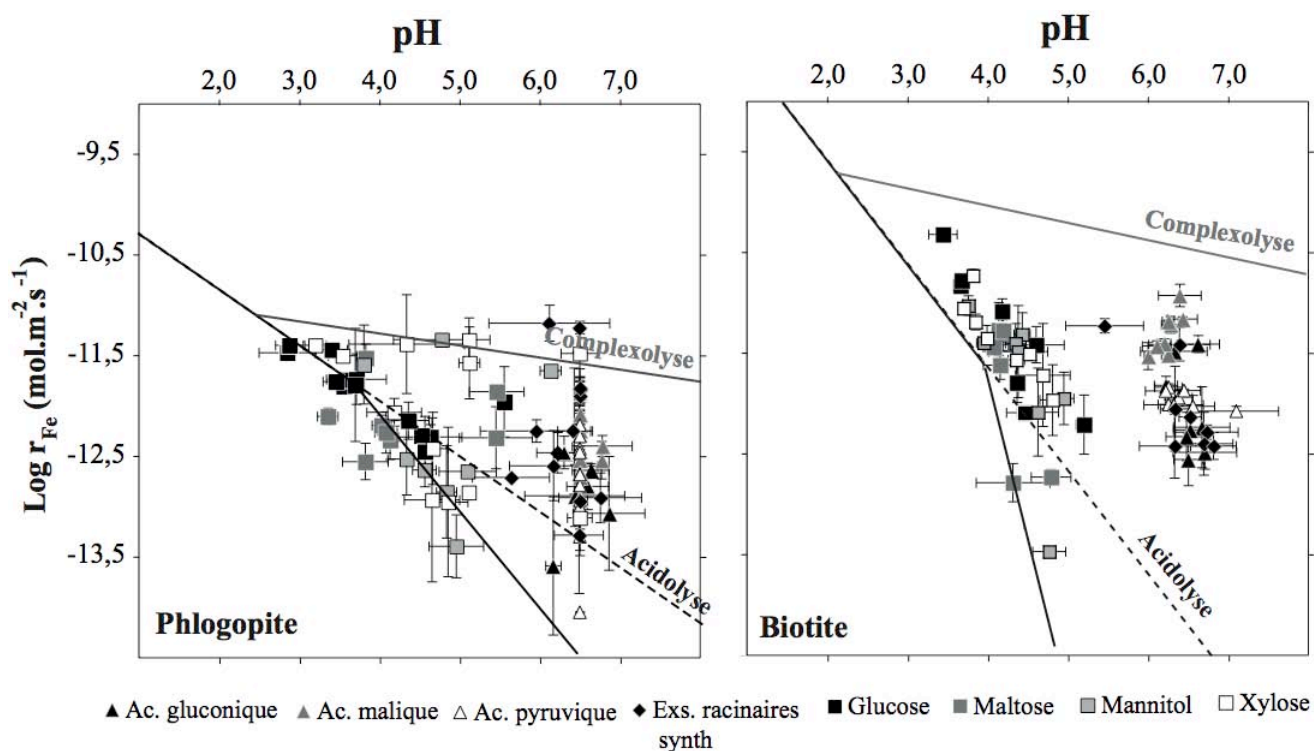


Figure 3- 16. Taux de libération du fer en fonction du pH lors de l'altération de phlogopite et biotite en présence de bactéries et de différentes sources de carbone utilisables par les bactéries. Chaque point représente la moyenne et l'écart type réalisés sur 4 répétitions.

Les exsudats racinaires synthétiques utilisés dans ces expériences sont un mélange de sucres et d'acides organiques. Les processus bactériens impliqués devraient être *a priori* intermédiaires (acido-complexolyse) à ceux observés pour les sucres et les acides organiques (soit un $\text{pH} \approx 5$ et $r_{\text{Fe}} \approx 10^{-12} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Or, les bactéries se comportent de la même manière qu'en présence d'acides organiques. Les interactions bactérie-minéral ainsi que le métabolisme énergétique des bactéries sont donc très complexes, dépendant de la souche elle-même et de la source de carbone initiale (Linton et al., 1988).

Dans ces expériences, aucun comportement particulier lors de l'altération des minéraux n'a pu être relié à l'origine de la souche, qu'elle soit Gram positif ou négatif, isolée de la rhizosphère ou d'horizons plus ou moins riches en matière organique ou en nutriments. Comme nous l'avons vu lors de nos expériences précédentes (section I.3), les quantités et la nature des acides organiques produits par les bactéries ont un rôle prédominant sur la lixiviation du fer dans l'altération de phlogopite.

Une corrélation positive entre le pourcentage de carbone métabolisé et le taux de libération du fer est à nouveau observée dans ces nouvelles expériences (figure 3-17). En présence de phlogopite, cette corrélation ne semble exister qu'avec le glucose. En effet, peu d'acides organiques sont libérés par les bactéries en présence d'acide gluconique, malique ou d'exsudats racinaires synthétiques. En revanche, pour la biotite, quelle que soit la source de carbone initiale, la quantité de fer lixivié croît avec la production d'acides organiques. Néanmoins, que ce soit en présence de phlogopite ou de biotite et indépendamment du substrat carboné de départ, la nature des acides organiques est similaire. Seules les quantités libérées diffèrent. Cependant, il n'y a pas de corrélation évidente entre la nature du substrat carboné initial et la quantité d'acides organiques produits.

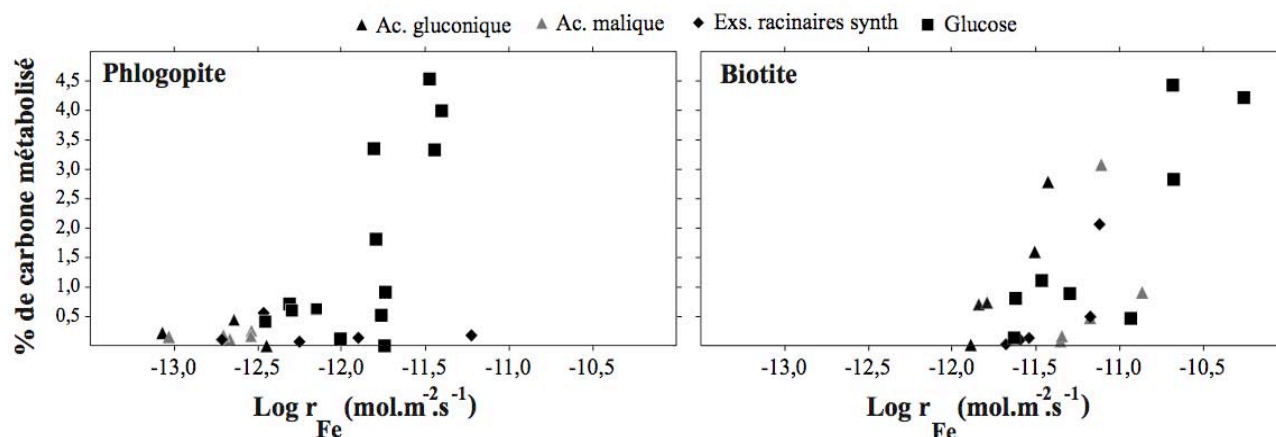


Figure 3- 17. Pourcentage de carbone métabolisé en fonction du taux de libération du fer lors de l'altération de phlogopite et de biotite par les bactéries en présence de diverses sources de carbone. Chaque point représente une mesure unique réalisée sur un échantillon moyen issu des 4 répétitions.

Pour résumé, peu d'acides organiques sont libérés en solution en présence d'acide gluconique, malique ou d'exsudats racinaires synthétiques, entraînant une faible acidification du milieu (pH 6-7). Une plus grande acidification du milieu résultant de l'excrétion de métabolites bactériens est observée en présence de sucres et est maximale en présence de glucose (pH 3-4).

De nombreuses études sur l'altération de minéraux par les bactéries (Berthelin 1976; Hameeda et al., 2006; Calvaruso et al., 2007; Uroz et al., 2007; Haichar et al., 2008; Patel et al., 2008) ont été réalisées en présence de plusieurs sources de carbone. Ces auteurs ont montré que les sources de carbone présentes dans les exsudats racinaires (sucres de type aldose) ou dans la mycorrhizosphère ont un impact à la fois sur la structure phylogénétique et les fonctions des communautés de bactéries du sol. Par exemple, Uroz et al., (2007) ont montré que les quantités de fer biolixivié lors de l'altération de biotite étaient plus importantes en présence de glucose que de mannitol ou en présence de bactéries isolées de la mycorrhizosphère. Pour les souches étudiées ici, nos résultats vont dans le même sens. Ils démontrent surtout qu'en présence de glucose ou de mannitol, le processus d'altération, en l'occurrence l'acidolyse, reste dominant quel que soit le minéral cible employé. Toutefois, ce processus et l'efficacité de l'altération minérale ne dépend pas de la souche bactérienne. Patel et al., (2008), lors de la solubilisation de minéraux phosphatés par une souche bactérienne *Citrobacter* sp., obtiennent des résultats cohérents avec nos observations. *Citrobacter* sp. produit différents acides organiques lorsqu'elle est mise en présence de différents sucres pendant l'altération de minéraux phosphatés. Cette souche bactérienne produit en particulier plus d'acide gluconique en présence de glucose, ce qui permet une lixiviation maximale de phosphate en solution.

En plus d'indiquer le processus majoritaire, nos travaux mettent en évidence l'importance de la relation bactérie-minéral-substrat sur le taux d'altération et sur le phénotype que l'on serait tenté d'attribuer uniquement à la souche bactérienne plutôt qu'au système dans son ensemble. De ce point de vue et sans doute en raison de sa structure cristallographique, la biotite est bien

moins discriminante que le phlogopite. De même, parmi les sucres, le xylose (composé du bois) a un comportement très particulier. Son utilisation par les bactéries accroît considérablement la lixiviation du fer contenu dans le phlogopite par complexolyse. Dans le cas de la biotite, son action ne se distingue pas de celle des autres sucres. Par conséquent, un phénotype d'altération complet doit être associé à plusieurs minéraux et source de carbone.

II.4 Influence du contact bactérie/minéral :

Les processus d'altération et leur induction dépendent-ils des interactions physiques entre les cellules bactériennes et les particules minérales : contact direct, semi-contact ou aucun contact ?

Pour répondre à cette question, trois modalités d'expériences d'altération à masse constante de phlogopite et de biotite ont été réalisées en microplaques (Figure 3-18) avec du glucose comme source de carbone et d'énergie et en présence des souches bactériennes RA1 et PS2. La première expérience dite de « contact » consiste à mettre en contact le minéral directement avec les bactéries, ce qui est habituellement le cas dans les expériences en microplaques. La deuxième expérience dite de « non-contact » consiste à séparer totalement les particules de minéral et les bactéries à l'aide d'un insert placé dans la microplaque (Millicell-96 Cell Culture Insert Plates, Millipore). L'insert contient les bactéries qui sont séparées des minéraux par un filtre de 0,2 μm qui ne limite pas la diffusion des métabolites dans la solution. La dernière expérience dite de « semi-contact » consiste à mettre en contact les bactéries avec seulement la moitié des particules minérales, dans l'insert. L'autre moitié est séparée des bactéries mais pas des métabolites produits. La masse de minéral est constante dans toutes les expériences et les 8 répétitions sont assurées par une distribution précise (pesée puits à puits) des minéraux.

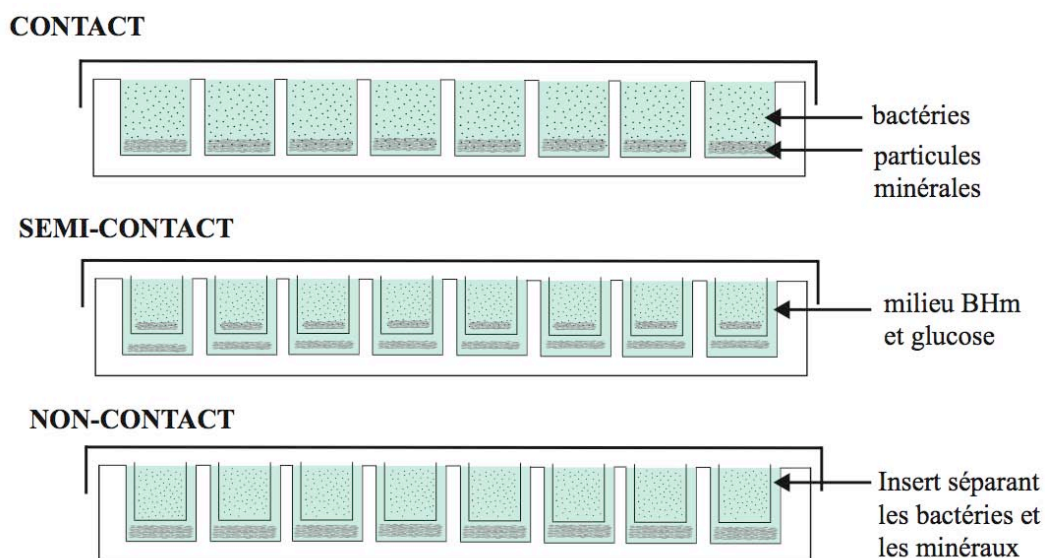


Figure 3- 18. Dispositifs en micro-réacteurs (microplaques) utilisés pour les expériences contact, semi-contact, non-contact

Pour respecter le domaine de quasi-équilibre (Cf §II.3.2) du processus d'altération, les protons, les acides organiques et le fer libérés en solution ont été mesurés après 3 jours d'expériences (Figures 3-19 et 3-20).

Les résultats obtenus, montrent que le taux de lixiviation du fer dépend fortement du contact bactérie/particule et que les combinaisons entre processus direct et indirect est assez subtil. D'après le test statistique ANOVA à 1 facteur et le test de Tukey ($P=0,0005$), la modalité « contact » entre les bactéries (PS2) et les particules minérales induit une acidification maximale. Dans les expériences avec le phlogopite, le pH atteint 4,3 et 3,2 respectivement pour RA1 et PS2 et avec la biotite le pH atteint 4,15 et 3,0 respectivement pour RA1 et PS2. Cette modalité induit également une fraction de fer lixivié plus importante. Dans les expériences avec le phlogopite $f(\text{Fe}) = 4,2\%$ et $16,2\%$ respectivement pour RA1 et PS2, avec la biotite $f(\text{Fe}) = 0,07\%$ et $0,32\%$ respectivement pour RA1 et PS2.

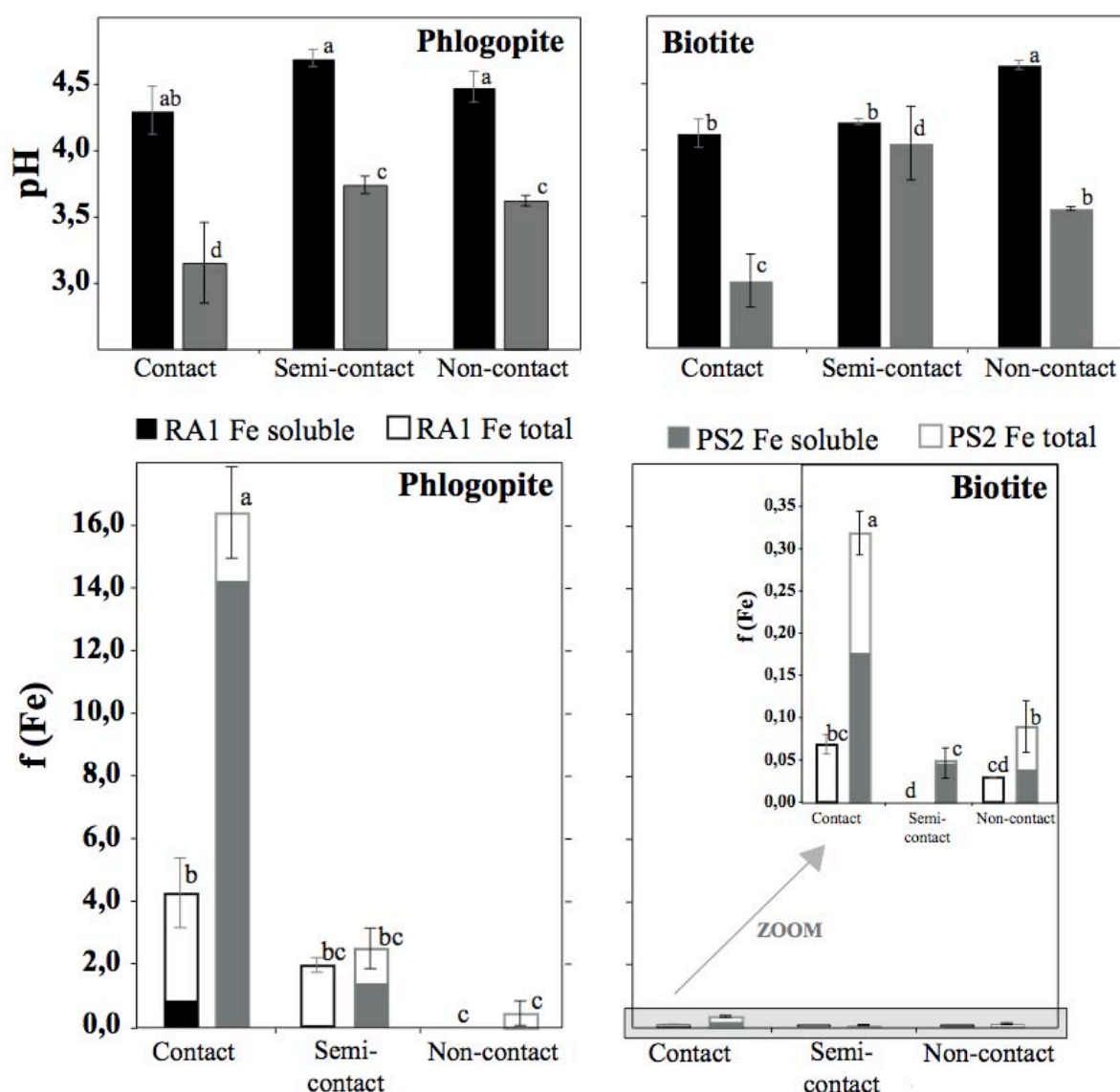


Figure 3- 19. pH et fraction (soluble et totale) de fer lixivié dans les expériences d'altération de phlogopite et de biotite suivant différentes modalités de contact bactéries-minéral. Les symboles a, b, c, d correspondent aux différents groupes de significativité obtenus par ANOVA à 1 facteur et par le test de Tukey ($P=0,0005$) sur 8 répétitions.

Dans les expériences avec phlogopite, le pH de la solution au bout de 3 jours n'est pas significativement différent dans les deux autres modalités (4,5 et 3,6 respectivement pour RA1 et PS2). Cependant la fraction de fer lixivié $f(\text{Fe})$ est nettement supérieure dans les expériences de semi-contact (2 et 3 % pour RA1 et PS2 respectivement) que dans les expériences de non-contact (0 et 0,3 % pour RA1 et PS2). Cet effet est d'autant plus marqué si l'on considère la fraction de fer colloïdal (i.e. fer immobilisé = fer total – fer soluble). Toutefois, c'est la fraction

soluble qui est la plus affectée par l'absence de contact. La fraction insoluble, qui pourrait en partie résulter de l'immobilisation du fer à l'interface minéral-solution (Cf § I.3), est proportionnelle à la masse de minéral et donc à la surface accessible aux bactéries, quelle que soit la souche employée.

Les quantités d'acides organiques libérés par les bactéries sont sensiblement équivalentes dans toutes les conditions d'expériences (Figure 3-20), soit environ 2% de carbone métabolisé par RA1 et 10% par PS2. Dans l'expérience de semi-contact, seulement 6 % du carbone ont été métabolisés par PS2. Parallèlement à cette faible quantité d'acides organiques produits, le pH est légèrement plus élevé (3,7) que dans les autres expériences, ce qui pourrait expliquer cette différence.

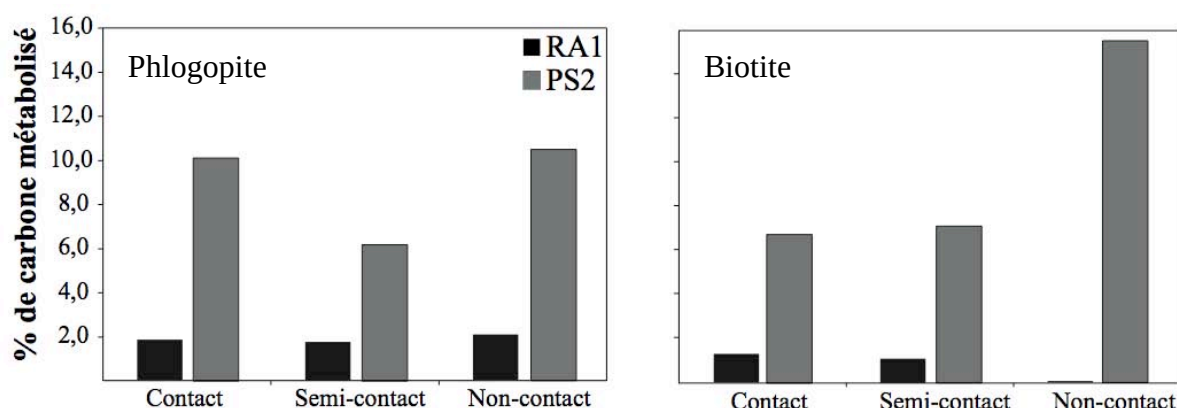


Figure 3- 20. Pourcentage de carbone métabolisé par les bactéries RA1 et PS2 en fonction des modalités d'interaction des bactéries avec les particules de phlogopite et biotite
Chaque barre de l'histogramme représente une mesure unique réalisée sur un échantillon moyen issu des 8 répétitions.

Dans les expériences avec biotite, dans les conditions de semi-contact avec la souche RA1, le pH final de la solution est identique à celui obtenu lorsque les bactéries sont en contact avec le minéral. Quels que soient la modalité et le pH final obtenu, les quantités de fer mesuré en solution sont non détectables. En revanche, les quantités de fer total (soluble + colloïdales) indiquent qu'en conditions de non-contact, il y a plus de fer lixivié (0,04‰) qu'en conditions de semi-contact. Au contraire, les quantités de carbone métabolisé sont deux fois plus faibles en conditions de non-contact (0,05 %) qu'en semi-contact (1 %). En présence de la souche PS2,

pour les modalités de semi-contact et de non-contact, le pH de la solution est plus élevé que pour les modalités de contact direct (respectivement 4 et 3, 4). Les quantités de fer mesurées en solution sont peu importantes de l'ordre de 0,04 et 0,03 ‰ respectivement pour les expériences de semi-contact et de non-contact; En revanche, le fer colloïdal est 2 fois plus important dans les expériences en non-contact par rapport aux deux autres modalités. Parallèlement, les quantités de carbone métabolisé sont les mêmes pour les expériences en contact et semi-contact (environ 7,5 %) alors qu'elles sont doublées dans les expériences de non-contact. Pour résumer, la souche PS2 acidifie plus le milieu et permet une lixiviation plus importante de fer que la souche RA1 quelle que soit la modalité de contact. Parallèlement, la souche PS2 métabolise plus de carbone que la souche RA1.

Le contact entre les bactéries et les particules minérales influence le processus d'acidolyse. L'acidification du milieu est en général significativement plus importante dans les modalités avec contact. L'influence du contact bactérie-minéral sur la quantité d'acides organiques produits est moins claire et variable selon le minéral utilisé. Comme pour les sources de carbone, la variation est souche dépendante : la souche « complexante » (RA1) s'avère moins sensible au contact que la souche acidifiante (PS2).

En revanche, le contact a une importance cruciale sur la quantité totale de fer lixivié, incluant les fractions solubles ou immobilisées. Toutefois, la fraction soluble diminue plus fortement que la fraction immobilisée. Le contact est donc déterminant pour l'induction du processus d'altération et pourrait laisser penser que l'effectif de sites réactifs croît avec le contact ou que l'action des bactéries est d'autant plus efficace qu'elle est proximale (au voisinage de la surface minérale). Cette interprétation rejoint celle de Vandevivere et al., 1994 et Bennet et al., 1996 qui suggèrent que l'excrétion de grandes quantités d'acides organiques par les bactéries adhérentes à la surface du minéral créent des zones de « microréaction », qui peuvent être observées en microscopie électronique (Hiebert et Bennett 1992; Thorseth et al., 1992). Par ailleurs, dans des travaux plus anciens, Zobell (1943) et Van Loosdrecht et al., (1990) avaient mis en évidence une corrélation entre les surfaces minérales accessibles et l'activité altérantes des bactéries.

Toutefois, les résultats obtenus ne concordent pas avec ceux de Robert et Berthelin (1986) ou de Vandevivere et al., (1994) qui ont montré que le contact entre les bactéries et les particules minérales n'était pas nécessaire pour augmenter ou maintenir le taux de dissolution du minéral

par acidolyse ou complexolyse. Par exemple, l'absence de contact entre la souche PS2 et la biotite et l'excrétion importante d'acides organiques ($\approx 16\%$ du carbone métabolisé) conduit à une lixiviation du fer moins importante que dans l'expérience contact.

Ces convergences ou divergences de processus peuvent être expliquées de différentes manières :

- d'un point de vue expérimental, les dispositifs et méthodes utilisées permettent d'étudier l'induction des processus d'altération et de lixiviation des éléments ($\Delta t = 3$ jours) loin de l'équilibre et non les flux élémentaires générés à l'échelle d'un réacteur sur une durée beaucoup plus longue. Néanmoins comme le montrent les résultats, l'échelle de temps choisie est suffisante pour obtenir une dynamique réactionnelle et mesurer la réponse adaptative des souches.

L'élément Fe choisi comme traceur des processus s'avère très sensible aux variations physico-chimiques locales du système. Il est, par conséquent, un moins bon traceur de flux que le magnésium ou le potassium plus fréquemment utilisés pour étudier les processus de lixiviation des silicates par voie microbienne.

Enfin, les démarches contact/non contact pour identifier les actions directs ou indirects des microorganismes sur les minéraux sont conduites sur de longues durées (30 jours). Elles ne prennent pas en compte la quantité de sites réellement réactifs ou de surfaces accessibles aux bactéries, les compétitions entre réactants chimiques et bactéries, les proportions de bactéries adhérentes et planctoniques. Les expériences menées ici en mode semi-contact illustrent bien l'importance de ces quelques paramètres.

Dans nos travaux, la mesure de paramètres globaux comme l'acidité ou la quantité d'acides organiques libérés en solution ne permet pas d'étudier les processus élémentaires à l'interface bactérie/minéral. Cette approche pourrait être complétée par des outils spectroscopiques plus fins.

II.5 Synthèse sur la variabilité des processus d'altération des minéraux

Cette étude expérimentale a permis de mieux contraindre et comprendre la variabilité des processus d'altération des minéraux et en particulier d'identifier les paramètres importants qui influent directement sur les taux de lixiviation du fer contenu dans deux micas.

Les paramètres testés ne peuvent pas être véritablement classés par ordre d'importance. On peut néanmoins les voir agir sur deux niveaux étroitement liés : celui de la réponse globale du système tout entier et celui de la réponse plus spécifique des microorganismes. La nature de la source carbone disponible dans le système ou les conditions de préculture ont une influence sur la physiologie des bactéries et par conséquent sur le taux de lixiviation du fer. Néanmoins, on voit que l'effet est autant qualitatif (e.g. nature des sources de carbone) que quantitatif (e.g. quantités disponibles).

Ces paramètres souche-dépendants influent notamment sur les métabolites bactériens produits (nature et quantités) et les modalités (acidolyse et complexolyse) de lixiviation du fer lors du processus d'altération.

Toutefois, au niveau du système, indépendamment du minéral et de la souche utilisés, les variations qualitatives (processus) et quantitatives (taux de lixiviation d'éléments) les plus significatives sont observées lors des changements de source de carbone et des modalités de contact. Ces deux paramètres engendrent des variations importantes dans la réponse du système.

Le contact entre les bactéries et les particules minérales n'est pas une condition nécessaire à la lixiviation du fer à partir des deux sources minérales : phlogopite et biotite. Cependant, le contact bactérie/minéral permet une amplification de la lixiviation de fer alors que les concentrations de protons ou métabolites en solution (« bulk ») sont sensiblement les mêmes en conditions de contact ou de non-contact. Ces résultats suggèrent des domaines réactionnels locaux, limité à la surface des particules minérales où les conditions physico-chimiques à l'interface bactérie/minéral sont différentes de celles mesurées en solution. En particulier, des concentrations en acides minéraux ou organiques plus élevées et non détectables en solution assureraient une amplification de la lixiviation du fer .

Le phénotype d'altération doit donc être attribué au système bactérie-minéral-solution et non à la souche bactérienne.

III. TRAÇAGE ISOTOPIQUE DES PROCESSUS DE LIXIVIATION

III.1 Contexte et objectifs

L'altération des minéraux est considérée comme la somme d'une série d'interactions complexes incluant des mécanismes physiques, chimiques et biologiques. Ainsi, dans la section précédente, le modèle décrivant les taux de libération du fer des micas en conditions aérobies a permis la distinction et la caractérisation de deux processus majeurs impliqués dans la lixiviation du fer par les bactéries en conditions aérobies : l'acidolyse et la complexolyse. Cependant, dans la nature, la contribution entre des processus strictement chimiques, des processus biochimiques dont les agents sont des produits d'êtres vivants et des processus « vivants » où la présence d'une bactérie est essentielle, s'avère très difficile à estimer. Le développement récent de nouvelles techniques analytiques permet maintenant d'analyser précisément, dans différents milieux naturels ou expérimentaux, le fractionnement entre les isotopes stables d'éléments minéraux majeurs. L'utilisation de ces nouveaux traceurs devrait permettre de préciser le cycle global des éléments dans les écosystèmes et notamment d'identifier plus précisément des produits résultant de l'altération de phases minérales. Dans des dispositifs expérimentaux contrôlés (plantes, substrats, minéraux), les mesures isotopiques paraissent être une voie prometteuse pour étudier les processus d'altération minérale spécifiques aux êtres vivants et leur modalité d'expression.

Des études récentes ont montré que certains processus biologiques et cinétiques pouvaient induire des fractionnements isotopiques entre les isotopes des métaux de transition (Beard 1999; Brantley 2001; Beard 2002; Anbar 2003; Brantley 2004; Mathur et al., 2005). Cependant, le fer et le cuivre sont très dépendants des conditions physicochimiques du milieu et possèdent plusieurs états d'oxydation, ce qui rend difficile l'interprétation de leurs variations isotopiques. Contrairement aux métaux de transition, le magnésium est moins sensible aux conditions physico-chimiques du milieu car il ne possède qu'un unique état d'oxydation (+II). Récemment, les compositions isotopiques du Mg ($\delta^{26}\text{Mg}$) ont été mesurées et varient de -6 à 1 ‰ dans divers échantillons naturels (Galy et al., 2002; Tipper et al., 2006a; Tipper et al.,

2006b; Brenot et al., 2008). Les variations naturelles des isotopes du Mg mesurées entre les roches, les sols et les eaux de rivière qui les drainent semblent indiquer un fractionnement pendant l'altération. Les compositions isotopiques en Mg des sols développés sur un matériel silicaté ont en effet un $\delta^{26}\text{Mg}$ plus lourd que la roche silicatée et que les eaux de rivières.

La différence de compositions isotopiques en Mg des microorganismes et du milieu qui les entoure a surtout été étudiée en milieu marin. Les fractionnements ont été en particulier très bien contraints pour les microorganismes comme les foraminifères. En effet, Chang et al., (2004) et Wombacher et al., (2006) ont montré que ces organismes marins ont une composition isotopique en Mg plus légère que l'eau de mer. Cependant, Ra et Kitagawa (2007) indiquent que les molécules de chlorophylle du phytoplancton marin sont à l'inverse légèrement enrichies en isotope du Mg lourd relativement à l'eau de mer. En fait, les étapes et sens des fractionnements depuis un milieu nutritif jusqu'à une molécule très complexe et spécialisée comme la chlorophylle reste encore aujourd'hui débattu.

En milieu continental, Black et al., (2008) et Bolou Bi et al., (2010) ont étudié le fractionnement isotopique du Mg pendant la croissance des plantes. Ils montrent que les plantes sont systématiquement enrichies en isotopes lourds du Mg. En revanche, le magnésium non prélevé et présent en solution est enrichi en isotopes légers. Les mécanismes de prélèvement, d'incorporation et de recyclage du Mg à l'intérieur de la plante ont été bien contraints dans l'étude de Bolou Bi et al., (2010). Les résultats de ces travaux montrent une influence de la disponibilité du Mg dans le milieu sur l'intensité de ces fractionnements. Les microorganismes ont un rôle majeur dans la lixiviation des éléments et la disponibilité de ceux-ci dans les solutions (cf section I pour la lixiviation du fer). Cependant, à ce jour, aucune étude n'a vérifié le rôle des processus microbiens d'altération sur la signature isotopique des solutions de lixiviation.

Nous avons ainsi choisi d'utiliser les isotopes du Mg, minéral abondant dans la phlogopite, afin de tester l'existence possible d'une signature bactérienne spécifique lors de l'altération de ce minéral en conditions expérimentales. Au cours de nos expériences menées en réacteurs type flacons (offrant l'avantage de volumes importants de solution de lixiviation), l'impact des activités bactériennes sur la lixiviation du fer, de l'aluminium, de la silice a été étudiée parallèlement à celle du magnésium. Ces éléments n'ont pas tous le même

comportement géochimique suivant les conditions physicochimiques du milieu et leur affinité pour les produits du métabolisme bactérien diffère également. Les fonctions lixiviantes des bactéries (complexantes ou acidifiantes) ont également été caractérisées. L'altération expérimentale de phlogopite en réacteur a été réalisée en présence de 2 souches bactériennes :

- *Rhanelia aquatilis* (RA1) identifiées comme bactéries complexantes lors de nos précédentes études ; Quatre expériences : R1, R2, R3 et R4, ont été réalisées avec RA1.

- *Pseudomonas sp.*, identifiées comme bactéries acidifiantes (PS2) ; deux expériences ont été réalisées avec PS2 : B1 et B2.

Parallèlement aux expériences réalisées en conditions biotiques, les mêmes expériences ont été menées en conditions abiotiques en présence d'acide nitrique et d'acides organiques. Les conditions expérimentales (pH, nature et concentration des acides organiques) de ces expériences abiotiques ont été fixées à partir de résultats obtenus sur des expériences réalisées en présence de bactéries. Les quantités de Mg, Al, Si et Fe en solution et la signature isotopique du Mg lixivié en conditions abiotiques ont été comparées à celles des éléments lixiviés en présence de bactéries.

III.2 Évolution du nombre de bactéries, de la consommation du glucose et du pH pendant les expériences

Le nombre de bactéries, de la quantité de glucose restant et de l'évolution du pH de la solution a été suivi dans toutes les expériences au cours du temps (Figure 3-21).

Le nombre de bactéries planctoniques dans les expériences a été quantifié en mesurant la densité optique (DO) à 600 nm des solutions (Figure 3-21a). Immédiatement après inoculation, la DO des réacteurs avec bactéries s'élevait à 0,05, valeur correspondant à environ 10^6 bactéries.ml⁻¹. En présence de la souche complexante RA1, le nombre de cellules bactérienne atteint une valeur maximale de DO entre le quatrième et le sixième jour de 0,21 (5.10^7 bactéries.ml⁻¹), 0,12 (10^7 bactéries.ml⁻¹) et 0,1 (10^7 bactéries.ml⁻¹) respectivement pour les expériences R1, R3 et R4. En présence de la souche acidifiante PS2, le nombre de cellules bactériennes augmente régulièrement mais peu et la valeur maximale de DO atteinte est égale à 0,06 (10^6 bactéries.ml⁻¹) et 0,08 (5.10^6 bactéries.ml⁻¹) respectivement à la fin des expériences

B1 et B2. La souche PS2 a donc une croissance bactérienne constante et un temps de génération faible en comparaison avec RA1.

En présence de la souche complexante RA1, la concentration en glucose (Figure 3-21b) diminue de 2 g.l⁻¹ en début d'expérience à 0, 1,02 g.l⁻¹ et 1,07 g.l⁻¹ à 6 jours respectivement pour les expériences R1, R3 et R4. En présence de la souche acidifiante PS2, entre le premier et le sixième jour, la concentration en glucose diminue de 2 g.l⁻¹ à 0,42 g.l⁻¹ et 0,29 g.l⁻¹ respectivement pour les expériences B1 et B2. La souche bactérienne PS2 a donc consommé plus de glucose que la souche RA1.

Le pH initialement de 6,5 dans tous les réacteurs biotiques (Figure 3-21c) a diminué rapidement pendant les 2 premiers jours. En présence de la souche RA1, les pH des solutions atteignent alors les valeurs de 5,2, 5, 4,6 et 4,2 pour les expériences R1, R2, R3 et R4. En présence de la souche Ps2, les pH atteignent 3,5 et 3,3 pour les expériences B1 et B2. Entre le deuxième et le douzième jour, le pH reste constant dans tous les réacteurs, excepté dans l'expérience R1 où il augmente jusqu'à une valeur maximale de 6,7 à 6 jours. La variation de pH est corrélée avec la consommation du glucose par les bactéries ; en effet, la souche RA1 consomme moins de glucose et acidifie moins le milieu que Ps2. Ceci indique donc une différence dans le métabolisme de ces deux souches. Nous avons démontré précédemment (section I.1.3) que la souche RA1 est une bactérie anaérobie facultative qui produit des acides issus de la fermentation comme l'acide lactique, acétique ou formique; cette souche a donc un anabolisme peu demandeur en énergie nécessitant une source initiale de carbone peu importante et un catabolisme relativement peu efficace pour la lixiviation d'éléments mais efficace pour la production de nouvelles cellules. La souche PS2 est une bactérie aérobie qui a au contraire un anabolisme demandeur en énergie nécessitant une source initiale de carbone importante et un catabolisme relativement efficace pour la lixiviation d'éléments mais peu efficace pour la production de biomasse. Ces secondes expériences en réacteur valident donc nos premiers résultats. Seul le réacteur de l'expérience R1 réalisée avec la souche RA1 se comporte irrégulièrement : le pH augmente rapidement pendant 4 jours jusqu'à une valeur de 6,5 ; simultanément, le glucose est entièrement consommé à 4 jours. Avec la disparition de la source de carbone et donc d'énergie, l'activité des bactéries ne parvient pas à maintenir le pH de la solution à 5 et les protons présents initialement sont vite neutralisés par le pouvoir tampon du phlogopite.

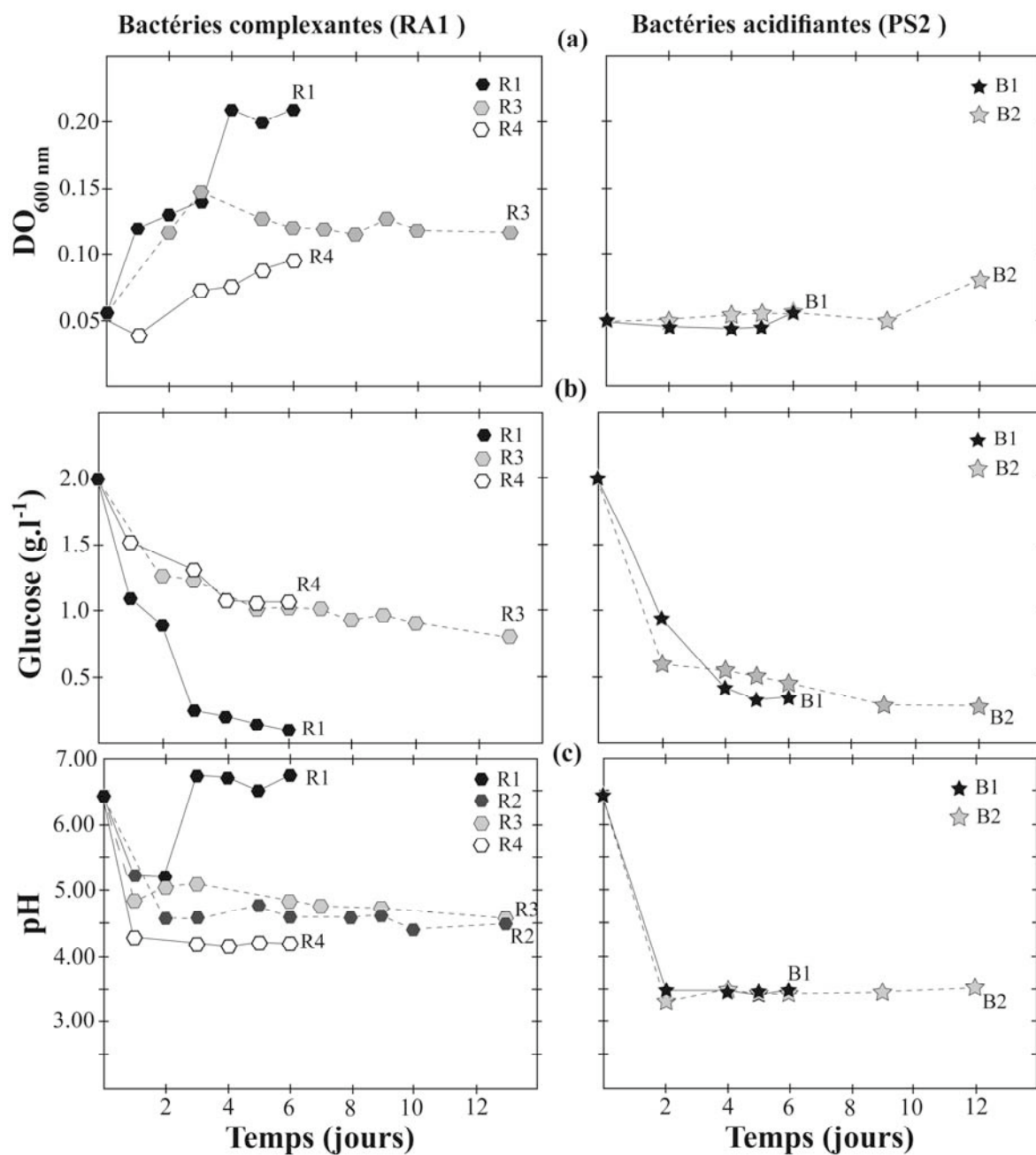


Figure 3- 21. Évolution de la densité cellulaire (DO 600 nm), des concentrations en glucose et des protons au cours du temps pour les expériences biotiques. Chaque point représente une mesure unique.

III.3 Concentrations en Mg dans les expériences de lixiviation chimique et biologique de phlogopite

Les concentrations en magnésium ont été mesurées au cours du temps dans les solutions de lixiviation de phlogopite par les agents chimiques et biologiques. Les résultats sont illustrés en fractions de Mg lixiviée (F_{Mg}), sur la figure 3-22 et correspondent aux pourcentages de Mg en solution par rapport à la quantité de Mg initialement dans les minéraux.

En conditions abiotiques, dans les expériences réalisées avec l'acide nitrique, F_{Mg} atteint le sixième jour une valeur de 1,25 ‰ pour un pH de 2,5, (expérience H1), 0,5 ‰ pour un pH de 3,5 (expérience H4) et 0,2 ‰ pour un pH de 4 (expérience H2). Ceci illustre bien que la concentration en protons influence fortement la lixiviation du Mg (cf. section I.1.2). Dans les expériences réalisées avec les acides organiques, F_{Mg} atteint une valeur entre 0,3 et 0,5 ‰, que ce soit avec de l'acide citrique ou gluconique et pour des pH entre 3,4 et 4, . Si on compare les expériences à un pH de 3,5, les valeurs de F_{Mg} sont très proches en présence d'acide nitrique ou d'acide organique. Ces observations sont cohérentes avec nos précédents résultats (cf. I.1.2). Par contre à 10 jours, pour les solutions atteignant un pH de 6, la valeur de F_{Mg} est plus importante lorsque le phlogopite est en présence d'acide citrique (0,85 ‰) que lorsqu'elle est en présence d'acide nitrique (0,60 ‰).

Dans les expériences biotiques, les valeurs de F_{Mg} atteignent à 6 jours une valeur de 0,75 ‰ et 0,40 ‰ respectivement en présence des souches PS2 et RA1. À 9 jours, F_{Mg} atteint 0,90 ‰ en présence de PS2. La souche bactérienne PS2 permet donc une lixiviation de magnésium plus importante que la souche bactérienne RA1 lors de l'altération de phlogopite.

La comparaison des expériences biotiques et abiotiques à un pH similaire montre que la valeur de F_{Mg} est plus importante en présence de bactéries ou d'acide citrique qu'en présence d'acide nitrique ou gluconique.

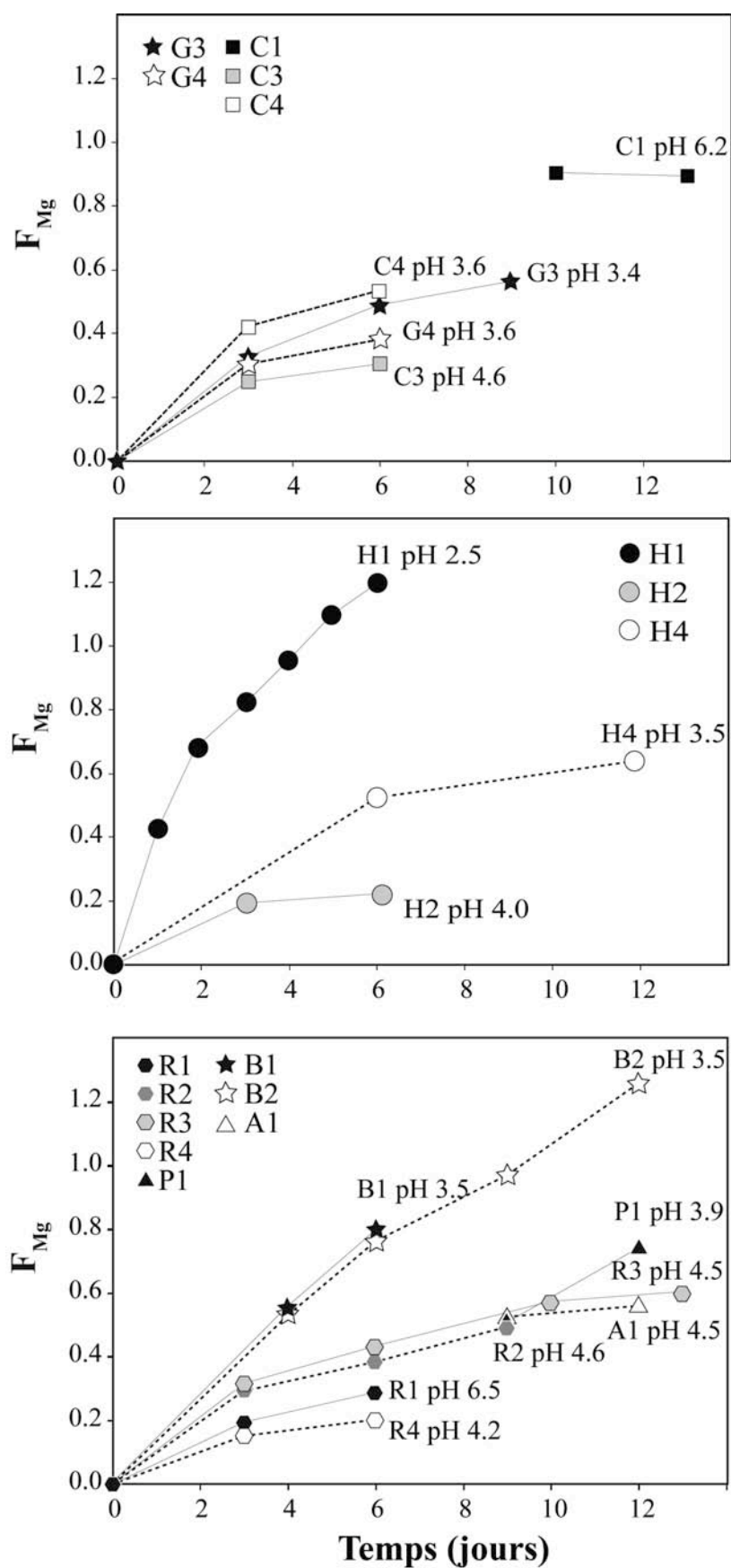


Figure 3- 22. Fraction de Mg libérée (F_{Mg}) dans les expériences de lixiviation chimique et biologique de phlogopite. Chaque point représente une mesure unique.

Les quantités de fer, d'aluminium et de silice lixiviés ont aussi été déterminées dans les solutions de lixiviation. Ces résultats ne sont pas présentés ici car les évolutions au cours du temps dans les expériences biotiques et abiotiques sont identiques à celles décrites pour le magnésium.

III.4 Stoechiométrie de la réaction de lixiviation du Mg, Fe, Al et Si lors de l'altération de phlogopite.

La stoechiométrie des réactions de lixiviation des éléments au cours du temps lors de l'altération du phlogopite, dans toutes les expériences biotiques ou abiotiques, est présentée dans la figure 3-23 par les rapports entre les quantités de Mg, Fe et Al et la quantité de silice et par le rapport Mg/Fe. Les valeurs théoriques, c'est-à-dire celles qui seraient obtenues si l'ensemble du minéral était solubilisé sont de 0,97 pour le rapport Mg/Si ; 0,10 pour le rapport Fe/Si ; 0,22 pour le rapport Al/Si et 9,75 pour le rapport Mg/Fe.

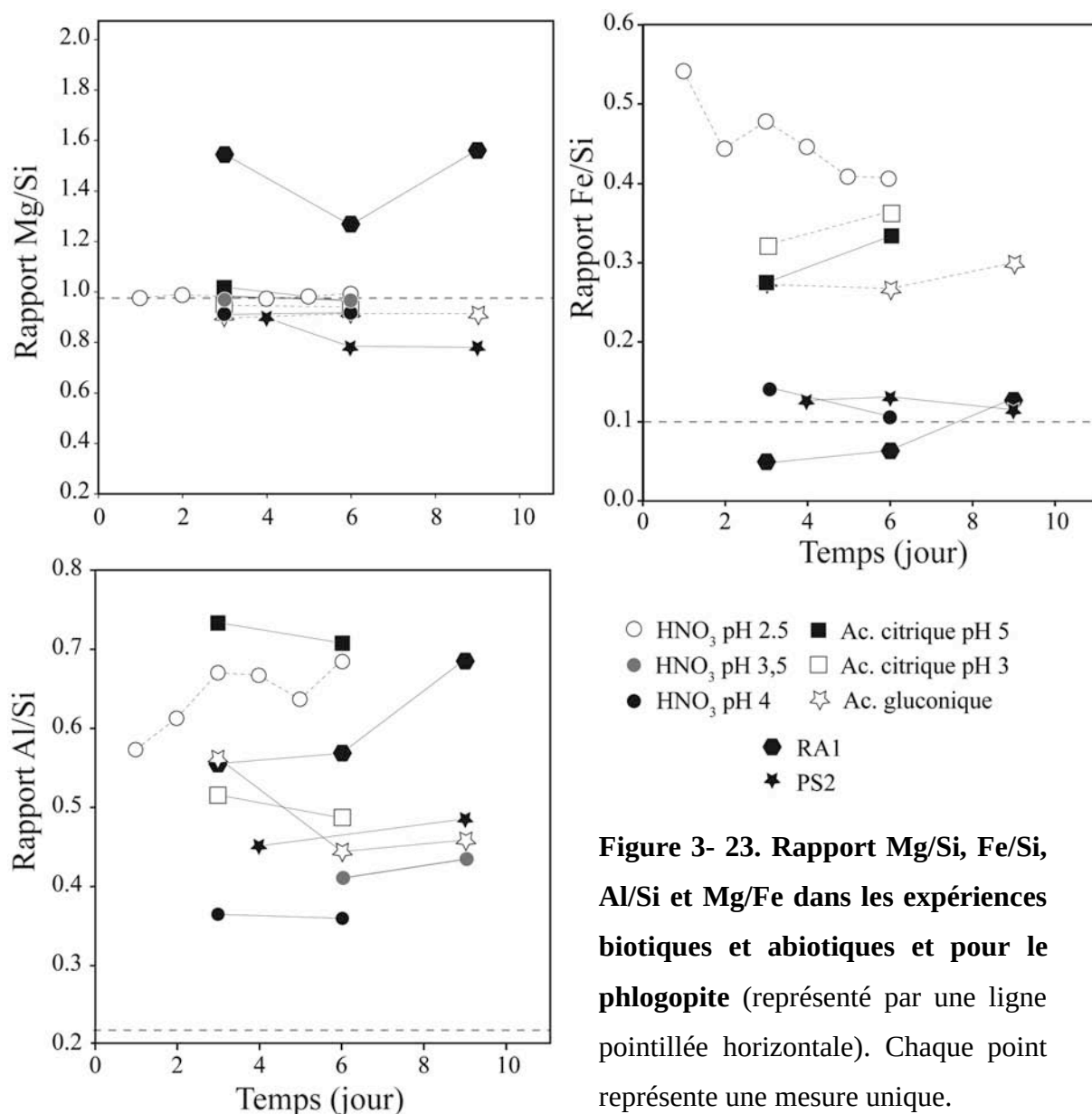


Figure 3- 23. Rapport Mg/Si, Fe/Si, Al/Si et Mg/Fe dans les expériences biotiques et abiotiques et pour le phlogopite (représenté par une ligne pointillée horizontale). Chaque point représente une mesure unique.

En conditions abiotiques, que ce soient dans les solutions des expériences réalisées avec les acides nitrique, citrique et gluconique, le rapport Mg/Si est de l'ordre de 1 et constant au cours du temps. Il n'indique aucune libération préférentielle de Mg par rapport à Si au cours de la réaction de d'altération de la phlogopite. Le rapport Al/Si est, en revanche, toujours très largement supérieur au rapport initial dans la phlogopite.

L'aluminium est donc préférentiellement libéré en solution par rapport au silicium, en présence d'acide nitrique et d'acides organiques. En présence d'acide nitrique, le rapport Al/Si est plus bas lorsque le pH de la solution est plus élevé, il est donc corrélé à l'activité des protons jusqu'à la valeur initiale du minéral (0,22). En effet, il est en moyenne de l'ordre de

0,7 ; 0,45 et 0,4 pour les expériences réalisées avec l'acide nitrique respectivement à pH 2,5; 3,5 et 4.

En revanche, la libération d'aluminium, en présence d'acides organiques, semble d'autant plus accentuée que le pH est proche de la neutralité. Ce rapport Al/Si est d'environ 0,45 pour les expériences réalisées avec l'acide gluconique. Il varie de 0,50 à 0,75 dans les expériences réalisées avec l'acide citrique respectivement à pH 3 et 5. Ceci suggère que l'effet ligand est plus fort pour des pH neutres car les liaisons carboxyliques des acides organiques ne sont pas dissociées pour la plupart et la concentration en proton est très faible.

Les mêmes résultats ont été obtenus avec le fer. Dans toutes les expériences abiotiques, les rapports Fe/Si indiquent que le fer se comporte similairement à l'aluminium. À l'exception des expériences avec l'acide nitrique pH 4, il est toujours solubilisé préférentiellement au silicium Cette lixiviation préférentielle du fer est corrélée à l'activité des protons lorsque l'agent d'altération est l'acide nitrique. Lorsque l'agent d'altération est un acide organique, l'effet ligand permet une lixiviation préférentielle du Fe même à pH élevé. Ces résultats en conditions abiotiques sont cohérents avec ceux de Kalinowski et al., (2004).

Dans les expériences biotiques réalisées avec la souche PS2, le rapport Mg/Si est proche de 1 au début de l'expérience et diminue faiblement vers une valeur de 0,8 à 9 jours. Cette évolution indique une libération préférentielle de Si par rapport au Mg ou une immobilisation de celui-ci et pas de Si. Le prélèvement du Mg par les bactéries ne peut expliquer cet écart car au regard de la faible croissance bactérienne et donc de la faible biomasse, la quantité de Mg incorporée dans les cellules (0,5 % du poids sec d'une bactérie ; Pelmont, 1993) est négligeable. L'hypothèse la plus probable est que l'altération du phlogopite a conduit à la formation de nanovermiculite qui immobiliserait le magnésium (Acker et Bricker 1992; Murakami et al., 2003). Les conditions de formation de cette phase secondaire en présence de bactéries ne sont pas clairement définies à l'heure actuelle.

Cependant, les travaux de Henderson et al., (1975) ont mis en évidence que des pH acides et des grandes concentrations en CO₂ favorisaient la formation de vermiculite dans les sols. Or dans nos expériences biotiques, les bactéries minéralisent une source de carbone et une partie est transformée en CO₂. Les conditions physico-chimiques à l'interface bactéries-minéraux peuvent être vraiment différentes de celles de la solution globale. Des conditions

particulières à cette interface (qui ne sont pas les mêmes avec des agents d'altération chimique) pourraient donc favoriser la formation de vermiculite et expliquer ainsi les résultats obtenus dans nos expériences biotiques. Le rapport Al/Si est quant à lui très largement supérieur au rapport initial dans le phlogopite, de l'ordre de 0,45, dans la gamme de ceux trouvés dans les expériences abiotiques. Le rapport Fe/ Si est du même ordre de grandeur que le rapport Fe/Si du phlogopite (0,10) en fin d'expérience (en début d'expérience, il était légèrement plus haut). Il n'y a donc pas de lixiviation préférentielle de Fe par rapport à Si. Ces lixiviations de Mg, Al et Fe par rapport à Si en présence de la souche PS2 sont proches de celles obtenues avec l'acide nitrique à un pH de 3,5- 4, ce qui semble vérifier le caractère acidifiant de la souche Ps2. Les cations octaédriques (Mg et Fe) et le silicium seraient libérés de façon stoechiométrique dans la solution suite à une action des protons à un pH de 4.

Pour les expériences biotiques réalisées avec la souche RA1, le rapport Mg/Si est de l'ordre de 1,5, largement supérieur à celui du phlogopite et indiquant une libération préférentielle de Mg par rapport au Si.

L'aluminium est lui aussi préférentiellement lixivié (comme dans toutes les autres expériences, quel que soit l'agent d'altération). Ces valeurs de rapport Al/Si sont en particulier proches de celles obtenues avec l'acide citrique, ce qui tend à démontrer le caractère complexant de la souche RA1. Cependant, cette souche de bactéries ne semble pas favoriser la lixiviation du fer, au contraire de l'acide citrique. Cela peut s'expliquer par le fait que les concentrations d'acide citrique excrété par la souche RA1 sont très faibles, de l'ordre de 0,02 mM ce qui est très inférieur à nos conditions abiotiques (1 mM). L'acide citrique à des pH proche de la neutralité est connu pour avoir une affinité supérieure pour l'aluminium par rapport au fer. Étant donné les faibles concentrations en acide citrique excrété, seul l'aluminium aurait été complexé.

III.5 Signatures isotopiques du Mg

La composition isotopique en magnésium ($\delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}}$) du phlogopite et l'évolution de la composition isotopique du Mg lixivié en fonction de la fraction de Mg libéré (F_{Mg}) en solution lors des expériences biotiques et chimiques sont présentées dans la figure 3-24.

La composition isotopique initiale moyenne du magnésium du phlogopite est de $\delta^{26}\text{Mg} = -1,22\text{‰} \pm 0,24\text{‰}$. La variation de la signature isotopique en Mg du phlogopite est large car le mica est formé à partir d'un mélange entre 2 pôles purs (phlogopite – annite) ce qui peut expliquer une certaine hétérogénéité.

Dans les expériences biotiques, les $\delta^{26}\text{Mg}$ des solutions sont de -1,41 et -1,31‰ pour RA1 à 3 et 6 jours, de -1,39 et -1,23‰ pour PA1 et AR1 à 12 jours, de -1,09 et -0,88‰ pour PS2 à 6 et 12 jours. Ces valeurs sont assez proches pour PA1, AR1 et RA1 compte tenu de la barre d'erreur de 0,15‰ (correspondant à la reproductibilité externe entre les standards, i.e. 2σ). Elles sont, en revanche, assez différentes pour la souche PS2. Dans les expériences abiotiques, les $\delta^{26}\text{Mg}$ des solutions sont de -0,82‰ pour HNO_3 (pH 2,5 ; 6 jours), de -1,02‰ pour l'acide gluconique (pH 3,4 ; 9 jours, 0,01M), de -1,22‰ pour l'acide gluconique (pH 3,6 ; 6 jours, 0,001M), de -1,52, -1,43, -1,42‰, pour l'acide citrique (0,001M) respectivement à 13, 6, 6 jours pour des pH de 6, 4,6 et 3,6.

Les compositions isotopiques en Mg des solutions pendant ou à la fin des expériences sont presque toutes comprises dans la gamme de compositions isotopiques moyenne du Mg déterminée pour le phlogopite initial. Les seuls fractionnements significatifs ont été mesurés avec HNO_3 à pH très acide (pH 2,5, 6 jours) et avec la souche acidifiante PS2 (à 12 jours) et l'acide citrique (pH 6, 13 jours). Dans les deux premières expériences, les solutions ont un $\delta^{26}\text{Mg}$ proche d'environ -0,85 ‰. Pour l'acide citrique, la solution a un $\delta^{26}\text{Mg}$ proche d'environ -1,52 ‰. Nos résultats indiquent donc un fractionnement isotopique faible ou négligeable pendant la lixiviation du Mg du phlogopite quel que soit l'agent chimique ou bactérien d'altération impliqué.

Cependant, deux tendances peuvent être distinguées si on se réfère à la composition isotopique moyenne du phlogopite ($\delta^{26}\text{Mg} = -1,22\text{‰}$). D'abord pour les expériences réalisées avec HNO_3 , l'acide gluconique et la souche acidifiante PS2, le Mg lixivié en solution est toujours enrichi en isotope lourd (^{26}Mg) par rapport au $\delta^{26}\text{Mg}$ moyen du phlogopite. Pour les expériences réalisées avec l'acide citrique et la souche RA1, le Mg lixivié en solution est toujours enrichi en isotope léger (^{24}Mg) par rapport au $\delta^{26}\text{Mg}$ moyen du phlogopite. Ces tendances inverses de fractionnement semblent s'accroître avec l'augmentation de la fraction

de Mg lixivié . Elles pourraient être expliquées par un effet activé ou non de chélation du Mg par des ligands organiques. En effet, les agents bien identifiés comme acidifiants (HNO_3 et la souche PS2) semblent favoriser la lixiviation de Mg lourd. Les agents complexant, comme l'acide citrique et la souche RA1 favorisent plutôt, la lixiviation de Mg léger. Toutefois, avec l'acide gluconique, le Mg lixivié est enrichi en isotopes lourds, comme dans les expériences avec les agents acidifiants. En fait, l'expérience avec l'acide gluconique a été réalisée à pH 3,5, c'est-à-dire dans les mêmes conditions que les expériences menées avec la souche PS2. Or, à ce pH (3,5), les groupements carboxyliques de l'acide gluconique sont en majorité protonés ($\text{pK}_a = 3,86$) et agit donc comme un acide fort. Ceci expliquerait que les compositions isotopiques en Mg dans les solutions soient assez similaires ($\delta^{26}\text{Mg}$ environ -1,05‰). De plus, le rapport Mg/Si des expériences avec l'acide gluconique se rapproche plus de celui des expériences réalisées avec l'acide nitrique que de celles réalisées avec l'acide citrique. En présence d'acide citrique, l'effet ligand est d'autant plus fort dans nos conditions expérimentales (pH d'environ 5) ce qui n'induit pas les mêmes fractionnements.

Les résultats obtenus pour les isotopes du Mg et le rapport Mg/Si en présence des différentes souches bactériennes sont différents entre la souche PS2 et les autres souches PA1, RA1 et AR1. Ces bactéries ont un métabolisme différent qui leur donne une efficacité vis-à-vis de la lixiviation des éléments qui n'est pas la même. La souche PS2 a été confirmée comme étant acidifiante et les souches RA1 et PA1 comme complexantes. Des vérifications complémentaires restent à faire, mais la mesure de la composition isotopique du Mg des solutions pourrait être un outil intéressant de mise en évidence de l'un ou l'autre de ces processus de lixiviation dans des systèmes plus complexes.

Dans la nature, les différences de compositions isotopiques mesurées entre les sols et les eaux, sont bien plus larges que celles que nous mesurons (Galy et al., 2002; Tipper et al., 2006a; Tipper et al., 2006b; Brenot et al., 2008). Plusieurs mécanismes ou processus pourraient expliquer les très faibles fractionnements isotopiques mesurés lors d'altération de minéraux en conditions expérimentales et notamment en présence de bactéries : (1) le fractionnement lors de la dissolution de phlogopite peut suivre une distillation de Rayleigh dont l'effet est d'autant plus marqué que la quantité de Mg lixiviée est faible (distillation suivant une loi exponentielle); (2) l'immobilisation du Mg par transformation partielle du mica en vermiculite (cf. I.2.4) ; et

enfin (3) l'incorporation du Mg à l'intérieur des cellules bactériennes (0,5 % de Mg en poids sec). Toutefois cette dernière hypothèse est peu probable car la biomasse formée par les bactéries est tellement faible (10^7 bactéries/ml) qu'elle ne peut expliquer à elle seule les fractionnements observés.

Nos résultats suggèrent que l'altération du phlogopite par les bactéries ne peut pas être seulement résumée par l'action des protons et des métabolites ou ligands organiques produits. La part d'immobilisation des éléments (Mg ou Fe) est non négligeable et suggère que des processus clé à l'interface bactérie-minéral doivent être pris en compte et qui restent à étudier.

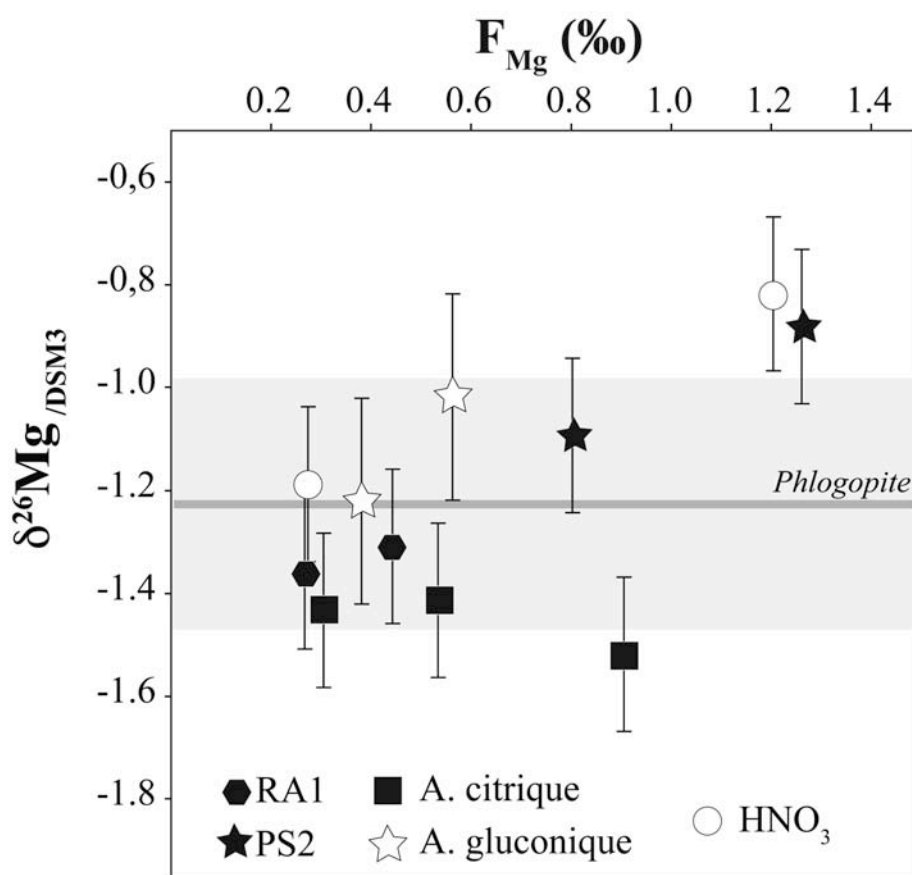


Figure 3- 24. Évolution du $\delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}}$ en fonction de la fraction de Mg lixiviée lors de l'altération de phlogopite dans les expériences biotiques et abiotiques. Chaque point représente la moyenne et l'écart-type d'au moins 6 mesures réalisées sur un échantillon.

Quel que soit le type d'expériences biotique ou abiotique, une corrélation est observée entre le pH, le taux de dissolution du phlogopite (R_{Si}) et le $\delta^{26}\text{Mg}$ des solutions de lixiviation.

Plus le pH est acide, plus le Mg sera libéré en solution et sera enrichi en isotopes lourds ^{26}Mg (Figure 3-25). L'étude de Pogge von Strandmann et al., (2008) décrit également une relation entre le fractionnement des isotopes du Mg et le pH des rivières (pH de neutres à basiques) drainant des basaltes. Ils montrent que plus le pH est basique, plus les rivières sont enrichies en isotopes lourds relativement aux basaltes.

Dans nos expériences avec l'acide citrique et la souche bactérienne complexante RA1, le $\delta^{26}\text{Mg}$ n'est pas corrélé avec R_{Si} ce qui confirme cet effet ligand déjà observé. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par Brantley et al., (2001) avec les isotopes du fer. Dans leur étude, le $\delta^{57}\text{Fe}$ diminue avec l'augmentation du taux de libération du fer indiquant que les ligands ont une préférence pour les isotopes légers.

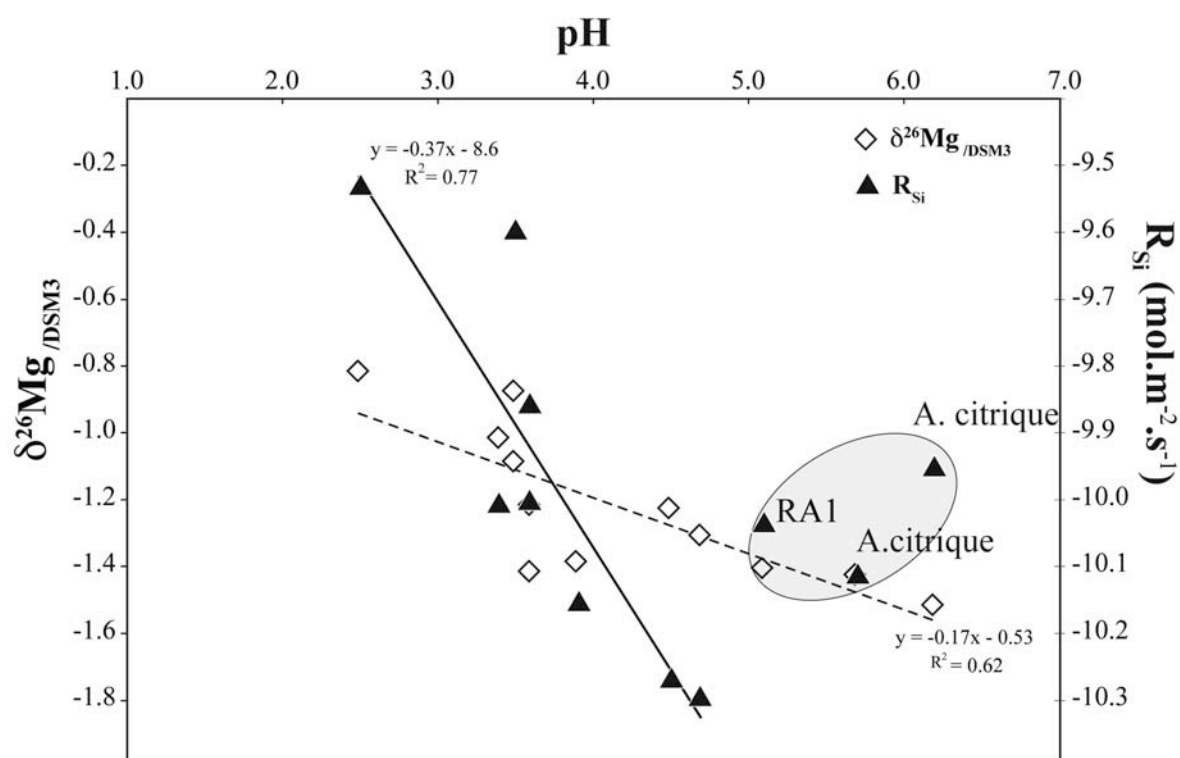


Figure 3- 25. pH versus $\delta^{26}\text{Mg}$ et le taux de dissolution du phlogopite (R_{Si}) pour les expériences biotiques et abiotiques

III.6 Synthèse sur l'utilisation des isotopes du Mg comme traceurs de processus bactériens d'altération

L'étude du fractionnement isotopique du magnésium au cours de l'altération microbienne du phlogopite confirme les précédents résultats suggérant qu'une baisse du pH et une production de métabolites par les bactéries pouvaient fortement accélérer la lixiviation du fer, de l'aluminium, du silicium et du magnésium lors de l'altération du phlogopite. La densité cellulaire et par conséquent, la croissance bactérienne ne sont pas corrélées à l'efficacité de lixiviation d'éléments. En effet, la souche PS2 a une croissance plus faible que la souche RA1 mais son activité induit une lixiviation plus importante du fer, de l'aluminium, du silicium et du magnésium. Les résultats obtenus en conditions abiotiques, montre que la lixiviation du Fe, Al, Si et Mg est aussi amplifiée en présence d'acide citrique.

Un très faible fractionnement isotopique est observé dans les solutions de lixiviation quel que soit l'agent d'altération du phlogopite. Deux tendances de fractionnement du Mg en solution, peuvent être cependant identifiées :

- (1) un enrichissement en isotopes lourds par rapport à la composition isotopique moyenne de la phlogopite lors que l'acidolyse prédomine (e.g en présence d' HNO_3 ou de PS2)
- (2) un enrichissement en isotopes légers par rapport au phlogopite pour les expériences réalisées avec l'acide citrique.

Ces tendances semblent être plus marquées lorsque la fraction de magnésium lixiviée augmente. De plus, avec des agents acidifiants (Tendance 1), la signature isotopique en Mg des solutions est fortement corrélée aux pH. Uniquement en présence de la souche bactérienne PS2, une immobilisation du Mg a été observée. L'effet des acides organiques fortement complexants (Tendance 2) joue un rôle important dans la dissolution du phlogopite et la composition isotopique en Mg de la solution de lixiviation. Une étude minéralogique des particules de phlogopite après les expériences doit être menée. Il semble que la lixiviation du Mg du phlogopite par les bactéries est imputable à l'action des protons et ligands produits, mais la part d'immobilisation des éléments s'avère non négligeable.

Les isotopes du Mg semblent être des traceurs potentiels des processus d'acidolyse et de complexolyse lors de l'altération de minéraux et de la lixiviation de Mg par les bactéries. Toutefois, des études complémentaires doivent être menées pour confirmer ces premiers résultats et combler certaines lacunes. Par exemple, dans nos réacteurs, trop peu de Mg a été lixivié à partir du minéral sélectionné et les expériences ont été réalisées, seulement, sur 4 souches bactériennes et des durées assez courtes.

Si ces résultats préliminaires sont validés, les processus bactériens de lixiviation du Mg des phyllosilicates n'expliquent pas les résultats obtenus sur les signatures isotopiques mesurées dans les eaux de rivière enrichies en isotope léger par rapport aux roches et sols drainés (Brenot, Cloquet et al., 2008; Tipper, Galy et al., 2008). D'autres processus supplémentaires doivent être alors envisagés et notamment ceux associés à l'action des plantes. Par exemple, les travaux de Bolou-Bi et al., (2010) ont mis en évidence que pendant l'altération de phlogopite lors de la croissance de plantes, le Mg lixivié en solution était enrichi en isotopes légers et inversement, la plante était enrichie en isotopes lourds. Ils expliquent cette composition isotopique de la solution lixiviée comme le résultat de l'incorporation du Mg lourd dans la plante après son adsorption préférentielle sur ses racines. L'action des bactéries et la contribution acidolyse/complexolyse peut soit diminuer ou renforcer ce fractionnement. De même, les sécrétions racinaires organiques des plantes dont la participation effective à l'altération du phlogopite a déjà été démontré (Hinsinger et al., 1992) pourraient aussi faire, en tant que source de carbone, varier l'activité des bactéries et orienter le processus d'altération. Tous ces processus liés à la croissance et l'activité des plantes (adsorption, absorption, sécrétion, récrétion, cycle...) et ceux liés à la présence et l'activité des bactéries complexantes pourraient expliquer l'enrichissement en isotopes légers des eaux par rapport aux roches et aux sols.

IV. CONCLUSIONS

Dans toutes les expériences biotiques et abiotiques, la lixiviation des cations (Mg, Fe, Al et Si) lors de l'altération du phlogopite et de la biotite est fortement corrélée à l'activité des protons. Nos résultats suggèrent que l'oxydation partielle du glucose en acides organiques est le mécanisme prédominant par lequel les bactéries amplifient la lixiviation d'éléments (Fe, Mg...) lors de l'altération de la biotite et de la phlogopite, surtout pour des pH proche de la neutralité.

Un modèle empirique a été utilisé afin d'identifier et de quantifier les 3 processus majeurs impliqués dans l'altération chimique ou microbienne des phyllosilicates en conditions aérobies : Acidolyse, Complexolyse, Immobilisation. En utilisant le fer comme traceur de processus, il permet de réaliser des études comparatives des taux d'altération des phyllosilicates (phlogopite et biotite) en présence ou non de bactéries et dans différentes conditions environnementales : nature des sources de carbone, contact semi-contact.... En se référant au modèle, il est alors possible d'établir un phénotype d'altération ternaire (ACI) dont les variations peuvent être étudiées en fonction des paramètres cités précédemment. Tous les résultats indiquent qu'ils ne peuvent pas être dû uniquement à la composante microbienne du système. En ce sens, pour établir un phénotype ACI, le phlogopite semble être un minéral test plus complet que la biotite, les processus sont variés et intenses et peuvent être clairement identifiés. La composition cristallographique et la réactivité du minéral sont donc aussi déterminantes que la génétique et le métabolisme de la bactérie. Toutefois, une étude sur plusieurs micas appartenant à la série annite-phlogopite serait nécessaire.

Cette caractérisation « phénotypique » qualitative et quantitative des processus d'altération des minéraux a été aussi complétée par une approche isotopique. Les résultats suggèrent un fractionnement différentiel du Mg sous l'action des protons et des ligands par la signature isotopique du Mg libéré en solution lors de l'altération du phlogopite.

La production d'acides organiques n'est pas limitée au métabolisme anaérobie. En condition aérobie, beaucoup de bactéries sécrètent des acides organiques. L'oxydation partielle des substrats carbonés dans ces environnements provient d'un métabolisme de débordement. La nature et la quantité des acides organiques produits sont fonction de la nature des nutriments limitants (types de sources de carbones). Chaque souche de bactéries possède des avantages physiologiques spécifiques à des conditions expérimentales de croissances (source de carbone

ou préculture), ce qui permet de produire une gamme d'acide organique qui agit différemment sur les surfaces des particules minérales suivant la nature de celles-ci.

Le contact bactérie/minéral permet une altération nettement supérieure à celle observée en conditions de semi-contact ou non-contact. Nos résultats suggèrent l'existence de zones de microréactions à la surface des phyllosilicates (basales et ou latérales) où les conditions physico-chimiques à l'interface bactérie/minéral sont différentes (concentrations d'acides minérales et organiques plus importantes).

Pour résumer, au regard de ce premier chapitre de résultats, l'approche interdisciplinaire proposée dans ce travail permet d'identifier et de caractériser les processus d'altération de phyllosilicates 2:1 par des bactéries et notamment avec le phlogopite qui permet une réponse plus variée des bactéries lors de la lixiviation d'éléments. Cette approche peut être appliquée, en particulier, à des communautés hétérotrophes du sol pour caractériser leur diverse compétence, stratégie ou invariance dans l'altération de minéraux dans différentes conditions environnementales (taux de matière organique dans les sols, richesse en nutriments, pH...).

**CHAPITRE 4 : Diversité fonctionnelle de communautés
bactériennes isolées de sols de Lorraine**

Le premier chapitre de résultats a présenté notre approche pour identifier les processus impliqués dans l'altération de phlogopite et biotite par des souches bactériennes. Nous avons montré que le modèle proposé pour cette étude était performant pour distinguer les 2 processus majeurs d'altération des micas (acidolyse et complexolyse) conduisant à la lixiviation du fer dans différents contextes expérimentaux. Ce second chapitre de résultats est consacré à l'application de cette méthode d'identification et à la recherche des processus responsables de la lixiviation des éléments par des communautés bactériennes fraîchement extraites de différents sols. **L'objectif est de mettre en évidence les paramètres environnementaux naturels qui contrôlent la structure et la fonction « altération de minéraux » de ces communautés. Le travail se décompose en deux parties :**

- (1) une comparaison du potentiel d'altération de communautés bactériennes extraites de deux sols naturels acides des Vosges, l'un ayant été amendé en 2003, l'autre non. L'objectif est ici de mesurer l'effet de l'amendement au cours du temps sur la fonction d'altération minérale bactérienne et sur la restauration de la fertilité potentielle de ce type de sol

- (2) la caractérisation de la structure et du potentiel d'altération de minéraux de communautés bactériennes fonctionnelles extraites de sols très contrastés en terme de pédogenèse du fait de différentes roches mères et occupations végétales. L'objectif est de corréler la fonction d'altération bactérienne aux conditions naturelles des milieux.

I EFFET D'UN AMENDEMENT CALCO-MAGNESIEN SUR LE POTENTIEL DE LIXIVIATION DU FER PAR DES COMMUNAUTES BACTERIENNES EXTRAITES DE SOLS DEVELOPPES SUR ROCHE ACIDE : INFLUENCE DES SAISONS ET DU COUVERT VEGETAL

I. 1 Contexte et objectifs

Depuis une trentaine d'années, la forêt vosgienne a subi un dépérissement important attribué à une carence en magnésium et calcium et se traduisant par un jaunissement du feuillage et une défoliation des arbres. Des études ont été réalisées sur ce phénomène

notamment dans le cadre du programme interdisciplinaire de recherche DEFORPA et via des réseaux de surveillance de la santé des forêts. Dans les années 1990–2000, les recherches attribuent les carences en Ca et Mg dans les sols à une acidification des sols due aux dépôts acides induits par la pollution atmosphérique anthropique (rejets SO_4^{2-} , NO_3^-) élevée à la fin du 20^e siècle. Les sols des reliefs vosgiens sont naturellement acides car ils se développent sur des roches pauvres en minéraux altérables (grès et granites) sous un climat froid et humide. Ainsi les pédogenèses conduisent à des sols bruns acides, dans le meilleur des cas, ou à des sols podzolisés, jusqu’au stade le plus évolué du podzol. Il y a peu de cations alcalins et alcalino-terreux libérés par altération. La faible proportion d’éléments nutritifs disponibles dans les sols par rapport aux cations acides comme les protons et l’aluminium explique que le taux de saturation des sols soit toujours faible. Le système tampon majoritaire dans les sols podzolisés est lié aux formes d’aluminium. La capacité à neutraliser les acides de ces sols est ainsi très peu élevée. L’ajout d’acide ne fait qu’accélérer leur acidification et diminuer leur taux de saturation qui est faiblement compensé (Thomas et al., 1999).

En réponse aux mesures de réduction des émissions mises en place dans le cadre de la Convention sur la Pollution Atmosphérique Transfrontalière à Longue Distance (*Convention on Long-range Transboundary Air Pollution*) placée sous l’égide de la Commission Economique pour l’Europe des nations Unies (UNECE), les dépôts acides ont dans leur globalité fortement diminué ces dernières années. Le dépérissement forestier a régressé mais l’acidification du massif vosgien continue. Même si il est désormais possible d’espérer une restauration spontanée des écosystèmes, le temps de résilience de ces derniers demeure inconnu. En attendant une restauration « naturelle », des essais d’amendement ont été réalisés en 2003 sur deux bassins versants, l’un sur grès (Forêt du Val de Senones) l’autres sur granite (forêt du Ventron). Dans ce contexte d’acidification/restauration des écosystèmes, des suivis de la qualité des sols et des eaux sont en cours (biologiques et chimiques). Les premiers résultats sur l’évolution de la qualité chimique des eaux indiquent une diminution de cette acidification (Angeli, 2006).

Vu la faible participation des différents systèmes tampon de ces sols, l’altération des minéraux primaires, même si ils sont présents en très faible quantité, ou celle des minéraux apportés par amendement, pourrait permettre la neutralisation d’une partie de l’acidité. Or, comme développés dans le chapitre 1, en plus des eaux acides, les agents favorisant cette altération sont principalement les bactéries, les champignons et les plantes. Dans ce contexte,

l'objectif général de ce travail a été de comparer la fonction d'altération des bactéries issues des sols du bassin versant amendé sur grès à celle des bactéries issues d'un bassin versant témoin voisin (Val de Senones). Les communautés bactériennes ont été extraites de tous les horizons pédologiques des profils de sols échantillonnés, à différentes saisons (novembre 2007, avril et juillet 2008, juillet 2009) et sous deux couvertures végétales : landes et forêt. Le nombre de bactéries dans ces sols a été déterminé ainsi que leur potentiel à dégrader des substrats carbonés. Le potentiel d'altération du phlogopite par ces communautés bactériennes a été caractérisé lors d'expériences en microplaques grâce au modèle validé dans le chapitre 3.

I. 2 Effet d'un amendement calco-magnésien sur les caractéristiques générales de sols acides sous landes

Pour rappel, les sols échantillonnés sur les bassins versants de Senones témoin et amendé (Gentil Sapin et Basse des Escaliers) et analysés dans cette étude sont décrits dans le chapitre 2 partie IV. Les analyses physico-chimiques (concentration en éléments totaux, pH, teneurs en carbone organique, en bases échangeables) des sols échantillonnés sur les sommets sous landes, ont été réalisées au LIMOS (Tableaux 4-1 et 4-2). Des analyses de sols prélevés sur les mêmes bassins mais sous forêt ont été réalisées à l'INRA Champenoux par Claude Nys, responsable du suivi de nombreux essais de chaulages en forêt. Une partie de ces données nous ont été transmises et seront discutées mais elles n'ont pas été incluses dans le manuscrit.

Les pourcentages d'oxydes mesurés dans la fraction solide totale sont en général peu différents dans les horizons des sols témoin et amendé (Tableau 4-1). Les pourcentages d'oxydes de silice sont cependant significativement plus élevés dans les horizons de surface du sol témoin. La différence peut être en partie due à une mauvaise dissolution de ceux-ci dans les échantillons (le bilan des analyses dans la fraction solide est loin des 100%). Les pourcentages d'oxydes de calcium, de potassium (K), de sodium (Na) sont également légèrement plus élevés dans l'horizon de surface du sol amendé. Un petit effet dilution pourrait donc expliquer, en partie, les teneurs en silice plus basses en surface du sol amendé.

L'amendement n'a donc pas d'effet significatif sur la composition chimique en éléments majeurs totaux des horizons minéraux de ces sols. L'horizon de surface du sol amendé est toutefois légèrement enrichi en cations alcalins et alcalino-terreux.

Tableau 4- 1. Analyses élémentaires des horizons de sols témoin et amendé échantillonnés sous landes

Sol cryptopodzolique amendé					Sol cryptopodzolique témoin				
% d'oxyde	A1	E	Bs	C	% d'oxyde	A1	E	Bs	C
SiO₂	68,62	80,78	70,61	74,25	SiO₂	73,67	85,43	69,11	67,00
Al₂O₃	4,02	5,13	8,41	8,48	Al₂O₃	3,36	4,27	8,52	11,25
Fe₂O₃	0,46	0,61	3,18	3,49	Fe₂O₃	0,48	0,64	2,67	2,89
MnO	0,01	0,01	0,01	0,02	MnO	0,01	0,01	0,02	0,02
MgO	0,06	0,09	0,17	0,18	MgO	0,05	0,07	0,19	0,26
CaO	0,12	0,06	0,06	0,09	CaO	0,07	0,06	0,06	0,06
Na₂O	0,31	0,29	0,32	0,34	Na₂O	0,14	0,22	0,22	0,31
K₂O	0,26	1,62	0,27	0,02	K₂O	0,02	0,02	0,02	0,03
Perte au feu	1,30	0,40	0,30	0,40	Perte au feu	0,3	0,2	0,2	0,3
Total	75,16	88,98	83,33	87,27	Total	78,09	90,93	81,00	82,12

Les autres caractéristiques physico-chimiques des horizons de sols témoin et amendé sous landes sont représentés dans le tableaux 4-2. Les données suggèrent que l'amendement a eu un effet positif sur :

- le pH des horizons de surface. Il a une valeur de 3,9 dans les horizons A1 et A2 du sol témoin. Le pH atteint presque 4,2 et 4 respectivement dans les horizons A1 et A2 du sol amendé.
- la teneur en carbone organique, plus importante dans tous les horizons du sol amendé
- les capacités d'échange cationique supérieures dans tous les horizons du sol amendé, certainement corrélées à des teneurs en MO également plus importantes dans ces sols.
- les concentrations en cations échangeables. Les concentrations en Ca, Mg et Al échangeables sont notamment supérieures dans tous les horizons du sol amendé. Les concentrations en fer échangeable sont supérieures dans les horizons Bs du sol amendé.

Ces observations sont en accord avec les conclusions données dans les premiers rapports ONF de Claude Nys (Nys, 2004) présentant le suivi des propriétés physico-chimiques des sols

avant et après ces amendements dans les Vosges. Ils observent également une augmentation globale de la MO et des taux de saturation des sols dès les premières années après amendement. Cet effet amendement sur les teneurs en MO et en cations alcalins et alcalino-terreux échangeables pourrait donc influencer l'activité des bactéries dans les sols du bassin versant amendé.

Tableau 4- 2. Caractéristiques physico-chimiques des horizons de sol témoin et amendé sous landes

Sol	Horizons de sol	Profondeur (cm)	C org (%)	pH	Cations échangeables (cmol ⁺ .Kg ⁻¹ de sol)				
					CEC	Mg	Fe	Ca	Al
Témoin	A1	0-20	3.0	3.93	1.62	0.04	0.07	0.57	0.31
	A2	20-30	1.1	3.87	1.08	0.02	0.09	0.26	0.57
	Bs	30-70	0.4	4.33	0.90	0.01	0.31	0.16	1.07
Amendé	A1	0-20	4.1	4.16	2.11	0.11	0.08	1.38	0.71
	A2	20-30	1.9	4.02	1.93	0.04	0.11	0.27	0.74
	Bs	30-70	0.8	4.29	1.15	0.01	0.81	0.38	1.67

I. 3 Les sols sous landes : effet saisonnier sur le nombre de bactéries extraites de chaque horizon, sur leur richesse fonctionnelle et sur leur potentiel d'altération

I. 3. 1 . Dénombrement des bactéries

Le nombre de bactéries totales et la proportion de bactéries cultivables par gramme de sol sec ont été déterminés pour tous les horizons des sols témoins et amendés prélevés en novembre 2007, avril 2008, juillet 2008 et juillet 2009 (Figure 4-1).

En général, le nombre de bactéries totales diminue avec la profondeur. Il varie de 5.10^{10} bactéries/g de sol sec dans les horizons de surface organo-minéraux (A1) à 5.10^7 bactéries/g de sol sec dans les horizons minéraux profonds (Bs/C). Ces variations sont corrélées avec les teneurs en C organique des sols qui diminuent toujours avec la profondeur. D'autres travaux démontrent le même type de corrélation (ex Van Elsas et al., 2007).

Dix à vingt fois plus de bactéries sont comptabilisées en juillet 2008 et 2009 (été) par rapport à novembre 2007 et avril 2008 (hiver et fin d'hiver). Le climat et notamment la

température jouent donc un rôle important sur le nombre de bactéries totales dans nos échantillons avec un effet stimulant sur la biomasse. Par contre il ne semble pas avoir d'effet de l'amendement sur le nombre de bactéries totales quel que soit l'horizon de sol.

Le rapport entre le nombre de bactéries cultivables et totales varie de 0,0001 à 0,9 % dans le sol témoin et de 0,01 à 0,9 % dans le sol amendé. Compte tenu des barres d'erreurs importantes sur les résultats de dénombrement des bactéries cultivables, aucune différence n'est significative en fonction de la saison de prélèvement. Cependant, l'amendement a un léger effet positif sur le nombre de bactéries cultivables, 10 fois plus important dans le sol amendé que dans le sol témoin.

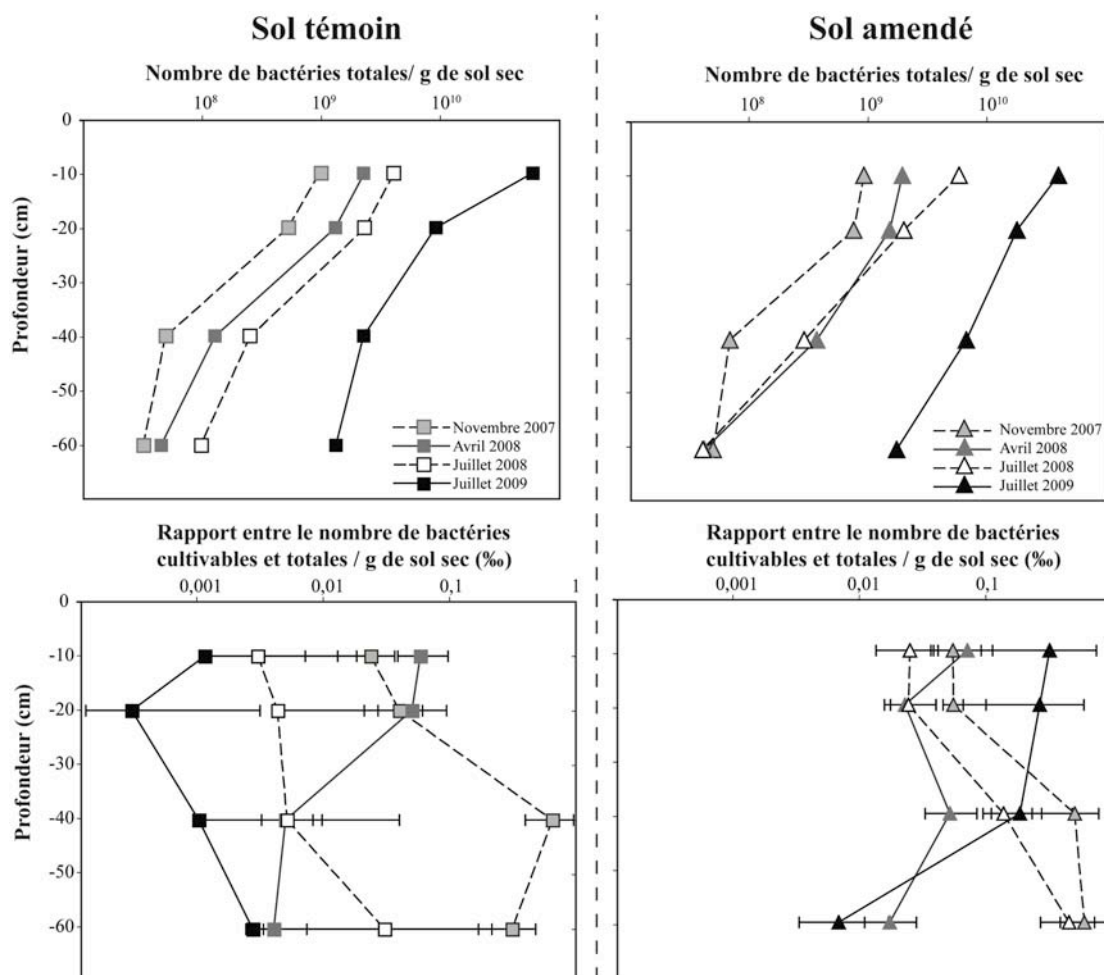


Figure 4- 1. Nombre de bactéries totales par gramme de sol sec et proportion de bactéries cultivables par rapport aux bactéries totales, exprimée en pour mille (‰), pour les sols témoin et amendé.

Ces résultats sont cohérents avec les travaux de (Andersson et Nilsson, 2001; Neale et al., 1997) qui ont quantifié la biomasse bactérienne suite à un amendement en Ca et Mg. Leurs résultats indiquent que la biomasse bactérienne totale n'est pas affectée par l'amendement mais que la biomasse bactérienne cultivable augmente après amendement. Ils attribuent cet effet à une augmentation du carbone organique facilement disponible pour les bactéries. Dans notre étude, les teneurs en carbone organique indiquent :

- dans les sols amendé et témoin, une diminution normale de ces quantités avec la profondeur ;
- des quantités significativement supérieures dans les horizons du sol amendé par rapport à celles mesurées dans le sol témoin.

La teneur en carbone organique dans les horizons de sols est donc très fortement corrélée ($r^2 > 0,9$) avec le nombre de bactéries mesuré dans ces mêmes horizons (Figure 4-2).

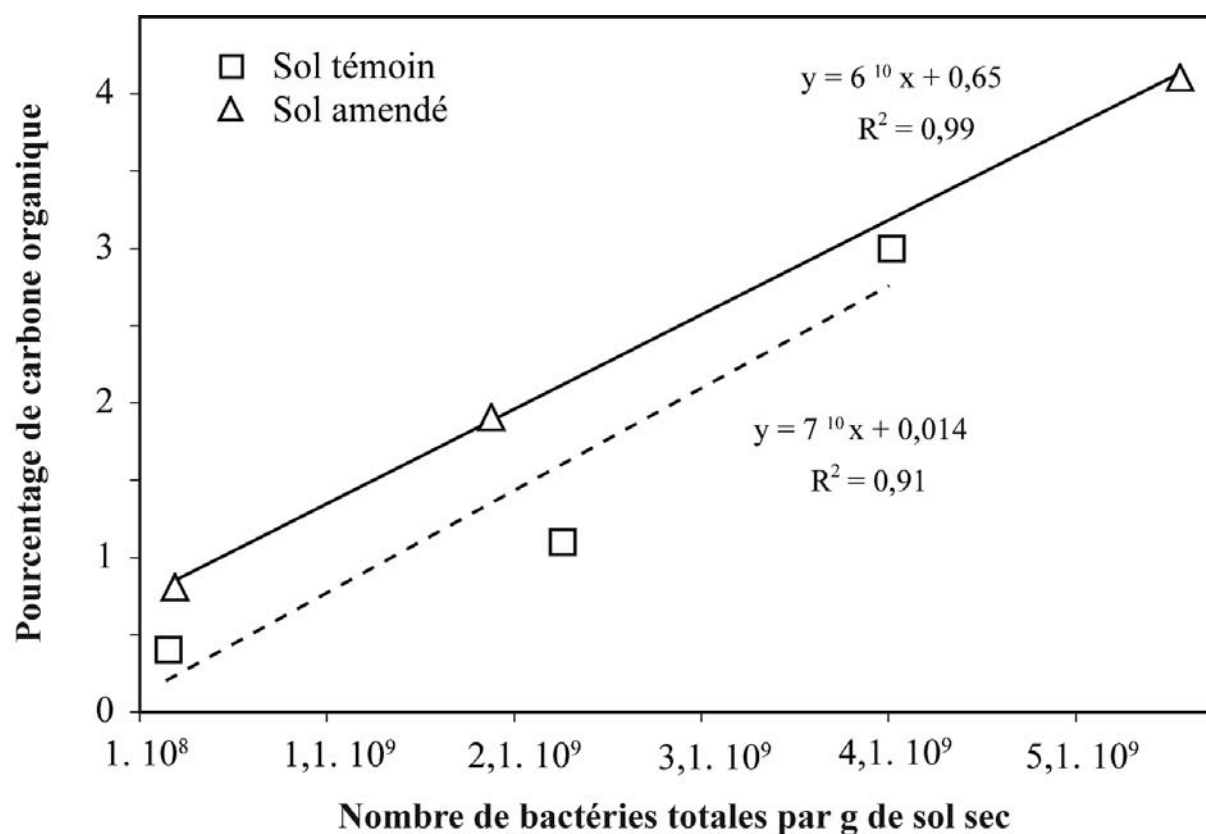


Figure 4- 2. Corrélation entre le pourcentage de carbone organique et le nombre de bactéries dans les horizons de sol amendé et témoin sous lande (mesures Juillet 2008)

I. 3. 2 . Richesse fonctionnelle potentielle de dégradation de substrats carbonés des communautés bactériennes

La capacité des communautés à dégrader différentes sources de carbone, appelée « richesse fonctionnelle potentielle » a été mesurée (Figure 4-3) après une mise en incubation de 4 jours de chaque communauté bactérienne dans des microplaques BIOLOG ecoplates® en déterminant le nombres de puits où la densité optique est supérieure à 0,25 (Plassart et al., 2008).

L'effet de l'amendement sur la richesse fonctionnelle des communautés de chaque horizon des deux sols a été testé par des analyses de variances (ANOVA 1 facteur) et par le test de Tukey HSD (Seuil de significativité de $P < 0,05$ avec $n = 4$).

Que les sols soient amendés ou non, les résultats des tests mettent en évidence une différence significative de la richesse fonctionnelle potentielle des communautés isolées en fonction de la période d'échantillonnage (Novembre 2007, Avril et Juillet 2008, Juillet 2009). Elle est toujours plus élevée en été, notamment en 2008. Elle est minimale dans les horizons de surface en hiver (novembre 2007).

Excepté en novembre, pour une même date d'échantillonnage, la richesse fonctionnelle potentielle est toujours significativement supérieure pour les communautés isolées des horizons de surface du sol amendé par rapport à celles isolées du sol témoin. Aucune différence significative n'est observée en général pour les communautés extraites des horizons plus profonds (notamment horizon Bs).

Dans le sol témoin, les sources de carbones utilisées par les communautés isolées varient suivant l'horizon et suivant la saison des prélèvements (données non montrées). En novembre, lorsque l'activité bactérienne est ralentie à l'arrivée de l'hiver, les communautés isolées des horizons de surface A1 et E ne dégradent que les polymères et quelques hydrates de carbone (D-mannitol et N-acetyl-D-glucosamine). En revanche, les communautés isolées de l'horizon Bs dégradent la plus grande partie des substrats carbonés. En avril, les communautés isolées des horizons de surface dégradent plus de substrats qu'en novembre. Cette capacité à dégrader divers substrats carbonés peut-être reliée à l'activité biologique qui redémarre parallèlement à la saison de végétation.

Pour les communautés isolées du sol amendé, les mêmes tendances sont observées entre saisons dans les horizons de surface. Si on compare au sol témoin, les communautés

isolées de ces horizons de surface dégradent plus de substrats comme certains hydrates de carbones (D-xylose, α -D-Lactose) et acides carboxyliques.

En été, quels que soient les horizons et le type de sol, les communautés ont dégradé plus de substrats en 2008 qu'en 2009 ; De plus, à une même date, très peu de différences sont observées entre les profils métaboliques des communautés bactériennes extraites de ces sols.

L'analyse des profils métaboliques montre une augmentation significative du niveau d'utilisation des substrats carbonés lié à la fois au changement de saison et à l'amendement. Cette différence indique soit un changement de la structure des communautés bactériennes, soit une adaptation de ces communautés suite à l'amendement conduisant à une augmentation de leur activité. En accord avec nos résultats, les travaux de (Frostegård et al., 1993) ne montrent pas de changement dans la structure des communautés bactériennes suite à un amendement calco-magnésien mais ils mettent en évidence une augmentation significative de la biomasse microbienne et des activités de dégradation des substrats carbonés (test BIOLOG).

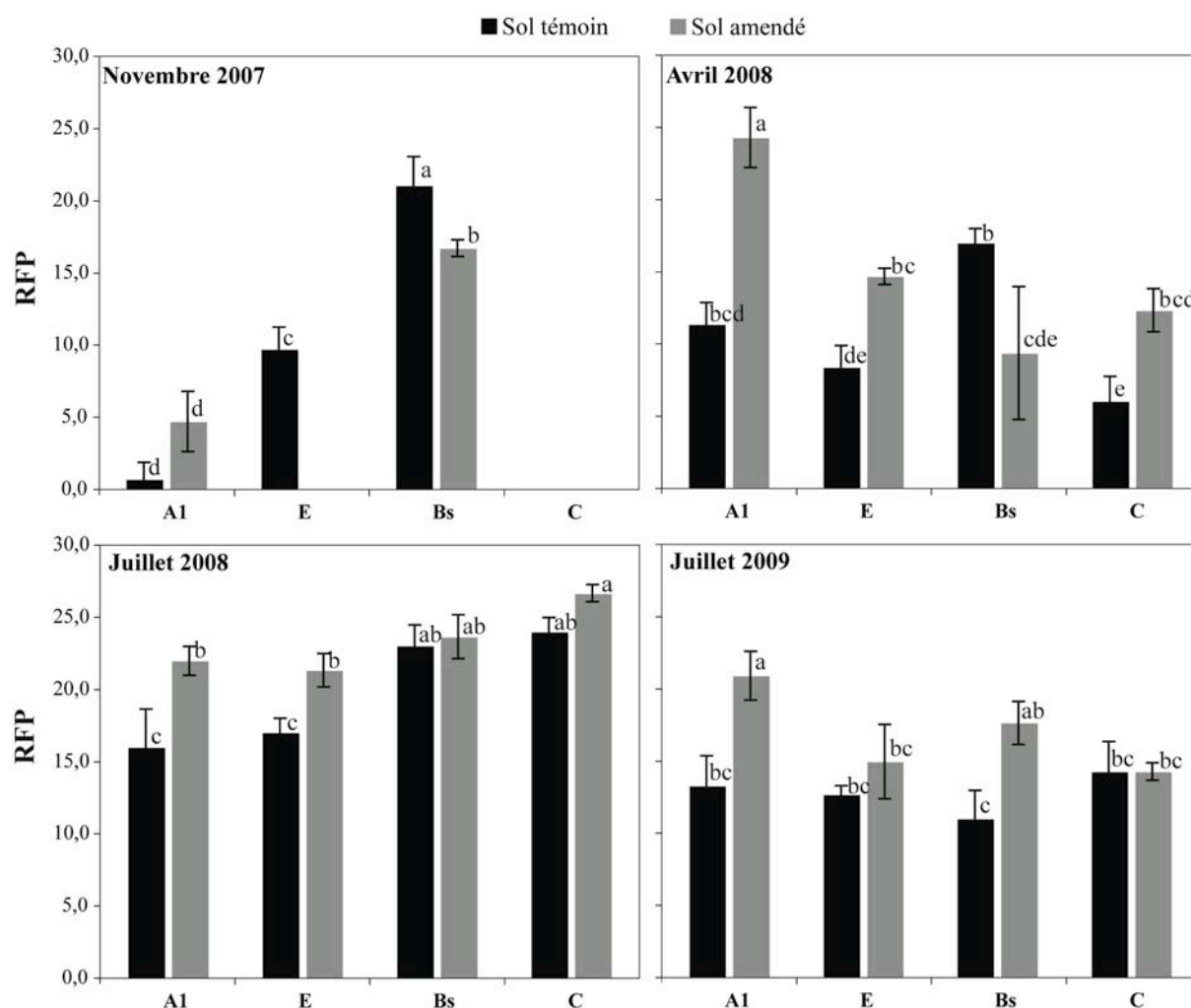


Figure 4- 3. Richesse fonctionnelle potentielle (RFP) des communautés bactériennes extraites des sols témoin et amendé sous landes. Chaque barre représente la moyenne réalisée sur 3 réplicats et les barres d'erreurs sont les écarts types. Les symboles a, b, c correspondent aux différents groupes de significativité obtenus par ANOVA à 1 facteur et par le test de Tukey ($P=0,0005$) sur 3 répétitions.

1. 3. 3 . Potentiel d'altération des phyllosilicates par les communautés bactériennes isolées directement des sols sous landes

Les communautés bactériennes extraites de différents horizons de sols échantillonnés en novembre 2007, avril 2008, juillet 2008 et juillet 2009 ont été mises en présence de phlogopite et de glucose dans des puits de microplaques et les quantités de fer et protons en solution ont été mesurées après 3 jours (voir chapitre 2 méthodologie pour plus de détails sur

les milieux ajoutés). Les résultats ont été reportés dans le modèle empirique décrivant le potentiel d'altération des bactéries et sont illustrés dans la figure 4-4.

Que l'on considère le sol témoin (Figure 4-4 A) ou le sol amendé (Figure 4-4 B), le potentiel d'altération du phlogopite par les communautés bactériennes extraites varie en fonction de la saison et le processus d'altération impliqué est constant quelle que soit la profondeur. Les communautés extraites du sol témoin en saison hivernale (novembre 2007 et avril 2008) induisent un processus d'acidolyse conduisant à la lixiviation du fer du phlogopite. En saison estivale (juillet 2008 et 2009), le processus impliqué par les communautés bactériennes est la complexolyse.

Dans le sol amendé, le processus dominant impliqué par les communautés bactériennes lors de l'altération du phlogopite est l'acidolyse en novembre 2007 et avril 2008 mais le processus tend dans quelques horizons à la complexolyse. En été, et notamment en juillet 2008, le processus clairement impliqué par les communautés bactériennes est la complexolyse.

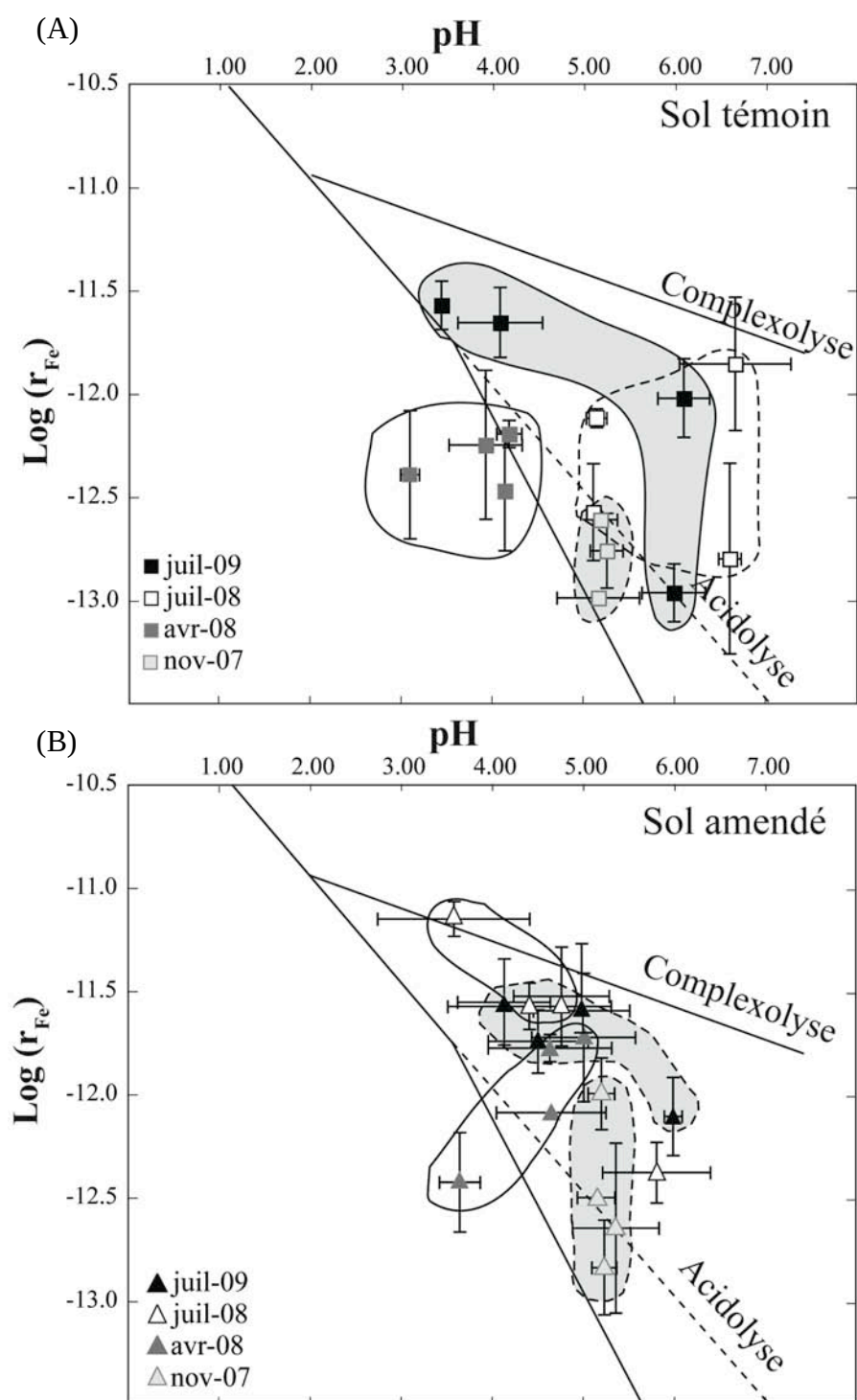


Figure 4- 4. Corrélation entre le pH et le fer (mesurés dans les puits des microplaques) illustrant le potentiel d'altération des communautés bactériennes extraites des différents horizons de sols témoin (A) et amendé (B) sous landes. Chaque point représente la moyenne et l'écart type réalisés

À une même date de prélèvement, si on compare au sol témoin, les communautés extraites du sol amendé permettent une lixiviation plus importante de fer. Le processus induit par les communautés bactériennes extraites du sol amendé et menant à la lixiviation du fer depuis le phlogopite est majoritairement la complexolyse. Les communautés du sol témoin

induisent une faible complexolyse (contribution importante des protons) ou une acidolyse franche en hiver. Ce potentiel d'altération plus efficace des communautés issues du sol amendé suggère une libération plus importante d'acides organiques ou une libération d'acides organiques plus complexants.

Les acides organiques produits par chaque communauté ont été déterminés et quantifiés à la fin de chaque expérience. Le pourcentage de carbone métabolisé par rapport au carbone utilisé a été calculé et est présenté en fonction du taux de libération du fer $\log(r_{Fe})$ dans la figure 4-5. Comme précédemment observé (Chapitre 3, I.4), nos résultats mettent en évidence une corrélation positive entre le pourcentage de carbone métabolisé et $\log(r_{Fe})$. Ainsi, plus il y a de métabolites sécrétés en solution, plus il y a de fer lixivié à partir du phlogopite. Deux tendances peuvent par ailleurs être distinguées en fonction de l'origine de la communauté bactérienne (sol témoin ou amendé) :

- Les communautés extraites du sol témoin, métabolisent une grande quantité de carbone au cours de l'expérience, de l'ordre de 1 à 10 %. Parallèlement, le taux de libération du fer varie de 10^{-13} à 10^{-12} mol.m⁻².s⁻¹.

- Les communautés extraites du sol amendé, métabolisent une plus faible quantité de carbone au cours de l'expérience (de l'ordre de 1 à 5 %). Parallèlement, le taux de libération du fer est plus variable, de 10^{-13} à 10^{-11} mol.m⁻².s⁻¹, mais nettement plus important (globalement d'un facteur 10).

Ces tendances soulignent bien le fait que les bactéries extraites du sol amendé sont plus « complexantes ». Elles libèrent des acides organiques très chélatants comme l'acide citrique ou l'acide oxalique. Les bactéries extraites du sol témoin libèrent des grandes quantités d'acides organiques peu chélatants comme les acides lactique ou acétique.

La plus ou moins grande disponibilité dans le milieu naturel de certains éléments nutritifs pourrait expliquer la variabilité du potentiel d'altération de minéraux par les bactéries. Les communautés bactériennes extraites du sol amendé se sont adaptées à leur milieu et semblent être devenues plus efficaces à lixivier le fer du phlogopite dans le milieu.

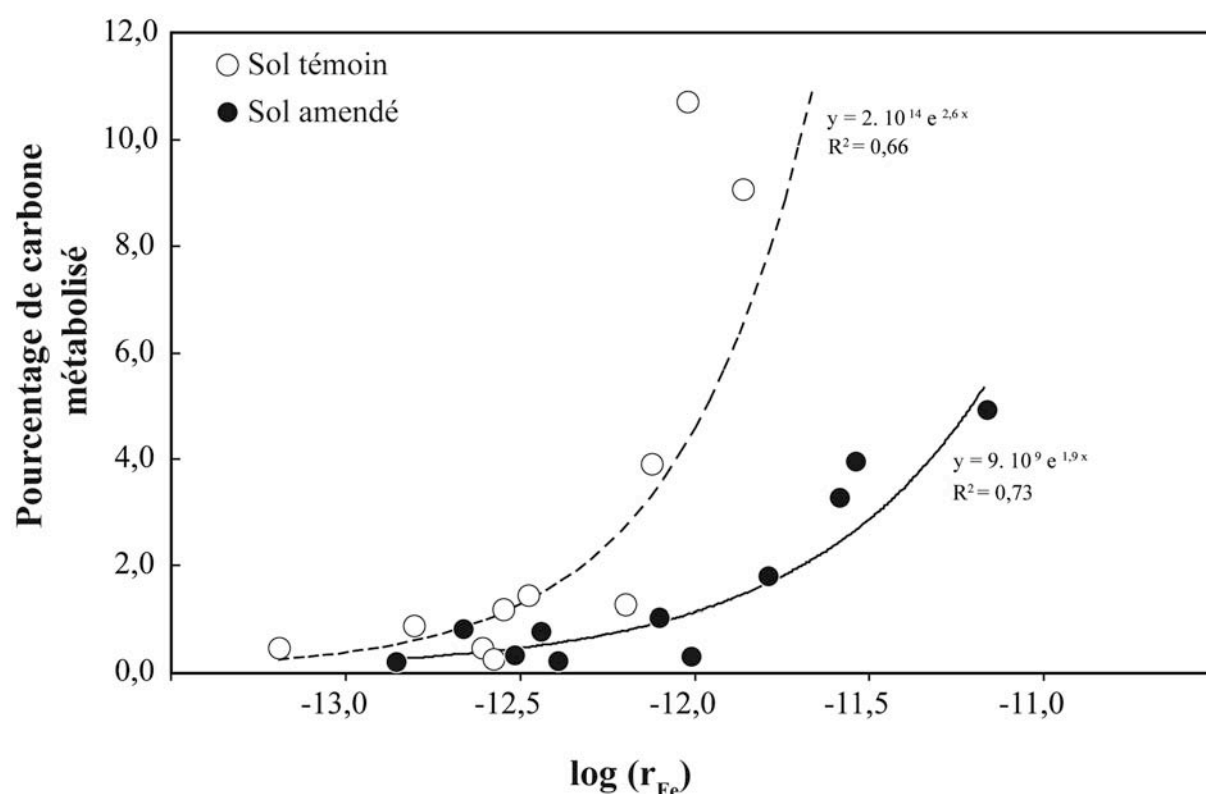


Figure 4- 5. Pourcentage de carbone métabolisé en fonction du taux de libération du fer $\log (r_{Fe})$ dans les expériences réalisées avec les communautés bactériennes extraites des sols témoin et amendé sous landes. Chaque point correspond à la mesure unique d'un échantillon moyen issu de 4 répétitions.

La variation du potentiel d'altération des communautés mise en évidence dans cette étude est cohérente avec la variation observée de la richesse fonctionnelle potentielle (RFP) des mêmes communautés bactériennes lors de la dégradation de différents substrats carbonés. Par exemple, en avril 2008, la RFP des communautés extraites des horizons A et E est significativement plus élevée dans les sols amendés que celle du sol témoin (dans les horizons profonds, cette différence est moins nette). Ces mêmes tendances sont observées en considérant le potentiel d'altération du phlogopite par les communautés bactériennes.

Dans les horizons de surface du sol témoin, l'acidolyse est le processus dominant (le fer n'a pas été lixivié en solution avec les communautés extraites de l'horizon A). Dans les horizons A et E du sol amendé, le processus impliqué est la complexolyse. Le potentiel de ces communautés à lixivier le fer est donc plus efficace.

Le processus d'altération impliqué par les communautés mis en évidence dans cette étude est relativement constant d'une saison à l'autre ce qui renforce voire valide l'approche critiquable utilisée pour échantillonner chaque profil de sol avec peu de répétitions et en faisant un échantillon moyen par horizon (mélange de 3 échantillons de sols). Ces prélèvements « rapides » semblent donc pouvoir être utilisés, même dans des sols hétérogènes, pour caractériser le phénotype des communautés bactériennes fonctionnelles impliquées dans la lixiviation du fer.

Pour résumer, l'amendement a eu un effet positif, rapide et persistant plusieurs années après traitement, sur la richesse fonctionnelle des communautés bactériennes extraites des sols et sur leur potentiel d'altération des minéraux.

I. 3. 4 . Effet du couvert végétal sur les communautés bactériennes fonctionnelles extraites des sols témoins et amendés

Dénombrement des bactéries :

Le nombre de bactéries totales et cultivables par gramme de sol sec a été déterminé pour tous les horizons des sols témoin et amendé prélevés en juillet 2009 sous forêt. Les résultats sont reportés sur la figure 4-6 où sont également illustrés ceux obtenus à la même date sous landes.

La même tendance que celle décrite sous landes est observée pour les bactéries extraites des sols amendés ou non sous forêt : le nombre de bactéries diminue avec la profondeur depuis l'horizon de surface A1 jusqu'aux horizons plus profonds Bs. Le nombre de bactéries totales dans les sols amendés ou non sous forêt est en général du même ordre de grandeur que celui déterminé sous landes dans ces horizons. La proportion de bactéries cultivables est proche dans les sols témoins sous lande et sous forêt. Par contre, dans les sols amendés sous forêt, les bactéries cultivables sont 10 à 100 fois moins nombreuses que sous landes, sauf dans l'horizon A1 où leur nombre est proche. Ainsi, l'amendement ne semble pas avoir eu d'effet sur le nombre de bactéries cultivables dans les sols sous forêt, contrairement ce que nous avons observé sous landes.

Sous landes, une litière était présente sur le site du sol témoin, mais elle n'a pas été échantillonnée. Cet horizon O était absent (« fondue ») sur le site d'échantillonnage du sol amendé.

Sous forêt, dans le sol témoin, l'horizon Oh bien développé a été prélevé pour analyses (il est peu développé sur le site amendé et n'a pas été prélevé). Le nombre de bactéries totales est 10 fois moins important dans cet horizon Oh témoin que dans l'horizon A1. La proportion de bactéries cultivables est au contraire 10 fois plus importante dans l'horizon Oh que dans l'horizon A1 sous forêt et 1000 fois plus importante que dans l'horizon A1 sous landes.

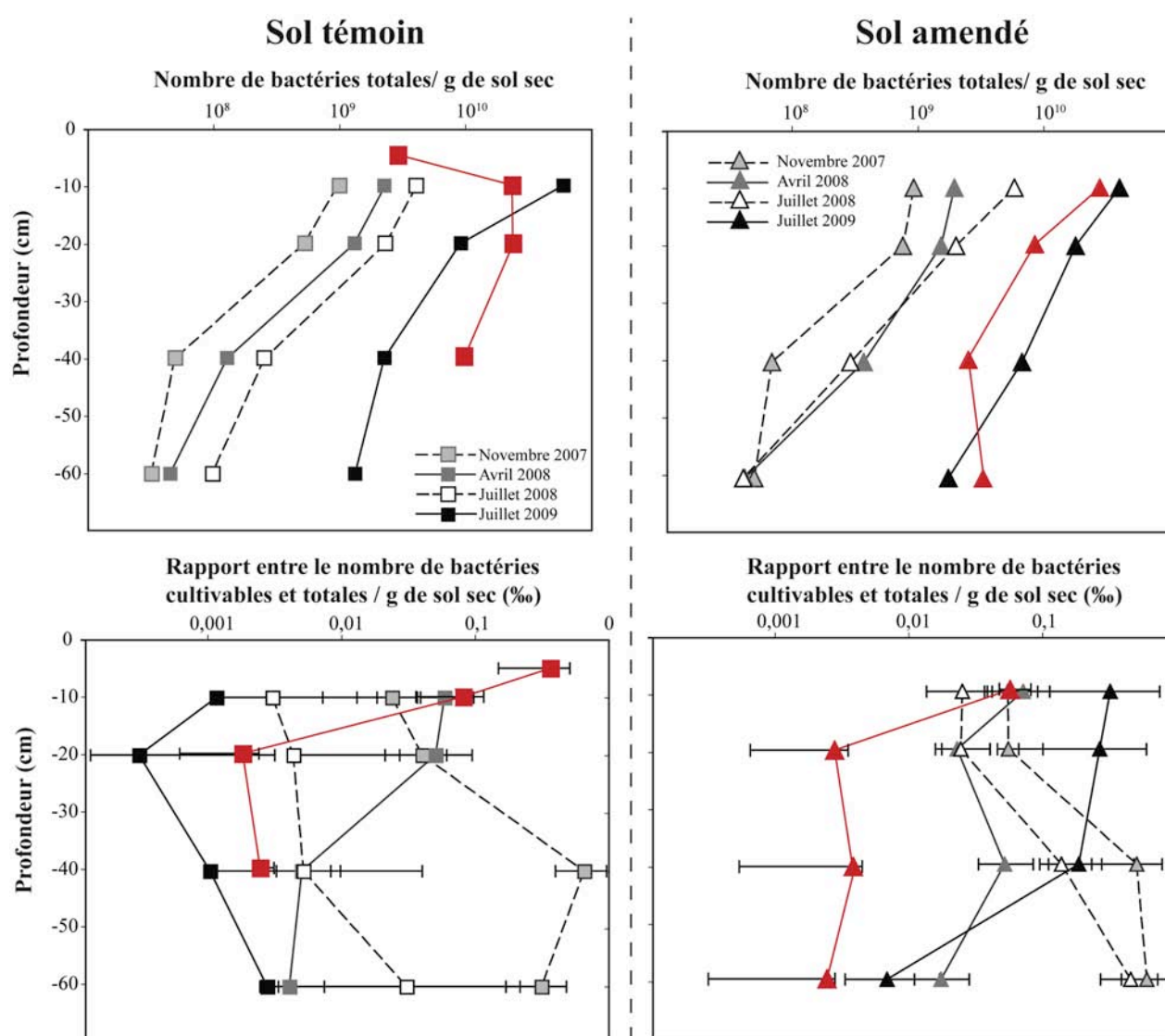


Figure 4- 6. Nombre de bactéries totales par gramme de sol sec et proportion de bactéries cultivables par rapport aux bactéries totales, exprimée en pour mille (‰), pour les sols témoin et amendé sous landes (en noir) et sous forêt (en rouge)

Richesse fonctionnelle potentielle de dégradation des substrats carbonés (Biolog):

En Juillet 2009, sous landes, la richesse fonctionnelle potentielle des communautés bactériennes extraites des horizons A1, E et Bs du sol témoin est différente de celle des communautés extraites du sol amendé, ce qui est cohérent avec nos précédentes observations, et suggère une augmentation significative du niveau d'utilisation des substrats carbonés liée à l'amendement. Par contre sous forêt, l'amendement n'a eu aucun effet significatif sur l'utilisation des substrats carbonés par les communautés bactériennes (Figure 4-7).

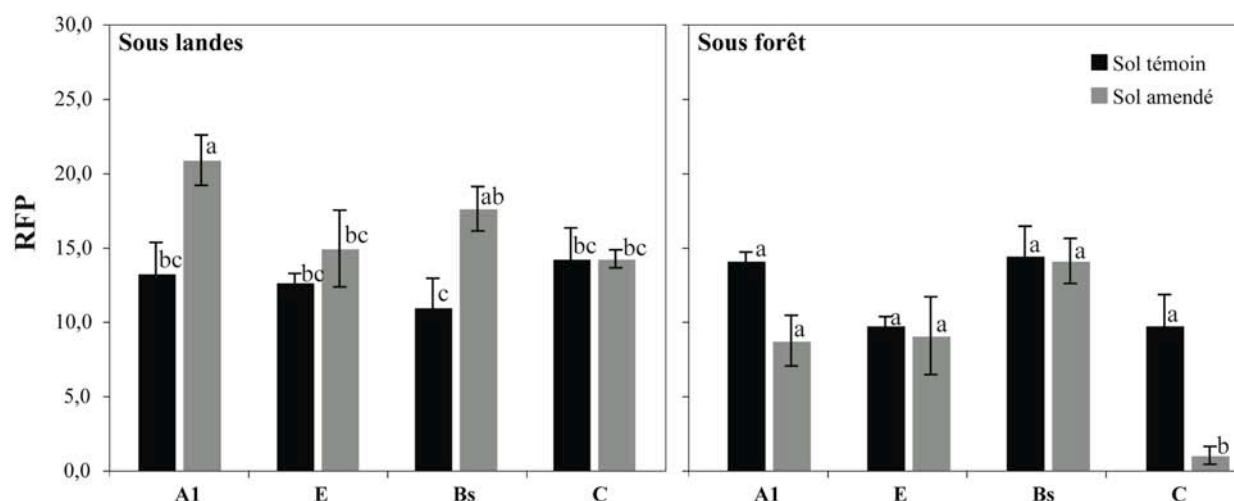


Figure 4- 7. Richesse fonctionnelle potentielle des communautés bactériennes extraites des sols témoin et amendé sous landes et sous forêt en Juillet 2009. Chaque barre représente la moyenne réalisée sur 3 réplicats et les barres d'erreurs sont les écarts types. Les symboles a, b, c correspondent aux différents groupes de significativité obtenus par ANOVA à 1 facteur et par le test de Tukey ($P=0,0005$) sur 3 répétitions.

Potentiel d'altération des phyllosilicates par les communautés bactériennes extraites directement des sols amendés ou non sous forêt :

La diversité du potentiel d'altération de phlogopite par des communautés bactériennes extraites de sols témoin et amendé sous forêt en juillet 2009 est illustrée sur la figure 4-8.

Sous forêt, les mêmes tendances que celles présentées sous landes entre le sol témoin et amendé peuvent être observées : (1) les communautés bactériennes extraites du sol amendé induisent clairement un processus de complexolyse, quel que soit l'horizon de sol considéré ; (2) dans le sol témoin, le processus impliqué par les communautés bactériennes lors de la lixiviation du fer du phlogopite est très clairement l'acidolyse quel que soit l'horizon de sol considéré. Sous lande, la différence de potentiel d'altération entre les sols témoin et amendé est moins claire car une faible contribution de la complexolyse s'ajoute au processus d'acidolyse dans certains horizons du sol témoin.

Nos résultats suggèrent que le couvert végétal n'a aucune influence sur le potentiel d'altération des communautés bactériennes extraites du sol amendé. Un faible effet est cependant visible sur les sols témoins, ceux sous forêt ayant des communautés bactériennes induisant seulement de l'acidolyse. Alors que l'amendement n'a eu aucun effet sur l'utilisation des substrats carbonés des communautés bactériennes extraites des sols sous forêt, il a un effet marqué sur le potentiel d'altération de ces communautés. Celles ci induisent en effet un processus de complexolyse plus efficace pour altérer les minéraux.

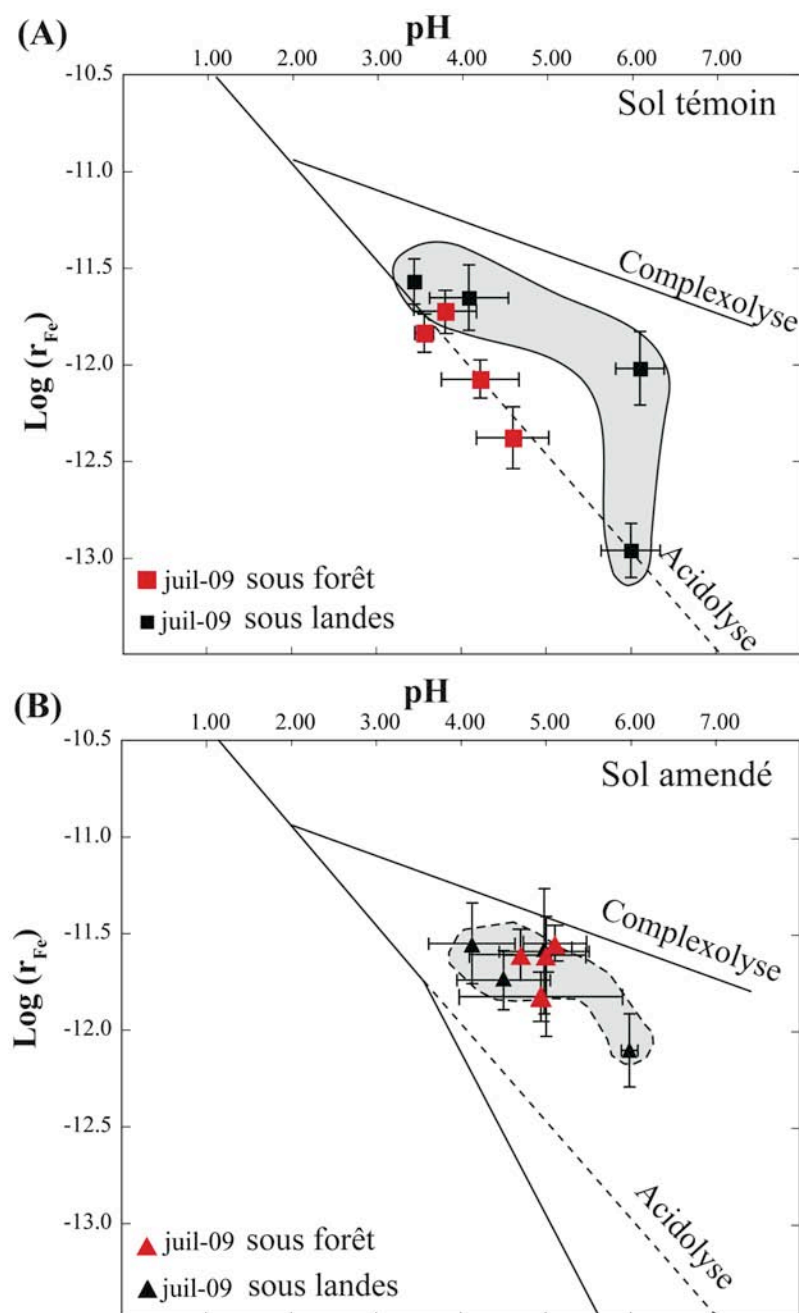


Figure 4- 8. Potentiel d'altération des communautés bactériennes extraites de différents horizons des sols témoin (A) et amendé (B) en été 2009 sous landes et sous forêt. Chaque point représente la moyenne et l'écart type réalisés sur 4 répétitions.

I. 4 . Synthèse intermédiaire sur l'effet d'un amendement calco-magnésien sur la fonction d'altération des communautés bactériennes extraites de sols podzolisés

Sous landes, l'amendement a eu un effet positif (1) sur la biomasse bactérienne cultivable, (2) sur la richesse fonctionnelle traduite par une augmentation significative du niveau d'utilisation des substrats carbonés et (3) sur le potentiel de lixiviation du fer lors de

l'altération de phlogopite par les communautés bactériennes extraites. Concernant cette dernière fonction, l'effet de l'amendement est également visible sous forêt. Nos résultats démontrent que les bactéries extraites des sols amendés sous les deux types de végétation (landes et forêt) sont plus « complexantes » et libèrent des acides organiques très chélatants alors que les bactéries extraites du sol témoin libèrent des grandes quantités d'acides organiques peu complexants. Nos résultats mettent également en évidence un effet saisonnier sur le potentiel d'altération de la phlogopite par les communautés bactériennes extraites des sols témoin et amendé. Sur site amendé, l'effet de l'amendement semble « gommer » l'effet éventuel du type de végétation sur les activités bactériennes.

Les processus bactériens d'altération mis en évidence au laboratoire peuvent être reliés à des résultats d'analyses d'acides organiques réalisées sur les solutions de sol gravitaires échantillonnées à différentes profondeurs dans les sols témoin et amendé sous landes, aux dates d'échantillonnage des sols (Novembre 2007, Avril 2008 et Juillet 2008). Un effet amendement peut être distingué sur les acides organiques en solution (Figure 4-9). En particulier, l'acide gluconique est produit en plus grande quantité dans les solutions du sol amendé. Comme l'acide gluconique est un acide produit exclusivement par les bactéries, ce résultat suggère une biomasse et/ou une activité bactérienne plus importante dans le sol amendé ce qui est cohérent avec nos précédent résultats.

L'acide oxalique reconnu comme un produit excrété par les plantes pour acquérir le magnésium (et calcium) dans les sols ne semble pas ou très peu varier suite à l'amendement. Les faibles variations semblent plus attribuées à un effet saisonnier.

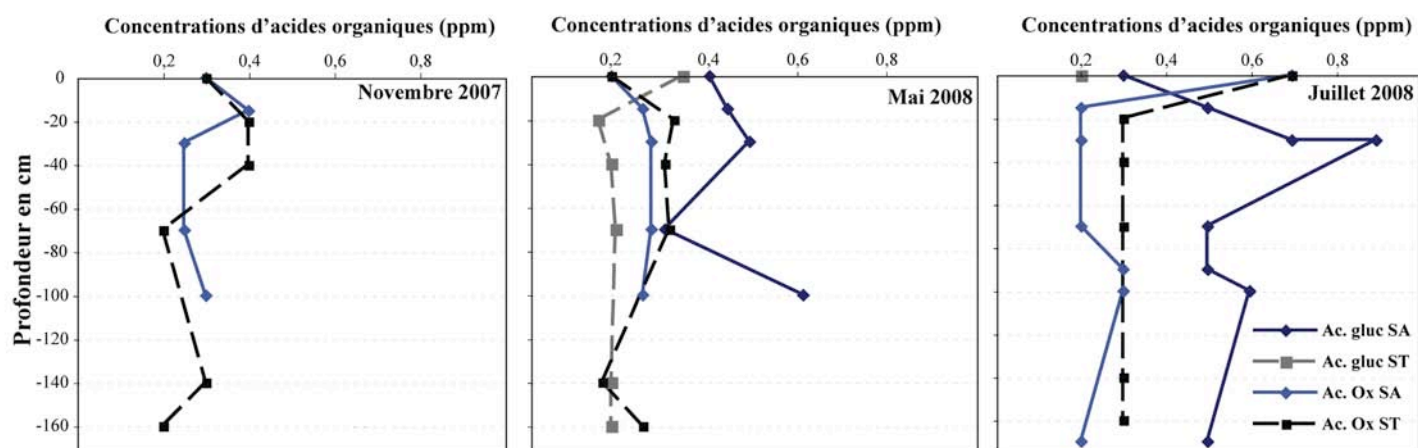


Figure 4- 9. Concentrations en acides organiques des solutions de sol gravitaires échantillonnées à différentes dates sur les sites témoin et amendé sous landes. Seuls les acides gluconique et oxalique sont au-dessus de la limite de détection. Chaque point correspond à la mesure unique d'un échantillon moyen.

II . POTENTIEL D'ALTERATION DE PHYLLOSILICATES PAR DES BACTERIES ISOLEES DE SOLS TRES CONTRASTES

Il existe une très grande diversité de sols se formant et évoluant différemment principalement sous l'action du climat (échelle globe), des roches mères (échelle régionale à locale), des reliefs (échelle paysage) et du type d'occupation végétale et/ou humaine (échelle parcelle). Les profils de sols se différencient verticalement en horizons considérés macroscopiquement comme homogènes. Mais à l'échelle d'une bactérie, au sein d'un horizon, le sol peut être considéré comme une succession de micro habitats très hétérogènes, soumis à des conditions physicochimiques variables dans le temps (effet saisonnier).

Ces micro habitats sont des environnements généralement oligotrophes, notamment dans les horizons minéraux. La rhizosphère des plantes correspond à un environnement plus favorable aux microorganismes, car les racines des plantes libèrent dans cette zone des exsudats riches en divers composés carbonés. Cependant, la rhizosphère des plantes impacte majoritairement les horizons organiques (O) et organo-minéraux (A1) des sols mais beaucoup moins les horizons profonds. Dans ces horizons minéraux, les bactéries doivent donc s'adapter et développer des stratégies pour leur survie. Chaque bactérie possède des avantages physiologiques spécifiques lui permettant de produire une large gamme d'acides organiques. Dans le chapitre 3, nous montrons que la nature des acides organiques produits par une souche bactérienne est variable suivant les conditions expérimentales de croissances (source de carbone ou préculture). Dans le milieu naturel, il est probable que les multiples conditions environnementales entraînent la production par les bactéries d'acides organiques divers qui agiront plus ou moins sur les particules minérales.

Sous des climats tempérés, l'altération des minéraux est qualifiée d'altération « biochimique ». Le régime de précipitation, les températures, la nature de la roche, des conditions de drainage, le pH des solutions de sols, et naturellement les activités biologiques ont une action intégrée qui conduit à la formation d'un type d'humus, à l'altération plus ou moins poussée des particules minérales dans les sols et à l'évolution d'un type de sol. En terme de pédogenèse à l'échelle du profil de sol, trois principaux processus d'altération peuvent être distingués (Campy, 2003) :

- (1) l'acidolyse sous l'influence d'un humus de type mull, le sol ayant une activité biologique élevée et une capacité d'échange cationique moyenne. Ce processus est caractéristique en particulier des cambisols au sens large,
- (2) la complexolyse sous l'influence d'un humus de type mor. Le sol est caractérisé par une faible activité biologique et une capacité d'échange cationique faible. Ce processus est typique de la podzolisation et conduit à la formation de sols de type podzol,
- (3) l'hydrolyse neutre sous l'influence d'un humus de type mull. Ce processus a lieu essentiellement dans les sols calcaires caractérisés par une forte activité biologique et une grande capacité d'échange cationique.

Le lien entre ces processus d'altération biochimique à l'échelle du profil de sol et les processus d'altération des minéraux par les bactéries n'a jamais encore été réalisé.

En revanche, des travaux mettent en évidence une corrélation entre les conditions de l'environnement « sol » et les processus d'altération par les bactéries. Cependant tous les travaux existants se sont limités à une étude dans les premiers centimètres du sol. Certaines études ont par exemple mis en évidence un potentiel d'altération de minéraux différent suivant l'origine de la souche bactérienne (Calvaruso et al., 2006; Calvaruso et al., 2007; Uroz et al., 2007; Koele et al., 2009; Leveau et al., 2009; Uroz et al., 2009). Ainsi, les souches bactériennes isolées de la rhizosphère et de la mycorrhizosphère ont un plus grand potentiel d'altération en comparaison des bactéries isolées du sol non rhizosphérique et certaines souches (les plus efficaces) sont capables de s'adapter à des conditions de pauvreté en nutriments. L'altération des silicates par les bactéries dans les sols semble donc liée à la richesse en éléments nutritifs organiques et minéraux du milieu.

Le travail qui suit est guidé par 3 principaux objectifs : (1) caractériser le potentiel d'altération de particules de phlogopite par des bactéries extraites de différents sols suivant la méthode décrite et validée dans le chapitre 3, (2) établir un lien entre les différents paramètres physico-chimiques des sols échantillonnés et les processus d'acidolyse ou de complexolyse induits par les bactéries et (3) comparer les processus bactériens d'altération de phlogopite à l'échelle des profils de sols.

Les communautés bactériennes étudiées ont été extraites après échantillonnage de huit sols représentatifs des grands types de pédogenèse en Lorraine : (1) leptosol rendzique

(rendzine), (2) leptosol rendzique colluvial (rendzine colluviale), (3) cambisol calcique (sol brun calcaire), (4) luvisol (sol brun lessivé), (5) cambisol dystrique (sol brun acide), (6) podzol, (7) podzol leptique (sol cryptopodzolique) et (8) luvisol gleyique (sol brun lessivé à pseudogley). Ce dernier type de sol a été échantillonné sous trois occupations végétales différentes : une prairie temporaire, une culture et une forêt (hêtres et chênes). Tous les profils sont connus, les sols caractérisés et des fosses permanentes sont utilisées en tant que profils de référence utiles pour l'enseignement de la pédologie en Lorraine. Les localisations et les descriptions précises des profils sont données dans le chapitre 2. Les caractéristiques physico-chimiques des différents horizons composant ces sols ont été à nouveau déterminées au LIMOS dans le cadre de ce travail. Nos résultats d'analyses ont été comparés aux anciennes analyses existantes.

II. 1 Caractéristiques générales des sols échantillonnés

Les valeurs de pH, la teneur en carbone organique et les concentrations en éléments échangeables mesurées dans le cadre de cette thèse sont présentées pour chaque horizon de sol échantillonné dans le tableau 4-3.

Tous ces paramètres pourraient avoir une influence sur le potentiel d'altération des minéraux par les bactéries ainsi que sur leur structure et sur d'autres activités. C'est ce que suggèrent nos résultats du chapitre 3. II. obtenus en conditions expérimentales sur des souches pures. En conditions naturelles, il a également été démontré dans d'autres études que le pH du sol était un déterminant majeur de la diversité et de l'activité microbienne des sols (Anderson et Nilsson, 2001). La teneur en matière organique est aussi un paramètre important influençant le nombre et l'activité des bactéries dans les sols (partie précédente). Ces matières organiques sont un des constituants majoritaires de la fraction solide dans les horizons de surface, elles sont très réactives et représentent « la source » ou « le stock » d'énergie pour les microorganismes (Girard et al., 2005). L'occupation végétale peut aussi avoir une importance primordiale dans la distribution et l'activité des bactéries. Les plantes influencent la teneur en MO du sol (donc la CEC) ainsi que la disponibilité des éléments nutritifs via (1) l'action des racines leur turnover et la sécrétion des exsudats racinaires (2) les prélèvements de nutriments fonction des besoins nutritionnels des plantes (3) le recyclage lors de la chute des litières et la minéralisation plus ou moins rapide des matières organiques.

Tableau 4- 3. Caractéristiques physico-chimiques des horizons de sols échantillonnés

(le signe – signifie que les valeurs sont en dessous de la limite de détection)

Sol	Horizons de sol	Profondeur (cm)	C org (%)	pH	Cations échangeables (cmol ⁺ .Kg ⁻¹ de sol)				
					CEC	Mg	Fe	Ca	Al
Sol cryptopodzolique (Podzol leptique)	A1	0-20	3.0	3.93	1.62	0.04	0.07	0.57	0.31
	A2	20-30	1.1	3.87	1.08	0.02	0.09	0.26	0.57
	Bs	30-70	0.4	4.33	0.90	0.01	0.31	0.16	1.07
Sol brun acide (Cambisol dystrique)	A1	0-30	2.3	3.74	1.75	0.02	0.26	-	1.37
	B	30-60	0.3	4.54	0.75	-	-	-	0.64
	C	> 60	0.05	4.58	1.31	-	-	-	1.07
Podzol	A1	0-30	12.0	3.96	1.01	0.14	0.04	0.10	0.30
	A2	30-40	0.5	4.30	0.14	-	-	-	0.06
	Bh	40-50	4.7	3.68	3.20	0.05	0.18	-	2.84
	Bs	50-70	2.4	4.76	0.82	-	0.03	-	0.69
	C	> 70	0.6	4.75	0.52	-	-	-	0.36
Rendzine (Leptosol rendzique)	A1	0-30	6.6	7.40	46.25	0.45	-	44.95	0.05
	B/C	30-60	3.8	8.20	42.21	0.22	-	41.6	0.05
Rendzine colluviale (Leptosol rendzique colluvial)	A1	0-30	7.2	7.80	28.54	0.34	-	27.54	0.03
	B/C	30-60	2.3	8.50	36.45	0.11	-	36.13	0.03
Sol brun calcaire (Cambisol calcique)	A1	0-15	1.3	5.90	1.31	0.12	-	0.97	-
	B	15-30	0.2	6.60	17.62	0.29	-	16.96	0
	C	> 30	0.6	7.90	19.49	0.49	-	18.45	0.07
Sol brun lessivé (Luvisol)	A1	0-15	2.7	5.40	4.17	0.33	-	3.38	0.03
	A2	15-30	1.0	4.40	1.74	0.05	-	0.64	0.91
	B	> 30	0.3	4.70	6.78	0.89	-	3.46	2.02

Le podzol, le cambisol dystrique et le podzol leptique, développés sur des roches mères détritiques siliceuses (grès) acides voir très acides, ont des pH variant de 3,7 à 4,8. Le luvisol et le luvisol gleyique sont formés sur une formation superficielle essentiellement limoneuse et ont des pH variant de 4,5 à 6,3. Les pH des sols développés sur roche mère calcaire, c'est-à-dire le leptosol rendzique, le leptosol rendzique colluvial et le cambisol

calciqie varient de 7,4 à 8,5. Dans chaque profil, les horizons de surface ont des valeurs de pH plus faibles que les horizons profonds, excepté pour le sol brun lessivé sur limons.

Les capacités d'échange cationique (CEC) et les teneurs en éléments échangeables dans les différents sols sont bien corrélées aux valeurs de pH des sols et à la richesse des roches mères en minéraux altérables.

Le podzol, le cambisol dystrique et le podzol leptique, développés sur des grès pauvres en magnésium et calcium, ont des CEC faibles, variant de 0,14 à 3,2 $\text{cmol}^+.\text{Kg}^{-1}$ de sol. L'aluminium échangeable (toxique pour des pH inférieurs à 3) est très majoritaire sur le complexe d'échange. Les sols sont donc très désaturés. Dans chaque profil, les horizons de surface ont une CEC plus élevée car ils sont plus riches en matière organique que les horizons profonds.

Les horizons du luvisol et du luvisol gleyique développés sur limons ont des capacités d'échange cationique variant de 6 à 18 $\text{cmol}^+.\text{Kg}^{-1}$ de sol. Le complexe d'échange de ces sols est relativement saturé en cations alcalins et alcalino-terreux excepté parfois dans les horizons A2 éluviaux, appauvris.

Le leptosol rendzique, le leptosol rendzique colluvial et le cambisol calciqie développés sur roche calcaire ont des capacités d'échange cationique élevées, variant de 17 à 47 $\text{cmol}^+.\text{Kg}^{-1}$ de sol. Le complexe d'échange de ces sols est toujours saturé par le calcium échangeable (qui représente plus de 98 % des « bases » échangeables).

Ces sols ont donc des pH et des teneurs en éléments échangeables très différents qui peuvent influencer la distribution et l'activité des bactéries.

Les analyses physico-chimiques des horizons du luvisol gleyique, à partir duquel les communautés bactériennes ont été extraites sous différentes occupations végétales (correspondant à divers degrés d'anthropisation), sont présentées dans le tableau (4-4). Aucune analyse n'a été réalisée sous la culture, nous avons fait l'hypothèse qu'il n'y aurait pas de différence significative entre le sol de cette parcelle et celui de la parcelle sous prairie qui est cultivée tous les 3 ans.

Sous forêt, le pH de tous les horizons est légèrement plus acide et la teneur en carbone organique est plus importante que le sol sous prairie (de l'ordre de 4,1% contre 3,4%). La capacité d'échange cationique du sol sous forêt est 2 fois plus faible que celle du sol

développé sous prairie. Le sol sous forêt se situe en haut de pente alors que le sol sous prairie se situe un peu en contrebas, sur faible pente. Ainsi, un phénomène de lessivage des argiles latéralement depuis le sol sous forêt vers le sol sous prairie pourrait expliquer cette CEC plus élevée malgré une teneur en MO plus faible des sols sous prairie. Une analyse de la granulométrie de chacun de ces sols permettrait de valider cette hypothèse.

Tableau 4- 4. Caractéristiques physico-chimiques des horizons du luvisol gleyique sous prairie et sous forêt

Sol	Horizons de sol	Profondeur (cm)	C org (%)	pH	Cations échangeables ($\text{cmol}^+ \cdot \text{Kg}^{-1}$ de sol)				
					CEC	Mg	Fe	Ca	Al
Sol brun lessivé à pseudogley sous prairie (Luvisol gleyique)	A1	0-15	3.4	5.00	10.39	0.93	-	9.02	0.05
	A2	15-30	1.3	5.90	13.94	0.79	-	12.70	-
	B2	30-60	-	6.30	18.21	1.35	-	16.32	-
Sol brun lessivé à pseudogley sous forêt (Luvisol gleyique)	A1	0-15	4.1	4.80	6.64	0.77	-	4.55	0.57
	A2	15-30	1.4	5.70	6.61	1.04	-	4.34	0.87
	B2	30-60	0.8	6.00	9.61	1.77	-	6.51	0.94

II. 2 . Effet d'une occupation agricole sur le potentiel d'altération de phlogopite par les communautés bactériennes

Après 72 heures d'incubation, les quantités de fer et de protons ont été mesurées en solution et le taux de libération du fer a été calculé ($\log(r_{\text{Fe}})$) pour identifier les processus d'altération du phlogopite par les communautés bactériennes extraites du sol brun lessivé à pseudogley dans les 3 profils correspondant aux 3 occupations végétales différentes (Figure 4-10).

En général quelle que soit l'occupation végétale, les communautés extraites des horizons de surface (A1) dans les 3 profils sont plus complexantes que les communautés isolées des horizons profonds (B2). Les communautés extraites des horizons de surface (A1) produisent des grandes quantités d'acides organiques à fort pouvoir complexant au contraire des communautés isolées des horizons profonds.

La quantité d'éléments lixiviés par les communautés bactériennes isolées de l'horizon éluvial A2 lors de l'altération de phlogopite est identique dans les trois profils. Ces communautés altèrent le phlogopite par complexolyse à un pH similaire proche de 5,5 et le taux de libération du fer est de l'ordre de $10^{-12} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Sous forêt, les communautés bactériennes extraites des horizons A1 et B2 induisent un pH respectivement de 6,6 et 3,2 dans les expériences et le r_{Fe} calculé est respectivement de l'ordre de $3 \cdot 10^{-12}$ et $8 \cdot 10^{-13} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Elles sont acidifiantes sous ce couvert. Sous prairie et culture, les communautés sont principalement complexantes. Les communautés extraites des horizons A1 et B2 induisent des pH de 5 et 6 respectivement et le r_{Fe} calculé est respectivement de l'ordre de $3 \cdot 10^{-12}$ et $8 \cdot 10^{-13} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Le potentiel d'altération des communautés bactériennes isolées des horizons de surfaces est différent dans les sols forestiers et dans les sols agricoles. Le type d'occupation et le degré d'anthropisation des sols semblent donc avoir un effet sur les processus bactériens d'altération en surface. Celui-ci pourrait être corrélé à une quantité moins importante de matières organiques dans les sols agricoles, ceux-ci étant certainement plus argileux par ailleurs. Cet effet occupation végétale et /ou anthropisation est atténué ou est masqué dans l'horizon éluvial et n'est pas très clair plus profondément.

Ces résultats sont cohérents avec nos résultats précédents (chapitre 4 partie I). En effet, nous avons déjà observé cette tendance à la complexolyse induite par les communautés bactériennes extraites du sol témoin sous landes. Les communautés isolées des sols sous forêt induisaient un processus d'acidolyse. Ces résultats pourraient être reliés à la quantité et la qualité du carbone organique différents sous les deux types de végétation. D'un point de vue quantitatif, ceci reste encore à être confirmé avec des analyses attendues en carbone organique des sites sous forêt. Il serait également intéressant d'étudier la qualité des matières organiques issue des litières sous landes à callune et sous forêt mature en majorité composée de résineux.

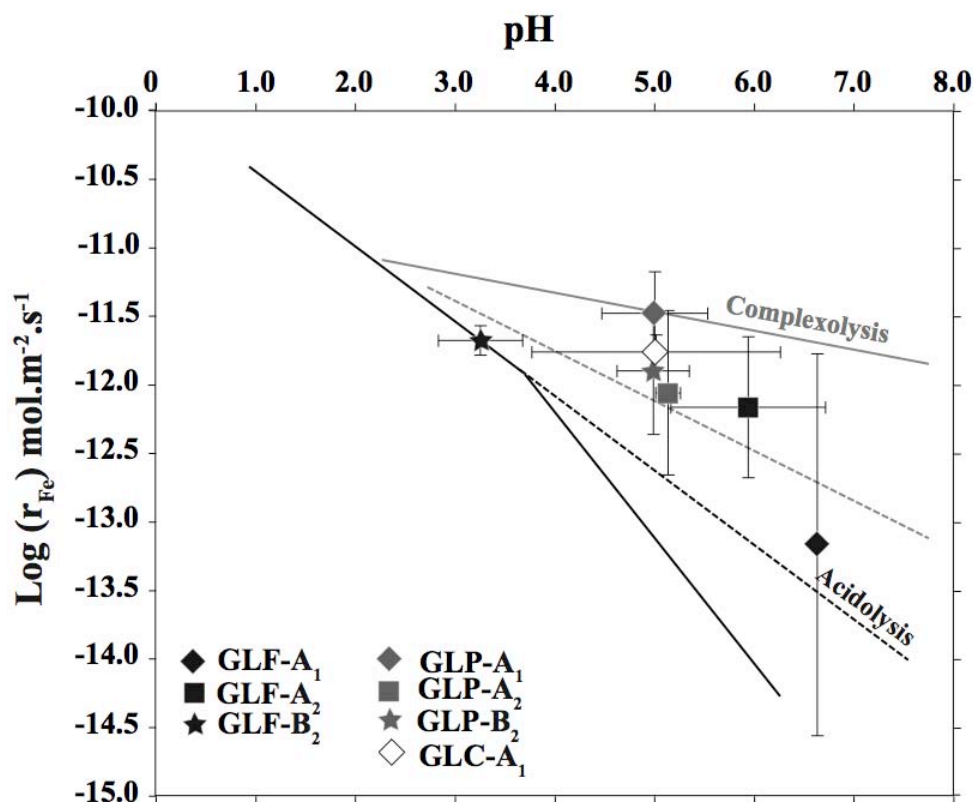


Figure 4- 10. Potentiel d'altération des communautés bactériennes extraites de différents horizons du luvisol gleyique (GL-A1 ; GL-A2 et GL-B2) sous différents couverts végétaux: forêt (GLF), culture (GLC) et prairie (GLP). Chaque point représente la moyenne et l'écart type réalisés sur 4 répétitions.

II. 3. Lien entre les paramètres physico-chimiques du sol et les processus d'altération de phlogopite par les communautés bactériennes

La variation du potentiel d'altération du phlogopite par les communautés bactériennes extraites de chaque horizon de ces 8 sols est illustrée dans la figure 4-11. Les résultats sont présentés en trois parties, correspondant aux tendances observées dans les trois grands types de sols que nous avons échantillonnés. Pour rappel, nous les séparons en fonction de leurs caractères physico-chimiques (cf. Chap 4. I.2.) et des processus biochimiques qui les caractérisent :

Cambisols (s.l.): les communautés extraites des horizons profonds (B₂ du luvisol gleyique et du luvisol, B/C du cambisol calcique et B, C du cambisol dystrique) sont acidifiantes. Lors de l'altération du phlogopite, elles permettent de libérer une quantité de fer à un pH donné identique à celui obtenu lors de la dissolution chimique théorique de la phlogopite par les protons. Elles provoquent une forte acidification du milieu (pH 3 à 4,5).

Les communautés extraites des horizons organo-minéraux de surface (A1 du luvisol gleyique, du luvisol, du cambisol calcique et du cambisol dystrique) sont complexantes. Par rapport aux communautés extraites des horizons profonds, lors de l'altération de la phlogopite, ces communautés induisent une faible modification du pH du milieu (5 à 7) mais permettent de libérer une même quantité de fer ($r_{Fe} = 2 \cdot 10^{-13} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Les communautés extraites des horizons éluviaux (A2) sont complexantes. Elles permettent la libération d'une grande quantité de fer ($r_{Fe} = 10^{-12} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) alors qu'elles induisent une faible acidification du milieu (5 à 6).

Les communautés extraites des horizons de surface (A1) produisent des acides organiques à fort pouvoir complexant au contraire des communautés isolées des horizons profonds (B et C du luvisol gleyique, du luvisol, du cambisol calcique et du cambisol dystrique). Les communautés extraites des horizons éluviaux sont les plus efficaces, permettant une plus grande libération de fer.

Les processus d'altération du phlogopite, par les communautés bactériennes extraites des sols sous couvert forestier sont donc variables en fonction des horizons de sols dont sont originaires les bactéries. Trois paramètres semblent particulièrement jouer : (1) la teneur en carbone organique (horizons de surface A1), (2) la teneur en argiles et (3) la concentration en éléments échangeables, notamment celle en éléments nutritifs. Ce dernier paramètre est corrélé aux deux précédents qui jouent sur la capacité d'échange cationique des horizons. Par exemple, les horizons éluviaux appauvris en argile et MO ont une capacité d'échange cationique plus faible que dans les autres horizons de sol. Les communautés induisent un processus d'altération spécifique différent des horizons en dessous.

Sols calcaires (s.l.) : Les communautés bactériennes extraites des horizons A1 et A1/C du leptosol rendzique colluvial sont acidifiantes. Elles provoquent une forte acidification du milieu (pH = 4) et un fort taux de libération du fer ($r_{Fe} = 5 \cdot 10^{-12} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Les communautés bactériennes extraites des horizons A1 du leptosol rendzique ont une contribution de la composante complexolyse et celles isolées de l'horizon B/C sont clairement

complexantes. Elles induisent une acidification moyenne du milieu (pH 5-6) tout en permettant un fort taux de libération du fer ($r_{Fe} = 5 \cdot 10^{-11} - 10^{-12} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Les communautés extraites du leptosol rendzique produisent des grandes quantités d'acides organiques à fort pouvoir complexant au contraire des communautés extraites du leptosol rendzique colluvial. Là encore, la capacité d'échange cationique légèrement plus importante dans le leptosol rendzique que dans le leptosol rendzique colluvial semble être un facteur important déterminant le phénotype d'altération des communautés bactériennes.

Podzols (s.l.): Les communautés extraites des horizons A1, A2, Bs et C du podzol sous forêt sont strictement acidifiantes, celle extraite de l'horizon Bh tend à la complexolyse. Les communautés extraites des horizons riches en carbone organique (A1 et Bh) induisent une forte acidification du milieu (pH 3) et sont les plus efficaces pour libérer le fer lors de l'altération du phlogopite ($r_{Fe} = 10^{-12} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Les communautés extraites du podzol leptique sous landes, quels que soient les horizons, sont complexantes. Elles acidifient faiblement le milieu. Le comportement différent des communautés isolées des deux sols pourrait être lié au couvert végétal différent leur fournissant dans le milieu naturel des matières organiques de nature et quantité différentes.

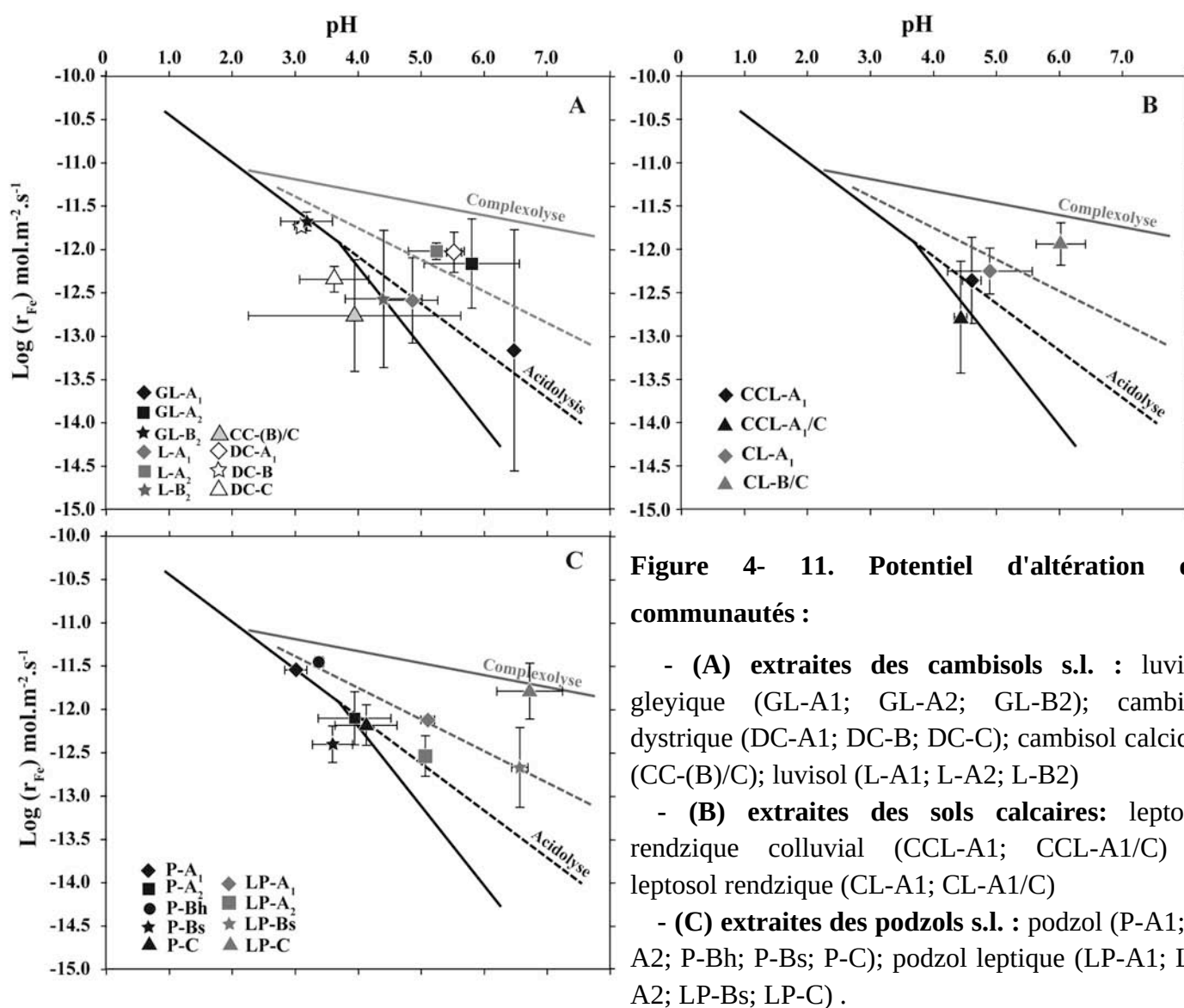
Les sols échantillonnés dans cette étude sont tous différents en termes de pédogenèses. Par conséquent, les processus biochimiques à l'échelle du profil conduisant à la formation de ces sols sont aussi très différents (i.e. acidolyse pour les cambisols s.l., complexolyse pour les podzols s.l. et hydrolyse neutre pour les sols calcaires). Pour un type de sol donné, aucune corrélation n'a été observée entre le processus impliqué à l'échelle du profil et un processus global induit par les communautés extraites. Ces différences entre les processus biochimiques impliqués à l'échelle du sol et celui impliqués par les bactéries peut s'expliquer par le fait que :

- les communautés extraites de ces sols sont uniquement des bactéries capables de survivre dans nos expériences sachant que moins 1 % des bactéries totales du sol sont cultivables, on peut se demander si nos résultats sont représentatifs de la réalité,

- nous avons vu dans le chapitre 3 qu'il existait des zones de micro-réactions autour des minéraux où les conditions chimiques sont différentes par rapport à la solution globale. Dans le sol, les bactéries agissent sur l'altération des minéraux à une échelle locale et cet effet

peut être dilué à l'échelle du profil. Par exemple, le processus de complexolyse est le processus prédominant qui a lieu dans les sols podzolisés, or dans nos expériences, le processus utilisé par les bactéries est l'acidolyse avec une acidification drastique du milieu par les bactéries. Pourtant, les quantités de carbone métabolisé par ces bactéries sont très importantes, de l'ordre de 5 à 15 % ce qui indique bien une production forte de ligands organiques. Or à un pH de 3, la plupart des acides organiques sont protonées dans le milieu et agissent comme des acides forts.

Pour résumer, il faut aussi tenir compte du phénotype d'altération des communautés pour interpréter nos résultats en plus du processus impliqué.



Chaque point représente la moyenne et l'écart type réalisés sur 4 répétitions.

En revanche, nos résultats montrent une corrélation entre le processus impliqué par les communautés bactériennes et les horizons de sol d'où elles ont été isolées (Tableau 4-5).

Ainsi, les communautés bactériennes extraites des horizons de surface ou plus globalement d'horizons riches en carbone organique (Bh) et des horizons éluviaux sont complexantes ou induisent une forte contribution de la composante complexolyse. Elles produisent de grandes quantités d'acides organiques complexants qui favorisent la lixiviation d'éléments lors de l'altération de minéraux. Les communautés bactériennes extraites des horizons profonds ou pauvres en carbone organique (plus pauvres que les horizons éluviaux) sont acidifiantes. Elles produisent de faibles quantités d'acides organiques complexants

Tableau 4- 5. Principaux résultats obtenus et comparaison relative du potentiel d'altération des communautés bactériennes en fonctions de la teneur en MO et de la richesse en nutriments minéraux (A : acidolyse et C : complexolyse)

Sol	Horizons de sol	Taux de MO	Richesse en éléments nutritifs minéraux	Processus impliqués par les communautés
Sol cryptopodzolique (Podzol leptique)	A1	+++	+	C
	A2	+	+	A
	Bs	+	+	A/C
Sol brun acide (Cambisol dystrique)	A1	++	+	C
	B	+	+	A
	C	-	+	A
Podzol	A1	+++	+	A/C
	A2	+	+	A
	Bh	+++	+	C
	Bs	+	+	A
	C	+	+	A
Rendzine (Leptosol rendzique)	A1	+++	+++	C
	B/C	+++	+++	C
Rendzine colluviale (Leptosol rendzique colluvial)	A1	++	++	A/C
	B/C	++	+++	A
Sol brun calcaire (Cambisol calcique)	A1	++	+	-
	B	+	++	-
	C	+	++	A
Sol brun lessivé (Luvisol)	A1	++	++	A
	A2	+	+	C
	B	+	++	A
Sol brun lessivé à pseudogley sous forêt (Luvisol gleyique)	A1	+++	+	C
	A2	++	+	C
	B	+	++	A

Nos résultats montrent une forte corrélation, entre la teneur en carbone organique des horizons de sol et le potentiel d'altération de la phlogopite par les communautés. La matière organique fournit une source d'énergie pour les communautés bactériennes hétérotrophes du sol mais elle correspond également à la principale réserve en nutriments comme l'azote, le phosphore et le soufre. Le pH du sol semble représenter un déterminant majeur pour la diversité et l'activité microbiennes du sol (résultats de la partie précédente et travaux de Anderson et Nilsson, 2001). Cependant, dans cette étude, aucune corrélation, entre le pH et le potentiel d'altération de la phlogopite par les communautés bactériennes, n'a été observée.

Les processus d'altération de la phlogopite par les communautés bactériennes peuvent être également liés à la teneur en argile ou éléments minéraux nutritifs.

Ces observations sont en accord avec celles de Uroz et al., 2009 qui ont démontré un ajustement du processus d'altération de la bactérie *Collimonas* dépendant de la source de carbone présente et des conditions biogéochimiques de leur environnement. L'origine des communautés bactériennes est un facteur crucial dans l'altération des minéraux.

Plusieurs études (Hameeda et al. 2006 ; Calvaruso et al., 2007; Uroz et al., 2007; Haichar et al. 2008 ; Patel et al., 2008; Leveau et al., 2009) ont aussi mis en évidence un potentiel d'altération des minéraux différent suivant la nature de la source de carbone et ont montré que les sources de carbones présentes dans les exsudats racinaires (sucres de type aldose) ont une influence significative sur la structure phylogénétique et les fonctions des communautés bactériennes dans les sols.

II. 4 . Les communautés fonctionnelles ont-elles des stratégies d'adaptation influençant la lixiviation d'éléments nutritifs lors de l'altération de phlogopite ?

Le modèle empirique utilisé dans cette partie de la thèse a permis de distinguer 2 processus d'altération du phlogopite : l'acidolyse et la complexolyse indiquant que les communautés bactériennes produisent une grande variabilité et diversité d'acides organiques plus ou moins complexants. Afin d'étudier plus précisément les produits de l'activité des bactéries, la détermination et la quantification des acides organiques produits dans chaque

expérience ont été réalisée avec les communautés bactériennes extraites des horizons de ces huit sols.

La figure 4-12 montre une corrélation positive entre les quantités de carbone métabolisé par les bactéries et le taux de libération du fer lors de l'altération du phlogopite. Deux tendances peuvent être observées sur ce graphique selon la teneur en matière organique des horizons et la roche mère des sols échantillonnés.

Les communautés extraites des sols acides développés sur grès (podzol, cambisol dystrique et podzol leptique) produisent des acides organiques en plus grandes quantités que les communautés des autres sols. Les communautés extraites des horizons profonds ont métabolisé une grande quantité de produits carbonés (glucose) ce qui a induit un taux maximal de libération du fer de l'ordre de $2 \cdot 10^{-12} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Les communautés extraites des horizons de surface ont métabolisé une faible quantité de carbone qui a toutefois permis d'atteindre un taux maximal de libération du fer de l'ordre de $3,2 \cdot 10^{-12} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Les communautés extraites des horizons profonds produisent des grandes quantités d'acides organiques faiblement complexants comme les acides lactique et acétique nécessitant une faible quantité de source de carbone suggérant que les bactéries auraient développé une stratégie r. Les communautés extraites des horizons de surface riches en matière organique produisent une petite quantité d'acides organiques fortement complexants comme l'acide citrique nécessitant une forte quantité de source de carbone suggérant que les bactéries auraient développé une stratégie K. Il semble donc que dans ce type de sol, la stratégie des communautés soit liée à la teneur en carbone organique présente dans le milieu. Ce paramètre, comme nous l'avons déjà souligné, représente un des paramètres majeurs de la diversité et de l'activité microbienne dans les sols.

Les stratégies r et K développées par les bactéries dans les sols ont été mises en évidence dans les travaux de Stenström et al., (1998) et Stenström et al., (2001) sur la fonction « respiration de communautés bactériennes » induite par un substrat donné (Méthode SIR) suite à un amendement de glucose sur l'horizon de surface d'un sol. Leurs résultats indiquent que les bactéries ayant un phénotype de type r ont un métabolisme très rapide et une croissance exponentielle s'exprimant par une production importante de CO_2 . En revanche, les

bactéries ayant un phénotype de type K ont un métabolisme lent et une croissance faible s'exprimant par une production de CO₂ constante.

Les communautés isolées des sols sur roches mères calcaires (leptosol rendzique, leptosol rendzique colluviale et cambisol calcique) ont toutes une stratégie r. La même stratégie est observée chez les communautés extraites des horizons éluviaux (A2) des sols sur limon.

Les communautés extraites de tous les autres horizons de sols sur limons (luvisol et luvisol gleyique) développent une stratégie K. Dans tous ces sols, ces stratégies ne sont pas corrélées à la teneur en matière organique des horizons au contraire de ce que nous observons chez les communautés des sols acides. Il semble donc qu'un autre paramètre du milieu puisse intervenir sur le développement d'une stratégie plutôt qu'une autre. Tous ces sols sont plus riches en nutriments disponibles (échangeables) que les sols acides développés sur grès. D'autre part, les quantités de Mg et Fe échangeables (donc disponibles) sont significativement plus importantes dans les sols limoneux (1,5 à 3,5 cmol⁺/ Kg de sol) que dans les sols calcaires (0,3 à 1,0 cmol⁺/ Kg de sol). Le calcium est naturellement l'élément échangeable le plus abondant et sature les sites échangeables dans les sols calcaires, mais ces fortes teneurs en calcium (et calcaire actif) sont connues pour provoquer des carences en autres éléments (ex. en fer) ou des toxicités (ex. manganèse).

Pour résumer, les communautés bactériennes extraites des horizons riches en nutriments et/ou en carbone organique développent une stratégie K nécessitant une grande quantité d'énergie (source de carbone). Ces bactéries (1) produisent peu de biomasse et (2) libèrent des faibles quantités d'acides organiques mais très complexants (acides citrique et oxalique) et efficaces pour lixivier le fer lors de l'altération du phlogopite. Les communautés bactériennes extraites des horizons pauvres en nutriments et en carbone organique développent une stratégie r qui ne nécessite pas une grande quantité d'énergie (source de carbone). Ces bactéries (1) produisent beaucoup de biomasse et (2) libèrent des grandes quantités d'acides organiques peu complexants (acides lactique, acétique et formique) peu efficaces pour lixivier le fer lors de l'altération de la phlogopite. Le type d'horizon à partir duquel sont extraites les communautés bactériennes est un facteur crucial dans l'altération des minéraux.

Communautés bactériennes extraites des horizons :

- ◇ sols acides pauvres en MO (A1 et Bh) ● sols calcaires
- ◆ sols acides riches en MO (A2, Bs et C) ● sols limoneux

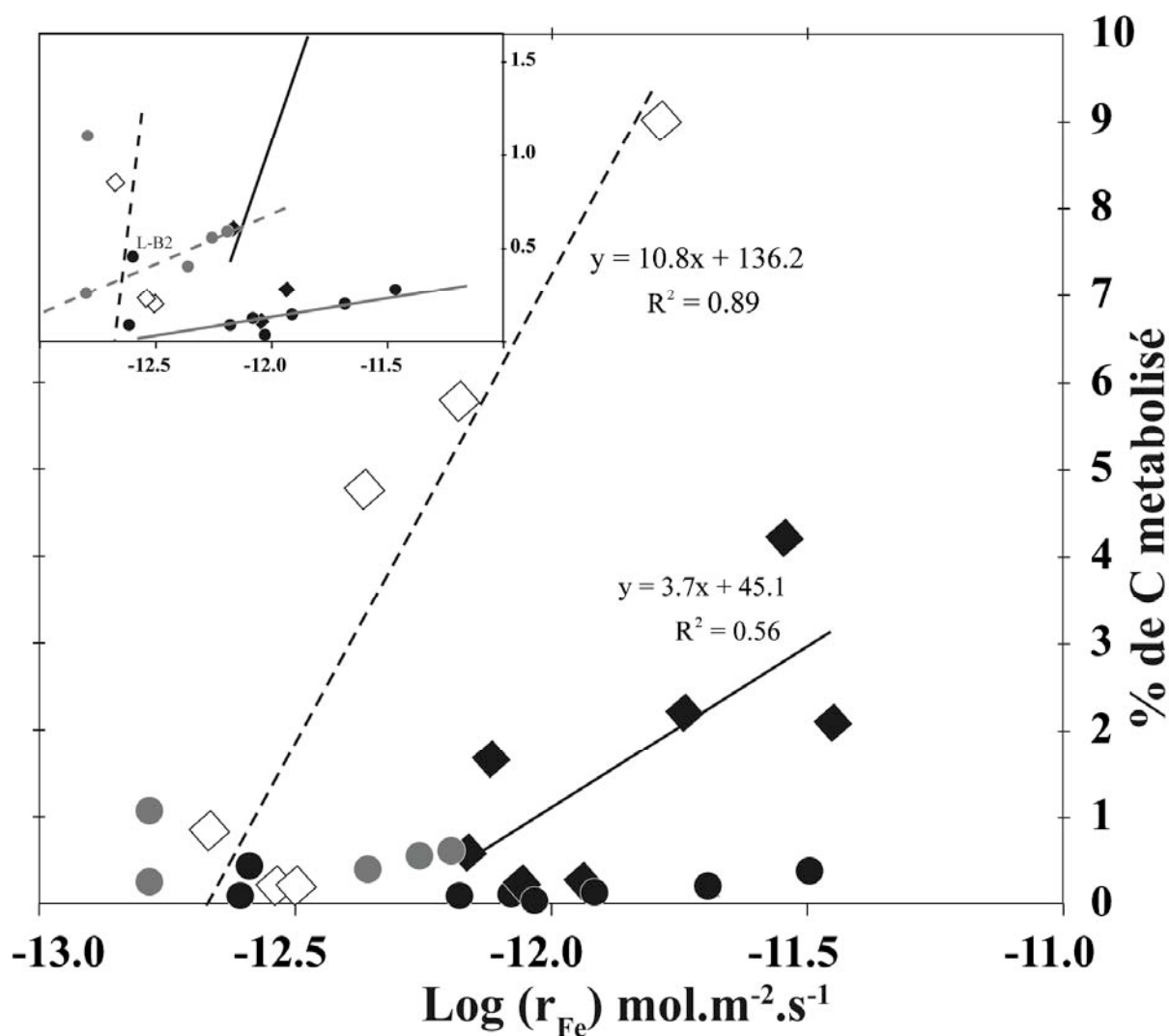


Figure 4- 12. Corrélation entre le pourcentage de carbone métabolisé et le taux de libération du fer - Mise en évidence de 2 stratégies d'altération pour les communautés bactériennes isolées de différents horizons de sols. Chaque point correspond à la mesure unique d'un échantillon moyen réalisé à partir de 4 répétitions.

II. 5 . Comparaison du potentiel d'altération de la phlogopite par les communautés ou par les souches bactériennes isolées des mêmes communautés fonctionnelles

Les souches bactériennes cultivables (en général 2 à 3) ont été isolées et séquencées à partir des communautés fonctionnelles extraites de chaque horizon des huit sols échantillonnés. Le potentiel d'altération du phlogopite par chacune de ces souches a été déterminé en microplaques et identifié via le modèle empirique. Les résultats sont présentés dans la figure 4-13.

Alors que les communautés bactériennes avaient un potentiel d'altération variable en fonction de l'horizon d'origine et de sa teneur en MO et/ou éléments échangeables, quel que soit le sol et l'horizon considéré, toutes les souches pures bactériennes isolées de ces communautés sont complexantes lors des expériences. Aucune tendance n'est observée en fonction de la teneur en matière organique, de la teneur en éléments échangeables, d'un effet rhizosphère ou appauvrissement (lessivage, lixiviation).

Les souches produisent de grandes quantités d'acides organiques fortement complexants. C'est le cas notamment d'une souche bactérienne isolée de l'horizon de surface du luvisol gleyique. Cette souche permet d'obtenir un taux de libération du fer à un pH de 6 bien supérieur à la dissolution chimique théorique réalisée avec l'acide citrique ($r_{\text{Fe}} = 6 \cdot 10^{-12} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Dans notre modèle, nous considérons l'acide citrique comme le plus complexant représentant la limite supérieure d'action des acides organiques bactériens. Cette souche doit libérer une substance plus complexante que l'acide citrique, probablement des sidérophores (non recherchés).

L'interaction entre les différentes souches de bactéries dans une communauté semble modifier le processus d'altération des minéraux par rapport à une souche bactérienne seule.

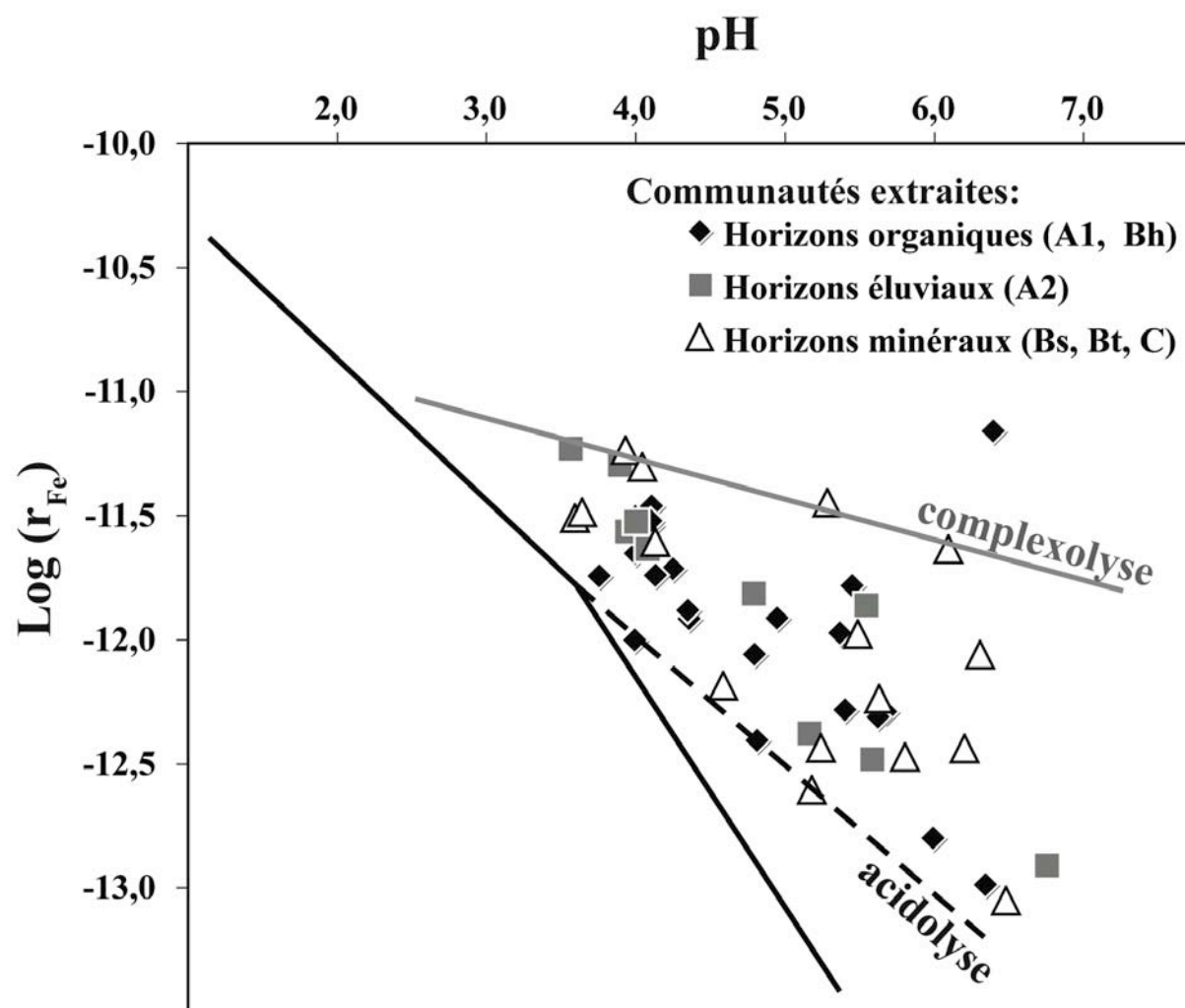


Figure 4- 13. Potentiel d'altération du phlogopite par des souches bactériennes isolées à partir des communautés extraites des 8 sols échantillonnées.

Considérant la partition du fer lixivié en solution par les bactéries selon l'activité des protons (acidolyse), l'activité des ligands (complexolyse) et l'immobilisation du fer (cf. partie I, I.4), un diagramme ternaire **A-C-I** a été construit intégrant la contribution de chaque paramètre à la lixiviation du fer. Ce diagramme ternaire **A-C-I** permet ainsi d'identifier les phénotypes des souches bactériennes selon les 3 grands groupes de sols échantillonnés (Figure 4-14).

Le premier groupe [$A_{0,8}$; $C_{0,5}$; $I_{0,2}$] regroupe les souches bactériennes isolées des communautés extraites des sols acides sur grès (podzol, cambisol dystrique et podzol leptique). La lixiviation du fer est due exclusivement à de l'acidolyse et de la complexolyse.

Le deuxième groupe [$A_{0,4}$; $C_{0,6}$; $I_{0,4}$] regroupe les souches bactériennes isolées des communautés extraites des sols calcaires (leptosol rendzique, leptosol rendzique coluvial et cambisol calcique). En leur présence, la lixiviation du fer provient d'une combinaison entre les 3 paramètres.

Le troisième et dernier groupe [$A_{0,25}$; $C_{0,6}$; $I_{0,5}$] regroupe les souches bactériennes isolées des communautés extraites des sols limoneux (luvisol et luvisol gleyique). La lixiviation du fer résulte surtout de complexolyse.

Le diagramme ternaire ne permet pas de bien différencier les deux derniers groupes. Comme discuté précédemment, les communautés fonctionnelles extraites des sols acides sur grès produisent des acides organiques en plus grandes quantités que les communautés des autres sols. Les communautés isolées des sols calcaires et limoneux induisent des processus plus proches, ce qui peut expliquer leur recouvrement dans le diagramme.

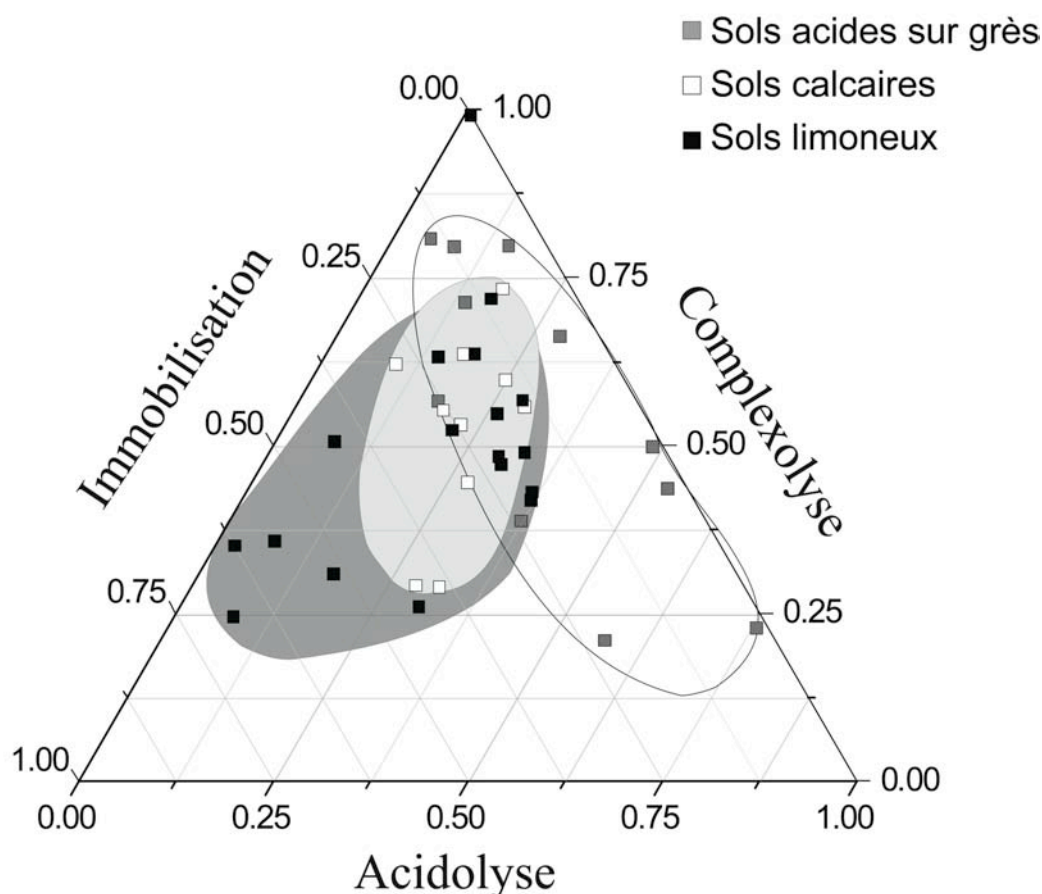


Figure 4- 14. Diagramme ternaire A-C-I représentant la contribution de l'acidolyse, de la complexolyse et de l'immobilisation à la lixiviation du fer du phlogopite par les souches bactériennes isolées des sols

Les souches isolées ont été séquencées et sont en majorités du genre *Burkholderia sp.* Les genres *Pseudomonas sp.*, *Sphingomonas sp.* et *Rhodococcus sp.* ont également été identifiés dans certains horizons (Figure 4-15).

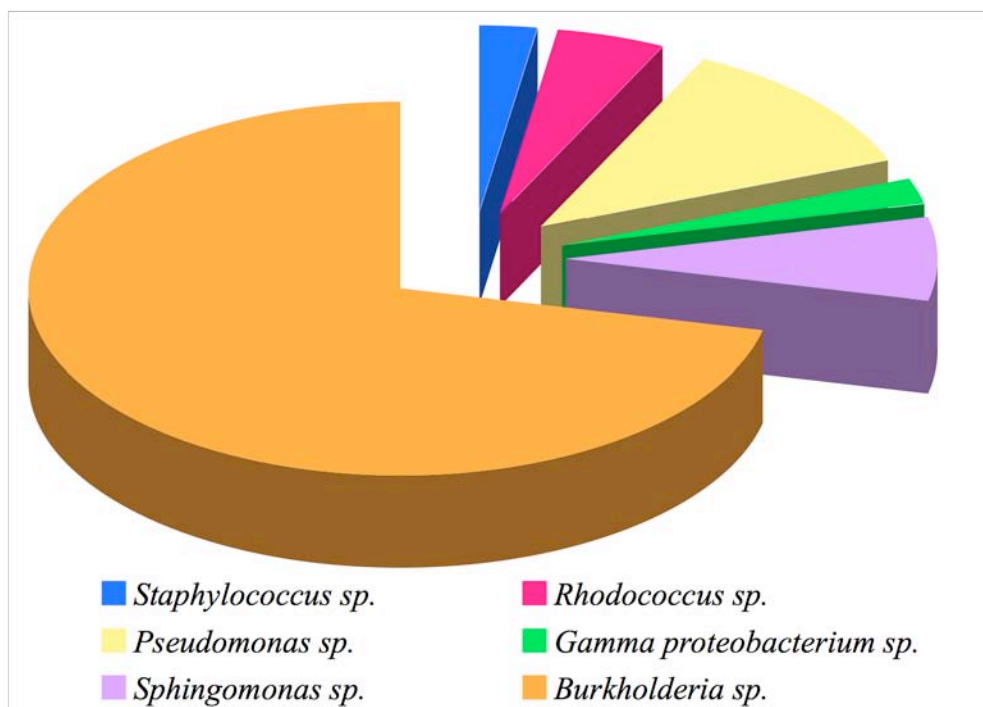


Figure 4- 15. Diversité des souches bactériennes isolées des sols lorrains

Aucune corrélation n'a pu être faite entre le genre de la souche bactérienne et sa compétence pour altérer les minéraux contrairement aux études de Leveau et al., (2009), Uroz et al., (2007) et Uroz et al., (2010) démontrant que les genres bactériens *Collimonas sp.*, et *Burkholderia sp.*, sont les plus efficaces à altérer les minéraux dans la rhizosphère (Figure 4-16). Nos résultats indiquent donc que l'altération des minéraux silicatés par des bactéries isolées de sols serait contrôlée par le phénotype bactérien, le minéral, l'environnement et un effet communauté et non pas par le génotype des souches bactériennes présentes. Mais la comparaison de nos résultats avec d'autres travaux est difficile car cette approche est aujourd'hui très peu étudiée. De plus, les résultats obtenus dans ce travail ne sont que préliminaires. Une étude plus approfondie sur l'identification et la caractérisation des souches pures isolées des communautés bactériennes fonctionnelles permettraient de valider nos résultats ou d'identifier les bactéries « lixiviantes de cations » et de connaître leur importance dans les sols vis-à-vis des bactéries opportunistes.

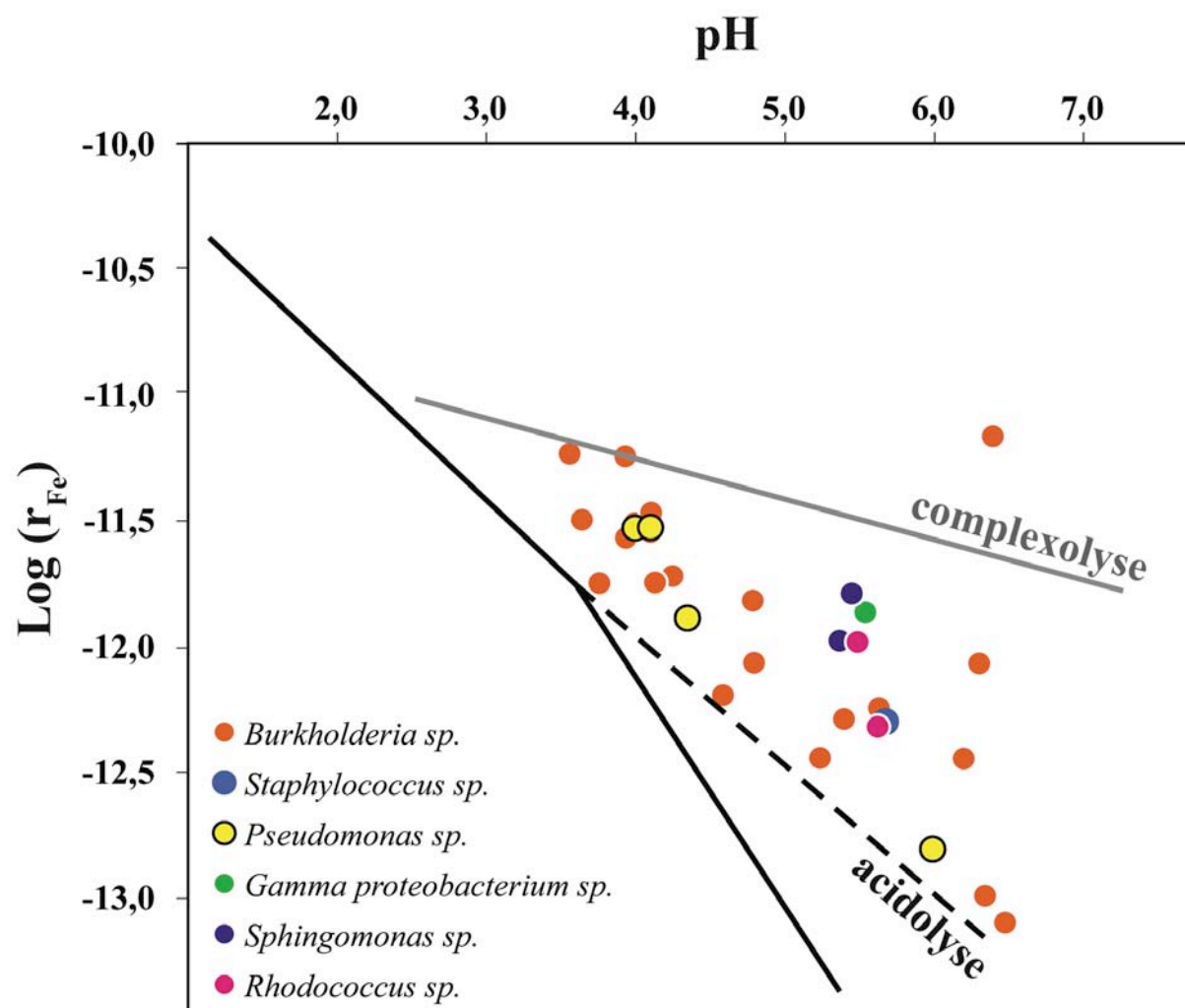


Figure 4- 16. Potentiel d'altération du phlogopite par des souches bactériennes suivant leur genre. Chaque point correspond à la moyenne de 4 répétitions.

II. 6 . Synthèse intermédiaire sur l'identification des processus d'altération bactériens dans des sols contrastés

L'horizon à partir duquel les communautés bactériennes ont été extraites est un facteur important expliquant la variabilité des processus d'altération des minéraux. Nos résultats montrent que la lixiviation du fer lors de l'altération du phlogopite est plus ou moins efficace selon les stratégies des communautés. Ces stratégies sont liées à (1) la teneur en carbone

organique et/ou (2) la teneur en argile et/ou (3) la teneur en éléments minéraux nutritifs échangeables.

Les communautés fonctionnelles extraites des sols acides sur grès produisent des acides organiques en plus grandes quantités que les communautés des autres sols. Les communautés bactériennes extraites des horizons riches en fer, Mg échangeable et carbone organique développent une stratégie K. Elles produisent des faibles quantités d'acides organiques fortement complexants pour lixivier le fer lors de l'altération de la phlogopite. Les communautés bactériennes extraites des horizons pauvres en éléments échangeables et carbone organique (horizons minéraux des sols) développent une stratégie r. Elles produisent des grandes quantités d'acides organiques faiblement complexants qui permettent une lixiviation moins importante de fer que les stratégies K.

Au contraire des communautés bactériennes, les souches bactériennes sont toujours complexantes. Ceci suggère que l'origine de la souche n'influence pas le processus de lixiviation du fer lors de l'altération du phlogopite. L'effet « communauté » expliquerait les stratégies d'adaptation en fonctions des conditions de milieu (MO, éléments échangeables) dans les sols. Quelques souches bactériennes doivent certainement dominer l'action du groupe dans des conditions environnementales précises.

III CONCLUSION

Les résultats obtenus dans ce chapitre 4 montrent l'importance significative de la richesse en nutriments organiques (taux de carbone dans le sol) et minéraux (amendement ou richesse naturelle en éléments échangeables issus de l'altération d'une roche mère riche) sur la biomasse et l'activité bactérienne.

Les communautés bactériennes développent des stratégies différentes pour acquérir et rendre disponibles les nutriments dont elles ont besoin. Les communautés issues d'horizons riches en nutriments développent ainsi une stratégie (dite « K ») efficace qui demande une source de carbone importante pour avoir un catabolisme efficace en libérant peu d'acides organiques mais très complexants. Les communautés issues d'horizons pauvres en nutriments qui ne fournissent donc pas une source de carbone suffisante, développent une stratégie (dite « r ») moins efficace. Elles consomment peu de substrats carbonés, elles libèrent beaucoup d'acides organiques mais ceux-ci sont peu complexant et ont un impact moindre sur la lixiviation des éléments lors de l'altération des minéraux.

Cette partie du travail de thèse participe plus globalement à une meilleure compréhension du fonctionnement des sols. Via les aspects altération et disponibilité potentielle des éléments, il contribue à l'amélioration des connaissances sur les facteurs contrôlant la fertilité des sols naturels et la nutrition des plantes.

DISCUSSIONS

- **CHAPITRE 5** : Discussion générale, Conclusion et Perspectives

INTRODUCTION

L'objectif de ce travail était d'identifier et de tracer les principaux processus impliqués dans l'altération des phyllosilicates résultant de l'activité de bactéries hétérotrophes et de comprendre leur variabilité en fonction de paramètres environnementaux. L'originalité de l'approche proposée réside dans l'utilisation d'un modèle d'altération empirique de l'activité des protons et de ligands organiques (référence abiotique) afin d'identifier et d'étudier les interactions entre les bactéries et les minéraux et les processus impliqués. Le second objectif de la thèse a été de corréler la fonction d'altération des communautés bactériennes aux conditions naturelles dans lesquelles elles se développent et d'où elles ont été extraites juste avant expériences.

Les résultats ont permis de mettre en évidence la fonction « lixiviation de cations » par les bactéries lors de l'altération de minéraux communs dans les sols. Par rapport à l'objectif global de cette thèse, il est intéressant maintenant de discuter de cette fonction « altération » et du lien entre la qualité biologique et chimique des sols et l'activité de certaines bactéries amenant à la lixiviation de cations dans les sols.

I LA FONCTION « ALTERATION » : DEFINITION, QUALITE, REGULATION

Dans toutes les expériences biotiques et abiotiques menées dans ce travail, la lixiviation des cations (Mg, Fe, Al et Si) lors de l'altération du phlogopite et de la biotite est fortement corrélée à l'activité des protons et des ligands organiques. Le modèle empirique proposé a ainsi permis :

- d'identifier les trois processus majeurs (acidolyse, complexolyse, immobilisation), en conditions aérobies, impliqués dans l'altération des minéraux silicatés et contrôlant la disponibilité des éléments minéraux essentiels,
- de réaliser des études comparatives des taux de libération initiaux du fer (et d'autres éléments) lors de la dissolution abiotique et bactérienne de particules de phlogopite et de biotite dans différentes conditions expérimentales.

Les résultats amènent plusieurs questions :

- comment qualifier les processus de lixiviation bactérienne : Sont-ils bioinduits ou biocontrôlés ? (autrement dit, les actions sont-elles indirectes ou directes ?) ; Quel est le processus dominant et quand ? Quels en sont les paramètres clefs ? Sont-ils internes ou externes au système?
- quelle est l'origine des variations des processus fonctionnels : y a-t-il une spécificité du métabolisme microbien ? Y a-t-il un déterminisme génétique ? Le phénotype proposé (ACI) qualifie-t-il la bactérie/communauté ou le système bactérie/minéral/solution?
- quels sont les bons traceurs des processus biogéochimiques (Fe ou Mg) : quels en sont les avantages et inconvénients ? les limites méthodologiques ? ou encore l'importance relative des processus microbiens par rapport aux autres processus biologiques (rhizosphériques) ou chimiques (météoritiques)?

Toutes ces questions conduisent à redéfinir les caractéristiques et le rôle de la fonction « lixiviation de cations » à différents niveaux : celui des processus physico-chimiques à l'interface bactérie-minéral-solution, celui de l'écologie microbienne du système et enfin celui de la géochimie élémentaire des solutions dans le système.

I. 1 Physico-chimie de la biolixiviation : du processus à la fonction

L'activité des bactéries favorise plus ou moins la lixiviation des éléments lors de l'altération du phlogopite. Lorsque cette biolixiviation résulte de l'action des protons (acidolyse), on peut parler d'altération induite par l'activité microbienne. L'intensité du processus est directement reliée à la quantité de protons produits par les bactéries. En revanche, la qualité de la biolixiviation semble contrôlée par la production bactérienne de ligands organiques : l'acidolyse des micas au voisinage de la neutralité et en l'absence de métabolites d'origine microbienne est très faible. À l'inverse, le métabolisme dit de débordement des bactéries améliore la lixiviation surtout pour des pH proches de la neutralité. En condition aérobie, il correspond à une oxydation partielle de la source d'énergie et de carbone en acides organiques, dont l'excrétion s'avère nécessaire. Néanmoins, en fonction des conditions expérimentales ou naturelles de croissance (source de carbone disponible, préculture, origine...) et des caractéristiques physiologiques de chaque bactérie, ce métabolisme produit une gamme d'acides organiques variée dont l'action sur la lixiviation de

cations est spécifique. C'est l'action différentielle et spécifique des métabolites bactériens sur les minéraux cibles qui détermine le taux de lixiviation des cations. Toutefois, ce type de lixiviation de cations lors de l'altération du minéral ne peut être considéré comme étant biocontrôlée, car il n'existe pas de preuve dans les expériences, de l'existence d'une telle activité bactérienne en fonction du taux de dissolution du minéral.

Le processus de complexolyse doit être aussi classé dans les processus d'altération bioinduits. En effet, le contact entre les bactéries et les particules minérales n'est pas une condition nécessaire à l'apparition du phénomène de lixiviation du fer lors de l'altération des micas qui peut être réalisée via les métabolites excrétés par les bactéries. Les expériences menées en mode contact, semi-contact et non-contact indiquent que le contact entre la bactérie et le minéral permet d'amplifier significativement la lixiviation de fer alors que les concentrations de protons ou métabolites dans les solutions globales sont sensiblement les mêmes qu'en conditions de non-contact, suggérant des zones de microréactions où les conditions physico-chimiques à l'interface bactérie/minéral sont différentes (concentrations d'acides minéraux et organiques plus importantes). Ces résultats montrent ainsi qu'il n'existe pas de liens simples entre les particules minérales, les bactéries et le processus d'altération. Le taux de dissolution dépend à la fois des propriétés du minéral, du métabolisme bactérien et des possibilités d'interactions entre les particules et les cellules bactériennes (Tableau 5-1).

Tableau 5- 1. Importance relative des différents paramètres sur la biolixiviation des micas.

Paramètres étudiés	Importance relative
Nature de la source de carbone	+++
Quantité de carbone	-
Contact bactérie/minéral	-
Préculture des bactéries	+
Minéral	+++
Phénotype bactérien	+++

I. 2 Écologie microbienne de la biolixiviation : variation fonctionnelle

I. 2. 1 Physiologie (métabolisme carboné) versus origine

Le carbone est un élément clé dans l'altération des minéraux induite par les activités des bactéries. Les bactéries ont besoin d'une source de carbone pour acquérir de l'énergie et pour leur croissance. Les sources de carbones sont multiples dans le sol. Les matières organiques peuvent avoir une origine naturelle liée à la biomasse végétale et/ou une origine anthropique. Leur nature diverse n'aura pas les mêmes impacts sur l'activité des bactéries et sur l'altération associée des minéraux des sols. Le carbone dans les sols provient en majorité de la dégradation des litières fraîches issues des parties aériennes (feuilles, tiges, branches) et souterraines (racines fines) mortes des végétaux, de la biomasse microbienne et des exsudats racinaires des plantes. Il sont présents sous différentes formes moléculaires plus ou moins dégradables par les bactéries :

- les sucres et les acides aminés facilement dégradables,
- les acides organiques moyennement dégradables,
- les composés humiques comme les acides fulviques ou humiques qui sont des molécules complexes difficilement dégradables.

Les résultats obtenus dans cette thèse ont montré que la quantité et la nature des sources de carbones avaient un impact important sur la production de métabolites secondaires (acides organiques) par les bactéries. La diversité en termes de quantité et nature de ces acides organiques produits explique globalement la variation observée des processus de lixiviation de cations lors de l'altération de minéraux silicatés. En effet, en présence du phlogopite, deux processus différents sont utilisés par les souches bactériennes suivant la nature de la source initiale de carbone. En présence de sucres, l'acidolyse est le processus dominant lors de la lixiviation du fer par les bactéries. En présence d'acides organiques, la complexolyse est le processus dominant impliqué. Peu d'acides organiques sont libérés en solution en présence d'une source de carbone autre que le glucose. Ceci explique la plus grande acidification du milieu issue des métabolites bactériens en présence de sucres (pH 3-4) qu'en présence d'acides organiques (pH 6-7).

De nombreuses études sur l'altération de minéraux par les bactéries ont été réalisées en présence de plusieurs sources de carbone (Berthelin, 1976; Hameeda et al., 2006; Calvaruso et al., 2007; Uroz et al., 2007; Haichar et al., 2008; Patel et al., 2008). Ces travaux ont tous montré que les sources de carbone présentes dans les exsudats racinaires (sucres de type aldose) ou dans la mycorrhizosphère avaient un impact à la fois sur la structure phylogénétique et sur les fonctions des communautés de bactéries du sol. Ces travaux avaient déjà souligné que suivant son origine (manteau symbiotique/mycorrhizosphère/sol brut), l'efficacité d'une souche à altérer un minéral n'est pas la même. Ainsi, en présence de bactéries isolées de la mycorrhizosphère, les quantités de fer lixiviées de la biotite (Bancroft) sont plus importantes. Les résultats de ces précédents travaux sont cohérents avec nos conclusions sur les relations existantes entre les stratégies développées par les communautés bactériennes extraites des différents sols et la richesse en nutriments organiques et minéraux de leur milieu d'origine.

En revanche, aucune corrélation n'a pu être faite entre le genre de la souche bactérienne et sa compétence pour altérer les minéraux contrairement aux études de Leveau et al., 2009, Uroz et al., 2007 et Uroz et al., 2010 qui démontraient que les genres bactériens *Collimonas* sp., et *Burkholderia* sp., étaient les plus efficaces à altérer les minéraux. **Ces résultats indiquent donc que l'altération des minéraux silicatés par des bactéries isolées de sols bruts serait contrôlée par le phénotype bactérien, le minéral, l'environnement et un effet communauté et non pas par le génotype des souches bactériennes formant les communautés. Cette hypothèse reste cependant à vérifier.**

I. 2. 2 Les stratégies : métabolisme carboné versus lixiviation

Deux stratégies écologiques r et K impliquées dans la lixiviation du fer lors de l'altération du phlogopite par les bactéries ont été mises en évidence. Les bactéries extraites des horizons riches en carbone organique et en éléments échangeables développent une stratégie K. Elles produisent en faibles quantités des acides organiques fortement complexants pour lixivier efficacement le fer lors de l'altération du phlogopite. C'est le cas des communautés extraites des horizons de surface organo-minéraux (A1), très largement prospectés par les racines de végétaux (donc approchant un effet rhizosphère), et des horizons Bh formés par accumulation de matières organiques et fer issus des horizons de surface. Les communautés bactériennes extraites des horizons pauvres en nutriments et carbone organique (horizons minéraux Bs, B, C, A2 des sols) développent une stratégie r. Elles produisent de grandes quantités d'acides

organiques faiblement complexants. Ceux ci induisent une lixiviation moins importante de fer que les stratégies K.

La figure 4-1 résume ces deux stratégies : (1) dans des environnements riches, les communautés bactériennes développent une stratégie K qui induit la libération d'une forte quantité de fer par de faibles quantités d'acides organiques fortement complexants (acides citrique et oxalique). Cette stratégie est favorisée par une quantité suffisante de carbone dans le milieu d'origine de ces communautés qui leur permet d'avoir un catabolisme efficace pour l'altération des minéraux mais peu efficace pour la production de biomasse ; (2) dans des environnements pauvres, la ressource en carbone et en autres nutriments est faible. Ces conditions ne permettent pas aux communautés de bactéries d'avoir un catabolisme efficace à sur la lixiviation de cations lors de l'altération des minéraux mais la stratégie est efficace pour la formation de nouvelles cellules. Elles développent préférentiellement une stratégie de type r.

La richesse en carbone et la teneur en éléments échangeables dans les horizons de sols sont des paramètres cruciaux contrôlant les stratégies d'altération des minéraux silicatés par les bactéries.

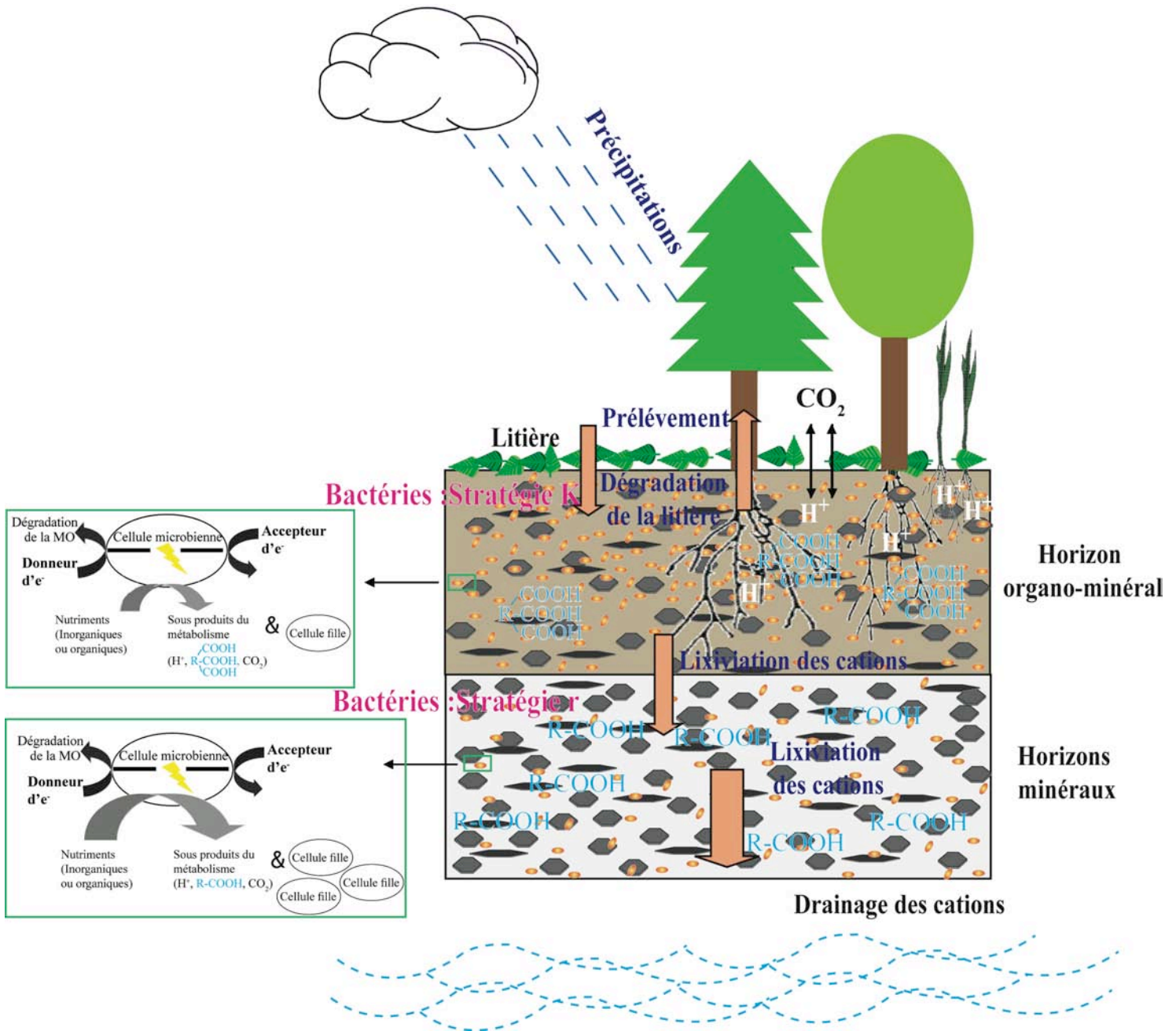


Figure 5-1. Schéma récapitulatif de la fonction « lixiviation de cations » des communautés bactériennes dans les horizons de sols lors de l'altération de minéraux silicatés

(R-COOH : acides organiques monofonctionnels ; $\begin{matrix} \text{R-COOH} \\ | \\ \text{COOH} \end{matrix}$: acides organiques polyfonctionnels)

1. 2. 3 Réflexion sur la fonction altération dans des sols caractérisés par une forte pollution organique

Aujourd'hui, de plus en plus de sites sont pollués accidentellement ou via des pollutions diffuses longues par des substances organiques xénobiotiques (ex. des pesticides dans les sols agricoles ou les hydrocarbures aromatiques polycycliques, ou le pétrole sur d'anciens sites industriels) qui peuvent interagir avec la matière organique naturellement présente. Les polluants en fonction de leur nature et des conditions physico-chimiques dans les sols peuvent s'adsorber sur les particules minérales, ou être absorbés par les organismes vivants ou encore être solubilisés dans les solutions de sol, polluer les rivières en amont. **Si les polluants restent dans les sols, quels seront alors leurs impacts sur la lixiviation des éléments par les bactéries ?**

Les études démontrant l'impact de ces polluants organiques sur l'altération des minéraux par les bactéries sont limités. Hiebert et Bennett (1992), Bennett et al. (1996), Bennet et al. (2000) et Roberts Rogers et al. (2003) ont travaillé sur l'altération de minéraux silicatés et carbonatés par les bactéries indigènes dans un aquifère d'eau à nappe libre contaminée par du pétrole (contenant notamment du benzène et du toluène). Leur étude a surtout porté sur les interactions minéraux-bactéries-solution et plus spécifiquement sur la colonisation bactérienne des minéraux corrélée à la chimie des eaux souterraines. Les aquifères sont des environnements oligotrophiques (comme les sols). Les bactéries dégradent la matière organique présente pour acquérir l'énergie et le carbone dont elles ont besoin pour leur croissance, produisant ainsi du CO₂ et des métabolites secondaires comme les acides organiques (Ehrlich, 1996). Ces métabolites agissent sur les particules minérales qui constituent un support de vie mais aussi une réserve en nutriments, et perturbent de façon positive ce système à travers les processus d'altération.

D'une part, les résultats de leurs études indiquent que des populations bactériennes aérobies et anaérobies spécifiques dominent dans différentes régions de l'aquifère contaminé. Plus on s'approche de la zone contaminée, moins il y a d'oxygène dû à la production excessive de CO₂ par les bactéries. Les bactéries aérobies et anaérobies possèdent une voie métabolique différente pour dégrader ce pétrole. Les gènes impliqués codent pour des

enzymes comme les dioxygénases chez les bactéries aérobies et pour les benzoyl-coA chez les bactéries anaérobies. Quelle que soit la voie métabolique utilisée, des acides organiques et inorganiques sont produits lors de ces réactions.

D'autre part, ces études ont mis en évidence, à plusieurs échelles d'observation, une accélération de la solubilité et du taux d'altération des minéraux silicatés par les bactéries dans la zone contaminée riche en carbone permettant de pallier une carence nutritive notamment en fer et en phosphore. Ces résultats sont cohérents avec ceux que nous avons obtenus dans cette thèse, lorsque nous avons démontré que les bactéries les plus efficaces à lixivier le fer lors de l'altération du phlogopite (ayant une stratégie K) provenaient d'horizons riches en carbone.

De plus, dans l'aquifère contaminé étudié, la minéralogie des minéraux influence directement l'activité microbienne. En effet, ils corrélient l'altération des silicates avec la présence de bactéries adhérentes sur les minéraux contenant du fer et du phosphore. Leurs résultats rejoignent également nos conclusions suggérant que les groupes phénotypiques des souches bactériennes étaient différents suivant le minéral utilisé pour réaliser les tests d'altération (biotite ou phlogopite).

Dans ces environnements contaminés, les bactéries indigènes se sont donc adaptées pour utiliser des nutriments organiques de nature particulière, diminuant progressivement la pollution de cet aquifère, pour induire une altération des minéraux et accéder à des nutriments inorganiques. En effet, il a aussi été observé une augmentation plus importante de la biodégradation de certains composés xénobiotiques autour des minéraux porteurs de fer et de phosphore. Ces résultats ont été confirmés par Atekwana et al. (2005) qui ont étudié la chimie de l'aquifère grâce à des mesures de conductivité et l'origine du carbone dissous par l'utilisation des isotopes du carbone. Ils montrent que les teneurs en éléments dissous (Si, Ca,...) dans la zone contaminée sont plus importantes que dans la zone non contaminée. Cette plus forte disponibilité des éléments est due à l'altération poussée des minéraux (feldspaths de calcium et carbonates) corrélée à la biodégradation des hydrocarbures et permettant ainsi une atténuation naturelle de la pollution.

I. 3 Impact de l'altération des minéraux silicatés par les bactéries sur les cycles biogéochimiques (Fe, Mg, Si ...)

Le choix d'un bon traceur de processus d'altération des minéraux est crucial pour la compréhension et l'interprétation des taux de dissolution des minéraux. Le silicium est donc traditionnellement utilisé comme traceur des taux de dissolution car il est peu sensible aux variations physico-chimiques locales du système et permet de s'affranchir des erreurs de détermination de ces taux dû à une dissolution non stoechiométrique, par dissolution préférentielle de certaines phases ou de certains cations ou par précipitation de minéraux secondaires. Pour distinguer ces éventualités, différents éléments ont été analysés lors de nos expériences.

Les tests d'altérations des minéraux ont été réalisés en microréacteurs avec comme indicateur l'analyse du Mg et du Fe. Le volume utile disponible dans ces expériences (200 microlitres) a limité fortement le choix de ces indicateurs colorés capables de détecter les éléments lixiviés lors de l'altération des micas. La sensibilité du colorant utilisé (Xylidyl blue) pour le dosage par colorimétrie du Mg était mauvaise et ce colorant n'était pas sélectif avec de fortes interférences lors des mesures avec les métabolites produits par les bactéries. Pour ces raisons, l'élément Fe a été choisi comme traceur des processus et s'avère très sensible aux variations physico-chimiques locales du système. Il est, par conséquent, un moins bon traceur de flux que le Mg ou le Si plus fréquemment utilisés mais un bon traceur des processus de lixiviation des silicates par voie microbienne. Le Fe a donc permis de distinguer les 3 processus majeurs (acidolyse, complexolyse et immobilisation) en conditions aérobies impliquées dans l'altération des micas par les bactéries.

Ces expériences en microplaques ne permettent pas d'établir l'importance des processus microbiens face aux processus rhizosphériques ou chimiques dans les sols. Les isotopes du Mg ont donc été choisis pour essayer de mettre en évidence une signature bactérienne d'altération des minéraux. Les réacteurs utilisés dans cette étude ont permis d'obtenir des grands volumes pour mesurer les quantités de Mg et la signature isotopique du Mg dans les solutions de biolixiviation de phlogopite après des temps d'expérience plus long que en microplaques. Cependant, l'outil isotopique n'a pas confirmé une signature bactérienne d'altération des minéraux par comparaison avec des expériences abiotiques pour simuler l'action des bactéries. Par contre, les isotopes du Mg pourraient être des traceurs

potentiels des processus d'acidolyse et de complexolyse lors de l'altération de minéraux et de la lixiviation de Mg par les bactéries. En effet, un très faible fractionnement isotopique a été observé entre les solutions de lixiviation et le minéral initial quel que soit l'agent d'altération du phlogopite. Deux tendances ont été distinguées et semblent accentuées lorsque la fraction de Mg lixiviée augmente :

- (1) pour les expériences réalisées avec HNO_3 et la souche PS2, le Mg lixivié en solution est enrichi en isotopes lourds par rapport à la composition isotopique moyenne du phlogopite,
- (2) pour les expériences réalisées avec l'acide citrique, le Mg lixivié en solution est enrichi en isotopes légers par rapport au phlogopite. De plus, avec des agents acidifiants, la signature isotopique en Mg des solutions est fortement corrélée aux pH de celle-ci. L'effet des acides organiques fortement complexants semble donc jouer un rôle important dans la dissolution du phlogopite et dans l'évolution de la composition isotopique en Mg de la solution de lixiviation.

Les faibles fractionnements isotopiques observés lors des processus bactériens de lixiviation du Mg à partir des phyllosilicates ne peuvent pas expliquer les variations des signatures isotopiques connues dans la nature, les eaux de rivière étant enrichies en isotope léger par rapport aux roches et sols drainés (Brenot, et al. 2008; Tipper et al., 2006a, 2006b et 2008). D'autres processus supplémentaires doivent être envisagés et notamment ceux associés à l'action des plantes, à la transformation des argiles dans les sols et à la lixiviation abiotique des minéraux. Dans le cas des plantes, Bolou-Bi et al. (2009) et Black et al. (2008) ont montré que ces dernières prélèvent préférentiellement les isotopes lourds du Mg laissant dans la solution les isotopes légers. Les processus liés à la croissance des plantes (adsorption, absorption, translocation interne, cycle...) couplés à ceux des bactéries complexantes (tels que ceux démontrés dans cette thèse), pourraient alors exacerber les processus de lixiviation purement géochimiques des minéraux silicatés et induire un enrichissement en isotopes légers des eaux de surface par rapport aux roches et aux sols.

II LE PHENOTYPE FONCTIONNEL ETABLI A PARTIR DE LA BIOLIXIVIATION DE CATIONS : UN CRITERE DU BON FONCTIONNEMENT DES SOLS ?

Le sol se forme et continue à se développer à travers des processus d'altération lié aux facteurs biologiques, chimiques, climatiques, topographiques et géologiques. Les processus biologiques, chimiques et physiques dans les sols, définissant en partie la qualité de celui-ci, ont un impact sur la durabilité des écosystèmes naturels. De très nombreuses études ont cherché à définir et caractériser les critères de qualité des sols d'un point de vue agronomique (Chaussod, 1996 ; Parr et al., 1992 ; Harris et al., 1996) ou environnemental (Hofman et al., 2003 ; Knoepp et al., 2000). La qualité biologique est une des composantes du sol en plus de la fertilité, de l'état sanitaire ou des externalités (impact environnemental de la qualité du sol comme les polluants).

Les communautés microbiennes (bactéries, champignons) représentent une composante essentielle pour le fonctionnement du sol. Ces microorganismes jouent un rôle clé dans beaucoup de fonctions écologiques (transformation de la matière organique, cycles des éléments, maintien de la structure du sol, biodégradation des polluants...) pour un sol d'une bonne qualité biologique (Hofman et al., 2003). De nombreux critères de cette qualité ont été définis par exemple le quotient métabolique (rapport entre la biomasse microbienne et la respiration), la diversité microbienne ou l'abondance des gènes maintenant mesurables par des nouvelles techniques moléculaires (Bastida et al., 2008).

La diversité fonctionnelle des microorganismes est donc un pré-requis pour une bonne qualité globale du sol, mais aussi pour permettre une certaine « tolérance » du sol envers des facteurs de stress. Pour estimer la qualité biologique d'un sol, il n'est pas donc utile d'établir une liste exhaustive des espèces présentes mais plutôt de chercher à identifier et quantifier des communautés pertinentes en terme de fonction dans le sol. Le rapport C/N représente par exemple un critère de bon fonctionnement biologique du sol à travers la dégradation de la matière organique par les microorganismes (bactéries et champignons). Un rapport C/N élevé (>30) indique une mauvaise dégradation de la litière est donc un humus de type mor. En revanche, un rapport C/N faible (<15) indique une bonne dégradation de la litière est donc un humus de type mull favorable à la culture du sol.

Rares sont les études qui ont cherché à mesurer la fonction d'altération des minéraux par les microorganismes pour compléter l'estimation de la qualité biologique des sols. Une étude préliminaire de Viles et al., (1995) a permis la conception d'un modèle mettant en relation l'activité biologique d'altération des roches à un gradient environnemental de stress (teneur en eau). Cette étude a montré l'efficacité in situ de certains processus d'altération des minéraux par différents agents biologiques (bactéries, algues, champignons...) et a corrélié ceux-ci face au gradient de stress. Cependant, la composante « sol » n'a pas été prise en compte dans cette étude, ni la variation des stratégies des différents agents biologiques face aux stress.

La lixiviation de cations par les bactéries lors de l'altération des minéraux a un rôle important dans le cycle des éléments dans le sol et notamment sur la fertilité du sol.

Dans des environnements riches (en carbone et la teneur en éléments échangeables), les communautés bactériennes développent une stratégie K qui induit la libération d'une forte quantité de fer et d'autres éléments minéraux, augmentant leur disponibilités pour les organismes vivants et améliorant ainsi la fertilité du sol. Dans des environnements pauvres, la ressource en carbone et en autres nutriments est faible. Ces conditions ne permettent pas aux communautés développant une stratégie de type r d'être efficaces sur la lixiviation de cations lors de l'altération des minéraux. Ceci amène donc à une disponibilité des éléments nutritifs moins importante et à une plus faible fertilité réelle sol.

La fonction lixiviation de cations par les bactéries lors de l'altération des minéraux peut donc constituer un critère de la bonne qualité biologique dans les sols.

III CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif global de ce travail de thèse a été d'étudier et d'identifier les interactions entre les bactéries et les minéraux dans le cadre du processus d'altération de minéraux silicatés ubiquistes. Une grande partie du travail a été consacrée à la caractérisation des processus bioinduits (acidolyse et complexolyse) conduisant à la lixiviation ou à l'immobilisation partielle des éléments minéraux. La combinaison d'une approche physico-chimique de la lixiviation des minéraux, d'une approche biologique et d'une approche isotopique nous a permis d'identifier et de modéliser à la fois ces processus et les paramètres clefs les contrôlant.

Trois domaines ont été différenciés suivant le processus qui prédomine. Lorsque le pH des solutions de lixiviation est inférieur à 3 en fin d'expérience, l'acidolyse est le processus dominant. Pour un pH final des solutions compris entre 3 et 5 l'acidolyse et la complexolyse sont impliqués. Le troisième domaine est représenté par l'immobilisation du fer.

La combinaison du modèle et d'un diagramme ternaire a permis la différenciation des processus bactériens responsables de la lixiviation du fer lors de l'altération du phlogopite et de la biotite. Cette approche a permis également de mettre en évidence des phénotypes bactériens d'altération selon le métabolisme et l'efficacité des souches bactériennes.

Différentes conditions expérimentales de laboratoires (préculture initiale des bactéries, source d'énergie...) ont été testées et sont des paramètres importants qui influent sur l'activité microbienne. Ces conditions influent notamment sur les métabolites bactériens produits (nature et quantités) et donc sur le potentiel de lixiviation d'éléments lors de l'altération de minéraux par les bactéries. De plus, le contact entre les bactéries et les particules minérales n'est pas une condition nécessaire à l'apparition du phénomène de lixiviation du fer lors de l'altération du phlogopite et de la biotite qui peut être réalisée via les métabolites excrétés par les bactéries.

L'utilisation des isotopes du Mg n'a pas confirmé l'existence d'une signature bactérienne spécifique d'altération des minéraux. Des tendances à confirmer suggèrent

cependant le traçage possible de processus d'acidolyse ou de complexolyse par cette méthode

L'étude des processus d'altération des minéraux par des communautés et des souches bactériennes dans différents types de sols très contrastés (pédogenèse, richesse naturelle en nutriments, amendement, couvert végétal) a permis d'établir un lien entre les différents paramètres physico-chimiques du sol, des paramètres environnementaux et les stratégies développées par les bactéries ainsi que leur variabilité.

Les résultats obtenus ont montré une importance significative de la richesse en nutriments organiques (taux de matière organique dans le sol) et minéraux (amendement ou richesse naturelle en nutriments issus de l'altération de la roche mère) sur la biomasse et l'activité bactérienne. Les communautés ont développé des stratégies différentes pour acquérir et rendre plus disponibles les nutriments dont elles ont besoin. Les communautés issues d'horizons riches en nutriments développent ainsi une stratégie (stratégie K) efficace qui demande une source de carbone importante pour avoir un catabolisme efficace en libérant peu d'acides organiques mais très complexants. Les communautés issues d'horizons pauvres en nutriments qui ne fournissent donc pas une source de carbone suffisante et développent une stratégie (stratégie r) qui libèrent beaucoup d'acides organiques peu complexants qui ont un impact moindre sur la lixiviation de minéraux.

PERSPECTIVES

Ces travaux de thèse permettent de mieux comprendre le rôle des bactéries sur une des étapes clé du cycle biogéochimique des éléments ayant lieu dans les sols. Les méthodes employées et validées pour identifier les processus bactériens d'altération sont proposées comme des outils de diagnostic indicateurs possibles de « qualité des sols ».

Afin d'approfondir et de mieux comprendre les processus associés à l'activité des bactéries dans les sols, différentes voies de recherche peuvent être proposées à différentes échelles d'observation :

- à l'échelle moléculaire : une identification et une caractérisation plus approfondies des souches isolées des communautés bactériennes fonctionnelles impliquées dans l'altération des minéraux permettraient d'identifier les bactéries « lixiviantes de cations » et de connaître leur importance dans les sols. L'étude des gènes impliqués en conditions aérobies dans le processus d'altération des minéraux permettrait de confirmer l'existence des stratégies d'altérations mises en évidence dans ce travail. Très peu de gènes sont, à l'heure actuelle, connus. Seuls des gènes participant à la synthèse de l'acide gluconique ont été identifiés dans des souches de *Pseudomonas*, d'*Erwinia* ou de *Rhizobium* lors de l'altération de minéraux phosphatés (Babu-Khan et al., 1995),

- à l'échelle du minéral : caractériser les sites réactifs des minéraux, l'adhésion des bactéries sur les particules minérales et les zones de microréactions autour des minéraux lors de l'altération des silicates par les bactéries permettrait d'avoir des informations sur le fonctionnement des bactéries adhérentes et leur importance par rapport aux bactéries planctoniques. La microscopie confocale et la réalisation d'isotherme d'adsorption des bactéries sur les particules minérales pourraient répondre à ces attentes,

- à l'échelle d'un microcosme : la plante a une importance cruciale dans l'altération des minéraux et cette fonction a été très étudiée ces dernières années chez différentes espèces de plantes et leurs microflore associées. Cependant, l'influence relative entre les processus issus de l'activité des plantes (mécaniques et chimiques via les exsudats racinaires) et ceux issus de l'activité des bactéries, sur l'altération des minéraux dans les sols, ne sont pas encore connues à ce jour. Les expériences nécessaires sont très difficiles à mettre en place et exigent des conditions axéniques très difficiles à conserver,

- à l'échelle d'une parcelle : l'étude des activités des communautés sur le cycle des éléments dans des mésocosmes et la réalisation du bilan de carbone permettraient de mieux comprendre le fonctionnement et la gestion du système concerné et étudier l'impact de facteurs anthropiques (polluants organiques ou minéraux, changements climatiques) sur le cycle biogéochimique des éléments. En effet, **le cycle du carbone est intimement lié aux cycles biogéochimiques des éléments à travers l'altération des silicates et l'activité des bactéries, d'abord via la consommation du carbone organique des sols par les bactéries comme source d'énergie, puis via la consommation du CO₂ lors de l'altération des silicates et la lixiviation les éléments.** Une corrélation positive existe entre la concentration

de CO₂, la concentration en protons et la concentration en éléments minéraux dissous dans les eaux (Konhauser, 2007). Ainsi, plus la concentration de CO₂ est élevée, plus la concentration en protons augmente et donc plus les éléments sont libérés en solution.

Ces dernières décennies, la concentration en CO₂ atmosphérique a augmenté significativement, parallèlement à une élévation moyenne de la température du globe. Plusieurs études ont modélisé l'effet de cette augmentation de CO₂ sur l'altération des silicates dans les sols et sur l'évolution du rôle respectif des plantes et des microorganismes. Les résultats de Brady et al. (1994) et Banwart et al. (2009) suggèrent une augmentation de la biomasse des plantes et des microorganismes menant à une augmentation de leurs activités métaboliques mais pas à une variation du pH des milieux considérés. Cependant, certaines études indiquent que l'augmentation de la concentration en CO₂ atmosphérique à court terme n'a pas (ou très peu) d'effet sur la biomasse ou la respiration bactériennes dans les sols mais a au contraire un effet sur les activités enzymatiques et donc sur les processus de biodégradation ou d'altération dans les sols (Mayr et al., 1999 et Haase et al., 2008).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques :

-A-

- Acker, J. G. et Bricker, O. P., 1992. The influence of pH on biotite dissolution et alteration kinetics at low temperature. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 56, 3073-3092.
- Anbar, A. D., 2003. Iron stable isotopes : beyond biosignatures. *Earth and Planetary Science Letters* 217, p223-236.
- Andersson, S. and Nilsson, S. I., 2001. Influence of pH and temperature on microbial activity, substrate availability of soil-solution bacteria and leaching of dissolved organic carbon in a mor humus. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1181-1191.
- Angeli, N., 2006. Evolution de la composition chimique des ruisseaux vosgiens. Analyse retrospective et effet d'un amendement calco-magnésien *Thèse Université Henri Poincaré Nancy 1, France*, 457.
- Atekwana, E.A., Atekwana, E., Legall, F.D. and Krishnamurthy, R.V., 2005. Biodegradation and mineral weathering controls on bulk electrical conductivity in a shallow hydrocarbon contaminated aquifer. *Journal of Contaminant Hydrology*, 80(3-4): 149-167.
- Augusto, L., Turpault, M.-P., and Ranger, J., 2000. Impact of forest tree species on feldspar weathering rates. *Geoderma* 96, 215-237.

-B-

- Babu-Khan, S. et al., 1995. Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3): 972-978.
- Bakken, L.R., 1985. Separation and purification of bacteria from soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 49: 1482-1487.
- Bakken, L.R. and Lindhal, V., 1995. Recovery of bacterial cells from soil. In: J.D. Van Elsas and J.T. Trevors (Editors), *Nucleic Acids in the Environment: Methods and Applications*. Springer Verlag, Heildelberg, pp. 9-27.
- Banwart, S.A., Taylor, L., Leake, J. et Beerling, D., 2009. Silicate mineral weathering reponses to increasing atmospheric CO₂, Plants and climate evolution. *Geophysical research abstracts*, 11: EGU 2009-14106.
- Barker, W., Welch, S., Chu, S. et Banfield, J., 1998. Experimental observations of the effects of bacteria on aluminosilicate weathering. *American Mineralogist* 83, p 1551-1563

- Barman, A. K., Varadachari, C., et Ghosh, K., 1992. Weathering of silicate minerals by organic acids. I. Nature of cation solubilisation. *Geoderma* 53, 45-63.
- Bastida, F., Zsolnay, A., Hernandez, T. et Garcia, C., 2008. Past, present and future of soil quality indices : A biological perspective. *Geoderma*, 147: 159-171
- Beard, B., Johnson, C., Cox L., Sun, H., Nealson, K., et Aguilar C., 1999. Iron isotope biosignatures. *Science* 285, p1889-1892.
- Beard, B., Johnson, C., Nealson, K., Skulan, J., Cox L., et Sun H., 2002. Application of Fe isotopes to tracing the geochemical and biological cycling of Fe. *Chemical Geology* 195, p87-117
- Bennett, P. C., Hiebert, F. K., et Joo Choi, W., 1996. Microbial colonization and weathering of silicates in a petroleum-contaminated groundwater. *Chemical Geology* 132, 45-53.
- Bennett, P.C., Hiebert, F.K. et Rogers, J.R., 2000. Microbial control of mineral-groundwater equilibria: Macroscale to microscale. *Hydrogeology Journal*, 8: 47-62.
- Bennett, P.C., Rogers, J.R. et Choi, W.J., 2001. Silicates, Silicate Weathering, and Microbial Ecology. *Geomicrobiology Journal*, 18: 3-19.
- Berner, E. K., Berner; R. A., and Moulton, K. L., 2003. Plants and mineral weathering: present and past. *Treatise on Geochemistry* 5, 169-188.
- Berthelin J., 1976. Etudes expérimentales des mécanismes d'altération des minéraux par des microorganismes hétérotrophes. . Thèse doctorat d'Etat, Université de Nancy p198.
- Berthelin J., 1977. Quelques aspects des mécanismes de transformation des minéraux des sols par les microorgrnismes hétérotrophes. . *Science du sol*, 1: 11-29.
- Berthelin, J., 1983. Microbial weathering processes. *Microbial Geochemistry*, Blackwell London: 223-262.
- Bigham, J.M., Bhatti, T.M., Vuorinen, A. et Tuovinen, O.H., 2001. Dissolution and structural alteration of phlogopite mediated by proton attack and bacterial oxidation of ferrous iron. *Hydrometallurgy*, 59(2-3): 301-309.
- Black, J. R., Epstein, E., Rains, W. D., Yin, Q. Z., et Casey, W. H., 2008. Magnesium-isotope fractionation during plant growth. *Environmental science and technology* 42, 7831-7836.
- Bolou Bi, E. B., Poszwa, A., et Vigier, N., 2008. Experimental determination of magnesium isotope fractionation during higher plant growth. *Geophysical Research Abstracts* 10.
- Bolou-Bi, E.B., Vigier, N., Brenot, A. and Poszwa, A., 2009. Magnesium Isotope Compositions of Natural Reference Materials. *Geostandards and Geoanalytical Research*, 33(1): 95-109.

- Bolou Bi, E. B., Poszwa, A., Leyval, C., Vigier, N., 2010. Experimental determination of magnesium isotope fractionation during higher plant growth. *Geochimica et cosmochimica acta*, in press.
- Boyle, J.R. et Voigt, G.K., 1973. Biological weathering of silicate minerals. *Plant and Soil*, 38(1): 191-201.
- Brady, P. et Carrol, S., 1994. Direct effects of CO₂ and temperature on silicate weathering: Possible implications for climate control. *Geochimica et cosmochimica acta*, 58:1853-1856
- Brantley, S., 2003. Reaction kinetics of primary rock-forming minerals under ambient conditions. . In: J.I. Drever (Editor), *Fresh Water Geochemistry, Weathering, and Soils*. Pergamon Press, Oxford, pp. 73-118.
- Brantley, S., Liermann L., et Bullen T., 2001. Fractionation of Fe isotopes by soil microbes and organic acids. *Geology* 29, p535-538
- Brantley, S., Liermann L., Guynn R., Anbar A., Icopini G., et Barling J., 2004. Fe isotopic fractionation during mineral dissolution with and without bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68, p3189-3204.
- Brenot, A., Cloquet, C., Vigier, N., Carignan, J., et France-Lanord, C., 2008. Magnesium isotope systematics of the lithologically varied Moselle river basin, France. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 5070-5089.
- Bricker, O.P., Paces, T., Johnson, C.E. et Sverdrup, H., 1994. Weathering and Erosion Aspects of Small Catchment Research. In: B. Moldan et J. Cerny (Editors), *Biogeochemistry of small catchments : A Tool for Environmental Research*. John Wiley et Sons, Chichester, pp. 86-105.

-C-

- Calvaruso, C., Turpault, M. P., and Frey-Klett, P., 2006. Root-Associated Bacteria Contribute to Mineral Weathering and to Mineral Nutrition in Trees: a Budgeting Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1258-1266.
- Calvaruso, C., Turpault, M. P., Leclerc, E., and Frey-Klett, P., 2007. Impact of ectomycorrhizosphere on the functional diversity of soil bacterial and fungal communities from a forest stand in relation to nutrient mobilization processes. *Microbial Ecology* 54, 567-577.

- Cama, J. et Ganor, J., 2006. The effects of organic acids on the dissolution of silicate minerals: A case study of oxalate catalysis of kaolinite dissolution. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70, 2191-2209.
- Campy, M., 2003. Géologie de la surface: Erosion, transfert et stockage dans les environnements continentaux. 2ième édition, *Ed. Dunod*, p 448
- Carignan, J. et al., 2004. Reflection on Mg, Cd, Ca, Li and Si Isotopic Measurements and Related Reference Materials *Geoanalytical Research*, 28: 139-148.
- Chang, V., Makishima A., Belshaw N. and R., O.N., 2003. Purification of Mg from low-Mg biogenic carbonates for isotope ratio determination using MC ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18, p 296-301.
- Chang, V. T. C., Williams, R. J. P., Makishima, A., Belshaw, N. S., et O'Nions, R. K., 2004. Mg and Ca isotope fractionation during CaCO₃ biomineralisation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323, 79-85.
- Chaussod, R. 1996. La qualité biologique des sols: évaluation et application. *Étude et gestion des sols*, 3, 4:261-278
- Chen, Y. et Brantley, S.L., 1997. Temperature- and pH-dependence of albite dissolution rate at acid pH. *Chemical Geology*, 135(3-4): 275-290.

-D-

- Drever, J. I., 1994. The effect of land plants on weathering rates of silicate minerals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58, 2325-2332.
- Drever, J.I. et Stillings, L.L., 1997. The role of organic acids in mineral weathering. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 120(1-3): 167-181.

-E-

- Ehrlich, H.L., 1998. Geomicrobiology: its significance for geology. *Earth-Science Reviews*, 45(1-2): 45-60.
- Eyring, H., 1935. The Activated Complex in Chemical Reactions. *The Journal of Chemical Physics*, 3(2): 107-115.
- Ezzaïm, A., 1997. Intérêt de la mesure du flux d'élément issu de l'altération des minéraux des sols dans le calcul des bilans minéraux d'un écosystème forestier. Le cas des plantations de Douglas dans le Beaujolais (France). Thèse de Doctorat, Nancy: Université de Nancy I, 198p.

-F-

- Fenchel, T., King, G. M. et T.H., B., 1998. *Bacterial Biogeochemistry- The ecophysiology of mineral cycling*. Elsevier academic press, 307 pp.
- Frostegård, Å., Åth, E., and Tunlid, A., 1993. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil*
- Furrer, G. et Stumm, W., 1986. The coordination chemistry of weathering: I. Dissolution kinetics of $[\delta]\text{-Al}_2\text{O}_3$ and BeO. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 50, 1847-1860.

-G-

- Gadd, G.M., 2006. *Fungi in biogeochemical cycles*. Cambridge University press, British Mycological society: 469.
- Galy, A., Belshaw, N.S., Halicz, L. and O'Nions, R.K., 2001. High-precision measurement of magnesium isotopes by multiple-collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 208(1-3): 89-98.
- Galy, A., Bar-Matthews, M., Halicz, L., et O'Nions, R. K., 2002. Mg isotopic composition of carbonate: insight from speleothem formation. *Earth and Planetary Science Letters* 201, 105-115.
- Galy, A. et al., 2003. Magnesium isotope heterogeneity of the isotopic standard SRM 980 and new reference materials for magnesium isotope ratio measurements. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18, p 1352-1356.
- Ganor, J., Mogollón, J.L. et Lasaga, A.C., 1995. The effect of pH on kaolinite dissolution rates and on activation energy. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59(6): 1037-1052.
- Ganor, J., Sharon, N. and Jordi, C., 2001. The effect of kaolinite on oxalate (bio)degradation at 25°C, and possible implications for adsorption isotherm measurements. *Chemical Geology*, 177(3-4): 431-442.
- Girard MC, Walter C, Rémy JC, Berthelin J & Morel JL (2005) *Sols et environnement*. Eds Dunod.
- Gleeson, D. B., Kennedy, N. M., Clipson, N., Melville, K., Gadd, G. M., et McDermott, F. P., 2006. Characterization of bacterial community structure on a weathered pegmatitic granite. *Microbial Ecology* 51, 526-534.

- Golubev, S.V., Bauer, A. et Pokrovsky, O.S., 2006. Effect of pH and organic ligands on the kinetics of smectite dissolution at 25°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(17): 4436-4451.
- Golubev, S.V. et Pokrovsky, O.S., 2006. Experimental study of the effect of organic ligands on diopside dissolution kinetics. *Chemical Geology*, 235(3-4): 377-389.
- Gottschalk, G., 1986. *Bacterial metabolism*. Springer-Verlag New York.
- Griffiths, B.S., Ritz, K., Ebbelwhite, N. and Dobson, G., 1998. Soil microbial community structure: Effects of substrate loading rates. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(1): 145-153.

-H-

- Haichar FZ., Marol C., Berge O., Rangel-Castro JI., Prosser JI., Balesdent J., Heulin T., et Achouak W., 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME Journal* 12, 1221-1230.
- Haase, S., Philippot, L., Neumann, G.n., Marhan, S. and Kandeler, E., 2008. Local response of bacterial densities and enzyme activities to elevated atmospheric CO₂ and different N supply in the rhizosphere of *Phaseolus vulgaris* L. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(5): 1225-1234.
- Haichar FZ., Marol C., Berge O., Rangel-Castro JI., Prosser JI., Balesdent J., Heulin T., and Achouak W. (2008) Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME Journal* 12, 1221-1230.
- Harris, R.F., Karlen, D.L. et Mull, D.J., 1996. A conceptual framework for assessment and management of soil quality and health. *Soil science society of america*, 49 : 61-82
- Hameeda B., Reddy Y., Rupela O. P., Kumar G. N., and Reddy G., 2006. Effect of Carbon Substrates on Rock Phosphate Solubilization by Bacteria from Composts and Macrofauna. *Current Microbiology* 53(4), 298-302.
- Hee Han S., Kim C., Lee J., Park J., Cho., Park S., Kim K., Krishnan H., et Kim Y., 2008. Inactivation of pqq genes of *Enterobacterintermedium*60 -2G reduces antifungal activity and induction of systemic resistance.. *FEMS Microbiological letter*, 282, p140-146.
- Helgeson, H.C., Murphy, W.M. et Aagaard, P., 1984. Thermodynamic and kinetic constraints on reaction rates among minerals and aqueous solutions. II. Rate constants, effective surface area, and the hydrolysis of feldspar. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 48(12): 2405-2432.

- Henderson, J.H., Doner, H.E., Weaver, R.M., Syers, J.K. et Jackson, M.L., 1975. Cation and silica relationships of mica weathering to vermiculite in calcareous harps soil. *Clays and clay minerals*, 24: 93-100.
- Hiebert, F.K. et Bennett, P.C., 1992. Microbial control of silicate weathering in organic-rich ground water. *Science*, 258(5080): 278-281.
- Hinsinger, P., Fernandes Barros, O. N., Benedetti, M. F., Noack, Y., and Callot, G., 2001. Plant-induced weathering of a basaltic rock: experimental evidence. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65, 137-152.
- Hinsinger, P., Jaillard, B., and Dufey, J. E., 1992. Rapid weathering of a trioctahedral mica by the roots of ryegrass. *Soil Science Society of America Journal* 56, 977-982.
- Hofman, J., Bezchlebova, J., Dusek, L., Dolezal, L., Holoubek, I., Andel, P., Anorgova, A. et Maly, S., 2003. Novel approach to monitoring of the soil biological quality. *Environment international*, 28: 771-778
- Hutchens, E., Valsami-Jones, E., McEldowney, S., Gaze, W. and McLean, J., 2003. The role of heterotrophic bacteria in feldspar dissolution - an experimental approach. *Mineralogical Magazine*, 67(6): 1157-1170.
- Hutchens, E., Clipson, N. et McDermott, F.P., 2008. Mineralogical influence on the structure and the diversity of bacterial communities associated with silicate minerals. *Geophysical Research Abstracts*, 10, EGU2008-A-03930

-J-

- Johnson, C.E., Litaor, M., Billett, M.F. et Bricker, O., 1994. Chemical Weathering in Small Catchment Research : climatic and anthropogenic influences. In: B. Moldan et J. Cerny (Editors), *Biogeochemistry of small catchments : A Tool for Environmental Research*. John Wiley et Sons, Chichester, pp. 86-105.

-K-

- Kalinowski, B.E. et Schweda, P., 1996. Kinetics of muscovite, phlogopite, and biotite dissolution and alteration at pH 1-4, room temperature. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60(3): 367-385.

- Kalinowski, B.E., Liermann, L.J., Givens, S. et Brantley, S.L., 2000. Rates of bacteria-promoted solubilization of Fe from minerals: a review of problems and approaches. *Chemical Geology*, 169(3-4): 357-370.
- Kalinowski, B.E. et Schweda, P., 2007. Rates and nonstoichiometry of vermiculite dissolution at 22°C. *Geoderma*, 142(1-2): 197-209.
- Koele, N., Turpault, M.-P., Hildebrand, E. E., Uroz, S., and Frey-Klett, P., 2009. Interactions between mycorrhizal fungi and mycorrhizosphere bacteria during mineral weathering: Budget analysis and bacterial quantification. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 1935-1942.
- Knoepp, J., Coleman, D., Crossley Jr, D.A. et Clark J. S., 2000. Biological indices of soil quality an ecosystem case study of their use. *Forest ecology and Management*, 138: 357-368.
- Konhauser, K., 2007. Introduction to geomicrobiology. Blackwell publishing company, p425
- Krumbein, W.E., 1972. Rôle des microorganismes dans la genèse, la diagenèse et la dégradation des roches en place. *Revue d'écologie et biologie du sol*, 9: 283-319.

-L-

- Lasaga, A.C., 1998. Kinetic Theory in the Earth Sciences. Princeton University Press.
- Leveau, J. H. J., Uroz, S., and de Boer W., 2009. The bacterial genus *Collimonas*: mycophagy, weathering and other adaptive solutions to life in oligotrophic soil environments. *Environmental microbiology* in press.
- Leyval C. and Berthelin J., 1989. Interaction between *laccaria laccata*, *Agrobacterium radiobacter* and beech roots : influence on P, K, Mg and Fe mobilization from minerals and plant growth. *Plant and Soil* 117, 103-120.
- Leyval C., Laheurte F., Belgy G., and Berthelin J., 1990. Weathering of micas in the rhizospheres of maize, Pine and Beech seedlings influenced by Mycchorizal and Bacterial Inoculation. *Symbiosis* 9, 105-109.
- Liermann, L. J., Kalinowski, B. E., Brantley, S. L., et Ferry, J. G., 2000. Role of bacterial siderophores in dissolution of hornblende. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 64, 587-602.
- Linton, J. D., Gouldney, D., et Woodard, S., 1988. Efficiency and stability of exopolysaccharide production from different carbon sources by *Erwinia herbicola*. *Journal of General Microbiology* 134, 1913-1921.

-M-

- Malmström, M., Banwart, S., Lewenhagen, J., Duro, L. et Bruno, J., 1996. The dissolution of biotite and chlorite at 25°C in the near-neutral pH region. *Journal of Contaminant Hydrology*, 21(1-4): 201-213.
- Malmström, M. et Banwart, S.A., 1997. Biotite dissolution at 25 °C: The dependance of dissolution rate and stoichiometry. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61: 2779-2799.
- Malmström, M., Destouni, G., Banwart, S.A. et Strömberg, B.H.E., 2000. Resolving the scale-dependence of mineral weathering rates. *Environmental science and technology*, 34(7): 1375-1378.
- Mathur, R., Ruiz J., Titley S., Liermann L., Buss H., et S., B., 2005. Cu isotopic fractionation in the supergene environment with and without bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol 69, p 5233-5246.
- Mayr, C., Miller, M. and Insam, H., 1999. Elevated CO₂ alters community-level physiological profiles and enzyme activities in alpine grassland. *Journal of Microbiological Methods*, 36(1-2): 35-43.
- Mulder, J. et Cresser, M., 1994. Soil and soil solution chemistry. In: B. Moldan et J. Cerny (Editors), *Biogeochemistry of small catchments : A Tool for Environmental Research*. John Wiley et Sons, Chichester, pp. 107-131.
- Murakami, T., Utsunomya, S., Yokoyama, T., et Kasama, T., 2003. Biotite dissolution processes and mechanisms in the laboratory and in nature: Early stage weathering environment and vermiculization. *American mineralogist* 88, 377-386.
- Murphy, W.M., Oelkers, E.H. et Lichtner, P.C., 1989. Surface reaction versus diffusion control of mineral dissolution and growth rates in geochemical processes. *Chemical Geology*, 78(3-4): 357-380.

-N-

- Neale, S. P., Shah, Z., and Adams, W. A., 1997. Changes in microbial biomass and nitrogen turnover in acidic organic soils following liming. *Soil Biology and Biochemistry* 29, 1463-1474.
- Neumann, G. et Römheld, V., 2000. The release of root exudates as affected by the plant physiological status. In: Z.V. R. Plinton, Z. Nannipieri (Editor), *The rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. Marcel Dekker 2000.

- Nihlgard, B.J., Swank, W. et Mitchell, M., 1994. Biological processes and catchment studies.
In: B. Moldan et J. Cerny (Editors), Biogeochemistry of small catchments : A Tool
for Environmental Research. John Wiley et Sons, Chichester, pp. 133-161.
- Nys, C. (2004). Restauration de la qualité des sols et des eaux de deux bassins
versants situés dans les Vosges gréseuses et les Vosges cristallines :
Caractérisation initiale des sites ateliers d'amendement calco-magnésien
(Bassins versants de Cornimont et Senones). INRA Nancy, ONF, 38p.

-O-

- Oelkers, E.H., 2001. General kinetic description of multioxide silicate mineral and glass
dissolution. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65(21): 3703-3719.
- Olsen, A.A. et Donald Rimstidt, J., 2008. Oxalate-promoted forsterite dissolution at low pH.
Geochimica et Cosmochimica Acta, 72(7): 1758-1766.

-P-

- Parr, J.F., Papendick, R.I., Hornick, S.B., Meyer, R.E., 1992. Soil quality: attributes and
relationship to alternative and sustainable agriculture. *American Journal of
alternative agriculture*, 7: 5-10
- Patel, D., Archana, G., et Kumar, G., 2008. Variation in the Nature of Organic Acid Secretion
and Mineral Phosphate Solubilization by *Citrobacter* sp. DHRSS in the Presence of
Different Sugars. *Current Microbiology* 56, 168-174.
- Pelmont, J., 1993. Bactéries et environnement. Presse universitaire de Grenoble, p 899
- Plassart, P., Akpa Vincelas, M., Gangneux, C., Mercier, A., Barray, S., and Laval, K., 2008.
Molecular and functional responses of soil microbial communities under grassland
restoration. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 127, 286-293.
- Pogge von Strandmann, P. A. E., Burton, K. W., James, R. H., van Calsteren, P., Gislason, S.
R., et Sigf'sson, B., 2008. The influence of weathering processes on riverine
magnesium isotopes in a basaltic terrain. *Earth and Planetary Science Letters* 276,
187-197.

-R-

- Ra, K. et Kitagawa, H., 2007. Magnesium isotope analysis of different chlorophyll forms in marine phytoplankton using multi-collector ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 22, 817-821.
- Rafie, O., 2003. Apport du traçage des mécanismes d'altération (acido-complexolyse) des micas au phénotypage fonctionnel des bactéries rhizosphériques. Rapport de DEA national de science du sol, Université Henri Poincaré Nancy 1: 9-27.
- Raulund-Rasmussen, K., Borggaard, O. K., Hansen, H. C. B., et Olsson, M., 1998. Effect of natural organic soil solutes on weathering rates of soil minerals. *European Journal of Soil Science* 49, 397-406.
- Robert M. et Berthelin J., 1986. Role of biological et Biochemical factors in soil mineral weathering. *Soil science society of america*, 12: 453-495.
- Rogers, J.R. et Bennett, P.C., 2004. Mineral stimulation of subsurface microorganisms: release of limiting nutrients from silicates. *Chemical Geology*, 203(1-2): 91-108

-S-

- Shillings, L.L., Drever, J.I., Brantley, S.L., Sun, Y. et Oxburg, R., 1996. rates of feldspar dissolution at pH 3-7 with 0-8 m M oxalic acid. *Chemical Geology*, 132(1-4): 79-89.
- Song, W., Ogawa, N., Oguchi, C.T., Hatta, T. et Matsukura, Y., 2007. Effect of *Bacillus subtilis* on granite weathering: A laboratory experiment. *CATENA*, 70(3): 275-281.
- Stenstrom, J; Stenberg, B; Johansson, M (1998) Kinetics of substrate-induced respiration (SIR): Theory *AMBIO* 27(1):35-39
- Stenström, J., Svensson, K., Johansson, M. 2001. Reversible transition between active and dormant microbial states in soil. *FEMS Microbiology Ecology* 36, 93-104.
- Stillings, L.L. et Brantley, S.L., 1995. Feldspar dissolution at 25°C and pH 3: Reaction stoichiometry and the effect of cations. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59(8): 1483-1496.

-T-

- Teixeira de Mattos, M. J. et Neijssel, O. M., 1997. Bioenergetic consequences of microbial adaptation to low-nutrient environments. *Journal of Biotechnology* 59, 117-126.
- Thomas, A. L., Dambrine, E., King, D., Party, J. P., and Probst, A., 1999. A spatial study of the relationships between streamwater acidity and geology, soils and relief (Vosges, northeastern France). *Journal of Hydrology* 217, 35-45.

- Thorseth, I. H., Furnes, H., et Haldal, M., 1992. The importance of microbiological activity in the alteration of natural basaltic glass. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 56, 845-850.
- Tipper, E. T., Galy, A., et Bickle, M. J., 2006a. Riverine evidence for a fractionated reservoir of Ca and Mg on the continents: Implications for the oceanic Ca cycle. *Earth and Planetary Science Letters* 247, 267-279.
- Tipper, E. T., Galy, A., et Bickle, M. J., 2008. Calcium and magnesium isotope systematics in rivers draining the Himalaya-Tibetan-Plateau region: Lithological or fractionation control? *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 1057-1075.
- Tipper, E. T., Galy, A., Gaillardet, J., Bickle, M. J., Elderfield, H., et Carder, E. A., 2006b. The magnesium isotope budget of the modern ocean: Constraints from riverine magnesium isotope ratios. *Earth and Planetary Science Letters* 250, 241-253.
- Touray, J.C., 1980. la dissolution des minéraux- Aspects cinétiques. Ed. Masson, Paris, 105 pp.
- Turpault, M.P. and Trotignon, L., 1994. The dissolution of biotite single crystals in dilute HNO₃ at 24°C: Evidence of an anisotropic corrosion process of micas in acidic solutions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 58(13): 2761-2775.
- Turpault, M.P., Ranger, J., Marques, R. et Ezzaïm, A., 1999. Les bilans entrées-sorties, indicateurs de gestion durable des écosystèmes forestiers. *Revue forestière française*, 2: 184-196

-U-

- Ullman, W.J., Kirchman, D.L., Welch, S.A. et Vandevivere, P., 1996. Laboratory evidence for microbially mediated silicate mineral dissolution in nature. *Chemical Geology*, 132(1-4): 11-17.
- Urey, H.C., 1952. *The planets, Their origin and Development*. Yale University Press.
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M. P., Pierrat, J. C., Mustin, C., and Frey-Klett, P., 2007. Effect of the Mycorrhizosphere on the Genotypic and Metabolic Diversity of the Bacterial Communities Involved in Mineral Weathering in a Forest Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 3019-3027.
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.-P., and Frey-Klett, P., 2009. Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. *Trends in Microbiology* 17, 378-387.

Uroz, S. et al., Efficient mineral weathering is a distinctive functional trait of the bacterial genus *Collimonas*. *Soil Biology and Biochemistry*, In Press, Uncorrected Proof.

-V-

Van der Salm, C., De Vries, W., Olsson, M. et Raulund-Rasmussen, K., 1999. Modelling impacts of atmospheric deposition nutrient cycling and soil weathering on the sustainability of nine forest ecosystem. *Water, air and soil pollution*, 109: 101-135

Vandevivere, P., Welch, S.A., Ullman, W.J. et Kirchman, D.L., 1994. Enhanced dissolution of silicate minerals by bacteria at near-neutral pH. *Microbial Ecology*, 27(3): 241-251.

Van Elsas, J. D., Jansson J. K., and Trevors, J. T., 2007. *Modern soil microbiology- Second Edition*. CRC Press Taylor and Francis Group.

Van Loosdrecht. M.C.M, Lyklema. J., Norde. W., et Zehnder. A.J.B, 1990. Influences of interfaces on Microbial activity. *Microbiological reviews* 54, 75-87.

Viles, H, 1995. Ecological perspectives on rock surface weathering: Towards a conceptual model. *Geomorphology*, 13: 21-35

-W-

Welch, S.A. et Ullman, W.J., 1993. The effect of organic acids on plagioclase dissolution rates and stoichiometry. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 57(12): 2725-2736.

Welch, S.A. et Vandevivere, P., 1994. Effect of microbial and other naturally occurring polymers on mineral dissolution. *Geomicrobiology Journal*, 12(4): 227-238.

Welch, S.A. et Ullman, W.J., 1996. Feldspar dissolution in acidic and organic solutions: Compositional and pH dependence of dissolution rate. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60(16): 2939-2948.

Welch, S.A. et Ullman, W.J., 1999. The effect of microbial glucose metabolism on bytownite feldspar dissolution rates between 5° and 35°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63(19-20): 3247-3259.

White, A.F. et al., 1999. The effect of temperature on experimental and natural chemical weathering rates of granitoid rocks. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63(19-20): 3277-3291.

- White, A.F. et Brantley, S.L., 2003. The effect of time on the weathering of silicate minerals: why do weathering rates differ in the laboratory and field? *Chemical Geology*, 202(3-4): 479-506.
- Wieland, E. et Stumm, W., 1992. Dissolution kinetics of kaolinite in acidic aqueous solutions at 25°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 56(9): 3339-3355.
- Wollast, R., 1967. Kinetics of the alteration of K-feldspar in buffered solutions at low temperature. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 31(4): 635-648.
- Wombacher, F., Eisenhauer A., Heuser A., et Weyer S., 2006. Magnesium stable isotope compositions in biogenic CaCO₃. *Geophysical Research abstracts* 8, A06353.
- Wu, L., Jacobson, A.D., Chen, H. et Hausner, M., 2007. Characterization of elemental release during microbe-basalt interactions at T= 28°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71(9): 2224-2239.
- Wu, L., Jacobson, A.D. et Hausner, M., 2008. Characterization of elemental release during microbe-granite interactions at T=28°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(4): 1076-1095.

-Z-

- Zobell, Z. E., 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of bacteriology* 46, 39-56

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

LISTE DES FIGURES:

CHAPITRE 1

Figure 1- 1. Composition moyenne minéralogique du sol en climat tempéré

Figure 1- 2. Schéma de l'activité microbienne

Figure 1- 3. Ordre d'altération des minéraux

Figure 1- 4. Illustration schématique de l'environnement sol autour des racines en terme de diffusion de substrats carbonés et de nutriments

Figure 1- 5. Réaction d'oxydo-réduction permettant la production d'ATP

Figure 1-6. Pourcentage d'éléments libérés lors de la lixiviation de phlogopite par 0,001M d'acides organiques à 60°C

CHAPITRE 2

Figure 2-1. Principales étapes méthodologiques de la thèse

Figure 2- 2. Représentation schématique des réacteurs

Figure 2-3. Représentation schématique des différentes étapes de préparation, d'incubation et révélation en microplaques

Figure 2- 4. Évolution dans le temps du pH (A), de la consommation de glucose (B) et le fer lixivié (C) lors de l'altération de phlogopite par les bactéries

Figure 2-5. Carte géologique simplifiée de la lorraine et lieu de prélèvement des échantillons

Figure 2- 6. Coupe géologique schématique du site d'étude A au site B

CHAPITRE 3

Figure 3- 1. Taux de libération du fer en solution ($\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) en fonction du pH pour le phlogopite (A) et la biotite (B)

Figure 3- 2. Représentation classique des concentrations de fer en solution en fonction du pH des résultats sur la lixiviation du fer lors de l'altération de phlogopite et biotite

Figure 3- 3. Schéma représentatif des domaines où agissent des processus distincts

Figure 3- 4. Diagramme ternaire A-C-I représentant la contribution de l'acidolyse, de la complexolyse et de l'immobilisation de la lixiviation du fer dans les expériences biotiques d'altération de phlogopite (A) et de biotite (B)

Figure 3- 5. Profils métaboliques de la souche bactérienne RA1 (A) et PS2 (B)

Figure 3- 6. Pourcentage de carbone métabolisé en fonction du taux de libération du fer

Figure 3- 7. Pourcentage de carbone métabolisé en fonction du pH

Figure 3- 8. Évolution de la densité bactérienne, de la concentration en glucose, du pH et de la quantité fer lixivié lors de l'altération de phlogopite

Figure 3- 9. Évolution de la concentration des acides oxalique, gluconique et propionique lors de l'altération de phlogopite par PS2 et RA1

Figure 3- 10. Pourcentage de carbone métabolisé au cours du temps

Figure 3- 11. Taux de fer libéré en solution à 3 et 7 jours en fonction du pH en présence de souches PS2 et RA1 soumises à différents types de précultures.

Figure 3- 12. Évolution au cours du temps de la densité cellulaire (DO_{600nm}), du pH, du glucose et de la quantité de fer lixivié pour des concentrations initiales de glucose de 2, 5 et 10 g.l⁻¹ (Souche bactérienne RA1)

Figure 3- 13. Concentration (mg.l⁻¹) des acides organiques produits par la souche bactérienne RA1 pour des concentrations de glucose initiales de 2, 5 et 10 g.l⁻¹ et % de carbone métabolisé par les bactéries au cours du temps

Figure 3- 14. Évolution du phénotype de la souche RA1 en fonction de la concentration initiale en glucose. Taux de dissolution du fer en fonction du pH

Figure 3- 15. Concentrations en nitrates (NO_3^-) et phosphates (PO_4^{3-}) au cours du temps dans les expériences réalisées avec RA1 à différentes concentrations initiales de glucose

Figure 3- 16. Taux de libération du fer en fonction du pH lors de l'altération de phlogopite et biotite en présence de bactéries et différentes sources de carbone utilisables par les bactéries

Figure 3- 17. Pourcentage de carbone métabolisé en fonction du taux de libération du fer lors de l'altération de phlogopite et de biotite par les bactéries en présence de diverses sources de carbone

Figure 3- 18. Dispositifs en micro-réacteurs (microplaques) utilisés pour les expériences contact, semi-contact, non-contact

Figure 3- 19. pH et fraction (soluble et totale) de fer lixivié dans les expériences d'altération de phlogopite et de biotite suivant différentes modalités de contact bactéries-minéral.

Figure 3- 20. Pourcentage de carbone métabolisé par les bactéries RA1 et PS2 en contact, semi-contact, et non-contact de particules de phlogopite et biotite

Figure 3- 21. Évolution de la densité cellulaire (DO 600 nm), des concentrations en glucose et des protons au cours du temps pour les expériences biotiques

Figure 3- 22. Fraction de Mg libérée (F_{Mg}) dans les expériences de lixiviation chimique et biologique de phlogopite

Figure 3- 23. Rapport Mg/Si, Fe/Si, Al/Si et Mg/Fe dans toutes les expériences biotiques et abiotiques et dans le phlogopite de départ

Figure 3-24. Évolution du $\delta^{26}Mg_{DSM3}$ en fonction de la fraction de Mg lixiviée lors de l'altération de phlogopite dans les expériences biotiques et abiotiques

Figure 3-25. pH versus $\delta^{26}Mg$ et le taux de dissolution du phlogopite (R_{Si}) pour toutes les expériences biotiques et abiotiques

CHAPITRE 4

Figure 4- 1. Nombre de bactéries totales par gramme de sol sec et proportion de bactéries cultivables par rapport aux bactéries totales, exprimé en pour mille (‰), pour les sols témoin et amendé.

Figure 4- 2. Corrélation entre le pourcentage de carbone organique et le nombre de bactéries dans les horizons de sol amendé et témoin sous lande (mesures Juillet 2008)

Figure 4- 3. Richesse fonctionnelle potentielle des communautés bactériennes extraites des sols témoin et amendé sous landes

Figure 4- 4. Corrélation entre le pH et le fer mesurés dans les puits de la microplaque illustrant le potentiel d'altération des communautés bactériennes extraites des sols témoin et amendé sous landes (A) sol témoin, (B) sol amendé

Figure 4- 5. Pourcentage de carbone métabolisé en fonction du taux de libération du fer log (r_{Fe}) dans les expériences réalisées avec les communautés bactériennes extraites des sols témoin et amendé sous landes

Figure 4- 6. Nombre de bactéries totales par gramme de sol sec et proportion de bactéries cultivables par rapport aux bactéries totales, exprimé en pour mille (‰), pour les sols témoin et amendé sous landes (en noir) et sous forêt (en rouge)

Figure 4- 7. Richesse fonctionnelle potentielle des communautés bactériennes extraites des sols témoin et amendé sous forêt en Juillet 2009

Figure 4- 8. Potentiel d'altération des communautés bactériennes extraites des sols témoin et amendé en été 2009 sous landes et sous forêt

Figure 4- 9. Concentrations en acides organiques des solutions de sol gravitaires échantillonnées à différentes dates sur les sites témoin et amendé sous landes

Figure 4- 10. Potentiel d'altération des communautés bactériennes extraites de différents horizons du luvisol gleyique (GL-A1 ; GL-A2 et GL-B2) sous différents couverts végétaux: forêt (GLF), culture (GLC) et prairie (GLP)

Figure 4- 11. Potentiel d'altération des communautés extraites de (A) différents horizons du luvisol gleyique (GL-A1; GL-A2; GL-B2); cambisol dystrique (DC-A1; DC-B; DC-C); cambisol calcique (CC-(B)/C) et du luvisol (L-A1; L-A2; L-B2); (B) leptosol rendzique colluvial (CCL-A1; CCL-A1/C) et leptosol rendzique (CL-A1; CL-A1/C) et (C) podzol (P-A1; P-A2; P-Bh; P-Bs; P-C); podzol leptique (LP-A1; LP-A2; LP-Bs; LP-C)

Figure 4- 12. Corrélation entre le pourcentage de carbone métabolisé et le taux de libération du fer - Mise en évidence de 2 stratégies d'altération pour les communautés bactériennes isolées de différents horizons de sols

Figure 4- 13. Potentiel d'altération de la phlogopite par des souches bactériennes isolées à partir des communautés extraites des sols

Figure 4- 14. Diagramme ternaire A-C-I représentant la contribution de l'acidolyse, la complexolyse et l'immobilisation sur la lixiviation du fer du phlogopite par les souches bactériennes isolées des sols

Figure 4- 15. Diversité des souches bactériennes isolées des sols lorrains

Figure 4- 16. Potentiel d'altération du phlogopite par des souches bactériennes suivant leur genre.

CHAPITRE 5

Figure 5-1. Schéma récapitulatif des fonctions de lixiviation de cations des communautés bactériennes dans les sols lors de l'altération de minéraux silicatés

LISTE DES TABLEAUX:

CHAPITRE 1

Tableau 1- 1. Principaux modes de dissolution des minéraux

Tableau 1- 2. Exemple de flux d'altération et dépôt atmosphérique de quelques sols.

Tableau 1- 3. Agents chimiques et biochimiques agissants sur l'altération

Tableau 1- 4. Processus d'altération biochimique dominant en fonction des zones climatiques et de quelques types de sols

Tableau 1- 5. Récapitulatif des taux de dissolution de quelques silicates calculés à partir de l'équation 1

CHAPITRE 2

Tableau 2- 1. Composition minéralogique des micas utilisés

Tableau 2-2. Liste des sources de carbone utilisées dans les expériences en microplaques. La concentration initiale est de $0,8 \text{ g.l}^{-1}$ de carbone.

Tableau 2- 3. Liste des horizons échantillonnés

CHAPITRE 3

Tableau 3- 1. Constante de dissolution apparente et ordre de réaction de phlogopite et de biotite

Tableau 3- 2. Concentrations d'acides organiques (ppm) mesurés en solution dans les expériences biotiques

CHAPITRE 4

Tableau 4- 1. Analyses élémentaires des horizons de sols témoin et amendé échantillonnés sous landes

Tableau 4- 2. Caractéristiques physico-chimiques des horizons de sol témoin et amendé sous landes

Tableau 4- 3. Caractéristiques physico-chimiques des horizons de sols échantillonnés

Tableau 4- 4. Caractéristiques physico-chimiques des horizons du luvisol gleyique sous prairie et sous forêt

Tableau 4- 5. Principaux résultats obtenus sur le potentiel d'altération des communautés bactériennes en fonctions de la teneur en MO et de la richesse en nutriments minéraux

CHAPITRE 5

Tableau 5- 1. Importance relative des différents paramètres sur la biolixiviation des micas.

ANNEXE

- **ARTICLE 1 accepté en révision dans *Geochimica et Cosmochimica Acta* :**
Dissolution rates of phyllosilicates as a function of bacterial metabolic diversity
- **ARTICLE 2 en cours de soumission :** Characterization of elemental release and Mg isotopic signatures during bacteria-phlogopite interactions

ARTICLE 1

Dissolution rates of phyllosilicates as a function of bacterial metabolic diversity

Balland, C^{*}, Poszwa, A., Leyval, C., and Mustin, C.

Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les Sols (LIMOS),
UMR 7137, Nancy-University, CNRS, Faculté des Sciences, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-les-
Nancy, Cedex, France

*corresponding author

tel : +33383684283

fax : +33383684284

clarisse.balland@limos.uhp-nancy.fr

ABSTRACT:

Biotite and phlogopite weathering experiments in aerobic conditions were carried out to better understand the dissolution kinetics and processes (proton- and ligand-promoted dissolution) involved in the presence of various bacterial strains. Miniature batch reactors (300 µl in microplate wells) were used at 24°C for 3 days with and without bacterial strains. Abiotic experiments were performed with organic and nitric acids in order to calibrate the biotite-phlogopite chemical dissolution. An empirical model was used to fit the pH dependence for iron release rate (r_{Fe}) considering the influence of both protons and ligands from acidic to neutral conditions (pH ranging from 3 to 7): $r_{Fe} = k_H(a_{H^+})^m + k_L(a_L)^l$ where k is the apparent rate constant, a_{H^+} and a_L are the activities of protons and ligands, and m and l are the reaction orders. For both minerals in most cases at a given pH, the iron release rates in the presence of bacteria were in good agreement with rates determined by the chemical model and could be explained by a combination of proton- and ligand-promoted processes. Bacteria affect mineral dissolution and iron release rates through the quantities and nature of the organic acids they produce. Three domains were differentiated and proposed as biochemical models of mica dissolution: 1) below pH 3, only proton-promoted dissolution occurred, 2) in weakly acidic solutions both ligand- and proton-promoted mechanisms were involved, and 3) iron immobilization occurred, at pH values greater than 4 for biotite and greater than 5 for

phlogopite. This model allows us to distinguish the “weathering pattern phenotypes” of strains. Bacteria that are isolated from horizons poor in carbon appear more efficient at weathering micas than bacterial strains isolated from environments rich in carbon. Moreover, our results suggest that the mineral could exert a control on the release of organic acids and the “weathering pattern phenotypes” of bacteria.

Keywords: weathering, biotite, phlogopite, bacteria, organic acids, model

1. INTRODUCTION

Many heterotrophic bacteria are implicated in the cycling of elements at the Earth’s surface through the weathering of silicate minerals in soils. Weathering processes contribute to soil fertility and may be critical for natural ecosystems on acid rocks (e.g. forests) because silicate minerals are one of the main sources of elements for living organisms. A great number of studies (BERTHELIN, 1983; ROBERT and BERTHELIN, 1986; LEYVAL et al., 1990; DREVER and STILLINGS, 1997; BARKER et al., 1998) have demonstrated that microorganisms can accelerate elemental release from silicate minerals in aerobic conditions. The bacteria acquire limiting nutrients like iron (Fe) and phosphorus (P) (ROGERS and BENNETT, 2004) by the release of protons or metabolites (ligands or organic acids) that influence pH, complex cations, or change the mineral saturation state (ULLMAN et al., 1996; LIERMANN et al., 2000; VALSAMI-JONES and MCELDOWNEY, 2000). In anoxic conditions, some studies observed that bacteria, via some precipitation/passivation effects on minerals surfaces, can reduce elemental release (e.g. SANTELLI et al., 2001; BENZERARA et al., 2004). However, in aerobic conditions or oligotrophic environments (nutrient depleted), these precipitation/passivation processes have not yet been demonstrated. Only a few studies investigate the quantitative and qualitative impact of microbial diversity on silicate weathering in soils (BENNETT et al., 1996; BENNETT et al., 2001; ROGERS and BENNETT, 2004; HUTCHENS et al., 2008a; HUTCHENS et al., 2008b). Experimental results lead the different authors to similar conclusions: mineral composition strongly influences the metabolic activities and the colonization pattern on minerals and rocks by bacteria. There is no evidence of that bacteria play a controlling role in the dissolution of silicate minerals, although they do control the dissolution of phosphate minerals (BABU-KHAN et al., 1995). Silicate weathering is the sum of a complex set of interactions including mechanical, chemical and biochemical processes.

Mineral dissolution is controlled by proton adsorption and the solution concentrations of hydroxyls or ligands that polarize and weaken oxygen-metal bonds at the mineral surface (HELGESON et al., 1984; FURRER and STUMM, 1986; MALMSTRÖM et al., 1996). Several studies have investigated the catalytic effect of dicarboxylic acids on the dissolution of oxides and silicates (FURRER and STUMM, 1986; CAMA and GANOR, 2006) and concluded that the silicate weathering mechanisms involved are surface-controlled. The overall dissolution rate in the presence of ligands is the sum of two independent surface reaction rates: one promoted by protons and the other promoted by ligands. Proton-promoted dissolution predominated at acidic pH (1-4) and the ligand-promoted dissolution occurs near-neutral pH (5-7) where the effect of protons is minimal (WELCH and ULLMAN, 1999). An empirical model was proposed to fit the pH and ligand dependent dissolution rate (R_w) of phyllosilicates (FURRER and STUMM, 1986): $R_w = k_H (a_{H^+})^n + K_N + k_{OH} (a_{OH})^m + k_L (a_L)^l$ (eq 1), where k_H is the apparent rate constant at acidic pH; k_N is the apparent rate constant at neutral pH; k_{OH} is the apparent rate constant at basic pH; k_L is the apparent rate constant in the presence of a ligand; a_{H^+} , a_{OH} and a_L are the activities of protons, hydroxyls and ligands; n , m and l are the reaction orders. Generally, weathering studies rely on mineral dissolution taking place in non-equilibrium systems and reaching a steady state, with the assumption that the mass and properties of minerals stay constant with time (BRANTLEY, 2003). Experimental studies of chemical silicate dissolution rates have been performed in open systems, i.e., flow-through reactors under controlled conditions. The conditions were generally kept under-saturated with respect to the reacting mineral and secondary phases (STILLINGS and BRANTLEY, 1995; SONG et al., 2007), even for long periods. Such methods allow accurate prediction of the mineral dissolution rate under abiotic conditions and the subsequent elemental release rate. These methods can also be used to evaluate the role of protons (“acidolysis”) or organic ligand (“complexolysis”) in laboratory dissolution processes. However, especially in biotic experiments, these methods are generally difficult to set up, not reproducible and difficult to interpret because the microbe-mineral interactions can change drastically after the bacteria die and are no longer able to maintain the chemistry (e.g., pH and ligands released) of their environment.

Experiments performed in batch reactors (closed systems) permit quantitative and reproducible identification of the various microbial processes involved in silicate mineral weathering. At the beginning of batch reactor experiments in biotic conditions, the observed release rates from minerals are high but generally decrease after one week (KALINOWSKI et al. 2000; WELCH et al. 2002; WU et al., 2007 and WU et al., 2008). This decrease is usually attributed to the precipitation of an iron oxy-hydroxide, a change in the solution chemistry

(number of protons, ligands, etc) or a depletion of mineral reactive sites. As a consequence, these methods, when performed over a period more than two weeks allow efficient prediction of the initial mineral dissolution rate for both the biotic and abiotic conditions.

We used miniaturized batches (microplate wells) in a bioassay to determine the initial dissolution rates of biotite and phlogopite by biological (bacterial) and chemical agents. The two minerals are 2:1 phyllosilicates with low solubility and are often present in soils particularly in acid soils. The efficiency of silicate mineral weathering was estimated based on pH and the amount of iron leached into solution.

The goal of our study is to compare the effect of bacteria extracted from soils to chemical leaching experiments. Experiments performed with nitric and citric acid permit the application of the empirical model developed by FURRER and STUMM 1986 to define the action of protons and ligands on silicate minerals dissolution. More precisely, this study was focused on the initial iron release rates from biotite and phlogopite at acidic pH as a function of the ecological origin (soil) and metabolic pathway (organic ligand by-products) of bacterial strains. The effective domains where bacteria enhance the dissolution of micas are delineated.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. Minerals

The two 2:1 phyllosilicates used in this study were biotite from France Raze – Limousin and phlogopite from Madagascar – Vohitrosy. The structural formulae of phlogopite and biotite are $K_{1,85} Na_{0,03} Ca_{0,04} [Si_{5,15} Al_{2,33} Fe_{0,52}] [Mg_{5,8} Fe^{2+}_{3,8} Ti_{0,1} \text{---}0,1] O_{20} (OH)_4$ et $K_{1,7} Na_{0,1} Ca_{0,1} [Si_{5,64} Al_{2,36}] [Mg_{1,3} Fe_{3,8} Ti_{0,4} Mn_{0,4} \text{---}0,4] O_{20} (OH)_4$, respectively. After wet grinding and sieving, both mineral samples were rinsed under sonication with distilled deionized water at neutral pH to remove ultrafine particles. The dried 50-100 and 295-420 μm fractions were selected to conduct experiments with phlogopite and biotite respectively. The specific surface areas of the phlogopite and biotite were 0.5 (± 0.3) and 0.1 (± 0.2) $m^2 g^{-1}$, respectively, as determined by the N_2 adsorption Brunauer-Emmet-Teller method. Each well (reactor) received 7 mg of phlogopite or 22 mg of biotite. Before starting the experiments, the mineral powders were sterilized at 170°C for 2 hours under a dry atmosphere.

2.2. Bacterial strains

Three heterotrophic bacterial strains (*PA1*, *AR1* and *RA1*) were isolated from the rhizosphere of beech, pine and wheat, respectively. These strains were chosen for their ability to dissolve minerals (*AR1* and *PA1*) or to produce organic acids (*RA1* and *PA1*) (LEYVAL et al., 1990). A complementary set of strains (*BE1*, *PS1*, *PS2*, *BS1*, *BS2*, *BS3*, *PC1*) was isolated from different horizons of a podzol a type of acidic soil located in the Vosges Mountains of northeastern France. The genus of the bacterial strains was determined by the amplification of 16S rRNA genes and sequencing. Polymerase chain reactions were performed using an universal set of primers in a total reaction volume of 50 µl containing 1x PCR mastermix (Eppendorf®), 0.1 µM of primers (966 F and 1401 R) and 1 µl cell extract (Fleske 1998). Before being sequenced by MWG biotech Company (Courtaboeuf, France), the PCR products (PCR product size: 433 base pair) were purified and concentrated using mini-columns (High Pure™ PCR product Purification Kit, Roche diagnostic). A blast program was used to compare the sequences with those of the GenBank databases (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). The following identification was made with a maximum identification of about 99 % summarized in Table 1: *Rhanelia aquatilis* (*RA1*), *Pantoea agglomerans* (*PA1*), *Agrobacterium* sp. (*AR1*), *Pseudomonas* sp. (*PS1*, *PS2*), *Burkholderia* sp. (*B1*, *B2* *B3*), *Paracoccus* sp. (*PC1*) and *Sphingobacterium* sp. (*BE1*).

2.3. Experimental set-up

All experiments were performed under aerobic and sterile conditions in the miniature batch reactors used by UROZ et al. (2007). The experimental device consisted of a microplate with 96 wells (Multiscreen® microplates MAGVN22), which allowed a large number of replicates. A 0.22 µm-pore-size Durapore filter membrane was placed at the bottom of each well to collect a solution without bacteria and particles at the end of experiments. This filtrate was used in another microplate to quantify the amount of iron, protons and organic acids released by bacteria and leached into solution.

Several phlogopite and biotite leaching experiments were performed with 9 bacterial strains (biotic experiments) isolated from the rhizosphere of plants and acid soils. To investigate and model the chemical mechanisms linked to the weathering ability of the bacterial isolates, leaching experiments without bacteria were performed with citric acid (10^{-2} and 10^{-3} M, pH adjusted from 3.5 to 6), gluconic acid (10^{-2} and 10^{-3} M, pH adjusted from 3.5 to 6) and nitric acid (concentration adjusted to be from pH 2.5 to 6).

Citric and gluconic acids were used as model chelating agents, and nitric acid was used as a model acidifying agent. Abiotic experimental conditions (i.e., pH, type and concentration of

organic acids) were based on the experimental results obtained in the presence of bacteria to approach these biotic experimental conditions and to compare more easily the experiments performed with and without bacteria.

2.3.1. Culture media

Solutions were prepared using “Milli-Q”, deionized water ($18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$). In all experiments, a mineral medium for bacterial cultures was used as a source of essential mineral nutrients (BUSHNELL and HAAS H.F., 1941) to simulate the chemical composition of a soil solution. This medium (Bhm) was prepared without iron or magnesium and therefore phlogopite or biotite were the only source of these elements. The depleted composition ($20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KCl}$; $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$; $22.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$; $65 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KNO}_3$; $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ CaCl}_2$ in distilled deionized water) is reflected by the low ionic strength (4.5 mM).

For biotic experiments, glucose ($2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) was added as the sole carbon and energy source for bacterial growth. Media were sterilized by autoclaving (30 min. at 110°C) and the glucose solution was filtered through $0.2 \mu\text{m}$ membranes.

All reactants were chosen according to their purity to minimize the contamination of Fe and Mg. The medium and the glucose solution were checked by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy analysis (ICP AES Jobin-Yvon 238 at LIMOS, France) and neither Fe nor Mg were detected at a detection limit 0.005 ppm .

2.3.2. Experimental procedure

Before filling the wells with minerals and culture media, the microplates were sterilized by UV irradiation for 2 hours. Biotic experiments were conducted with an actively growing bacterial culture, freshly rinsed and conditioned as described below. Prior to inoculation in each well of the microplate, bacterial isolates were recovered and cultivated in a 2 ml LB liquid medium (Luria and Bertani broth) for 1 day in aerobic conditions. The cell suspension (the exponential phase) was rinsed three times in deionized water and then re-suspended in 1 ml of the BHM media to obtain a suspension of 10^8 cells per ml. Twenty microliters of the cell suspension were incubated in the mineral filled microplates for 3 days with $160 \mu\text{l}$ of BHM media and $20 \mu\text{l}$ of glucose. The microplates were incubated at 24°C on a reciprocating shaker (New Brunswick, 120 rpm). In each experiment, 12 replicates (12 wells) were performed with the same bacterial inocula.

For the chemical weathering experiments (the experiments without bacteria), the assay was performed in BHm mineral media in pH range from 2 to 7 adjusted by adding organic (gluconic and citric) or mineral (nitric) acids.

2.4. Elemental analyses

Twelve replicates (12 wells) were performed for each sample, including four replicates for each pH measurement, four replicates for each iron concentration and four replicates for glucose consumption and metabolites produced by bacteria. Mean values and standard deviations were calculated. The effect of the different weathering agents on the dissolution of biotite and phlogopite were determined by variance analysis at the threshold level of $P < 0.05$ (XLSTAT version 2008 6.01).

2.4.1. Colorimetric determination of iron, protons and glucose

At the end of experiments, solutions were immediately filtered through 0.2 μm microplate filters. The solutions were removed by vacuum transfer and collected in a microplate containing dye indicators that are sensitive the presence of iron, protons and glucose. The amount of iron released (Fe^{2+} and Fe^{3+}) in solution was determined by adding 20 μl of ferrospectral® dye indicator (Merck 1.14761) to 200 μl of the leaching solutions. A microplate reader (SAFAS Xenius FLX) was used to measure the absorbance at 595 nm.

The quantitative analysis of the acidification processes during the experiments was accomplished with bromocresol green (1g.L^{-1} , BG, Sigma-Aldrich 114367) a very common acid sensitive dye. The pH was determined by adding 10 μl of bromocresol green to 200 μl of filtrate. Bromocresol green (BG) is yellow ($\lambda_{\text{max}} = 440\text{ nm}$) in acidic solution ($\text{pH} < 3.8$) and blue ($\lambda_{\text{max}} = 620\text{ nm}$) in more basic solutions ($\text{pH} > 5.8$). The pH of the leaching solution was determined at two wavelengths close to both BG maxima (BESHIR et al., 2007).

Consumption of glucose by bacteria was determined by measuring the glucose remaining in the 3 μl filtered solution after addition of 300 μl of GOD-PAP (enzymatic kit, BioLabo). After 20 min, the glucose concentration was measured at an absorbance of 520 nm. The detection limit for glucose was 0.1 ppm.

According to the manufacturer's instructions, calibration curves were constructed to determine the relationship between the absorbance and the concentrations of iron, protons and glucose (data not shown). These relationships were validated in the work of Uroz et al. (2007).

During the experiments, iron oxy-hydroxides could have been formed, and consequently, the iron concentration in solution may have been underestimated. Any amorphous iron was dissolved by 200 µl of a mixture of potassium chloride and hydroxylamine (KCl 1M and NH₂OH 0.2%) at pH 5 placed on the filtration residues (mineral particles and bacteria) for 1 hour (JEANROY, 1983). Then, the solutions were filtered and 20 µl of ferrospectral® dye was added for the quantification of leached amorphous iron. The mixture of potassium chloride and hydroxylamine is a weak reducing agent and solubilizes only amorphous iron oxy-hydroxide. The effect is negligible on fresh mineral particles with surfaces free of iron oxy-hydroxide. This method was tested by adding the reactant to fresh mineral particles for one hour, no Fe was detected for phlogopite and an amount close to the detection limit was measured for biotite (0.02ppm).

2.4.2. Metabolite release

Non-acidified samples were stored at -18 ° C. The twelve organic acids released most often in solution by bacteria were measured using with ion chromatography with conductivity detection (ICS 3000, Dionex Corp.) and an analytical column (IonPac® AS 11 HC, Dionex corp.). The samples were eluted with KOH solution of varying concentrations (0.9 mM to 60 mM) over time (step gradient) with a flow rate of 1.3 ml/min. The synthetic reference materials used were sodium formate, D-gluconic acid, sodium butyrate, pyruvic acid sodium salt, sodium citrate tribasic, sodium oxalate, sodium propionate, sodium acetate, succinic acid disodium salt, DL-malic acid disodium salt (from Sigma-Aldrich), sodium-L-lactate and malonic acid disodium salt (from fluka). Uncertainties were better than 0.5% for all organic acids measured.

2.5. Calculation of elemental release and dissolution rate

The apparent release rate of iron from the micas (r_{Fe} moles element $m^{-2}.s^{-1}$) and the apparent mineral dissolution rate R_w (moles mineral $m^{-2}.s^{-1}$ based on $-O_{20}(OH)_4$ units) were determined. The influence of pH and organic acids on iron release rate was evaluated using the linear rate law (MALMSTRÖM et al., 1996; DREVER and STILLINGS 1997; MALMSTRÖM and BANWART, 1997) described by the equation:

$$r_{Fe} = k_H (a_{H^+})^n + K_N + k_{OH} (a_{OH})^m + k_{L,M} (a_L)^l \quad (\text{eq 1})$$

where k_H is the apparent rate constant at acid pH; k_N is the apparent rate constant at neutral pH; k_{OH} is the apparent rate constant at basic pH; k_L is the apparent rate constant in the

presence of ligands; a_{H^+} , a_{OH} and a_L are the activities of protons, hydroxyls and ligands respectively; n , m , and l are the experimentally obtained orders of the reaction with respect to protons, hydroxyls and ligands. In the present study concerning biotite and phlogopite weathering in an acidic environment, the terms K_N and $k_{OH,M} (a_{OH})^{n,M}$ are negligible. Experimental data were fitted to the simplified equation: $r_{Fe} = k_H (a_{H^+})^n + k_{L,M} (a_L)^l$ (eq 2).

3. RESULTS

3.1. Validation of the bioassay procedure

Several preliminary experiments on the biotic weathering of phlogopite were carried out to verify the physico-chemistry of the solutions and the stability of the physiological state of the bacteria during the 4-day experiments. Significant changes in these conditions could induce an immobilization of iron and bias in the calculation of iron release rates.

From the beginning of the experiments to the end of the fourth day, the percentage of glucose remaining decreased regularly from 100% to 19%, 10.2%, 1% and 0% respectively for PS2, PA1, RA1 and AR1, respectively (Figure 1A and 1B). The bacterial strains RA1 and AR1 consumed the entire carbon source. At the end of the first day, the pH in all biotic reactors had decreased from an initial value of 6.5 to 3.2, 3.7, 4.5, and 4.9 for PS2, PA1, AR1 and RA1, respectively. The pH remained constant in all experiments between the second and the third day. During the fourth day, for all the strains except for PS2, the pH increased to between 4.0 and 5.9. However, between day 1 and day 3, conditions were stable. As long as energy/carbon sources and nutrients were available, the release of protons and organic acids did not change with time and a quasi-steady state equilibrium was observed. The bacterial physiology was not affected because the cells could not switch their metabolism during the short time of the assay. Their growth was also limited to between 1 to 3 replications and cell attachment to mineral surfaces remained negligible. Only 1 to 20 per mill of bacteria adhered to the mineral surfaces (microscopic observations not shown).

After 3 days, the conditions changed drastically especially in experiments with bacterial strains AR1 and RA1. Limited or no access to a C source led to an increase of pH and a decrease in the iron that was released into solution (Figure 1 C). To avoid as much as possible this immobilization of iron in our experiments, we chose to stop the experiments and to collect the final solution during the third day. The glucose remaining in solution, pH, Fe released from silicate minerals and organic acids released by bacteria were determined from this solution.

3.2. Released iron concentrations

3.2.1. Biotic experiments

Results of phlogopite and biotite weathering efficiency of 9 bacterial strains after 72 hours are presented in Tables 2A and 2B. Most weathering activity of the strains produced a high concentrations of protons and metabolites (organic acids) and allowed a high amount of iron release from both minerals.

In the presence of phlogopite (Table 2A), all bacterial strains isolated from podzol (*BE1*, *B1*, *B2*, *B3*, *PC1*, *Ps1* and *Ps2*) were more efficient to weather phlogopite than strains isolated from rhizosphere of plants and the amount of dissolved iron was about one order of magnitude greater. For experiments performed with biotite, *BE1*, *B1*, *B2*, *B3*, *PA1*, *Ps1* and *Ps2* were the most efficient bacterial strains releasing iron in solution (about ten to hundred times more iron in solution) compared to *RA1* and *PC1*.

In experiments with biotite, protons were preferentially produced by all bacteria in solution except *RA1*. The pH was about 3 in the presence of biotite and 4-5 in the presence of phlogopite. Organic acids were produced in 5 to 10 times higher quantities with biotite than with phlogopite. Also, more iron was released in solution in the experiments with biotite except when the strains *RA1* and *BE1* were used.

Each bacterial strain had its own metabolic signature, which was characterized by a specific production of organic acids in different amounts (Table 2B). For example, *RA1* and *PA1* mainly produce lactic and acetic acids because they are fermentative bacteria (facultative anaerobes). Gluconic acid was one of the only acids produced by the aerobic strains *Ps1* and *Ps2*. The same organic acids were always produced in the experiments performed with the 2 minerals but the quantities differed. For the same bacterial strains (*B1*, *AR1*, *PS2* and *RA1*), in a repeated experiment, the pH, organic acids and Fe released could be significantly different varying from 20 to 90 % of iron in solution. This result could be explained by either difference in lag time (reduced bacterial activity corresponding to a period of adaptation) at the beginning of the experiments or by an excessive consumption of glucose due to the stress, which would lead to iron precipitation. However, the measured initial dissolution rates (section 3.1) show that the process was uniform within the 3 days of experiments. The amounts of iron immobilized as an oxy-hydroxide on the mineral surfaces varied from one experiment to another but were not negligible compared with iron in solution (Table 2A).

3.2.2. Chemical weathering of minerals (abiotic experiments)

Leaching experiments of biotite and phlogopite were performed with mineral and organic acids but without bacteria to model the proton- and ligand-promoted dissolution processes and to define criteria for evaluating the impact of bacteria on mineral weathering.

The concentrations of soluble and precipitated iron after 3 days of chemical weathering with mineral or organic acids are presented in Figure 2. The same trend was obtained for both minerals; the pH decreased and iron was released into solution. The release of iron was higher with biotite than phlogopite.

Three domains could be identified for changes in pH and variations in dissolution as function of the weathering agent. Domain I was when the pH of the solution was below 3 and there was no difference between the quantities of iron released in solution by the different weathering agents for mineral or organic acids. Domain II occurred between pH 3 to 5 when more iron was released into solution in the presence of citric or gluconic acid (except at 10^{-4} M) than with nitric acid. In experiments with organic acids, the highest quantities of soluble iron were obtained at high concentrations of organic acids (10^{-2} M). Soluble iron concentrations were similar with citric and gluconic acids. The quantity of iron released is slightly lower when the initial concentration of citric acid is more dilute (10^{-3} M). On the other hand, the quantity of iron released is much lower when the initial concentration of gluconic acid is more dilute (10^{-3} or 10^{-4} M). Citric acid (pKa: 3.13; 4.76; 6.4) is a more efficient weathering agent than gluconic acid (pKa 3.86). Domain III is when pH was higher than 5 with HNO_3 and gluconic acid and no iron is detected in solution. At pH greater than 5, organic ligands favor the formation of metal complexes and maintain iron in a soluble form. For both minerals, whatever the weathering agent, no iron was precipitated below pH 3. Above pH 3, the quantity of iron precipitated was negligible in experiments performed with organic acids (except gluconic acid at 10^{-4} M) and was high in experiments performed with HNO_3 . The process depends on the type and concentration of the weathering agents. Proton-promoted dissolution predominates at acidic pH and ligand-promoted dissolution predominates at neutral pH (WELCH and ULLMAN, 1999).

3.3. Iron release rates

The measured iron release rates are presented on a log scale ($\log R_{\text{Fe}}$) as a function of the average pH (Figures 3). In abiotic experiments (Figure 3A and 3B), the pH controls elemental release. In HNO_3 experiments, the proton-promoted dissolution rate appears as a diagonal line with a negative slope ($-n$) that varies with mineral composition ($n=0.46$ and 1.07 for phlogopite and

biotite, respectively). The highest elemental release occurred at low pH and the lowest rates occurred near neutral pH. As shown by Figure 3 and Table 3, k_{H^+} and n vary with mineral composition. For phlogopite and biotite, the apparent and normalized to surface areas dissolution rate constants are $k_H = 3.4 \cdot 10^{-9} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and $3.6 \cdot 10^{-8} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectively. The reaction order n (0.428 for phlogopite and 1.385 for biotite) with respect to hydrogen ion activity (Figures 3A and 3B) was in good agreement with literature data sets (ACKER and BRICKER, 1992; KALINOWSKI and SCHWEDA, 1996; MURAKAMI et al., 2003).

Above pH 3, iron release rates for biotic and citric acid experiments are generally higher relative to chemical leaching performed with HNO_3 and gluconic acid (Figure 3). For a given pH, iron release rates were 2 to 3 times higher during bioleaching compared to chemical leaching performed with HNO_3 .

4. DISCUSSION

4.1. Proton-promoted versus ligand-promoted dissolution

Iron release rates in low-pH regions was consistent with the empirical equation (also called the linear law) described by FURRER and STUMM 1986. As shown by all abiotic experimental data, at a pH below 4, the dissolution rate of minerals increased exponentially with increasing proton activity and followed the empirical equation $[r_{\text{Fe}} = k_{H^+} (a_{H^+})^n = r_{\text{Fe}}^H]$, equation 2]. However, the dissolution rate of mineral was less well defined in the near neutral domain. Due to the low solubility of iron at near-neutral pH, above pH 4-5, the apparent iron release rates decreased and were underestimated. The decrease appeared to be driven by iron solubility, indicating immobilization mechanisms (precipitation) or secondary mineral formation on mineral surfaces. The theoretical and expected dissolution rates by protons at near neutral pH must be estimated by linear extrapolation (the straight line on figure 3) from the acidic region.

Above pH 4 for biotite and pH 5 for phlogopite, citric and gluconic acids played a role in dissolution by reacting with iron at the mineral surface to form surface complexes (BOYLE et al., 1974; DREVER and STILLINGS, 1997; ROBERT and BERTHELIN, 1986). Consequently, dissolution of both micas by organic acids followed the empirical model $r_{\text{Fe}} = k_{H^+} (a_{H^+})^n + k_L (a_L)^l = r_{\text{Fe}}^H + r_{\text{Fe}}^L$. The apparent rate r_{Fe}^L depends on the nature and activity of ligands (Figure 3; Table 3) and on pH. At concentrations of 10^{-2} M and 10^{-3} M , citric and gluconic acids appear to increase mica dissolution rate r_{Fe}^L by a factor of 1 to 100, particular when the pH is

increased to neutral and (ii) decreased reaction order to around 0.2. This result indicates that dissolution was greatly enhanced by organic acids (i.e. “catalysts”, GOLUBEV et al., 2006) forming strong surface and aqueous complexes with iron. Furthermore, the fitted iron release rates from both minerals in the presence of organic acids were not directly proportional (according to the log-log plot) to the concentration of the organic acids. Concentrations over 10^{-3} M caused stagnation of the dissolution rates and consequently of the surface complexation processes. This may result from the saturation of reactive sites by organic acids or from surface passivation by precipitation of secondary iron species. Small amounts of iron extracted by hydroxylamine from abiotic batch experiments suggest that secondary and crystallized iron nanophases crystallized on the weathered mica surfaces.

As shown by log-log plots (Figure 3), at a pH_B equal to 2.5 for phlogopite or pH 2 for biotite, only proton-promoted dissolution (Domain I) occurred, whereas in weakly acidic pH, both ligand- and proton-promoted processes were involved (Domain II). When pH values were greater than 4 for biotite or 5 for phlogopite (the dashed line) the iron is immobilized (Domain III). The bifurcation point (B) and the extrapolate line (L) of the theoretical model form the limits of acidolysis (protons) and complexolysis (ligands) Domains (I and II) and immobilization Domain (III). A schematic relationship that includes the reactive domains between the iron release rate and pH can be then proposed as a model (Figure 3E.). The delineation of domains depends on the mineral, the ionic strength and the nature of the ligands. The large “out of borders” area (in white on Figure 3E) indicate the probable position of physicochemical limits of weathering processes (dashed lines 1 and 2). In the present work, experiments did not go beyond these limits.

In biotic experiments performed with bacteria (Figures 3C and 3D for phlogopite and biotite, respectively), the pH ranged from 3 to 7. Few bacterial strains (PS1 and PS2) belonged to Domain I. The activity of the bacteria strongly affected pH, which had a minimum value of 3. The iron release rate reached a maximum (about $10^{-11} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and reflected an effective exclusion of proton-promoted dissolution by these bacteria. At near neutral pH (4-6.5), the efficiency of bacterial silicate weathering did not depend only on proton activity. For both mineral dissolution experiments, strains produced a high quantity of protons and metabolites. As a consequence a high amount of iron was released (r_{Fe} from about 10^{-12} to $10^{-11} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). A large number of bacterial strains (B1, B2, B3, PC1, BE1, RA1 and PA1) were situated in Domain II. Strains B2, B3 and PS2 increased iron release rates from phlogopite compared to rates measured for citric acid alone. In this case, the iron release rate was clearly ligand-promoted and could be fitted by the model $r_{\text{Fe}} = r_{\text{Fe}}^L$. However, the upper

limit of domain II mainly depended on the type of metabolites produced by the bacteria and the domain could be extended. For strains AR1 and RA1 in the presence of phlogopite and RA1 and BE1 in the presence of biotite, the iron release rate (r_{Fe} from about 5.10^{-13} to 10^{-12} $\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) was much less than the experimental values obtained for HNO_3 . These bacterial processes belonged to Domain III. The activity of bacteria favored the immobilization of iron and did not increase iron release rates significantly.

4.2. Origin and effect of small chelating ligands (metabolites by-products)

After 72 hours, all bacterial strains secreted large amounts of short-chain organic acids (Table 2B). Results showed a positive and significant correlation between the percentage of metabolized carbon by bacteria (i.e. organic acids produced normalized to consumed glucose) and iron release rates (Figure 4). No relationship was observed between the glucose consumption, the iron release rate and pH (data not shown). Thus, bacteria had a significant effect on mineral dissolution through the excretion of metabolic products. Indeed previous works have shown that partial glucose oxidation can lower pH via the production of gluconic acid (VANDEVIVERE et al. 1994; WELCH and ULLMAN, 1999; WU et al., 2008). Generally, in optimal conditions for nutrition and oxygenation, the end-product of glucose degradation is carbon dioxide, which is partially diffused to the atmosphere. However, under stress conditions, the glucose is oxidized beyond intermediate by-products (organic acids). Indeed, the lack of required enzymes leads some bacteria to accumulate or expel as waste various intermediate acids (GOTTSCALK, 1986), such as fumaric, citric and oxalic acids, and especially lactic, pyruvic and acetic acids. In most cases, when the pH ranges from 5 to 7, the effect of these by-product organic acids on the weathering of phlogopite and biotite was identical to that observed for the high citric acid concentrations (10^{-3} M) used in abiotic experiments. The RA1 strain is an exception, as it produced a large amount of metabolites that did not favor the release of iron during the weathering of phlogopite and biotite. In contrast, in the presence of phlogopite, strain PS2 released five times more iron than the abiotic experiments with citric acid. The reason for the rate enhancement in the presence of organic ligands produced by bacteria remains unclear but is definitively strain-dependent. The strong increase in iron release rates in the presence of strain PS2 could be explained in different ways: (i) bacteria produced siderophores that greatly accelerate the dissolution of iron (LIERMANN et al., 2000), but their presence was not tested here; (ii) the effective concentration of ligands causing weathering was underestimated and higher concentrations

may be present near the mineral surface or in the surrounding area adjacent to adhering bacteria (VANDEVIVERE et al. 1994); (iii) through sorption processes, the cell walls could participate in the mobilization of iron; (iv) only sixteen organic acids were measured by ionic chromatography and the bacteria may have released other by-products. Bacteria could recycle iron complexes and metabolites that were produced earlier. Thus, for ligand-promoted dissolution, the amount of organic acids is not the sole parameters to take into account but the type (chelation degree) of bacterially-produced ligands must also be taken into account. The presence of polyfunctional acids like citric or oxalic acid could increase the silicate dissolution rate by 3 to 10 times compared to the silicate dissolution rate in experiments performed with monofunctional acids such acetic acid (ROBERT M. and BERTHELIN J., 1986; WELCH and ULLMAN, 1993). The effectiveness of the ligands also depends on the nature of their functional groups, the molecular structure and the thermodynamic stability of the surface complexes they form (STUMM, 1992; DREVER, 1997, GOLUBEV et al. 2006). The effectiveness of ligands depends also on the composition, the crystallography and the conditions of formation of the minerals. For example, at low temperatures and pressures, acetic and gluconic acids inhibit smectite weathering (GOLUBEV et al., 2006), whereas gluconic acid enhanced phlogopite and biotite weathering in our study. Smectite, a secondary mineral formed in soils at low temperature and pressure is more stable than the biotite group minerals formed at high temperature and pressure.

4.3. Iron immobilization during bacterial weathering of micas

Our experiments were performed in aerobic conditions. In Domain III, a decrease in the initial iron released from micas could be explained by both the iron chemical behavior in oxygenized media and major immobilization processes: i.e., free or adsorbed iron complexed by organic compounds or an iron precipitated as oxides and hydroxides. The effect of an organic acid on dissolution and its ability to inhibit precipitation of secondary minerals (like oxy-hydroxides) was difficult to evaluate. The presence of weak organic acids (chelating agents) reduced both the re-adsorption of dissolved iron and the formation of insoluble Fe- or Al-oxy-hydroxide such as ferrihydrite, bayerite, etc (SPOSITO, 1989). In contrast, some metabolite compounds such as some long- and short- chain acids could establish irreversible bonds with reactive mineral surface and inhibit the dissolution (GOLUBEV et al., 2006).

The apparent iron in solution and total iron (iron in solution and precipitated iron) release rates and the reaction orders were calculated from abiotic experiments (Table 3). In the presence of both minerals, in all experiments performed with organic acids, the apparent rate

constants (K_{H+}) in solution were very close (Log K_{H+} about -10.3 and -9.8 for phlogopite and biotite, respectively). The experimentally determined reaction orders were also very close (around 0.2) for high organic acid concentrations. However, these reaction order values were small compared to those for HNO_3 ($n=0.56$ and 1.43 for phlogopite and biotite respectively). Moreover, from one mineral to another, n varied strongly, according to analysis of the variance at the threshold level $P<0.05$. For gluconic acid at low concentration ($10^{-4}M$), value of n (0.78 and 0.66 for phlogopite and biotite, respectively) were very different from experiments performed with organic acids but close to values obtained with HNO_3 because gluconic acid was not chelating enough.

The difference between iron in solution and total iron (in solution and precipitated) strongly influenced the reaction orders passing from 0.56 to 0.46 and from 1.43 to 1.07 for phlogopite and biotite respectively (Table 3). Precipitation of Fe-containing phases (iron oxy-hydroxide) strongly influenced the iron concentration above pH 4 except in the presence of organic acids obviously.

During biotic experiments, in the presence of biotite, the percentage of immobilized iron is related to the percentage of metabolized carbon (Figure 5). When more organic acids were released into solution, less iron was immobilized. For phlogopite, this tendency could not be established due to a lack of data. The affinity of organic ligands for iron prevented the precipitation of Fe-containing phases and maintained iron in solution.

4.4 Weathering phenotype of strains

Even if major bacterial processes involved in phyllosilicate weathering are usually well defined, their efficiency and specificity depend on (1) metabolites produced by bacteria, (2) the mineral crystal-chemistry and (3) the ability of bacteria to take advantage of mineral-bound nutrients.

As previously mentioned, our proposed model allows the partition of bacterially-mediated aerobic processes involved in iron release according to various parameters: proton activity, ligand activity, and iron immobilization. Through comparative analyses of bacterial iron release rates for both minerals, a ternary diagram “ACI” could be proposed (Figure 6) in which iron release rate in aerobic condition resulted from a combination of **A**cidolysis ($r_{Fe} = k_H (a_{H+})^n$), **C**omplexolysis (if $r_{Fe} > k_H (a_{H+})^n$) and **I**mmobilization (if $r_{Fe} < k_H (a_{H+})^n$). These processes can be used to generate “weathering pattern phenotypes”. For phlogopite, four weathering patterns could be distinguished. The first group [$A_{0.1}$, $C_{0.9}$ and $I_{0.3}$] is represented by strains B2, B3 and PS2 and iron release was due mostly to complexolysis. The aerobic

bacteria that were isolated from deep horizons of soil (mineral horizons) were the most efficient strain for phlogopite weathering (r_{Fe} about $2 \cdot 10^{-11} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and mainly produced gluconic acid (0.1 to 2 mmol.l^{-1}). The second group [$A_{0.75}$, $C_{0.6}$ and $I_{0.1}$] was represented by acidifying strains AR1, PA1, PC1 and RA1, which were less efficient at phlogopite weathering (r_{Fe} about 10^{-12} - $10^{-13} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). These strains were isolated from surface horizons of soils and more precisely from the rhizosphere. These facultative anaerobic bacteria mainly produced high concentrations of monofunctional acids such as lactic and acetic acids (1 to 2 mmol.l^{-1}), which weakly impacted mineral weathering. The third group [$A_{0.1}$, $C_{0.8}$ and $I_{0.75}$] was formed of strains BE1 and B1, which very slightly acidified the medium (pH 5 to 6.5). They did not produce a sufficient amount of organic acids (about 0.1 mmol of gluconic, lactic and acetic acids) to maintain iron in solution. These bacterial strains were isolated from the surface horizon of soil (the organic horizon). Finally, the last group [$A_{0.8}$, $C_{0.1}$ and $I_{0.1}$] was made of the sole strain PS1. This bacterial strain strongly acidified the medium (pH 3) and was also isolated from the surface horizons of soil. These observations suggest that the origin of strains (soil horizons) has an influence on the processes (complexolysis/acidolysis) implemented by bacteria to weather micas. Bacterial strains isolated from deep mineral horizons weather micas by complexolysis whereas the bacterial strains isolated from horizons rich in carbon (the surface horizon and rhizosphere of plants) weather micas by acidolysis. These results are in good agreement with the work of UROZ et al. (2007) and highlight the effectiveness at mineral weathering of bacterial strains isolated from the mycorrhizosphere (organic source) and bulk soil (mineral source). Isolated bacteria were in mostly *Burkholderia*, *Collimonas*, *Pseudomonas* and *Sphingomonas* genera and the most efficient strains belonged to the *Burkholderia* genus. Results from one isolate to another indicate a variation in weathering intensity.

For biotite, only two phenotypes could be distinguished. The first and largest one [$A_{0.1}$, $C_{0.8}$ and $I_{0.4}$] was represented by strains B1, B2, B3, PA1, PS1 and PS2. Iron release was mainly due to complexolysis and group 1 of phlogopite. These strains were the most efficient bacteria for biotite weathering (r_{Fe} about $5 \cdot 10^{-11} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and they mainly produced very high concentrations of gluconic acid (2 to 7 mmol.l^{-1}). The second group [$A_{1.0}$, $C_{0.75}$ and I_0] was represented by strains AR1, BE1 and RA. Iron release was mainly due to acidolysis (100%) with iron immobilization at less than 25%. They were the least efficient bacteria for phlogopite weathering (r_{Fe} about $5 \cdot 10^{-12}$ - $10^{-13} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). These facultative anaerobic bacteria produced high concentration of monofunctional acids (1 to 13 mmol.l^{-1}), weakly

impacting iron dissolution. No clear correlation was observed between the origin of bacterial strains and the processes implicated during the weathering of biotite.

Combination of the empirical model and the ternary diagram provided a differentiation of phyllosilicate bioweathering processes according to the metabolism and effectiveness of bacterial strains. In general, aerobic bacterial strains were the most efficient at weathering minerals. These strains were isolated from a poor and acidic soil where their environmental conditions were very limited in nutrients. In contrast facultative anaerobic bacteria (AR1, RA1 and PA1) isolated from rich organic sources like the rhizosphere of plants were less efficient than the other strains.

Bacterial strains like B3 or PA1 do not have the same effectiveness at weathering phlogopite and biotite. Moreover, the “process patterns” were more variable for phlogopite (4 groups) than for biotite (2 groups). Figure 4 shows that for a same iron release rate (r_{Fe}), more organic acids were produced by bacteria in the presence of biotite than in the presence of phlogopite. This suggests control by the mineral on the release of organic acids by bacteria. It seems more “difficult” for bacteria to weather biotite than phlogopite. Biotite, has a very low Mg/Fe ratio indicating a great concentration of iron in octahedral coordination, which is more difficult to release than in tetrahedrally-coordinated iron. A low pH (< 3) is necessary to dissolve biotite through tetrahedron destruction (ACKER et al., 1992). Biotite also has a great reaction order (1.43). The reaction order and the Mg/Fe ratio contributed to a decrease the iron release rate and to an increase in iron oxy-hydroxide formation. The chemical composition and the structure of the mineral influenced strongly the weathering pathways of biotite and phlogopite (ZOBELL, 1943; VAN LOOSDRECHT, M.C.M et al., 1990; BENNETT et al., 1996; GLEESON et al., 2006). In our study, the variation could be explained by the availability of nutrient elements at the mineral surface. Nevertheless, for a same strain, the intensity of weathering changed, but the process involved was generally preserved (for example in the presence of phlogopite PS1, PS2, PA1, RA1, B1 and AR1). The crystal-chemistry of the mica samples is also of primary importance and caution must be exercised when (bio)weathering processes from one mineral to another are compared. Finally, it would be interesting to identify the combined effect of both mineral and microbial diversity on mica weathering and consequently on iron and oligo-element cycling in soil or subsurface environments.

5. CONCLUSION

The results obtained with miniature closed systems (microplates) allowed a comparative study of the initial iron release from biotite and phlogopite in biotic or abiotic conditions. In the biotic experiments, bacteria affected mineral dissolution and iron release by producing various amount of chelating organic acids. The observed enhancement of the biotite and phlogopite dissolution rates was the results of a ligand-promoted mechanism in addition to a proton-promoted dissolution mechanism and immobilization of iron. Three domains have been highlighted according to the predominating processes. Below pH 3, only proton-promoted dissolution occurred, whereas in weakly acidic pH solutions both ligand- and proton-promoted mechanisms were involved. Another process to be considered was the immobilization of iron. We propose a model allowing the partition of bacterially-mediated processes involved in iron release according to various parameters: proton activity, ligand activity, and iron immobilization. Thus, “weathering pattern phenotypes” of several strains can be distinguished. According to their metabolism and their origin, aerobic bacterial strains isolated from deep horizons that are poor in organic matter appear to weather micas most efficiently compared to facultative anaerobic bacterial strains isolated from the rhizosphere, an environment rich in organic nutrients. Moreover, our results suggest that the mineral exerts a control on the release of organic acids by bacteria. The overlap between a wide range of microbial metabolic processes and dissolution mechanisms under controlled environmental conditions (e.g., carbon sources, ionic strength, etc) could be statistically investigated. Ultimately, this method will provide a multivariate ecological database, which will be useful for defining typical weathering phenotypes of bacteria and their possible relationship with textural properties of phyllosilicates and other soil parameters.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Géraldine Kintsinger and David Billet for their assistance during the organic acids analysis, to Aurélie Cébron, Thierry Béguiristain and Patrick Billard for their advice on bacterial strain sequencing and to Kouamé Adou and Colette Munier-Lamy for the discussion about the manuscript. We also thank S. Glasauer and three anonymous reviewers for their thorough and constructive reviews.

REFERENCES

- Acker, J. G. and Bricker, O. P., 1992. The influence of pH on biotite dissolution and alteration kinetics at low temperature. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **56**, 3073-3092.
- Babu-Khan, S., Yeo, T., Chia, , Martin, W., L., Duron, m., R., Rogers, R., D., and Goldstein, A., H., 1995. Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 972-978.
- Barker, W., Welch, S., Chu, S., and Banfield, J., 1998. Experimental observations of the effects of bacteria on aluminosilicate weathering. *American Mineralogist* **83**, p 1551-1563
- Bennett, P. C., Hiebert, F. K., and Joo Choi, W., 1996. Microbial colonization and weathering of silicates in a petroleum-contaminated groundwater. *Chemical Geology* **132**, 45-53.
- Bennett, P. C., Rogers, J. R., and Choi, W. J., 2001. Silicates, Silicate Weathering, and Microbial Ecology. *Geomicrobiology Journal* **18**, 3-19.
- Benzerara, K., Menguy, N., Guyot, F., De Luca G., Heulin, T., and Audrain, C. 2004. Experimental colonization and weathering of orthopyroxenes by the pleomorphic bacteria *Ramlibacter tatahouinensis*. *Geomicrobiology Journal*. **21**, 341-349.
- Berthelin, J., 1983. Microbial weathering processes. *Microbial Geochemistry, Blackwell London*, 223-262.
- Beshir, W. B., Eid, S., and Ebraheem, S., 2007. Use of Bromocresol Green Dyed Poly(Vinyl Butyral) Film for Dosimetric Applications. *International journal of polymeric material* **56**, 1067-1077.
- Boyle, J. R., Voigt, G. K., and Sawhney, B. L., 1974. Chemical weathering of biotite by organic acids. *Soil Science* **117**, 42-45.
- Brantley, S., 2003. Reaction kinetics of primary rock-forming minerals under ambient conditions. . In: Drever, J. I. (Ed.), *Fresh Water Geochemistry, Weathering, and Soils*. Pergamon Press, Oxford.
- Bushnell, L. D. and Haas H.F., 1941. Hydrocarbon utilization by microorganisms. *Journal of bacteriology* **41**, 653-673.
- Cama, J. and Ganor, J., 2006. The effects of organic acids on the dissolution of silicate minerals: A case study of oxalate catalysis of kaolinite dissolution. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **70**, 2191-2209.

- Drever, J. I. and Stillings, L. L., 1997. The role of organic acids in mineral weathering. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **120**, 167-181.
- Furrer, G. and Stumm, W., 1986. The coordination chemistry of weathering: I. Dissolution kinetics of $[\delta]\text{-Al}_2\text{O}_3$ and BeO. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **50**, 1847-1860.
- Ganor, J., Mogollón, J. L., and Lasaga, A. C., 1995. The effect of pH on kaolinite dissolution rates and on activation energy. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **59**, 1037-1052.
- Gleeson, D. B., Kennedy, N. M., Clipson, N., Melville, K., Gadd, G. M., and McDermott, F. P., 2006. Characterization of bacterial community structure on a weathered pegmatitic granite. *Microbial Ecology* **51**, 526-534.
- Golubev, S. V., Bauer, A., and Pokrovsky, O. S., 2006. Effect of pH and organic ligands on the kinetics of smectite dissolution at 25°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **70**, 4436-4451.
- Gottschalk, G., 1986. *Bacterial metabolism*. Springer-Verlag New York.
- Helgeson, H. C., Murphy, W. M., and Aagaard, P., 1984. Thermodynamic and kinetic constraints on reaction rates among minerals and aqueous solutions. II. Rate constants, effective surface area, and the hydrolysis of feldspar. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **48**, 2405-2432.
- Hutchens, E., Clipson, N., and McDermott, F. P., 2008a. Mineralogical influence on the structure and the diversity of bacterial communities associated with silicate minerals. *Geophysical Research Abstracts* **10**, EGU2008-A-03930.
- Hutchens, E., McDermott, F. P., and clipson, N., 2008b. Bacteria, fungi and arche on silicate minerals- A case for selective colonization. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **72**, 404.
- Jeanroy, E., 1983. Diagnostic des formes du fer dans les pédogénèses tempérées. Évaluation par les réactifs chimique d'extraction et apports de la spectrométrie mossbauer. Doctorat Thesis, Université de Nancy 1.
- Kalinowski, B. E. and Schweda, P., 1996. Kinetics of muscovite, phlogopite, and biotite dissolution and alteration at pH 1-4, room temperature. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **60**, 367-385.
- Kalinowski, B. E., Liermann, L. J., Givens, S., and Brantley, S. L., 2000. Rates of bacteria-promoted solubilization of Fe from minerals: a review of problems and approaches. *Chemical Geology* **169**, 357-370.

- Leyval, C., Laheurte, F., Belgy, g., and berthelin, J., 1990. Weathering of micas in the rhizosphere of maize, pine and beech seedlings influenced by myccorhizal and bacterial inoculation. *Symbiosis* **9**, 105-109.
- Liermann, L. J., Kalinowski, B. E., Brantley, S. L., and Ferry, J. G., 2000. Role of bacterial siderophores in dissolution of hornblende. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **64**, 587-602.
- Malmström, M. and Banwart, S., 1997. Biotite dissolution at 25°C: The pH dependence of dissolution rate and stoichiometry. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **61**, 2779-2799.
- Malmström, M., Banwart, S., Lewenhagen, J., Duro, L., and Bruno, J., 1996. The dissolution of biotite and chlorite at 25°C in the near-neutral pH region. *Journal of Contaminant Hydrology* **21**, 201-213.
- Murakami, T., Utsunomya, S., Yokoyama, T., and Kasama, T., 2003. Biotite dissolution processes and mechanisms in the laboratory and in nature: Early stage weathering environment and vermiculization. *American mineralogist* **88**, 377-386.
- Robert, M. and Berthelin, J., 1986. Role of biological and Biochemical factors in soil mineral weathering. *Soil science society of america* **12**, 453-495.
- Rogers, J. R. and Bennett, P. C., 2004. Mineral stimulation of subsurface microorganisms: release of limiting nutrients from silicates. *Chemical Geology* **203**, 91-108.
- Santelli, C. M., Welch, S. A., Westrich, H. R., and Banfield, J. F., 2001. The effect of Fe-oxidizing bacteria on Fe-silicate mineral dissolution. *Chemical Geology* **180**, 99-115.
- Song, W., Ogawa, N., Oguchi, C. T., Hatta, T., and Matsukura, Y., 2007. Effect of *Bacillus subtilis* on granite weathering: A laboratory experiment. *CATENA* **70**, 275-281.
- Sposito, G. 1989. The chemistry of soils. Oxford University Press. New York.
- Stillings, L. L. and Brantley, S. L., 1995. Feldspar dissolution at 25°C and pH 3: Reaction stoichiometry and the effect of cations. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **59**, 1483-1496.
- Ullman, W. J., Kirchman, D. L., Welch, S. A., and Vandevivere, P., 1996. Laboratory evidence for microbially mediated silicate mineral dissolution in nature. *Chemical Geology* **132**, 11-17.
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M. P., Pierrat, J. C., Mustin, C., and Frey-Klett, P., 2007. Effect of the Mycorrhizosphere on the Genotypic and Metabolic Diversity of the Bacterial Communities Involved in Mineral Weathering in a Forest Soil. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 3019-3027.

- Valsami-Jones, E. and McEldowney, S., 2000. Mineral dissolution by heterotrophic bacteria: principles and methodologies. In: J.D. Cotter-Howells, L. S. C., E. Valsami-Jones and M. Batchelder (Ed.), *Environmental Mineralogy: Microbial interactions, Anthropogenic influences, Contaminated land and Waste management*. Mineralogical Society of Great Britain and Ireland.
- Van Loosdrecht, M.C.M, Lyklema, J., Norde, W., and Zehnder, A.J.B, 1990. Influences of interfaces on Microbial activity. *Microbiological reviews* **54**, 75-87.
- Welch, S. A. and Ullman, W. J., 1993. The effect of organic acids on plagioclase dissolution rates and stoichiometry. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **57**, 2725-2736.
- Welch, S. A. and Ullman, W. J., 1999. The effect of microbial glucose metabolism on bytownite feldspar dissolution rates between 5° and 35°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **63**, 3247-3259.
- Welch, S. A., Taunton, A. E., and Banfield, J. F., 2002. Effect of microorganisms and microbial metabolites on apatite dissolution. *Geomicrobiology Journal* **19**, 343-367.
- Wieland, E. and Stumm, W., 1992. Dissolution kinetics of kaolinite in acidic aqueous solutions at 25°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **56**, 3339-3355.
- Wu, L., Jacobson, A. D., Chen, H., and Hausner, M., 2007. Characterization of elemental release during microbe-basalt interactions at T= 28°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **71**, 2224-2239.
- Wu, L., Jacobson, A. D., and Hausner, M., 2008. Characterization of elemental release during microbe-granite interactions at T=28°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **72**, 1076-1095.
- ZoBell, Z. E., 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of bacteriology* **46**, 39-56.

Tables captions:

Table 1. Identifying characteristics of the bacterial strains used in this study (with a size of PCR product about 433 bp) and the number of acquisitions obtained in the GenBank databases (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)

Table 2A. General characteristics of solutions collected from biotic experimental reactors with nine bacterial strains, including quantities of soluble and immobilized iron and protons released after 72 hours of dissolution and consumption of glucose.

Table 2B. Major organic acids released by bacteria during experiments

^a n.m.: not measured, “-”: below detection limit. The standard deviation was calculated from analyses of at least four wells. Each line represents one experiment.

[#] $\mu\text{mol/l}$

Table 3. Apparent iron release rate (r_{Fe} moles $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and reaction order with respect to protons calculated from Figure 3. Values in brackets represent standard deviation.

Figures captions:

Figure 1. Daily variations in (a) pH, (b) glucose consumption and (c) iron releases in solution for the first biotic experiments performed during 4 days with 4 bacterial strains PS2, AR1, PA1 and RA1 in the presence of phlogopite to validate the biotest procedure:

Figure 2. Concentration ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) of iron in solution and iron immobilized in oxy-hydroxides from phlogopite (A) and biotite (B) dissolution versus pH. Bars correspond to standard deviation.

Figure 3. Log-log plots of iron release rate in solution (r_{Fe} moles $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) versus pH for abiotic experiments with (A) phlogopite and (B) biotite and for biotic experiments with (C) phlogopite and (D) biotite with (E) a model of limits and domains for process determination. Bars correspond to standard deviation for the 4 replicates.

Figure 4. Logarithm of the ratio between metabolized carbon (carbon in organic acid produced) and consumed carbon versus the logarithm of the release rate of iron into solution (r_{Fe} moles $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) for biotic experiments in the presence of biotite and phlogopite.

Figure 5. Correlation between the percentage of iron immobilized and the percentage of carbon metabolized in the presence of biotite for biotic experiments.

Figure 6. Ternary diagram representing the relative contribution of acidolysis ($r_{\text{Fe}} = k_{\text{H}}(a_{\text{H}^+})^m$), complexolysis (if r_{Fe} in solution $> k_{\text{H}}(a_{\text{H}^+})^m$) and immobilization of iron (if r_{Fe} in solution $< k_{\text{H}}(a_{\text{H}^+})^m$) on iron release in biotic experiments performed with phlogopite (A) and with biotite (B). Black squares represent bacterial strains.

Table 1.

Bacterial strains	Closest match according to 16S rRNA gene sequence	% similarity	Accession
BE1	Sphingobacterium sp.	98%	F5859899.1
B1	Burkholderia sp.	99%	U96936.1
B2	Burkholderia sp.	99%	EU184087.1
B3	Burkholderia sp.	99%	EU477832.1
RA1	Rhanella aquatilis	99%	DQ862542.1
PA1	Pantoea agglomerans	98%	GQ862542.1
PC1	Paracoccus sp.	99%	DQ857285.1
PS1	Pseudomonas sp.	99%	FJ581010.1
PS2	Pseudomonas sp.	99%	AM933514.1
AR1	Agrobacterium sp.	99%	EU399912.1

Table 2 A.

n.m.: not measured, “-”: below detection limit, “a, b, c “ represents different experiments

micromol l⁻¹

Mineral	Bacteria	pH	std pH	Fe #	std Fe	Fe precipitated #	std Fe total	% of glucose remaining	% metabolized carbon
Phlogopite	<i>BE1 a</i>	4.80	0.17	14.00	6.70	11.1	6.90	18.4	n.m.
	<i>BE1 b</i>	4.95	0.17	3.40	1.90	3.4	1.90	14.4	n.m.
	<i>B1 a</i>	4.51	0.21	18.00	1.00	7.7	1.20	-	0.20
	<i>B1 b</i>	6.81	0.52	1.60	1.20	2.6	1.30	7.2	n.m.
	<i>B2 a</i>	5.17	0.40	16.00	2.50	10.3	2.60	29.1	0.13
	<i>B2 b</i>	5.16	0.19	21.00	4.50	56.7	4.60	27.1	n.m.
	<i>B3 a</i>	6.08	0.09	20.00	4.30	9.2	4.40	2.0	n.m.
	<i>RA1 a</i>	4.60	0.25	4.20	1.50	n.m	n.m.	40.6	n.m.
	<i>RA1 b</i>	4.59	0.13	0.50	0.20	n.m	n.m.	n.m.	2.06
	<i>RA1 c</i>	5.90	0.11	3.80	0.30	2.6	0.02	1.5	n.m.
	<i>RA1 d</i>	5.90	0.08	4.80	0.20	3.6	0.03	2.8	n.m.
	<i>PA1 a</i>	4.42	0.05	5.00	1.00	n.m	n.m.	-	0.67
	<i>PA1 b</i>	4.54	0.08	2.80	1.00	n.m	n.m.	n.m.	n.m.
	<i>PA1 c</i>	5.92	0.37	0.50	0.90	n.m	n.m.	n.m.	n.m.
	<i>PC1 a</i>	4.91	0.27	17.00	2.60	10.7	2.70	12.4	n.m.
	<i>PS1 a</i>	3.00	0.30	25.00	5.30	7.8	5.40	2.6	n.m.
	<i>PS1 b</i>	3.11	0.50	23.30	1.10	4.0	1.90	5.4	n.m.
	<i>PS2 a</i>	5.80	0.19	29.00	3.60	7.2	3.50	18.6	1.24
	<i>PS2 b</i>	3.28	0.10	45.00	2.00	1.0	2.90	14.1	0.81
	<i>PS2 c</i>	3.00	0.36	17.70	1.40	2.4	1.60	3.6	n.m.
	<i>AR1 a</i>	4.48	0.08	1.50	0.10	0.0	0.10	-	0.11
	<i>AR1 b</i>	4.55	0.12	1.50	0.10	0.0	0.10	n.m.	n.m.
	<i>AR1 c</i>	6.19	0.06	-	-	1.8	0.50	6.3	n.m.
Biotite RAZE	<i>AR1 a</i>	4.84	0.14	2.40	1.60	3.1	1.70	44.1	n.m.
	<i>BE1 a</i>	4.01	0.05	0.05	0.03	1.5	0.10	39.6	1.24
	<i>BE1 b</i>	4.13	0.16	31.50	24.10	9.4	34.50	78.3	n.m.
	<i>B1 a</i>	3.35	0.02	76.40	2.60	7.0	3.40	n.m.	11.17
	<i>B1 b</i>	5.26	0.56	5.10	1.50	4.5	5.40	6.3	n.m.
	<i>B2 a</i>	4.21	0.14	34.40	2.00	27.8	4.30	25.7	2.72
	<i>B2 b</i>	3.82	0.08	26.00	2.60	18.7	5.20	27.2	2.03
	<i>B3 a</i>	4.18	0.05	12.80	1.20	3.3	1.60	34.2	3.88
	<i>PA1 a</i>	3.97	0.03	30.20	3.40	10.3	3.60	24.3	n.m.
	<i>PC1 a</i>	3.00	0.06	-	-	0.2	0.70	42.3	0.63
	<i>PS1 a</i>	3.31	0.10	23.00	0.90	1.5	1.10	6.0	4.11
	<i>PS1 b</i>	3.41	0.09	48.30	0.90	13.7	2.40	11.7	n.m.
	<i>PS2 a</i>	3.00	0.50	13.60	0.50	10.7	1.50	32.6	6.92
	<i>PS2 b</i>	3.83	0.20	45.30	2.20	7.3	2.40	34.8	7.12
	<i>PS2 c</i>	3.51	0.30	40.10	6.30	12.2	6.60	35.1	n.m.
	<i>RA1 a</i>	4.12	0.31	0.20	0.20	12.0	0.30	39.9	0.30
	<i>RA1 b</i>	5.23	0.15	1.10	0.30	2.8	0.60	8.1	n.m.

Table 2 B.

n.m.: not measured, “-”: below detection limit, “a, b, c” represents different experiments

micromol l⁻¹

Mineral	Bacteria	gluconic acid #	lactic acid #	acetic acid #	formic acid #	butyric acid #	succinic acid #	oxalic acid #	citric acid #
Phlogopite	<i>AR1 a</i>	-	37	-	-	-	129	27	-
	<i>B1 a</i>	79	69	195	2	-	-	-	-
	<i>B2 a</i>	125	95	3	2	-	-	-	-
	<i>PA1 a</i>	-	1014	-	21	-	45	44	-
	<i>PS2 a</i>	44	47	1554	539	-	10	165	-
	<i>PS2 b</i>	1300	-	-	4	51	-	-	-
	<i>RA1 b</i>	103	247	2221	156	135	524	152	18
Biotite	<i>BE1 a</i>	19	11	64	2990	-	-	8	-
	<i>B1 a</i>	571	-	66	114	12651	-	167	-
	<i>B2 a</i>	3802	-	200	791	-	-	8	-
	<i>B2 b</i>	2890	-	144	606	-	-	5	-
	<i>B3 a</i>	1732	-	180	519	3010	-	21	-
	<i>PC1 a</i>	41	-	37	1483	-	-	7	-
	<i>PS1 a</i>	2100	-	186	2637	2029	-	32	7
	<i>PS2 a</i>	892	74	83	46	1926	-	25	1
	<i>PS2 b</i>	7722	-	-	1832	2157	-	53	8
	<i>RA1 a</i>	-	-	522	-	-	-	-	-

Table 3.

Materials	Weathering agent	Log k		n	
		Fe	Fe total	Fe	Fe total
Phlogopite	Citric acid 10 ⁻² M	-10.66 (0.10)	-10.64 (0.083)	0.15 (0.02)	0.15 (0.02)
	Citric acid 10 ⁻³ M	-10.05 (0.14)	-9.95 (0.17)	0.29 (0.03)	0.29 (0.03)
	Gluconic acid 10 ⁻² M	-10.50 (0.34)	-10.41 (0.07)	0.17 (0.08)	0.18 (0.02)
	Gluconic acid 10 ⁻³ M	-9.96 (0.06)	-9.88 (0.08)	0.41 (0.01)	0.43 (0.02)
	Gluconic acid 10 ⁻⁴ M	-9.27 (1.54)	-9.55 (0.46)	0.78 (0.37)	0.70 (0.11)
	HNO ₃	-9.78 (0.11)	-9.98 (0.17)	0.56 (0.03)	0.46 (0.05)
Biotite	Citric acid 10 ⁻² M	-9.75 (0.20)	-9.45 (0.07)	0.15 (0.04)	0.16 (0.01)
	Gluconic acid 10 ⁻² M	-9.88 (0.12)	-9.80 (0.10)	0.13 (0.03)	0.15 (0.02)
	Gluconic acid 10 ⁻³ M	-9.96 (0.11)	-9.48 (0.14)	0.35 (0.03)	0.40 (0.03)
	Gluconic acid 10 ⁻⁴ M	-9.13 (0.62)	-8.97 (0.42)	0.66 (0.13)	0.67 (0.09)
	HNO ₃	-6.82 (0.57)	-7.51 (0.19)	1.43 (0.17)	1.07 (0.60)

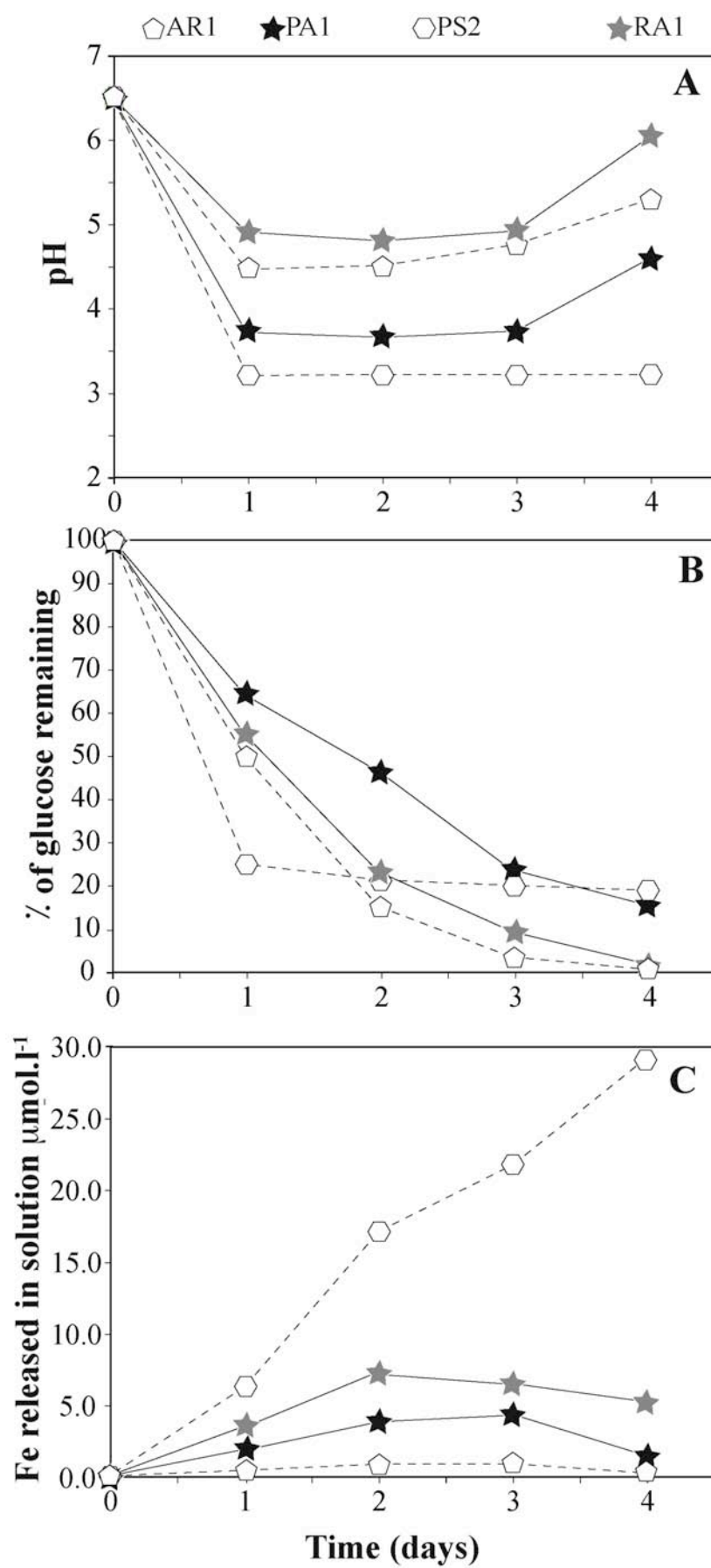


Figure 1.

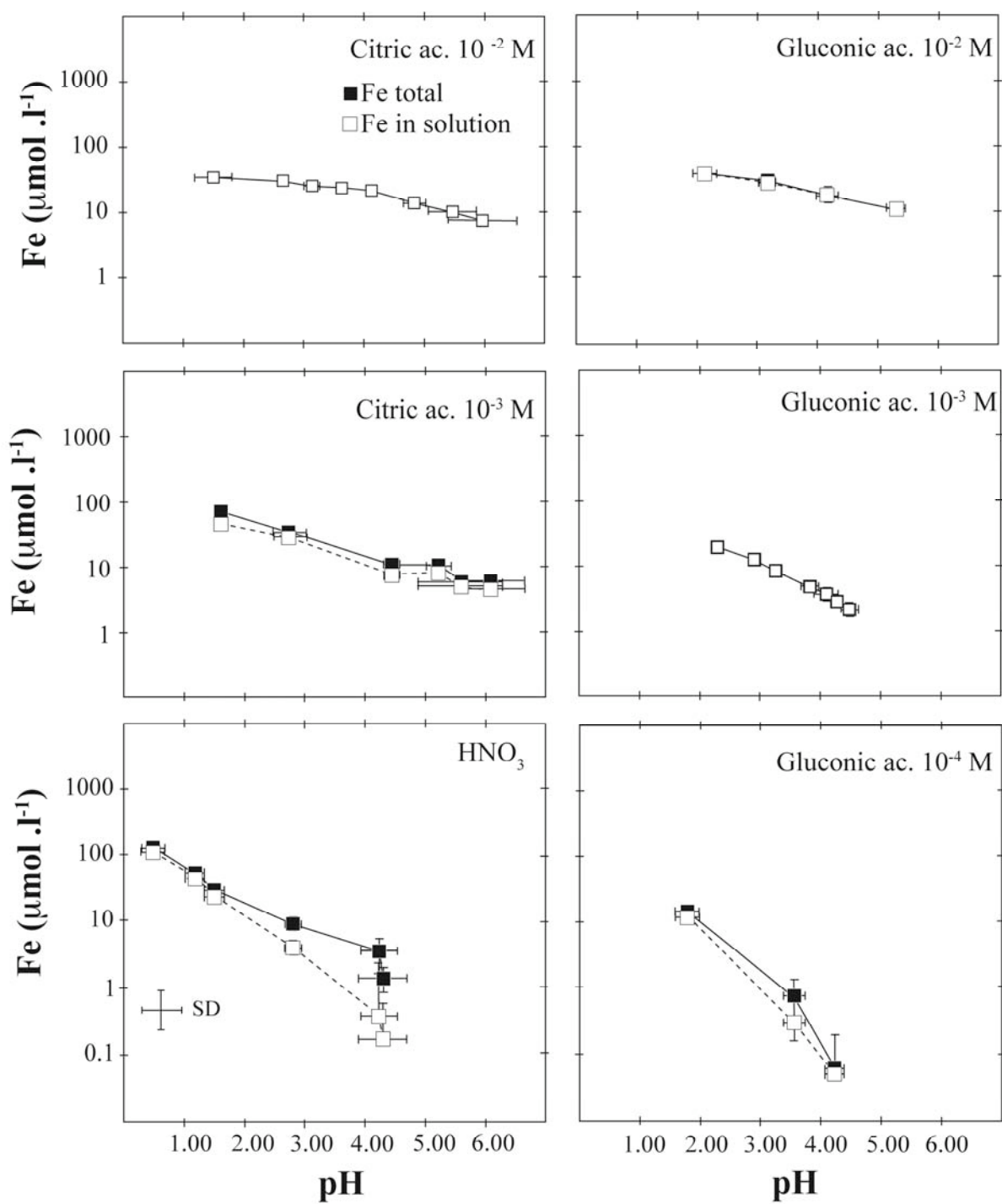


Figure 2A.

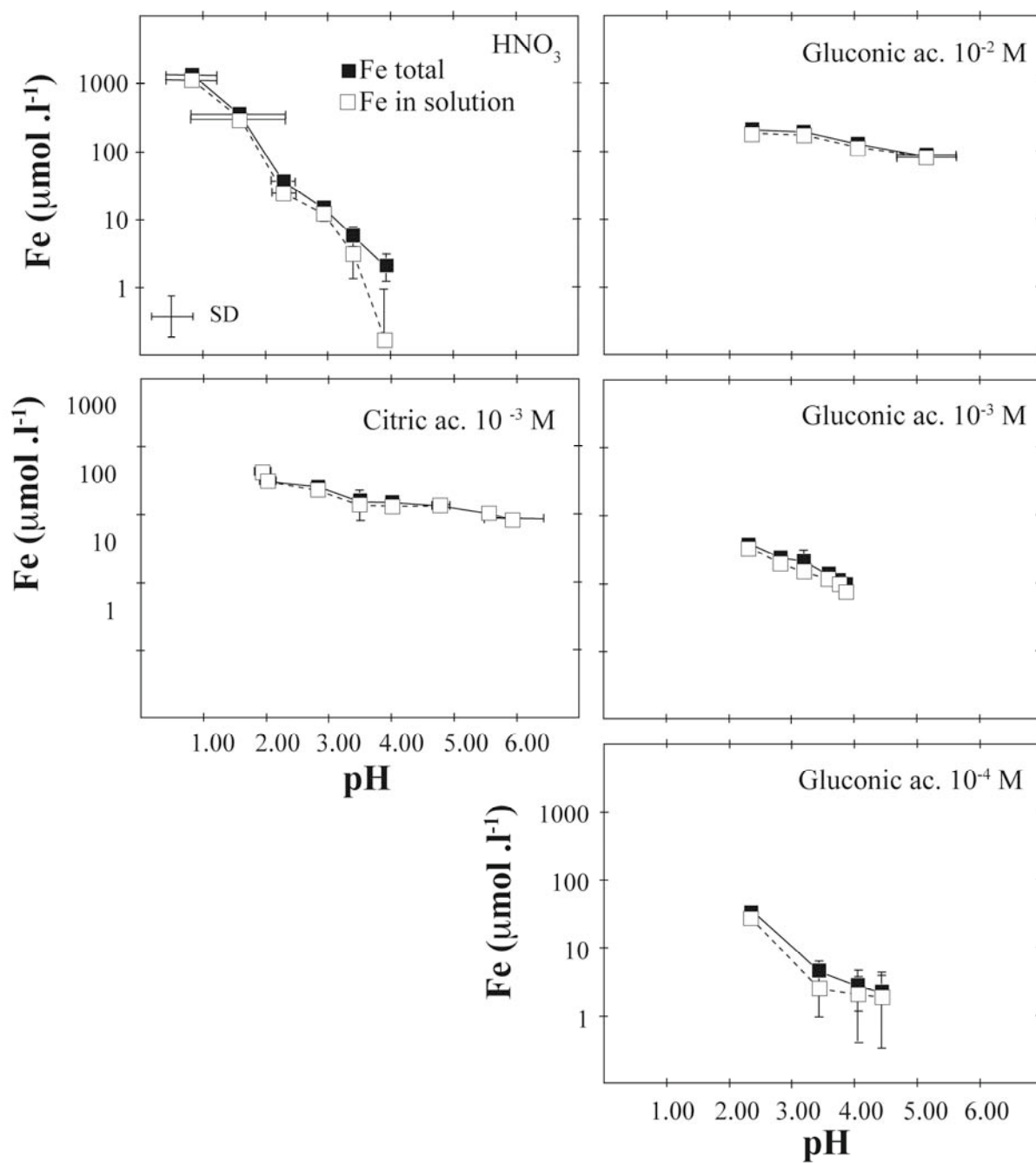


Figure 2B.

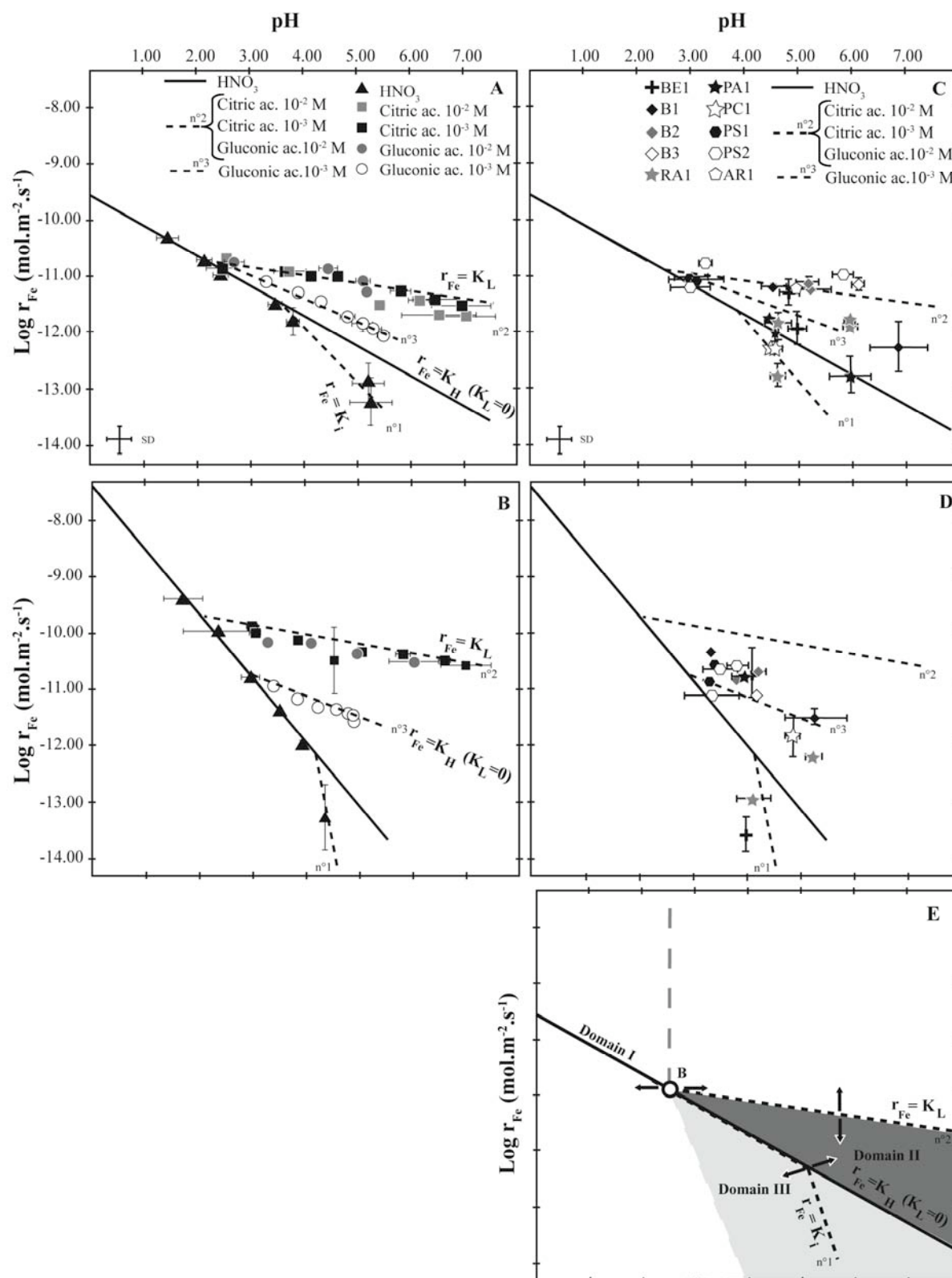


Figure 3.

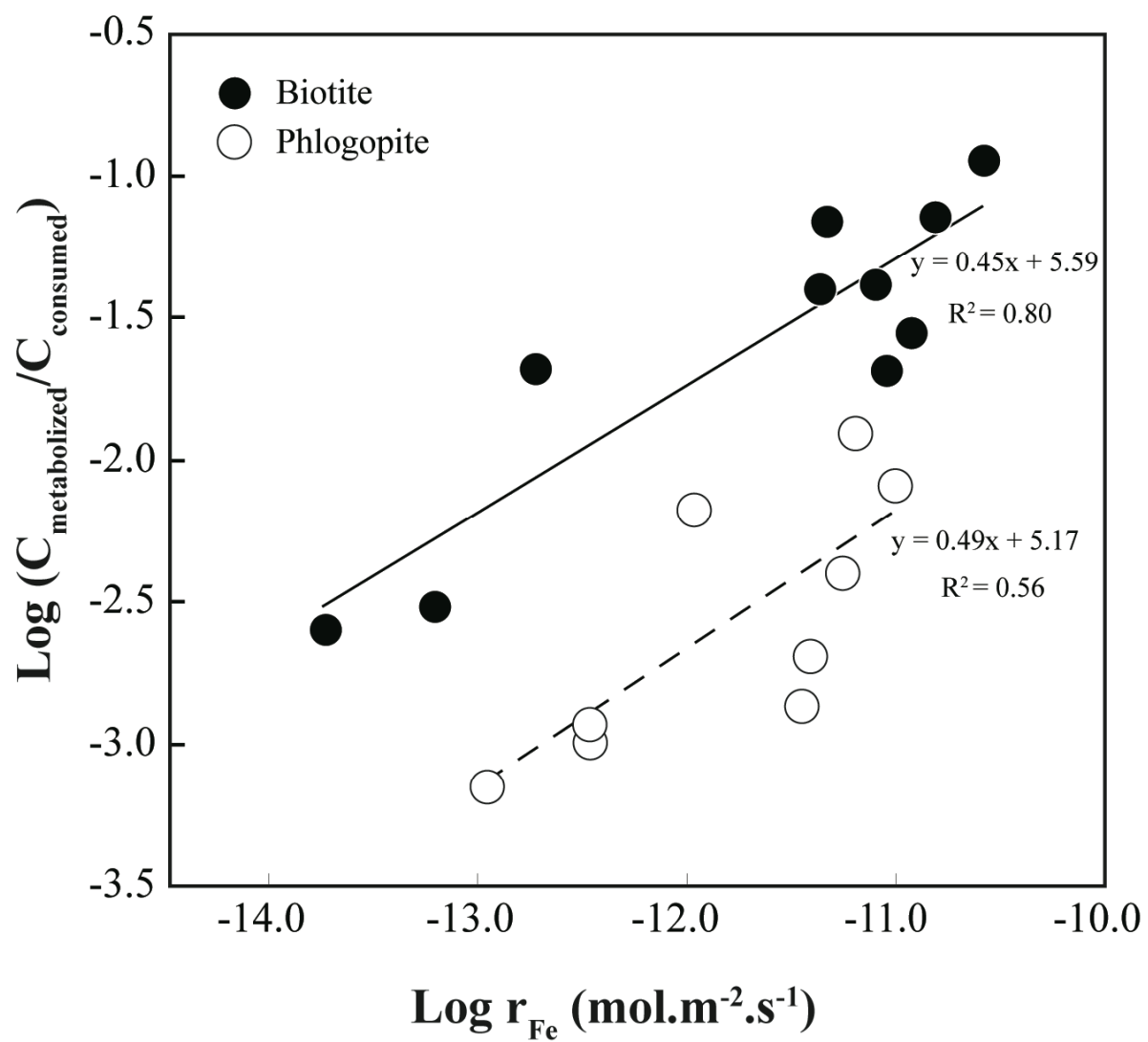


Figure 4.

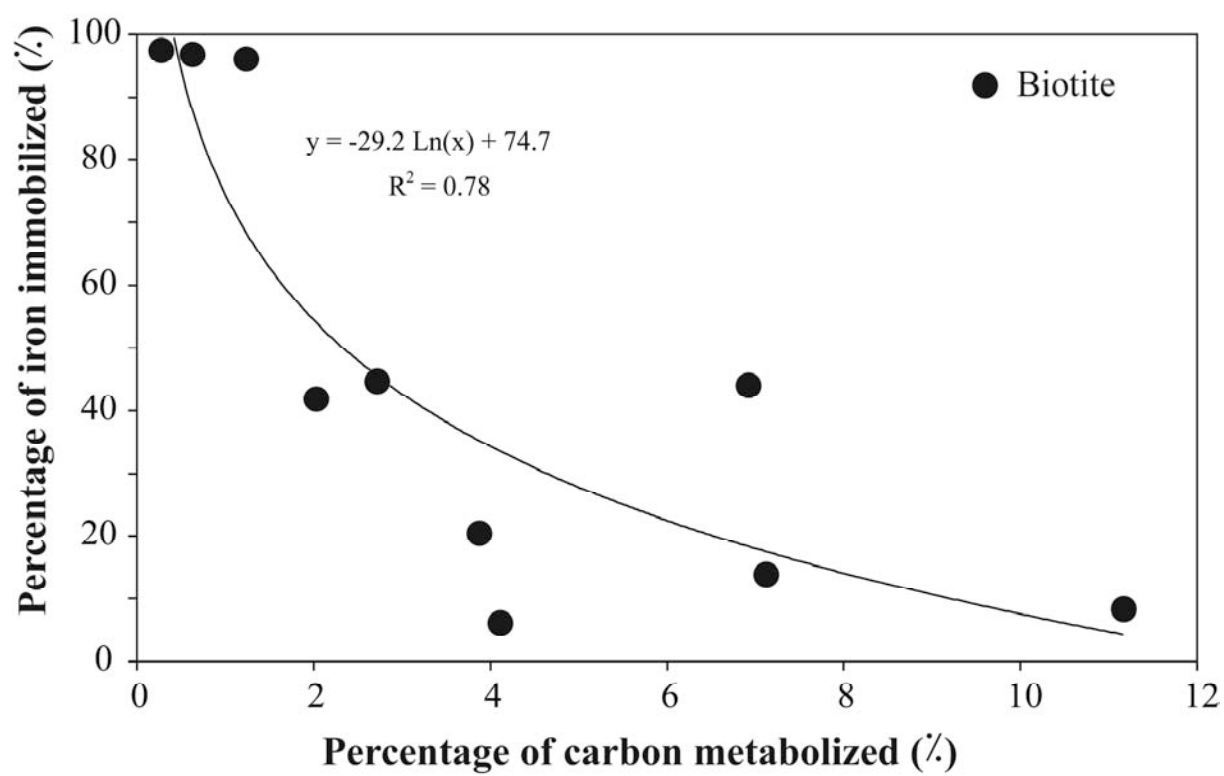


Figure 5.

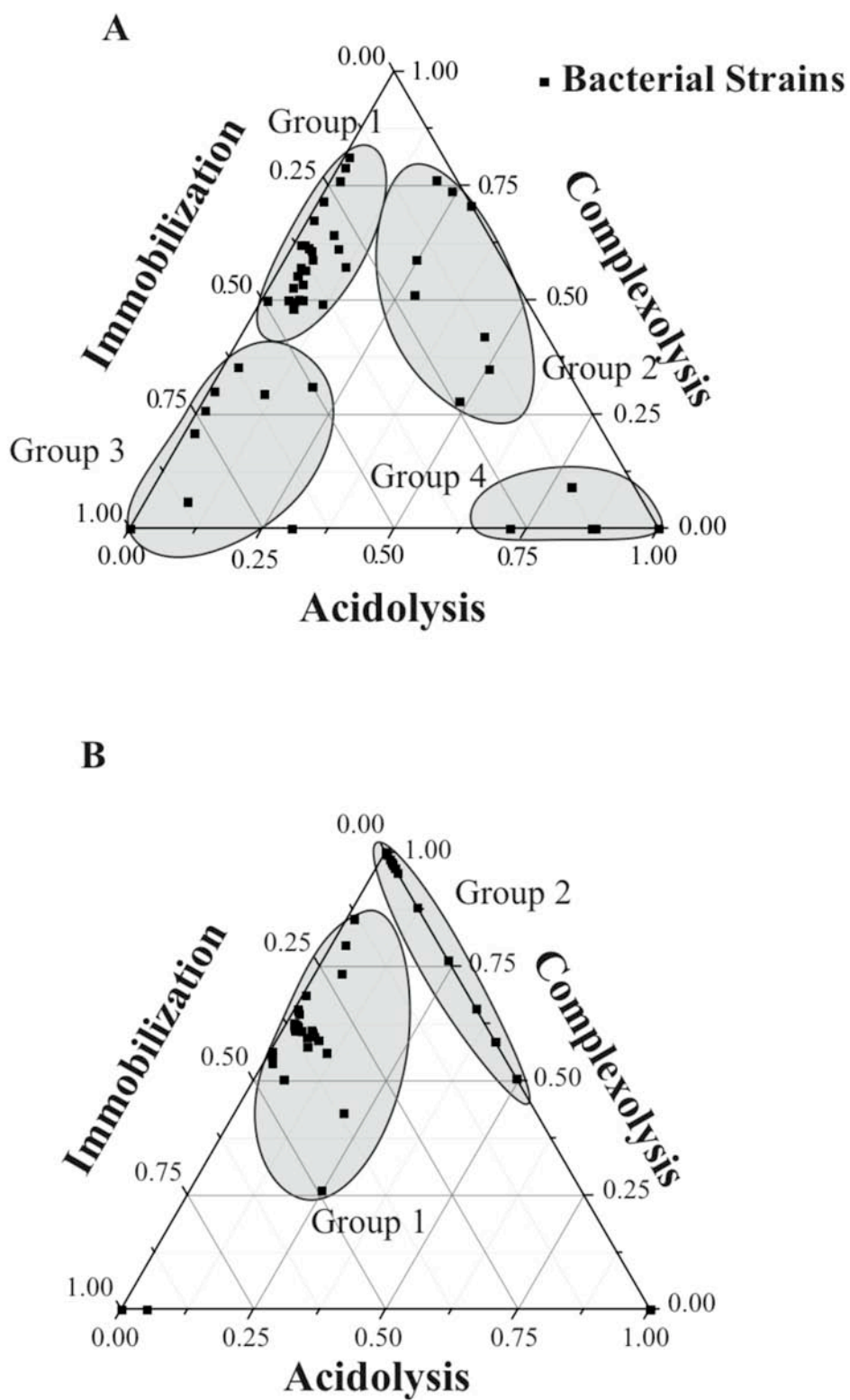


Figure 6.

ARTICLE 2

Characterization of elemental release and Mg isotopic signatures during bacteria-phlogopite interactions

Clarisse Balland¹, Anne Poszwa¹, Nathalie Vigier², Emile B. Bolou-Bi^{1,2} and Christian Mustin¹

¹ Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les Sols (LIMOS), Nancy-université-CNRS, P.O. Box 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

² Centre de Recherches Pétrologiques et Géochimiques (CRPG), 15 rue Notre Dame des Pauvres, 54501 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

ABSTRACT:

Phlogopite weathering experiments in aerobic conditions and in closed systems were carried out to study the potential fractionation processes linked to dissolution kinetics and processes (proton- and ligand-promoted dissolution) involved in the presence of four bacterial strains. Batch reactors were used at 24°C for 12 days with and without bacterial strains. Abiotic experiments were performed with organic and nitric acids in order to investigate and model the chemical processes linked to the weathering ability of the bacterial isolates. Citric and gluconic acids were used as a model of chelating agent, and nitric acid as a model of acidifying agent.

Results demonstrate that pH lowering and metabolites by produced during heterotrophic bacterial activities could greatly accelerate Mg and Si release from phlogopite. For a similar pH, the fraction of elements released in the solution was greater in presence of bacteria or citric acid when compared to nitric and gluconic acid experiments. Bacterial metabolism is different for one strain to another and induces substantial changes in solution pH; these changes had important consequences for the rate of elemental release from phlogopite compared to abiotic conditions. A very small Mg isotopic fractionation linked to phlogopite dissolution was highlighted in leached solution of all experiments. Two tendencies can be distinguished and appear more accentuated with higher leached Mg fractions. For experiments performed with HNO₃ and acidifying bacterial strain, the Mg leached into solution was

enriched in heavy isotope compared to phlogopite. For experiments performed with citric acid, the Mg leached into solution was enriched in light isotope compared to phlogopite. Moreover, the Mg isotopic composition of leached solution was correlated to the pH and the phlogopite dissolution rate with an enrichment in heavy isotope when pH is acid, except for experiments performed with chelating bacteria and citric acid where the Mg leached into solution from phlogopite was enriched in light isotopes.

Keywords: bacteria, phlogopite, organic acids, magnesium isotopic composition

1. INTRODUCTION

Mineral weathering is a key global process releasing mineral elements in soil profiles, controlling the composition of percolating waters and the formation of secondary mineral. In particular, weathering is a major source of magnesium in soils, plants and waters. At a more global scale, weathering processes influence the chemistry of rivers.

Ninety percent of minerals in the continental crust are silicate minerals. They represent the main reservoir of magnesium at the surface of Earth. Moreover, the weathering of silicate minerals plays an important role in the cycle of carbon, as released elements are involved in the storage of CO₂ through the formation of carbonates.

Two combined steps lead to the weathering of a mineral: physical disintegration and chemical dissolution more or less linked to biological processes. Silicate weathering is then considered to be the sum of complex set of reactions including mechanical, chemical and biochemical processes.

A lot of studies have demonstrated that bacteria can amplify aluminosilicate weathering reactions (ROBERT and BERTHELIN, 1986; LEYVAL et al., 1990; VANDEVIVERE et al., 1994; BARKER et al., 1998; WELCH and ULLMAN, 1999; HUTCHENS et al., 2003). However, these studies do not demonstrate if silicate dissolution must be considered as an indirect consequence of microbial metabolism (release of protons, metabolites or specific ligands) or as a specific strategy (i.e. dissolution serve some physiological functions) giving a competitive ecological advantage to colonizing bacteria (BENNETT et al. 2001). Few studies have been dedicated to the quantitative and qualitative impact of microbial diversity on silicate weathering in soils (BENNETT et al., 1996; BENNETT et al., 2001; ROGERS AND BENNETT, 2004). These experimental results lead the different authors to similar conclusions:

mineral chemistry influences strongly the colonization pattern of mineral and rocks by bacteria and their metabolic activities. The methods employed during these previous studies are analysis of elements released into the leach solution, bacterial colonization pattern of minerals and analysis of structural and chemical modification of minerals by microscopy or X-ray diffraction. With these methods, the direct effect of bacteria could not be distinguished of an indirect effect of the metabolites that bacteria produce.

Recent studies have shown that living organisms, by exchange at equilibrium and kinetic processes, can induce isotopic shifts for stable transition metal (Fe, Cu, ...) isotopes (BEARD, 1999; BRANTLEY, 2001; BEARD, 2002; ANBAR, 2003; BRANTLEY, 2004; MATHUR et al., 2005). The chemical behavior of iron and copper is very dependent of the redox conditions, which lead isotopic variations difficult to interpret. Magnesium is an element much less sensitive to the physicochemical conditions of the medium because the ion of magnesium (Mg^{2+}) has invariable oxidation state (+II). Recently, magnesium isotopes have been used in environmental studies. Results demonstrate that Mg isotopes could be a good tracer of weathering and of some biological processes. In nature, Mg isotope compositions ($\delta^{26}\text{Mg}$) vary from - 6 to 1 ‰. These variations were first used to study the Mg sources in natural samples such as soils, rocks and river (BRENOT et al., 2008; TIPPER et al., 2006; TIPPER et al., 2008). Mg isotopic compositions ($\delta^{26}\text{Mg}$) in silicate soils vary from -0.11 to 0.02 ‰, heavier than silicate rock (-0.4 to -0.8 ‰) and than rivers draining the same rock (-1.8 to -0.7 ‰), suggesting a fractionation during rock weathering. These studies didn't measure the impact of living organisms on these fractionation mechanisms. However, It is known that bacteria and plants have a crucial role on rocks weathering (BOYLE and VOIGT, 1973; HINSINGER et al., 1992; LEYVAL C. et al., 1990; ROBERT and BERTHELIN, 1986).

In marine environments, recent studies have highlighted different Mg isotopic compositions between marine microorganisms and seawater. For example, CHANG et al. (2004) and VON POGGE et al., (2008) showed that marine organisms have a Mg isotopic composition lighter ($\delta^{26}\text{Mg} = -1.9$ ‰) than seawaters ($\delta^{26}\text{Mg} = -0.8$ ‰). BLACK et al., 2006 and RA and KITAGAWA, 2007 indicate that marine phytoplankton chlorophyll molecules ($\delta^{26}\text{Mg}$ vary from 0.09 to -0.48 ‰) are slightly enriched in heavier Mg isotope relative to seawater ($\delta^{26}\text{Mg} = -0.83$ ‰). Chlorophyll molecules synthesis can induce Mg isotope fractionation, but the sense of this fractionation is still debated.

In continental systems, BLACK et al., (2008) and BOLOU BI et al., (accepted) have highlighted Mg isotope fractionations between plants and their source of nutrients. Plants

grown experimentally are systematically enriched in the heavy Mg isotope compared to their source of Mg. Fractionation processes during plant growth have been well investigated and seem to occur at two main levels: uptake by roots then translocation of Mg into plants. But eventual Mg fractionation processes during mineral dissolution were not studied. For example, in experiments of BOLOU-BI et al. (accepted) carried with silicate minerals as source of Mg, the Mg leached in solution was depleted in heavier Mg. They did not demonstrate that this was only due to the uptake of heavy Mg in plants. The knowledge of isotopic signature of solution at the interface bacteria/mineral could give some interesting complementary informations on the impact of microorganisms on Mg isotopic composition of soil solution, natural waters and rivers.

We investigate therefore the impact of bacterial activity on the Mg isotopic composition of solutions during the weathering of phlogopite minerals in closed systems, in aerobic conditions. Two types of leaching experiments were performed: (1) “bioleaching” with a mineral media in presence of bacterial strains and (2) chemical leaching experiments with nitric or organic acids in a sterile mineral media. The Mg, protons and Si fluxes released in the course of time were measured to distinguish the two main processes involved by bacteria: proton- and ligand- promoted dissolution through the determination and quantification of organic ligands by-produced (organic acids). Chemical and isotopic composition of solutions resulting from these two key processes and obtained in biotic conditions were compared to those released abiotically during chemical leaching experiments.

2. MATERIALS AND METHODS

Several phlogopite leaching experiments were performed with 4 bacterial strains (biotic experiments) isolated from rhizosphere of plants and acid soils according to their high weathering potential. To investigate and model the chemical processes linked to the weathering ability of the bacterial isolates, leaching experiments without bacteria were performed with different acids:

- citric acid (10^{-3} M, pH adjusted at 3.5 to 6)
- gluconic acid (10^{-3} M, pH adjusted at 3.5 and 5)
- nitric acid (concentration adjusted to be at pH 2.5, 3.5, 4, 5.5).

Citric and gluconic acids were used as a model of chelating agent, and nitric acid as a model of acidifying agent. Abiotic experimental conditions (pH, type and concentration of organic

acids) were based on experiments obtained in presence of bacteria to approach these biotic experimental conditions and to be able to compare more easily between them experiments performed with and without bacteria.

2.1. Minerals

The natural 2:1 phyllosilicate used in this study is a phlogopite (from Madagascar – Vohitrosy). The chemical composition of this mineral is as follows (g/kg): SiO₂ 390; Al₂O₃ 150; Fe₂O₃ 52; MnO 0.9; CaO 2.5; MgO 294; K₂O 110; TiO₂ 11.3; Na₂O 1.3; P₂O₅ 1.1 (LEYVAL et al., 1990). After wet grinding and sieving, phlogopite minerals were rinsed under sonication with distilled deionised water at circum neutral pH to remove ultrafine particles. The dried 50-100 µm fraction was selected to conduct experiments with phlogopite. A specific surface area of 0.5 (±0.3) m².g⁻¹ was determined by an N₂ adsorption Brunauer-Emmet-Teller method. Before starting experiments, the mineral powder was sterilized at 170°C during 2 hours under dry atmosphere.

2.2. Bacterial strains and cultivation

Soil bacteria were pre-selected according to their contrasted weathering abilities through the two main processes evolved for silicate minerals dissolution (1) proton-promoted dissolution by “acidifying” bacteria and (2) ligand-promoted dissolution - through the speciation of organic acids by-produced. Three heterotrophic strains of bacteria (*PA1*, *AR1*, *RA1*), previously isolated from rhizosphere of beech, pine and wheat, were chosen for their ability to dissolve mineral by acidification of the media (*AR1* and *PA1*) or to produce organic acids (*RA1* and *PA1*) (LEYVAL et al. 1991). A complementary strain (*PS2*) was isolated from an acidic soil i.e. podzol (WRB) located in the Vosges Mountains (north-eastern of France) and characterized as an acidifying bacteria (BALLAND et al., submitted).

The genus of the bacterial strains was determined by the amplification of 16S rRNA genes and sequencing. Polymerase chain reactions were performed using an universal set of primers in a total reaction volume of 50 µl containing 1x PCR mastermix (Eppendorf®), 0.1 µM of primers (966 F and 1401 F) and 1 µl cell extract (Fleske 1998). Before being sequenced by MWG biotech Company (Courtaboeuf, France), the PCR products (PCR product size: 433 base pair) were purified and concentrated using mini-columns (High Pure™ PCR product Purification Kit, Roche diagnostic). A blast program was used to compare the sequences with those of the GenBank databases (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). The following identification was made with a maximum identification of about 99 %:

Rhanella aquatilis (RA1), *Pantoea agglomerans* (PA1), *Agrobacterium radiobacter* (AR1) and *Pseudomonas* sp. (PS2).

All bacterial strains were cryopreserved at -80 °C in 30 % glycerol and then precultivated on Petri dishes containing Luna and Bertani agar (LB 20 g.l⁻¹ from Difco and 15 g.l⁻¹ agar). Strains were grown at 28 °C. Biotic experiments were conducted with actively growing culture of bacteria, freshly rinsed and conditioned as describe below. Prior to deposition in batch's reactors, bacterial isolates were recovered and cultivated in 2 ml LB liquid medium during 1 day. Cells suspension was rinsed three times in deionised water and then suspended in 10 ml of the BHm media in order to obtain 10⁷ cells per ml of suspension.

2.3. Experimental set-up

Biotic and abiotic or chemical leaching (without bacteria) experiments were performed in batch reactor closed systems in order to follow the variation with time of some parameters such as protons, elements released into solution and bacterial physiology (consumption of glucose, number of bacteria). Each batch reactor was sterilized with culture media by autoclaving at 110°C during 30 min.

2.3.1. Culture media

In all experiments, the usual mineral medium for bacterial cultures (Bushnell-Hass like) was used as a source of essential mineral nutrients in order to simulate a soil solution chemical composition. This medium was an iron and magnesium free, thus phlogopite was the only source of these elements for bacteria. Its depleted composition (20 mg.l⁻¹ KCl ; 20 mg.l⁻¹ NaH₂PO₄, 2H₂O ; 22.5 mg.l⁻¹ Na₂HPO₄, 2H₂O ; 65 mg.l⁻¹ (NH₄)₂SO₄ ; 100 mg.l⁻¹ KNO₃ ; 20 mg.l⁻¹ CaCl₂ in distilled deionised water) is reflected by its resulting low ionic strength (4.5 mM).

Microbial weathering of phyllosilicate was carried out in presence of glucose as sole source of carbon and energy. To avoid iron and magnesium input, glucose solutions (20 g.l⁻¹, 0.8 mM of carbon) were prepared with ultrapure deionised water (18MΩ.cm⁻¹, Elga Purelab) and sterilized by filtration at 0.2 µm. All reactants were chosen according to their purity to minimize the contamination of Fe and Mg. The medium and the glucose solution were checked by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy analysis (ICP AES Jobin-Yvon 238 at LIMOS, France) and neither Fe nor Mg were detected at a detection limit 0.005 ppm.

2.3.2. Experimental procedure

In addition of the sterility precautions taken all along experiments, all laboratory material was precleaned (HNO_3 weakly concentrated) to avoid any mineral contamination. Biotic and abiotic experiments were run in batch reactors composed by glass flasks. Reactors have been agitated continuously on a shaker (Certomat.u, Braun 120 rpm) except for experiments R1, R4, P1, A1, H3 and C2 where flasks have been agitated manually once every day for approximatively 30 seconds. Experiments were conducted in aerobic conditions at a room temperature of 24°C . Each batch was “closed” with carded cotton and greaseproof paper that allow circulation of ambient air but protect to bacterial contaminations.

In biotic experiments, each reactor was filled with 3 g of phlogopite powder, 10 ml of cells suspension, 80 ml of BHm and 10 ml of glucose solution (Batch’s concentration: 2 g.l^{-1}). Cells suspensions have been incubated in reactors for 6 to 12 days.

The number of bacterial cells in suspension ($\text{OD}_{600\text{nm}}$), the consumption of glucose, the nature and quantities of metabolites released and the leached elements concentrations were followed with time. All experiment set-up, days of sampling and specific parameters characterized are summarized in Table 1A. For chelating bacteria, four experiments were performed with RA1 (R1 to R4). A single experiment was performed in presence of strain PA1. For acidifying bacteria, two experiments were performed with strain Ps2, the former was stopped at 6 days (B1) and the second at 12 days (B2). A single experiment was performed in presence of AR1.

Chemical weathering experiments (without bacteria) were performed in the same type of glass flasks filled with phlogopite (3g), the mineral medium (100 ml) and different acids. Experiments setup (molarity and pH), time of sampling and specific parameters characterized are compiled in table 1B. Four experiments were performed with nitric acid (HNO_3) at various pH (H1 to H4). Four experiments were performed with gluconic acid (G1 to G4). Six experiments were performed with citric acid (C1 to C6).

After each sampling in biotic and abiotic reactors, solutions were collected, filtered at $0.2 \mu\text{m}$ and stored at 4°C before analysis.

2.4. Elemental and physiological analyses

2.4.1. Determination of protons, glucose and number of cells

The quantitative analysis of the acidification processes during the experiments was accomplished with bromocresol green (1 g.L^{-1} , BG, Sigma-Aldrich 114367) a very common acid sensitive dye. The pH was determined by adding $10 \mu\text{l}$ of bromocresol green to $200 \mu\text{l}$ of filtrate. Bromocresol green (BG) is yellow ($\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$) in acidic solution ($\text{pH} < 3.8$) and

blue ($\lambda_{\max} = 620 \text{ nm}$) in more basic solutions ($\text{pH} > 5.8$). The pH of the leaching solution was determined at two wavelengths close to both BG maxima (BESHIR et al., 2007). A microplate reader (SAFAS Xenius FLX) was used to measure the absorbance at these different wavelengths.

Consumption of glucose by bacteria was determined by measuring the glucose remaining in the 3 μl filtered solution after addition of 300 μl of GOD-PAP (enzymatic kit, BioLabo). After 20 min, the glucose concentration was measured at an absorbance of 520 nm. The detection limit for glucose was 0.1 ppm.

According to the manufacturer's instructions, calibration curves were built (data not shown) to determine the relationship between the absorbance and the amount of protons and glucose, respectively from the bromocresol green and GOD-PAP. These relationships were validated in the work of Uroz et al. (2007).

The concentration of planktonic bacteria was determined usually by measuring the absorbance of the cell suspension at a wavelength of 600 nm. A correlation between the number of cell and the absorbance was realized by enumerate directly the number of cell with a Thoma cell under microscopic observation in function of the optical density at 600 nm. For each bacterial strain, an equation was obtained giving an approximation of the number of cell suspension in function of the optical density (data not shown).

2.4.2. *Metabolites released in leaching solution*

Non-acidified samples (R1, B1 and B2) were stored at -18°C . Ten organic acids, the most usually released in solution by bacteria (formic, gluconic, butyric, pyruvic, citric, oxalic, propionic, acetic, succinic, malic, lactic and malonic acid), were determined and quantified. Measurements were realized with an ion chromatography using conductivity detection (ICS 3000, Dionex Corp.) and an analytical column (AS 11 HC, Dionex corp.). The sample was eluted with KOH solution of varying concentrations (0.9 mM to 60 mM) over time (step gradient) with a flow of 1.3 ml/min. The synthetic reference materials used were sodium formate, D-gluconic acid, Sodium butyrate, pyruvic acid sodium salt, sodium citrate tribasic, sodium oxalate, sodium propionate, Sodium acetate, Succinic acid disodium salt, DL-malic acid disodium salt (from Sigma-Aldrich) and Sodium-L-lactate and Malonic acid disodium salt (from fluka). Uncertainties were better than 0.5% for all organic acids measured.

2.4.3 *Mg and Si Concentrations*

Concentrations of cations (Mg and Si) released in the solution were analyzed by atomic absorption spectrometry (SAA Perkin Elmer 5000 at CRPG Nancy, France) and by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES Jobin-Yvon 238 at LIMOS Nancy, France). All solution samples were acidified with HNO_3 prior to analysis. The detection limit for Mg and Si was 0.05 ppm. Uncertainties with our medium were better than 5 %. Accuracy and reproducibility were controlled by repeated (5 times) analyses of Mg and Si synthetic reference materials (Spex-Certiprep).

2.4.4 Mg isotopes determination solution and phlogopite

Mg isotope composition was determined (i) on Mg in solutions collected from all experiments with no separation between the ionic or chelated Mg forms and (ii) on structural Mg contained in the initial phlogopite powder.

Mg isotope measurements were realized using two multiple collector inductively coupled plasma mass spectrometry (MC ICP-MS): the Isoprobe based at CRPG Nancy (France) and the Nu plasma based at ENS Lyon (France). The instrumental mass bias was corrected using standard-sample bracketing (GALY et al., 2001). To prepare for isotope analysis, a sample aliquot containing at least 50 μg of Mg was dried in Teflon cups. The elements in solution were dissolved with peroxide of hydrogen (H_2O_2 30%) and concentrated nitric acid to eliminate glucose.

A pure fraction of Mg was required for isotopic analysis to reduce interference and matrix effects (GALY et al., 2001). The method used to separate the Mg from all other elements in this work was validated and described by BOLOU-BI et al. (2009). Briefly, purified Mg fractions were obtained by ion chromatography liquid in two steps. Before these steps, the samples dissolved in 0.5 ml HCl 1N were loaded in the resin. The first step of separation was performed using an anion exchange resin (Bio-Rad AG $\text{\textcircled{R}}$ MP-1M, 100-200 mesh size) to remove the transition metals. The second step was performed using a cationic resin (Bio-Rad AG50W-X12, 200-400 mesh size), which separates Mg from all the other cations. It was necessary to realize several passages on this cationic resin to collect 100% of pure Mg initially in the samples. The more difficult was the separation between K and Mg as our samples have high K/Mg concentration molar ratios (varying between 0.5 and 17). Reference material NIST SRM980_{CRPG} was doped in K with a K/Mg ratio of 17 to control the efficiency of separation of Mg from the other elements. The data obtained ($\delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}} = -3,97 \pm 0.14$; $\delta^{25}\text{Mg}_{\text{DSM3}} = -2,01 \pm 0.15$) was in accordance with the value of the standard reference material NIST SRM980_{CRPG} ($\delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}} = -3,98 \pm 0.05$; $\delta^{25}\text{Mg}_{\text{DSM3}} = -2,04 \pm 0.05$). The

reference solution used was NIST SRM980_{CRPG} ($\delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}} = -3,98 \pm 0.05$; $\delta^{25}\text{Mg}_{\text{DSM3}} = -2,04 \pm 0.05$) using the following relation in the conventional delta unit defined by: $\delta^{26}\text{Mg} = [({}^{26}\text{Mg}/{}^{24}\text{Mg})_{\text{sample}} / ({}^{26}\text{Mg}/{}^{24}\text{Mg})_{\text{standard}} - 1] * 1000$

Our results were reported relative to a new reference material developed by Cambridge University: DSM3 (Dead Sea Magnesium) when the heterogeneity of the NIST SRM980_{CRPG} reference material was demonstrated (CARIGNAN et al., 2004 and GALY et al., 2003)

3. RESULTS

Preliminary experiments of phlogopite dissolution in the same conditions that those presented in the material and methods section were performed with the four bacterial strains. Strains RA1 and PS2 were the most efficient at released elements from this silicate mineral. These strains were then more precisely study.

3.1 Glucose consumption, bacterial growth and pH variations

In Table 2 are compiled data on pH, glucose, Mg, Si concentrations, and optical density (DO, linked to cells number) measured in the media and in all biotic reactors. The initial composition of the solution in each reactor (time = 0 days) was assumed to be equivalent to those of the growth media used. The change of the planktonic bacteria amount during experiments is given by the optical density at 600 nm ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) and represented on Figure 1a. Immediately after inoculation, all reactors with bacteria showed initial $\text{OD}_{600\text{nm}}$ of 0.05 corresponding to a cell number of $\approx 10^6$ bacteria. ml^{-1} . In experiments with bacterial strain RA1, cell numbers increased regularly up to a maximum OD at the end of experiments of 0.21 (5.10^7 bacteria. ml^{-1}), and 0.1 (10^7 bacteria. ml^{-1}) respectively for experiments R1 and R4. In experiment R3, the maximum OD value is reached at day 3 and slightly decreased after down to 0.12 (1.10^7 bacteria. ml^{-1}). In presence of bacterial strain Ps2, cell numbers only slightly increased with time, as shown by the OD variation up to a maximum of 0.06 ($\approx 10^6$ bacteria. ml^{-1}) and 0.08 (5.10^6 bacteria. ml^{-1}) respectively for experiments B1 and B2 at the end of the experiments. The bacterial strain Ps2 had a constant and weak growth during time in contrast to RA1, with a slow time generation.

Simultaneously, in presence of bacterial strain RA1, glucose concentrations decreased from 2 g. l^{-1} to 0, 1.02 and 1.07 g. l^{-1} respectively for experiments R1, R3 and R4 the 6th day (Table 2, Figure 1b). In presence of bacterial strain Ps2, glucose concentrations decreased

strongly below 1g.l^{-1} within the two first days suggesting that Ps2 consumed more glucose than RA1 at the beginning of the experiments. Concentrations decreased then more slightly down to 0.42 and 0.29 g.l^{-1} respectively for experiments B1 and B2 after the 6th day.

In all biotic reactors, the pH rapidly decreased within the two first days from an initial value of 6.5 (Figure 1c). The second day, the pH reached a value of 5.2, 5.0, 4.6 and 4.2 respectively for experiments R1, R2, R3 and R4 in presence of the chelating bacteria RA1 and 3.5 and 3.3 respectively for experiments B1 and B2 with acidifying bacteria PS2. Between days 2 and 12, the pH remained constant in all experiments, except in experiments R1 where the pH increased again the third day to a quite constant value of 6.5-6.7. This change in the experiment R1 compared to all other ones is linked to the almost total consumption of glucose by bacteria. For experiments P1 and A1, the pH values at 12 days were 3.9 and 4.5 respectively in presence of bacterial strains PA1 and AR1.

3.2 Organic acids released

Figure 2 represents the change with time of organic acids concentrations produced by bacterial strains RA1 (experiment R1) and PS2 (experiments B1 and B2) and measured in solutions. In all experiments, propionic, malic and malonic acids were below the detection limit. In experiments performed with the bacterial strain RA1 (experiments R1), the maximum concentrations were reached at the end of the second day for lactic acid (62 ppm), acetic acid (77 ppm), formic acid (2.5 ppm), succinic acid (23.5 ppm), oxalic acid (7.2 ppm) and citric acid (3.1 ppm). Between the second and the sixth day, concentrations of organic acids decreased slightly down to 37.1, 8.3, 4.2 and 5.4 ppm respectively for lactic, formic, succinic and oxalic acids. The maximum concentration were reached the first day for acetic acid (77 ppm), strongly decreased to reach about 0 the sixth day. Few ppm of citric acid (3.1 ppm) were detected only the first day. The bacterial strain Ps2 (experiments B2) produced only gluconic and butyric acids. Gluconic acid concentrations increased from 1600 ppm the second day to 2360 ppm the 6th day and 2486 ppm the 12th day. Butyric acid concentrations increased from 21 to 31 ppm the 6th day and 54 ppm the 12th day.

3.3 Dissolved elemental concentrations

The fraction of Mg and Si leached from phlogopite and measured in solution at the end of biotic and abiotic experiments are given respectively in Table 2 and Table 3. This fraction of Mg and Si is very low and Mg/ Si concentrations are well correlated whatever the experiments and bacteria present.

Figure 3 represents the fraction of Mg dissolved from phlogopite as a function of time for biotic and abiotic reactors. In abiotic conditions, for experiments performed with HNO_3 (Figure 3a), at the end of the sixth day, the fraction of dissolved Mg from phlogopite (F_{Mg}) reached values of 1.25 ‰ at pH 2.5 (experiment H1), 0.5 ‰ at pH 3.5 (experiment H4) and 0.2 ‰ at pH 4 (experiment H3). Protons concentration influenced strongly the Mg released. For experiments performed with gluconic acid, the fraction of dissolved Mg from phlogopite (F_{Mg}) reached same values of 0.43 and 0.49 ‰ at 6 days respectively in experiments G3 and G4. The fraction of dissolved Mg from phlogopite (F_{Mg}) reached value 0.30 and 0.53 ‰ at 6 days with citric acids respectively in experiments C3 and C4. At a given pH of 3.5, the presence of gluconic acid (G3, G4) permitted to release the same quantities of Mg from phlogopite than nitric acid (H4). For a given pH, about 6 at 10 days, F_{Mg} was three times more important in presence of citric acid (experiment C1 = 0.90‰) than nitric acid (experiment H3 = 0.27‰).

In biotic experiments, F_{Mg} increased slightly in the course of time and reached the sixth day a value of 0.29, 0.38, 0.43, 0.20 ‰ 0.80 and 0.76 ‰, respectively for experiments R1, R2, R3, R4, B1 and B2. The ninth day, F_{Mg} reached a value of 0.49, 0.51, 0.53 and 0.76 ‰ respectively for experiments R2, P1, A1, and B2. Strain Ps2 permitted to released two times more Mg and Si into solution from phlogopite than facultative anaerobic bacterial strains (PA1, RA1, AR1)

Comparing bioleaching and leaching experiments at similar pH, F_{Mg} was greater in presence of bacteria or citric acid than with nitric and gluconic acid experiments. Reactors agitated constantly during experiments released significantly more Mg and Si into solution than non-agitated experiments as previously observed in the experiments of BRANTLEY et al. (2004). This is very clear for experiments with strain RA1, experiments R2 and R3 (agitated) had two times more elements leached into solution from phlogopite than experiments R1 and R4.

3.4 Mg isotope compositions

The Mg isotopic composition of phlogopite and Mg leached into solution at the end of the experiments are summarized in Table 2 and Table 3. The Mg isotopic composition of phlogopite is $\delta^{26}\text{Mg} = -1.22 \pm 0.24$ (average realized from X samples). In biotic conditions, with strain RA1 (experiment R2), $\delta^{26}\text{Mg}$ values in solution were -1.41 and -1.31 at 3 and 6 days, with strain PA1 and RA1 (experiment P1 and A1) $\delta^{26}\text{Mg}$ values in solution were -1.39

and -1.23 at 12 days. Solutions with strains PS2 (experiments B1 and B2) had a $\delta^{26}\text{Mg}$ values of -1.09 and -0.88 at 6 and 12 days respectively.

In abiotic conditions, with nitric acid (experiment H1), the $\delta^{26}\text{Mg}$ in solution were -0.82 at sixth day. With gluconic acid (experiments G3 and G4), the $\delta^{26}\text{Mg}$ in solution were -1.02 and -1.22 respectively the ninth and the sixth day. The $\delta^{26}\text{Mg}$ values measured with citric acid in experiments C1, C3 and C4 respectively at 13, 6 and 6 days were, -1.52, -1.43 and -1.42. Except with HNO_3 at pH 2.5 (H1, 6 days), and with strain PS2 (B2 at 12 days), the magnesium isotopic compositions of solutions were very close between them and similar to the $\delta^{26}\text{Mg}$ value of phlogopite (about -1.22). In general results indicate no significant change of the isotopic composition of Mg leached into solution compared to that of Mg in phlogopite.

4. DISCUSSIONS

4.1. Origin of the acidity and organic acids in biotic experiments

The bacterial strains RA1 (chelating bacteria) and PS2 (acidifying bacteria) did not have the same behavior during experiments. The former strain had a low growth bacterial and consumed moderately the glucose. It released several organic acids such as lactic, acetic, formic, succinic, oxalic and citric acids acidified weakly the medium (pH = 4.5). The second strain had a very low growth bacterial but consumed a great part of the glucose. It released few type of organic acids (gluconic and butyric acids) but in great quantities and acidified strongly the medium (pH = 3.5).

The consumption of glucose, and the enhance of the cell numbers into solution were interpreted to reflect bacterial growth followed by a prolonged stationary phase most likely sustained by the internal recycling of organic matter and nutrients.

In our experiments, bacteria used glucose as both an energy source (electron donor) and a carbon source for biomass synthesis. There was a link between glucose consumption and acidification depending on bacterial metabolism. We explain the lowered pH was than bacteria produced organic acids. Previous works have shown that the partial glucose oxidation can lowered pH via the production of gluconic acid (VANDEVIVERE et al. 1994; WELCH and ULLMAN, 1999; WU et al., 2008). The metabolites produced by bacterial strains have been measured in our experiments (Figure 2). The production of organic acids depended on many factors such as the nutritional, physiological and growth conditions of cultures. In presence of

RA1, organic acids produced were citric, oxalic acid and especially lactic, formic and acetic acid. The organic acid produced mainly by aerobic bacteria Ps2 was gluconic acid.

For the facultative anaerobic bacteria (RA1 and PA1), under stress conditions, the oxidation continued beyond the glucose intermediate. The lack of required enzymes led some bacteria to accumulate or expel as waste various intermediate acids (GOTTSCALK, 1986), such as fumaric, citric, oxalic acid and especially lactic, pyruvic and acetic acid resulting from fermentation. Thus, these strains had an anabolism not very requiring in energy and consequently, a catabolism relatively not very effective requiring a low amount of initial carbon source. In the contrary, the strain Ps2 is an aerobic bacterial strain that had an anabolism requiring sufficient energy and a catabolism relatively effective requiring a great initial source carbon.

For experiments R1 performed with strain RA1, glucose was quickly and entirely consumed at 3 days, and pH increased strongly to 7 due to protons consumed by buffering capacity of phlogopite. At the end of the third day, following the lack of carbon source, bacterial activity decreased strongly and stopped and bacteria cannot maintain pH at 5. For consequence, this experiment will not be taken into account in the rest of this study.

As shown by protons and organic acids released, results confirmed that RA1 and PA1 are a chelating bacteria and PS2 an acidifying bacteria. These products induced by bacterial metabolism induced substantial changes in solution pH with important consequences for the elemental release from phlogopite compared to abiotic conditions.

4.2 Elemental release rates

The influence of pH, organic acids and bacteria on the release rate of Mg and Si was evaluated using the linear rate law described by MALMSTRÖM and BANWART, (1997) and MALMSTRÖM et al., (1996) and given by the following equation:

$$r_M = k_H (a_{H^+})^n + K_O + k_{OH} (a_{OH})^m + k_{L,M} (a_L)^l \quad (\text{eq 1})$$

where M is the element released (Mg or Si), k is the rate constant, a_{H^+} , a_{OH} and a_L are the activities of protons, hydroxyl and ligand respectively and n, m, and l are the orders of reactions experimentally obtained with respect to proton, hydroxyl and ligand. The model suppose that (1) the ligand-promoted process operates in parallel with and independently of the hydroxyl or proton-promoted processes, (2) ligand-promoted rates are additive. In the present study, the phlogopite weathering is done in acid environment and terms $K_{O,M} + k_{OH,M} (a_{OH})^{n,M}$ are negligible. Thus, experimental data were fitted to rate law yielding the following equation:

$$r_M = k_H (a_{H^+})^n + k_{L,M} (a_L)^l \text{ (eq. 2)}$$

The form of this empirical release rate equation is characteristic of dissolution rate laws with proton adsorption or ligand complexation at the mineral surface. In both biotic or abiotic experiments, the apparent initial release rates of Mg and Si were calculated using the equation 2 in the course of time. In all experiments, the release rate of Mg and Si decreased slightly with time (data not show). This was frequently observed in dissolution experiments using fresh mineral samples as in works of FURRER and STUMM, (1986) and MALMSTRÖM and BANWART, (1997). It could be attributed to a first step of quick dissolution of ultrafine particles then to a decrease of the dissolving surface area and more reactive surface sites.

Figure 4 represents the Mg (r_{Mg}) and Si (r_{Si}) release rates in function of average pH. The correlations observed confirmed that elemental release was largely pH controlled. The highest elemental release occurred at low pH, whereas the lowest rates occurred at near neutral pH.

Bioleaching and chemical leaching performed with citric acid permitted higher release rates relative to chemical leaching performed with HNO_3 and gluconic acid. For a given pH, Mg release rates were ~ 2 to 3 fold higher in bioleaching compared to chemical leaching performed with HNO_3 and Si release rates were also ~ 1.5 fold higher.

Acidifying bacteria (PS2 and AR1) amplified Mg and Si release rates compared to HNO_3 . As shown by organic acids analysis, strain PS2 produced into solution about 1 mM of gluconic acid leading to a pH of 3.5. At this given pH, Mg and Si release rates were lower and similar for chemical experiments performed with gluconic acid (G1, G2 and G3 at similar conditions that experiments with PS2 and $\sim 1.43 \cdot 10^{-10} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and HNO_3 (H4) (and $1.38 \cdot 10^{-10} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$); At this pH, gluconic acid (pKa 3.86) acted like a strong acid. But enhanced elemental released rates in presence of PS2 and AR1 suggest that other process must be taken into account to interpret such variations. VANDEVIVERE et al., (1994) highlighted microreaction zones at the contact bacteria-mineral where the chemical compositions of the solution in these site was strongly different that the bulk solution with high protons and organic acids concentrations.

All bacterial strains used in this work, acidifying (PS2 and AR1) or chelating (PA1 and RA1) bacteria accelerate elemental (Mg and Si) release from phlogopite principally through pH lowering and the production of chelating agent such as organic acids. A similar conclusion was previously reported in several other studies (VANDEVIVERE et al., 1994; BAKER et al., 1998; WU et al., 2008).

The growth of bacteria measured in the course of time was not correlated to the Mg and Si released into solution during the phlogopite bioleaching. This suggest that the growth of

bacteria was not a crucial factor for highlighting bacterial effectiveness to weather phlogopite. The generation time of Ps2 was less important than RA1. Inversely, elemental release was more important in presence of bacterial strain Ps2 ($2.22 \cdot 10^{-10}$ and $2.51 \cdot 10^{-10} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ respectively for Mg and Si release rates) than with bacterial strain RA1 ($1.06 \cdot 10^{-10}$ and $7.23 \cdot 10^{-11} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). However, only planktonic bacteria were enumerated in our experiments, whereas adhering bacteria are known to play an important role in the enhancing mineral weathering (VANDEVIVERE et al. 1994).

Viable bacteria (in exponential and stationary growth phase) were necessary to maintain low pH in our experiments releasing protons, organic acids and CO_2 into solution (WELCH and ULLMAN 1993; VANDEVIVERE et al. 1994). As shown by experiments R1, in absence of glucose, bacteria in decline growth phase did not maintain production of protons and other organic acids, and pH increased due to the consumption of protons by phlogopite. Thus, the growth conditions of bacteria affect directly the chemistry of solution directly through the excretion of protons and organics acids and as an indirect consequence the elemental release during mineral dissolution (HUTCHENS et al. 2003).

4.3 Stoichiometry of dissolution

The reaction stoichiometry is illustrated in Figure 5 in the form of the ratios of the elements released (Mg and Si), together with the elements ratios of the initial phlogopite in the course of time. With HNO_3 at pH 2.5 and 3.5 respectively for experiments H1 and H4, the ratios of Mg/Si decreased slightly with increasing pH (0.98, 0.92 and 0.92 respectively at pH 2.5, 3.5 and 4 at 6 days). But they are similar to the bulk initial ratio of the phlogopite (0.97); These values of Mg/Si are in good agreement with those obtained by KALINOWSKI et al. (1994) during the phlogopite dissolution by HNO_3 .

All other experiments (bio- and chemical leaching) had Mg/Si values below the bulk initial ratio of the phlogopite except for experiments performed with chelating bacterial strains RA1 (Mg/Si about 1.5). In presence of RA1 (experiments R2 and R3), Mg was preferentially released in comparison to Si. This indicates a greater dissolution of octahedron compared with tetrahedron. ACKER and BRICKER (1992) demonstrated that at pH superior to 3 (case of our experiments R1 to R4 with a pH close to 4.5), biotite octahedrons were preferentially destructed. Moreover, BARMAN et al., (1992) highlighted that biotite weathering in presence of strong chelating agent such as citric and oxalic acids preferentially released Mg into solution than Si; This was the case of our experiment R1, where low amounts of oxalic and citric acids were quantified (about 7 and 3 ppm respectively for oxalic and citric acid).

In the study of BARMAN et al. (1992), results of chemical leaching in presence of citric acid suggest a preferential release of Mg compare to Si due to the high solubility of Mg and that the localization of Mg in octaedron easily accessible to the solution. At pH 1, the authors demonstrated a preferential elemental released occurring in the following order: $Mg > Fe > Al > Si$.

In our study, during chemical leaching in presence of citric acid (experiments C1 to C6), Mg/Si ratios (0.95) were slightly below to the Mg/Si ratio of the phlogopite (0.97), indicating that in contrast to the obsevation of BARMAN et al., 1992, Si was preferentially released. At pH 3.5, the preferential elemental released occurring was $Fe > Al > Mg = Si$ with F_{Fe} 2.02; F_{Al} 1.82; F_{Mg} 0.53 and F_{Si} 0.56 ‰; The difference between our results and those of BARMAN et al., 1992 can be explain (i) by the fact that at this pH 3.5, only two carboxylic groups of citric acid were dissociated ($pK_a = 3.13; 4.76; 6.4$), and it is known that citrate have strong affinity for iron to the detriment of magnesium in comparison to experiments of BARMAN et al. 1992, where citric acid had all these carboxylic groups dissociated; (ii) by a high concentration of citric acid (1 mM) used in our chemical experiments and those of BARMAN et al., 1992 that didn't reflect the concentration in bioleaching experiments in presence of RA1 (about 3 ppm or 0.02 mM). High concentrations of organic acids can enhance surface complexation processes decreasing the number of surface reactive sites and consequently leading to a saturation of rates (GOLUBEV et al., 2006). These observations were confirmed by experiments C5 and C6 performed with high concentration of citric acid (10 to 100 mM) leading to Mg/Si ratios in solution significantly lower (about 0.7) than experiment C2 (0.95) but with a similar r_{Mg} value of $8.10^{-11} \text{ mol.m}^{-2}.\text{m}^{-1}$.

For experiments bacterial strain PS2 (B2) and with gluconic acid (G4), Mg/Si ratios were very close to the bulk ratio of phlogopite (0.97) as in experiment with HNO_3 (H4). This observation is in accordance with the results on Mg and Si released rate indicating that a pH control on Mg and Si leaching from phlogopite.

4.4 Magnesium isotopic fractionation with and without bacteria

The Mg isotope compositions of solutions during or at the end of bio- and chemical leaching experiments were always closed to to initial phlogopite particles ($-1.22 \text{ ‰} \pm 0.20$). However, two tendencies can be distinguished (Figure 6) in function of the fraction of dissolved Mg from phlogopite (‰).

First, the phlogopite weathering with HNO_3 (experiment H1) or acidifying bacterial strain Ps2 (experiments B1 and B2) released heavier Mg into solution leading to a $\delta^{26}Mg$

higher than phlogopite from -0.8 to -1.22. Second, Mg released during dissolution with citric acid was lighter than phlogopite by as much as 0.2 ‰.

For experiments performed with bacteria (RA1 et PS2), the $\delta^{26}\text{Mg}$ of Mg released tended to be lighter at day 6 than 9 suggesting a possible Rayleigh fractionation from phlogopite. Rayleigh fractionation is considered as the process that fractionates Mg isotopes in the most effective way. A series of curves were calculated to fit our data by a Rayleigh fractionation equation (Figure 5b) : $\delta^{26}\text{Mg}_{\text{sample}} = \delta^{26}\text{Mg}_{\text{phlogopite}} + 1000 (\alpha - 1) * \ln f$ (eq. 3), where f is the fraction of Mg released from phlogopite, α is the Mg isotopic fractionation factor between leached Mg and phlogopite. The lines represent Rayleigh distillation model that uses the more appropriated empirical α values comprised between 1.00002 and 0.9998; To fit the measured differences between leached solution and phlogopite, varying from 0.05 to -0.2 ‰. The best fractionation factor was $\alpha = 1.00002$. This value is very low indicating a negligible fractionation during bioleaching experiments. However, when the fraction of Mg leached is more important ($f > 1$ ‰ for H1 and B2), the fractionation factor required to fit the data is significantly greater ($\alpha = 0.9998$). These results suggest a greater Mg isotopic fractionation where more Mg is leached from phlogopite.

According to a very low fractionation factor with Rayleigh distillation equation, the data can be fitted by an equilibrium fractionation equation (Figure 5c) in a closed system: $\delta^{26}\text{Mg}_{\text{initial phlogopite}} = (\delta^{26}\text{Mg}_{\text{sample}} - \delta^{26}\text{Mg}_{\text{final phlogopite}}) \cdot x + \delta^{26}\text{Mg}_{\text{final phlogopite}}$ (eq. 4) where x corresponds to the element leached fraction. The value of $\delta^{26}\text{Mg}_{\text{final phlogopite}}$ that best fitted the data were comprised between -1.23 and -1.19 ‰ closed to the $\delta^{26}\text{Mg}_{\text{initial phlogopite}}$ (-1.22 ‰) indicating a very low fractionation between leached Mg and phlogopite ($\Delta = \delta^{26}\text{Mg}_{\text{final-phlogopite}} - \delta^{26}\text{Mg}_{\text{initial-phlogopite}}$ ranged from 0.01 to -0.03 ‰). To fit the data obtained in presence of HNO_3 , citric acid and PS2 (experiments H1, C1 et B2), it was necessary to reach a $\delta^{26}\text{Mg}_{\text{final-phlogopite}}$ value of 0.5 ‰ at the end of experiments. The $\Delta (\delta^{26}\text{Mg}_{\text{final phlogopite}} - \delta^{26}\text{Mg}_{\text{initial phlogopite}})$ was 1.72 ‰. This value is in the same range of those found in the nature, thus the equilibrium fractionation can explained this variation.

Whatever the model used to fit our data and whatever experiments (bio- or chemical leaching), the Mg isotopic fractionation factor was very low indicating no or a very negligible fractionation during the first event of bioleaching of phlogopite. Several mechanisms could explain this low isotopic fractionation in the experiments: (1) the Mg leached fraction is weak during weathering of phlogopite, (2) the incorporation of Mg into bacterial cells, but the biomass obtained in our experiments was so weak and could not be explained our results.

In nature, the system is not closed but has an infinite reservoir and solutions replenished continuously. This could be permit a Mg released more important with several leaching events and perhaps a fractionation factor more significant. Moreover, if our results are representative, mineral leaching by bacteria would not explain the Mg isotopes signatures measured in river waters isotopically lighter compared to rock and soils (TIPPER et al., 2006a; TIPPER et al., 2006b; BRENOT et al., 2008; TIPPER et al., 2008).

Whatever the experiments (bio- or chemical leaching), the $\delta^{26}\text{Mg}$ generally increases with decreasing pH (Figure 7 a), with a correlation of 0.62. More pH is acid; more Mg released into solution is enriched in the heavy isotope.

In neutral to basic domains, POGGE VON STRANDMANN et al., (2008) suggested a pH dependency between the Mg isotopic composition of direct-runoff rivers and the formation and stability of secondary phases. Direct-runoff rivers with a high pH (about 10) have a $\delta^{26}\text{Mg}$ higher than the draining basalt. Direct-runoff rivers with a lower pH (about 8), more concentrated in Mg leached from the basalt have low $\delta^{26}\text{Mg}$ relative to this bedrock. In other word, on basalt, more pH is basic; more $\delta^{26}\text{Mg}$ relative were enriched in heavier isotopes relative to this bedrock (Figure 7b). In the study of POGGE VON STRANDMANN et al., (2008), the Mg isotopic composition in natural water would be controlled by pH of solutions that drained rock and soils. Moreover, the $\delta^{26}\text{Mg}$ could be correlated to the mineral dissolution rates that increase with decreasing pH.

In our study, inversely to the study of POGGE VON STRANDMANN et al., (2008), the $\delta^{26}\text{Mg}$ of Mg released into solution of all experiments generally increased with increasing mineral dissolution rate except for experiments performed with citric acid (C3 and C4) and experiment with chelating bacterial strain RA1 (R4), where Mg released into solution is enriched in the light isotope (Figure 7 b). This could be explained by the affinity of stronger chelates to lighter isotopes. This hypothesis is coherent with conclusions of BRANTLEY et al., (2001) on a study of iron isotope fractionation, where $\delta^{57}\text{Fe}$ decreased with increasing release rate of iron. Recently, BOLOU-BI et al., (accepted) have highlighted that during phlogopite weathering by plants, the Mg leached into solution was enriched in light isotopes and inversely the bulk plants were enriched in the heavy isotopes. They explained this Mg isotopic composition of the leached solution as the results of the heavy Mg incorporation in plants and adsorption on roots. In addition, the action of plant through the organic acids secretion (such as citric acid) is not negligible on the phlogopite weathering (HINSINGER et al., 1992). Both absorption and secretion by plants processes, together with the possible influence

of chelating bacteria on isotopic signature of Mg leached from phlogopite highlighted in this study, would explain the systematic light isotopic signature of waters compared to rock and soils.

Our results need to be completed (1) with experiment times occurred on a long-life to have several events bioleaching, (2) with the characterization of secondary phases formed in the course of experiments with several spectroscopic techniques such as X ray diffraction and (3) taking account the influence of plants versus bacteria on silicate weathering.

4. CONCLUSIONS

This study demonstrates that pH lowering and metabolites by produced during heterotrophic bacterial activities could greatly accelerate Mg and Si release from phlogopite. Comparing bioleaching and chemical leaching experiments at similar pH, the fraction of elements released into solution was greater in presence of bacteria or citric acid when compared with nitric and gluconic acids experiments. Bacterial metabolism differs for one strain to another and induces substantial changes in solution pH; these changes had important consequences on the rate of elemental release from phlogopite compared to abiotic conditions. In our experiments, aerobic bacterial strains were more efficient to leach Mg during phlogopite weathering than facultative anaerobe bacteria.

In most experiments, no or very small Mg isotopic fractionation linked to the phlogopite leaching was highlighted. However, two tendencies could be distinguished especially with the highest leached Mg fractions obtained: (1) for experiments performed with HNO_3 and acidifying bacteria PS2, the Mg leached into solution was enriched in heavy isotope compared to phlogopite; (2) For experiments performed with citric acid, the Mg leached into solution was enriched in light isotope compared to phlogopite. However, whatever the model used to fit the majority of the data, the Mg isotopic fractionation factor was very low indicating no or a negligible fractionation during our experiments corresponding to the first event of bioleaching of phlogopite (closed system). Moreover, where high phlogopite dissolution rate is correlated with low pH, the Mg isotopic composition of leached solution is enriched in heavy isotopes. In experiments performed with chelating bacteria and citric acid, the high phlogopite dissolution rate was enriched in light isotopes especially at weak acid pH (4-6).

5. ACKNOWLEDGEMENTS

6. REFERENCES CITED

- Acker, J.G. and Bricker, O.P., 1992. The influence of pH on biotite dissolution and alteration kinetics at low temperature. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 56(8): 3073-3092.
- Anbar, A.D., 2003. Iron stable isotopes : beyond biosignatures. *Earth and Planetary Science Letters* 217, p223-236.
- Babu-Khan, S. et al., 1995. Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3): 972-978.
- Barker, W., Welch, S., Chu, S. and Banfield, J., 1998. Experimental observations of the effects of bacteria on aluminosilicate weathering. *American Mineralogist* 83, p 1551-1563
- Barman A. K., Varadachari C., and Ghosh K. (1992) Weathering of silicate minerals by organic acids. I. Nature of cation solubilisation. *Geoderma* **53**(1-2), 45-63.
- Beard, B., Johnson, C., Cox L., Sun, H., Nealson, K., and Aguilar C., 1999. Iron isotope biosignatures. *Science* 285, p1889-1892.
- Beard, B., Johnson, C., Nealson, K., Skulan, J., Cox L., and Sun H., 2002. Application of Fe isotopes to tracing the geochemical and biological cycling of Fe. *Chemical Geology* 195, p87-117
- Bennett, P.C., Hiebert, F.K. and Joo Choi, W., 1996. Microbial colonization and weathering of silicates in a petroleum-contaminated groundwater. *Chemical Geology*, 132(1-4): 45-53.
- Bennett, P.C., Rogers, J.R. and Choi, W.J., 2001. Silicates, Silicate Weathering, and Microbial Ecology. *Geomicrobiology Journal*, 18: 3-19.
- Black J. R., Epstein E., Rains W. D., Yin Q. Z., and Casey W. H. (2008) Magnesium-isotope fractionation during plant growth. *Environmental science and technology* **42**(21), 7831-7836.
- Black J. R., Yin Q.-z., and Casey W. H. (2006) An experimental study of magnesium-isotope fractionation in chlorophyll-a photosynthesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **70**(16), 4072-4079.
- Black J. R., Epstein E., Rains W. D., Yin Q. Z., and Casey W. H. (2008) Magnesium-isotope fractionation during plant growth. *Environmental science and technology* **42**(21), 7831-7836.

- Bolou Bi E. B., Poszwa A., and Vigier N. (2008) Experimental determination of magnesium isotope fractionation during higher plant growth. *Geophysical Research Abstracts* **10**(EGU2008-A-08852).
- Bolou-Bi, E.B., Vigier, N., Brenot, A. and Poszwa, A., 2009. Magnesium Isotope Compositions of Natural Reference Materials. *Geostandards and Geoanalytical Research*, 33(1): 95-109.
- Boyle J. R. and Voigt G. K. (1973) Biological weathering of silicate minerals. *Plant and Soil* **38**(1), 191-201.
- Brantley, S., Liermann L., and Bullen T., 2001. Fractionation of Fe isotopes by soil microbes and organic acids. *Geology* 29, p535-538
- Brantley, S., Liermann L., Guynn R., Anbar A., Icopini G., and Barling J., 2004. Fe isotopic fractionation during mineral dissolution with and without bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68, p3189-3204.
- Brenot, A., Cloquet, C., Vigier, N., Carignan, J. and France-Lanord, C., 2008. Magnesium isotope systematics of the lithologically varied Moselle river basin, France. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(20): 5070-5089.
- Carignan, J. et al., 2004. Reflection on Mg, Cd, Ca, Li and Si Isotopic Measurements and Related Reference Materials *Geoanalytical Research*, 28: 139-148.
- Chang, V.T.C., Williams, R.J.P., Makishima, A., Belshaw, N.S. and O'Nions, R.K., 2004. Mg and Ca isotope fractionation during CaCO₃ biomineralisation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 323(1): 79-85.
- Galy, A., Bar-Matthews, M., Halicz, L. and O'Nions, R.K., 2002. Mg isotopic composition of carbonate: insight from speleothem formation. *Earth and Planetary Science Letters*, 201(1): 105-115.
- Galy, A., Belshaw, N.S., Halicz, L. and O'Nions, R.K., 2001. High-precision measurement of magnesium isotopes by multiple-collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 208(1-3): 89-98.
- Galy, A. et al., 2003. Magnesium isotope heterogeneity of the isotopic standard SRM 980 and new reference materials for magnesium isotope ratio measurements. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18, p 1352-1356.
- Ganor, J., Mogollón, J.L. and Lasaga, A.C., 1995. The effect of pH on kaolinite dissolution rates and on activation energy. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59(6): 1037-1052.

- Golubev, S.V., Bauer, A. and Pokrovsky, O.S., 2006. Effect of pH and organic ligands on the kinetics of smectite dissolution at 25°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(17): 4436-4451.
- Gottschalk, G., 1986. Bacterial metabolism. Springer-Verlag New York.
- Hinsinger P., Jaillard B., and Dufey J. E. (1992) Rapid weathering of a trioctahedral mica by the roots of ryegrass. *Soil Science Society of America Journal* 56(3), 977-982.
- Hutchens, E., Valsami-Jones, E., McEldowney, S., Gaze, W. and McLean, J., 2003. The role of heterotrophic bacteria in feldspar dissolution - an experimental approach. *Mineralogical Magazine*, 67(6): 1157-1170.
- Leyval, C., Laheurte, F., Belgy, g. and berthelin, J., 1990. Weathering of micas in the rhizosphere of maize, pine and beech seedlings influenced by myccorhizal and bacterial inoculation. *Symbiosis*, 9: 105-109.
- Malmström, M. and Banwart, S., 1997. Biotite dissolution at 25°C: The pH dependence of dissolution rate and stoichiometry. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61(14): 2779-2799.
- Malmström, M., Banwart, S., Lewenhagen, J., Duro, L. and Bruno, J., 1996. The dissolution of biotite and chlorite at 25°C in the near-neutral pH region. *Journal of Contaminant Hydrology*, 21(1-4): 201-213.
- Mathur, R. et al., 2005. Cu isotopic fractionation in the supergene environment with and without bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol 69, p 5233-5246.
- Murakami, T., Utsunomya, S., Yokoyama, T. and Kasama, T., 2003. Biotite dissolution processes and mechanisms in the laboratory and in nature: Early stage weathering environment and vermiculization. *American mineralogist* 88: 377-386.
- Ra, K. and Kitagawa, H., 2007. Magnesium isotope analysis of different chlorophyll forms in marine phytoplankton using multi-collector ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 22: 817-821.
- Robert, M. and Berthelin, J., 1986. Role of biological and Biochemical factors in soil mineral weathering. *Soil science society of america*, 12: 453-495.
- Rogers, J.R. and Bennett, nutrients from silicates. *Chemical Geology*, 203(1-2): 91-108.
- Tipper, E.T., Galy, A. and Bickle, M.J., 2006. Riverine evidence for a fractionated reservoir of Ca and Mg on the continents: Implications for the oceanic Ca cycle. *Earth and Planetary Science Letters*, 247(3-4): 267-279.

- Tipper, E.T., Galy, A. and Bickle, M.J., 2008. Calcium and magnesium isotope systematics in rivers draining the Himalaya-Tibetan-Plateau region: Lithological or fractionation control? *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(4): 1057-1075.
- Vandevivere, P., Welch, S.A., Ullman, W.J. and Kirchman, D.L., 1994. Enhanced dissolution of silicate minerals by bacteria at near-neutral pH. *Microbial Ecology*, 27(3): 241-251.
- Welch, S.A. and Ullman, W.J., 1999. The effect of microbial glucose metabolism on bytownite feldspar dissolution rates between 5° and 35°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63(19-20): 3247-3259.
- Wieland, E. and Stumm, W., 1992. Dissolution kinetics of kaolinite in acidic aqueous solutions at 25°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 56(9): 3339-3355.
- Wollast, R., 1967. Kinetics of the alteration of K-feldspar in buffered solutions at low temperature. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 31(4): 635-648.
- Wombacher, F., Eisenhauer A., Heuser A. and Weyer S., 2006. Magnesium stable isotope compositions in biogenic CaCO₃. *Geophysical Research abstracts*, 8, A06353.
- Wu, L., Jacobson, A.D. and Hausner, M., 2008. Characterization of elemental release during microbe-granite interactions at T=28°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(4): 1076-1095.

Table captions

Table 1. Analysis and operating conditions description of bio- and chemical leaching experiments.

Table 2. General characteristics of bioreactors solutions.

* “ppm”; ⁺ Ratios between Mg and Si leached into solution and Mg and Si contained in phlogopite, exprimed in permil; "-" below detection

\$ MC-ICP-MS data were obtained using the Nu instrument (ENS, Lyon, 2 σ external precision 0.15%). Reported values are the means of two or more replicate analysis of each sample

Table 3. General characteristics of reactors solutions in abiotic conditions.

* “ppm”; ⁺ Ratios between Mg and Si leached into solution and Mg and Si contained in phlogopite, exprimed in permil ; "-" below detection

\$ MC-ICP-MS data were obtained using the Nu instrument (ENS, Lyon, 2 σ external precision 0.15%). Except for data in italic, which were obtained, using the Isoprobe (CRPG, Nancy, 2s external precision 0.20 %). Reported values are the means of two or more replicate analysis of each sample. "#" Organic acid concentration of 0.001M; "##" Organic acid concentration of 0.01M; "###" Organic acid concentration of 0.1M

Figure captions

Figure 1. Optical densities at 600 nm (a), Glucose concentrations (b) and pH (C) versus time for biotic experiments reactors. Data for experiments AR1 and PA1 only appear in panel (c); data for RA1 exp d only appears in panels (b) and (c).

Figure 2. Organic acids concentrations versus time for R1 experiments performed with RA1 and B1 experiments performed with Ps2.

Figure 3. Fraction of Mg leached into solution from phlogopite versus time for bio- and chemical leaching experiments.

Figure 4. Mg and Si release rates versus pH for all experimental reactors.

Figure 5. Mg/Si ratio in the course of time for all experimental reactors.

Figure 6. $\delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}}$ versus the fraction of dissolved Mg from phlogopite for (A) all experimental reactors indicated in table 2 and table 3, (B) Rayleigh distillation model to fit data calculated from equation 3 and (C) equilibrium fractionation equation calculated from equation 4.

Figure 7. (a) $\delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}}$ and phlogopite dissolution rates versus pH for all experimental reactors, (b) Comparison of $\Delta \delta^{26}\text{Mg}_{\text{Mg leached in solution}} - \delta^{26}\text{Mg}_{\text{initial-rocks*}}$ and Mg leached in solution versus pH for our data and data of Pogge von Strandmann et al., (2008).

* rocks = phlogopite for our data and basalt for those of Pogge von Strandmann et al., (2008).

Table 1.

Weathering agents	Experiments names	Sampling time (days)	Analysis					
			pH	OD600nm	Mg, Si l concentrations	Glucose remaining	Organic acids	$\delta^{26}\text{Mg}$ / DSM3
RA1	R1	1,2,3,4,5,6	x	x	x	x	x	
RA1	R2	1,2,3,6,9,13	x	x	x			x
RA1	R3	2,3,5,6,7,8,9,10,12	x	x	x	x		
RA1	R4	1,3,4,5,6	x	x	x	x		
PA1	P1	9,12	x	x	x			
AR1	A1	9,12	x	x	x			
PS2	B1	2,4,6	x	x	x	x	x	x
PS2	B2	2,4,6,9,12	x	x	x	x	x	x
HNO ₃	H1	1,2,3,4,5,6	x		x			x
HNO ₃	H2	1,2,3,4,5,6	x		x			
HNO ₃	H3	6,9	x		x			
HNO ₃	H4	3,6,9,12	x		x			
Gluconic acid ^{##}	G1	2,3,6	x		x			
Gluconic acid ^{##}	G2	2,3,6	x		x			
Gluconic acid ^{##}	G3	2,3,6,9	x		x			x
Gluconic acid [#]	G4	1,2,3,4,5,6	x		x			x
Citric acid [#]	C1	10,13	x		x			x
Citric acid [#]	C2	6	x		x			
Citric acid [#]	C3	1,2,3,5,6	x		x			x
Citric acid [#]	C4	1,2,3,5,6	x		x			x
Citric acid ^{##}	C5	1,2,3,5,6	x		x			
Citric acid ^{###}	C6	1,2,3,5,6	x		x			

Table 2.

Bacterial strains	Experiments names	Times (day)	pH	DO _{600nm}	F _{Mg} ⁺	F _{Si} ⁺	glc *	Gluconate *	Lactate *	Acetate *	Butyrate *	Formate *	Succinate *	Oxalate *	Citrate *	$\delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}}$ [§]
RA1	R1	1	5.2	0.120			1100	-	15.0	38.3	-	1.3	4.7	3.4	3.1	
		2	5.2	0.125			900	-	62.0	77.1	-	2.5	23.5	7.2	-	
		3	6.7	0.140	0.19	0.23	250	-	54.2	152.4	-	16.8	6.2	4.9	-	
		4	6.7	0.210			200	-	41.0	36.8	-	11.0	5.3	4.7	-	
		5	6.5	0.200			150	-	43.1	2.9	-	9.8	4.3	5.1	-	
		6	6.7	0.210	0.29	0.30	100	-	37.1	0.0	-	8.3	4.2	5.4	-	
RA1	R2	2	5.0													
		3	5.1		0.30	0.19										-1.41 +/- 0.07
		6	4.8		0.38	0.29										
		9	4.7		0.49	0.31										-1.31 +/- 0.03
		13	4.6		0.59											
RA1	R3	2	4.6	0.118			1261									
		3	4.6	0.147	0.31		1231									
		5	4.8	0.127			1017									
		6	4.6	0.120	0.43	0.29	1020									
		9	4.6	0.127			970									
		10	4.4	0.118	0.57	0.40	900									
		13	4.5	0.117	0.60		800									
RA1	R4	3	4.2	0.076	0.15											
		4	4.2	0.081												
		5	4.2	0.091			1080									
		6	4.2	0.096	0.20	0.22	1070									
PA1	P1	9	4.7		0.51	0.35										
		12	3.9		0.74	0.57										-1.39 +/- 0.09
AR1	A1	9	4.5		0.53	0.39										
		12	4.5		0.56	0.44										-1.23 +/- 0.03
PS2	B1	2	3.5	0.050			940	1400.8	-	-	24	-	-	-	-	
		4	3.5	0.043	0.55	0.60	640	1635.3	-	-	44	-	-	-	-	
		6	3.5	0.055	0.80	1.01	420	1675.2	-	-	47	-	-	-	-	-1.09 +/- 0.03
PS2	B2	2	3.3	0.050			600	1607.8	-	-	21	-	-	-	-	
		4	3.5	0.054	0.53	0.58	450	2155.7	-	-	39	-	-	-	-	
		6	3.5	0.055	0.76	0.96	290	2360.1	-	-	31	-	-	-	-	
		9	3.5	0.050	0.97	1.21	280	2257.5	-	-	26	-	-	-	-	
		12	3.5	0.080	1.26		260	2486.4	-	-	54	-	-	-	-	-0.88 +/- 0.05

Table 3.

Weathering agent	Experiments names	Times (day)	pH	F _{Mg} ⁺	F _{Si} ⁺	Gluconate *	Citrate *	δ ²⁶ Mg _{DSM3} [§]
HNO ₃	H1	1	2.5	0.41	0.41			
		2	2.5	0.67	0.67			
		3	2.5	0.82	0.81			
		4	2.5	0.95	0.96			
		5	2.5	1.10	1.09			
		6	2.5	1.20	1.19			-0.82 +/- 0.02
HNO ₃	H2	1	4.0	0.05				
		2	4.2	0.14				
		3	4.0	0.18	0.19			
		4	4.0	0.19				
		5	4.0	0.20				
		6	4.0	0.21	0.22			
HNO ₃	H3	6	5.4					
		9	5.6	0.27				
HNO ₃	H4	3	3.5	0.32	0.35			
		6	3.6	0.51	0.56			
		9	3.5	0.57				
		12	3.5	0.63	0.67			
Gluconic acid ##	G1	2	3.4			1669		
		3	3.2	0.38	0.36	1669		
		6	3.5	0.45	0.42	1669		
Gluconic acid ##	G2	2	3.5			1669		
		3	3.4	0.32		1669		
		6	3.6	0.43		1669		
Gluconic acid ##	G3	2	3.4			1669		
		3	3.5	0.32	0.35	1669		
		6	3.4	0.49	0.52	1669		
		9	3.4	0.56	0.6	1669		-1.02 +/- 0.25
Gluconic acid #	G4	1	3.5			166.9		
		2	3.6			166.9		
		3	3.6	0.30	0.32	166.9		
		5	3.6			166.9		
		6	3.6	0.38	0.40	166.9		-1.22 +/- 0.05
Citric acid #	C1	10	5.7	0.9	0.94		163.9	
		13	6.2	0.9	0.98		163.9	-1.52 +/- 0.06
Citric acid #	C2	6	5.2	0.30			163.9	
Citric acid #	C3	1	4.6				163.9	
		2	4.6				163.9	
		3	4.6	0.25	0.24		163.9	
		5	4.6				163.9	
		6	5.7	0.30	0.31		163.9	-1.43 +/- 0.02
Citric acid #	C4	1	3.5				163.9	
		2	3.5				163.9	
		3	3.6	0.42	0.43		163.9	
		5	3.7				163.9	
		6	3.6	0.53	0.56		163.9	-1.42 +/- 0.07
Citric acid ##	C5	1	5.2				1639	
		2	5.3				1639	
		3	5.3	0.21	0.37		1639	
		5	5.2				1639	
		6	5.2	0.29	0.50		1639	
Citric acid ###	C6	1	5.3				16390	
		2	5.4				16390	
		3	5.3	0.23	0.39		16390	
		5	5.3				16390	
		6	5.3	0.3	0.51		16390	

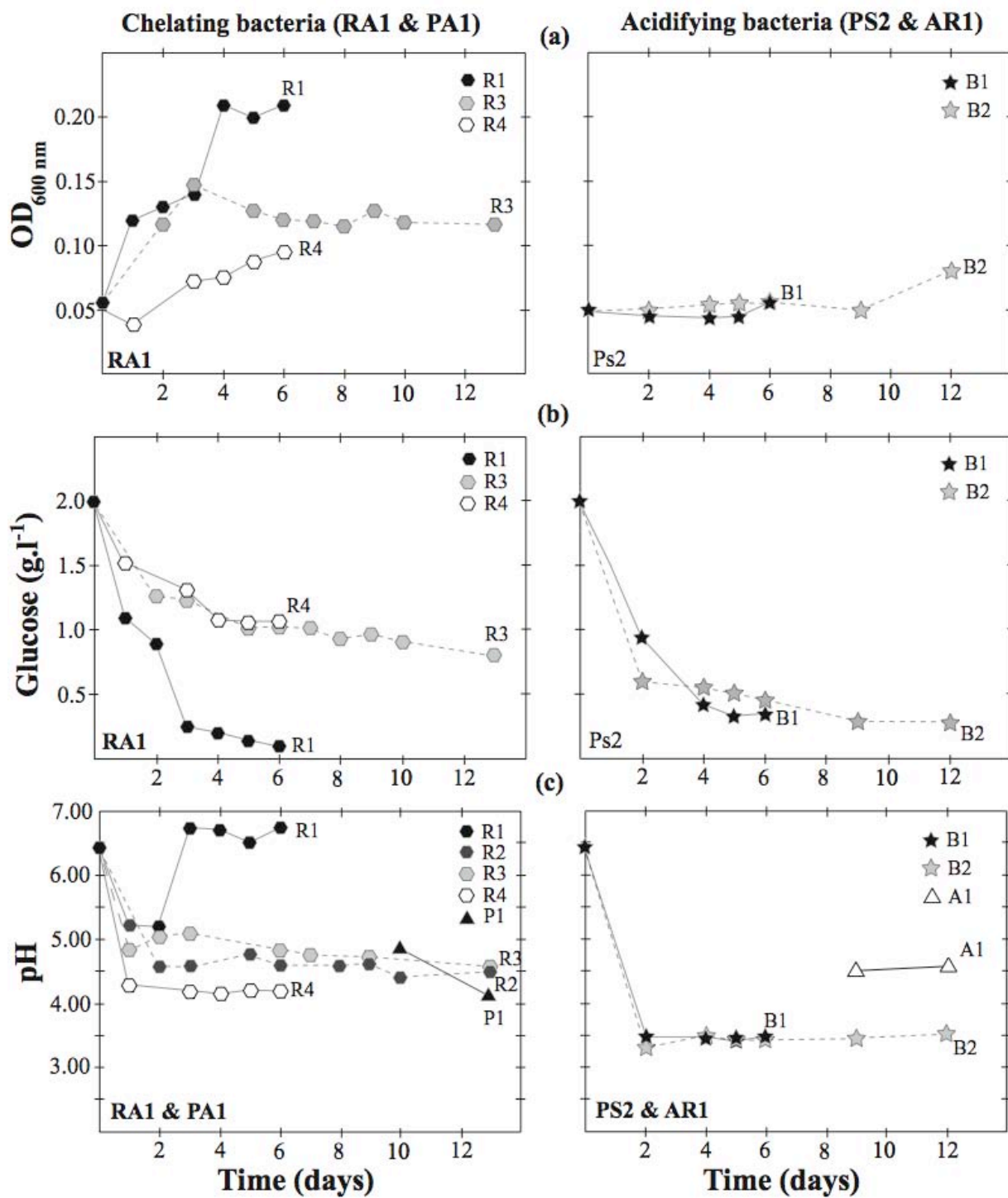


Figure 1.

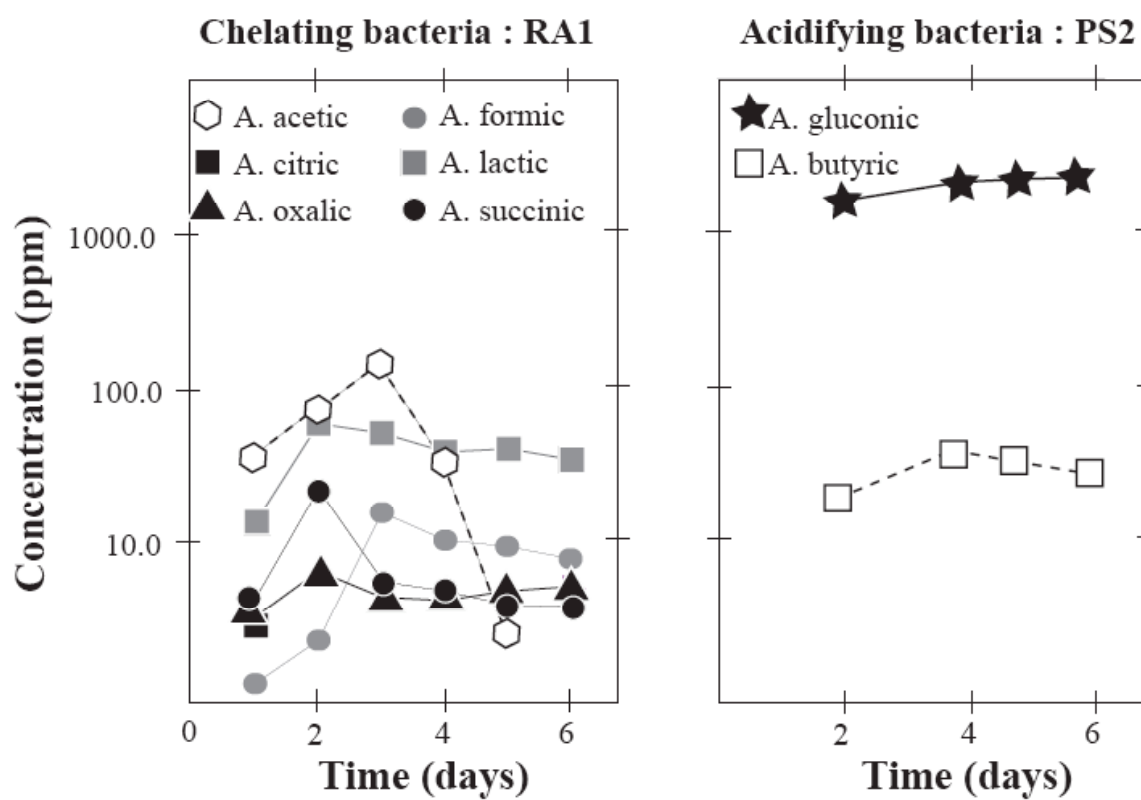


Figure 2.

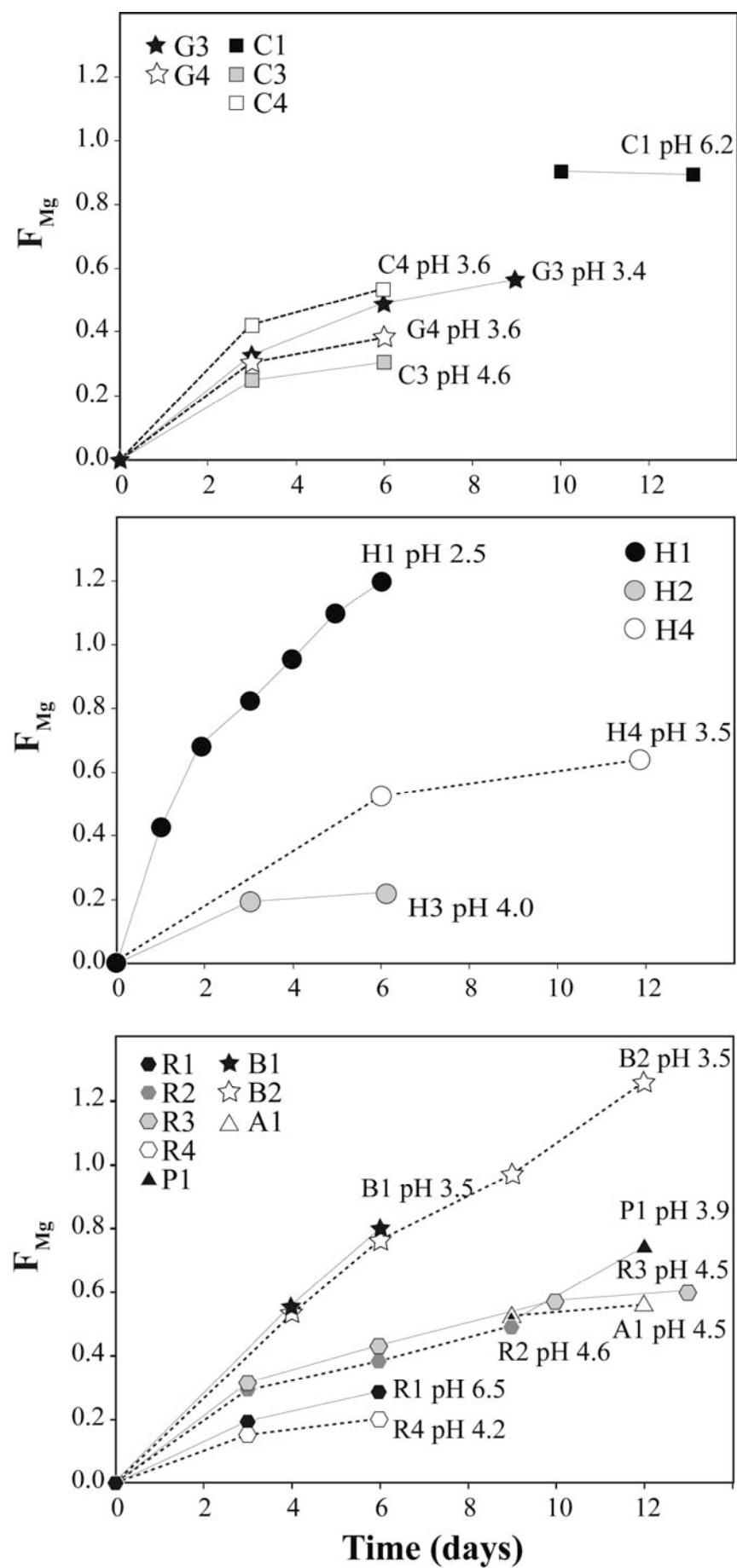


Figure 3.

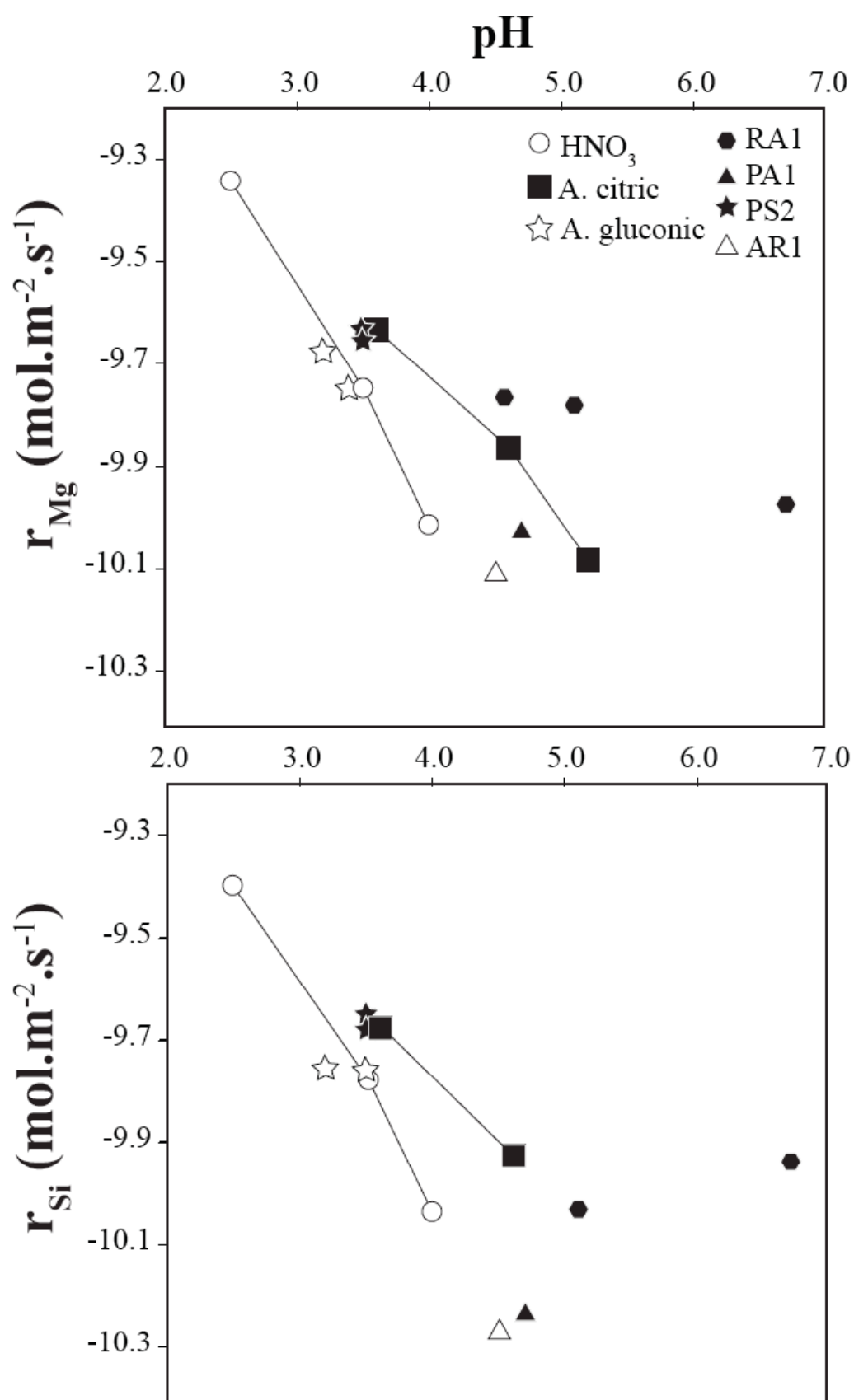


Figure 4.

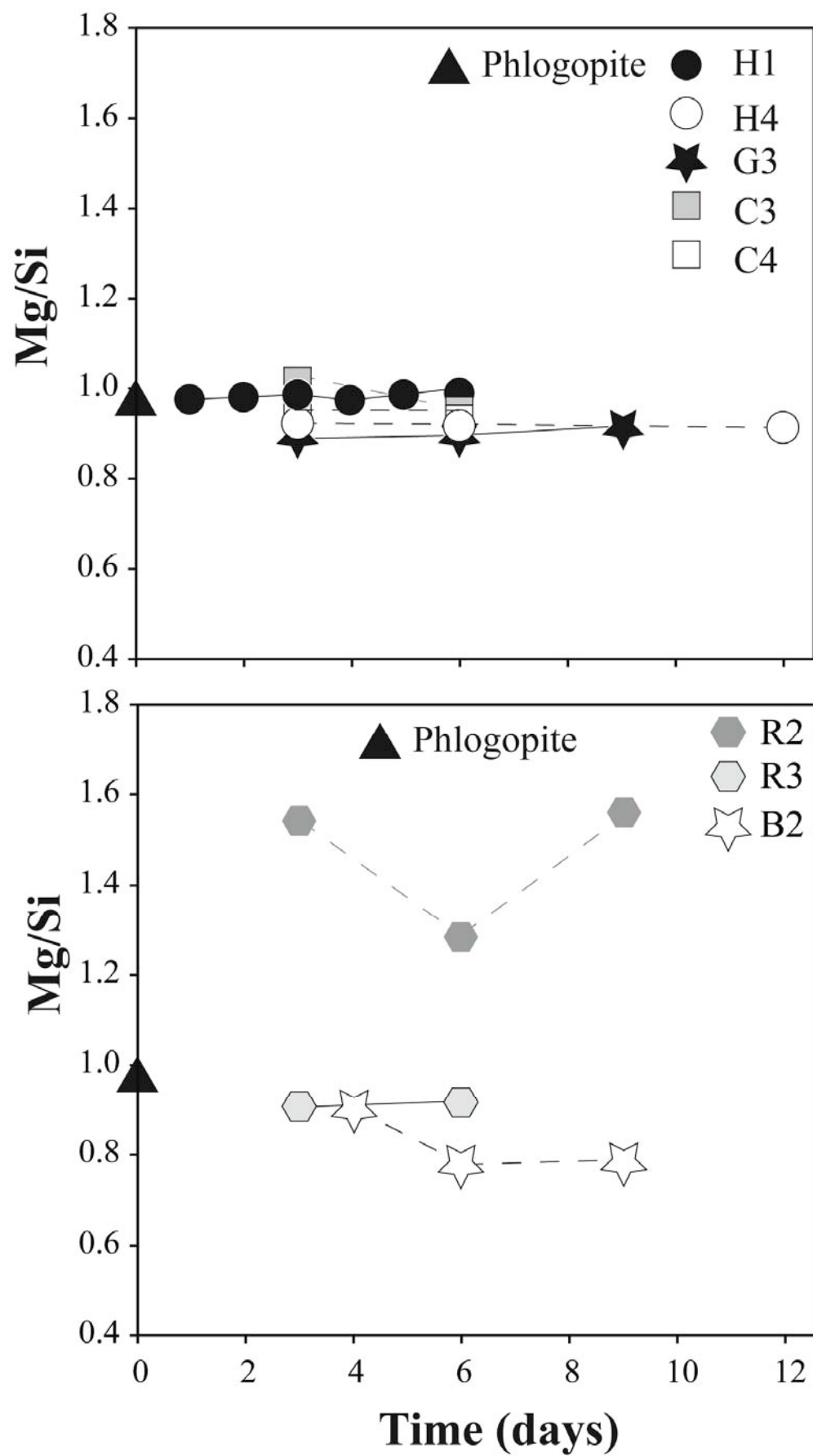


Figure 5.

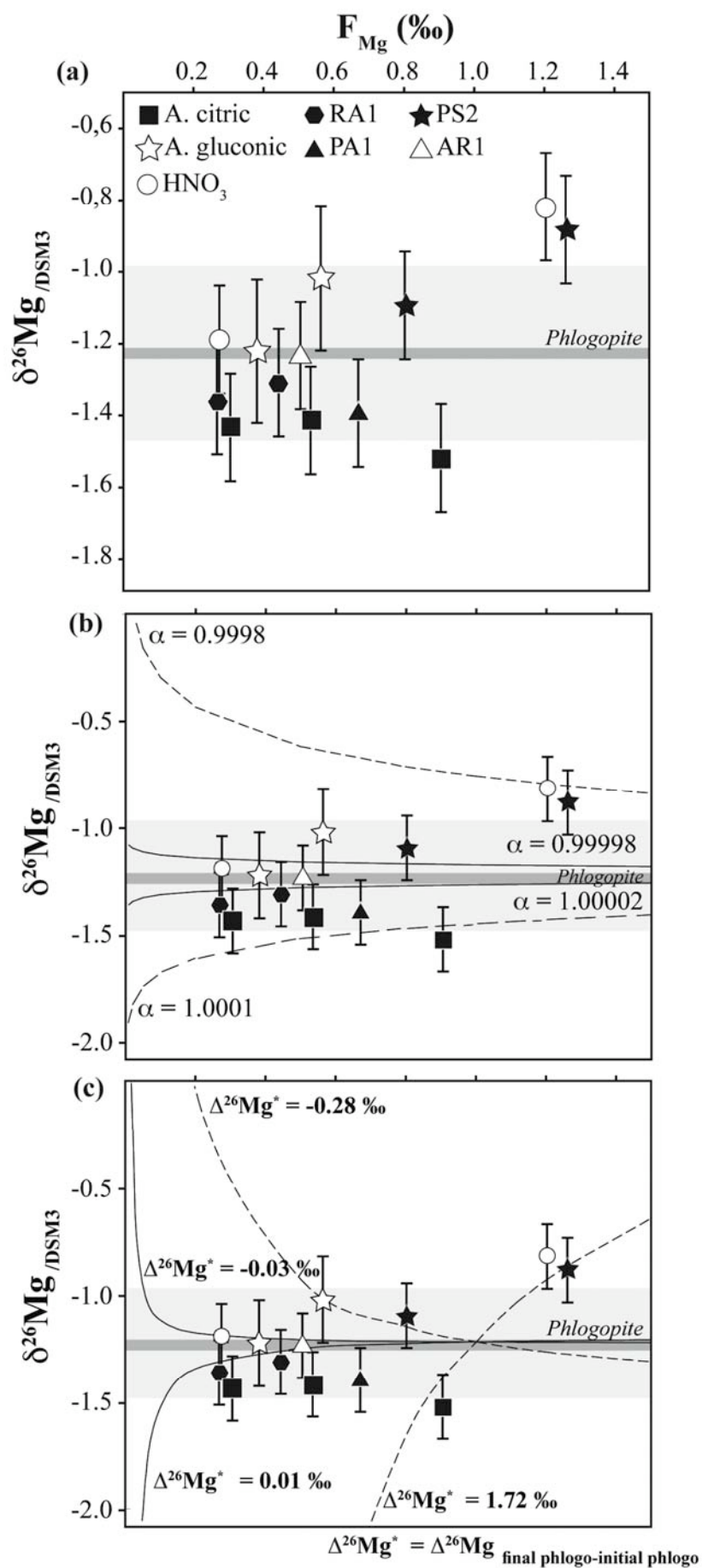


Figure 6.

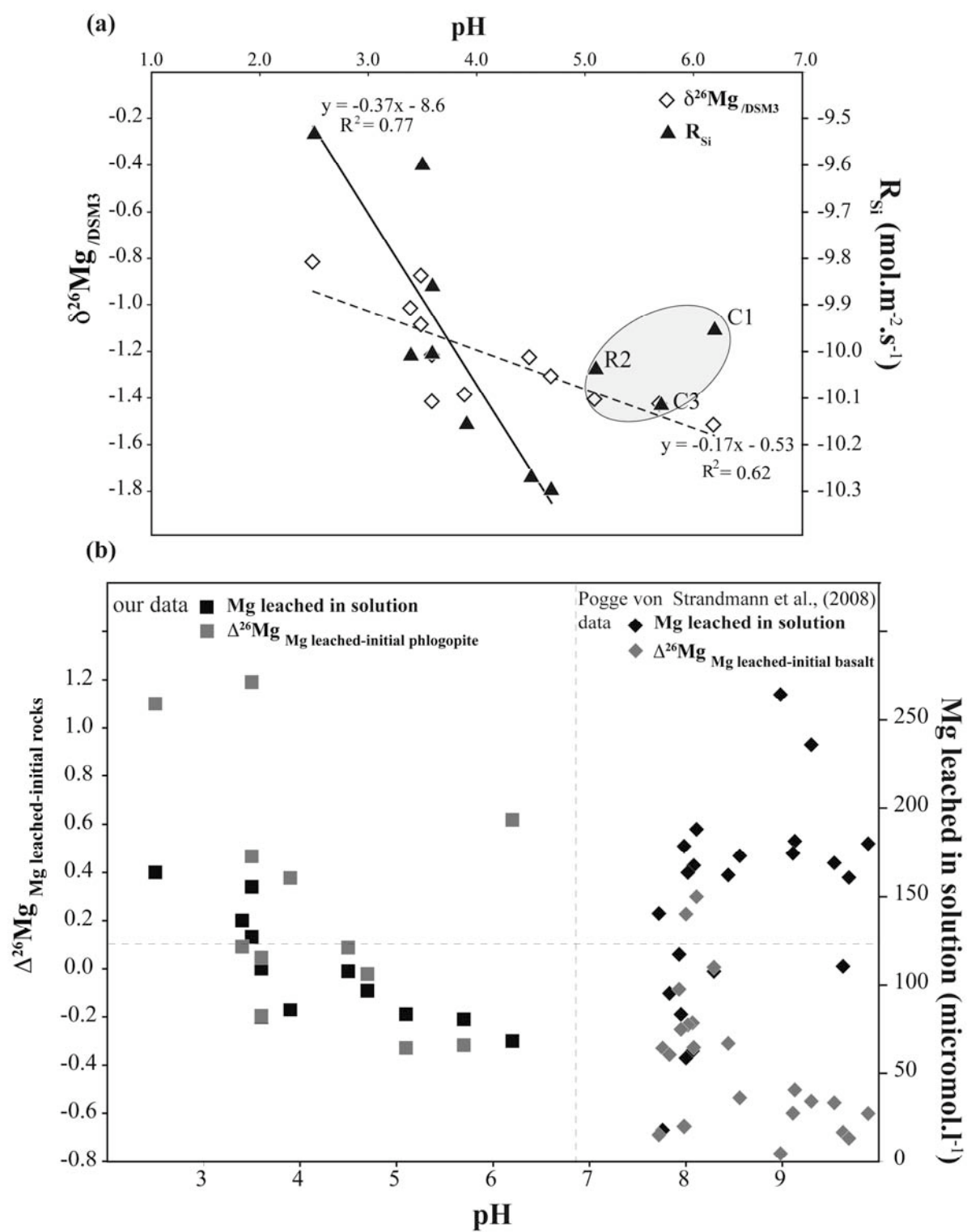


Figure 7

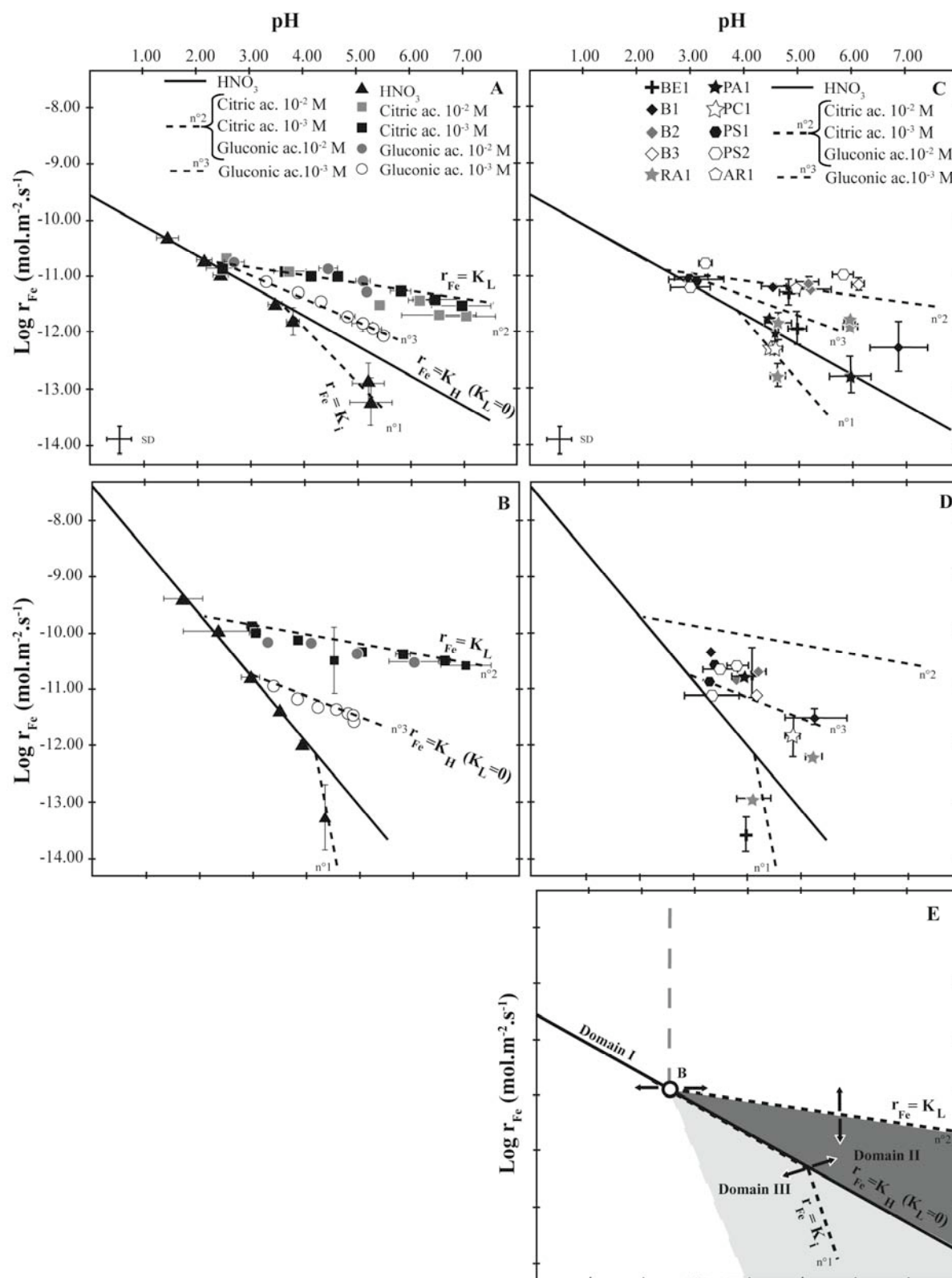


Figure 3.

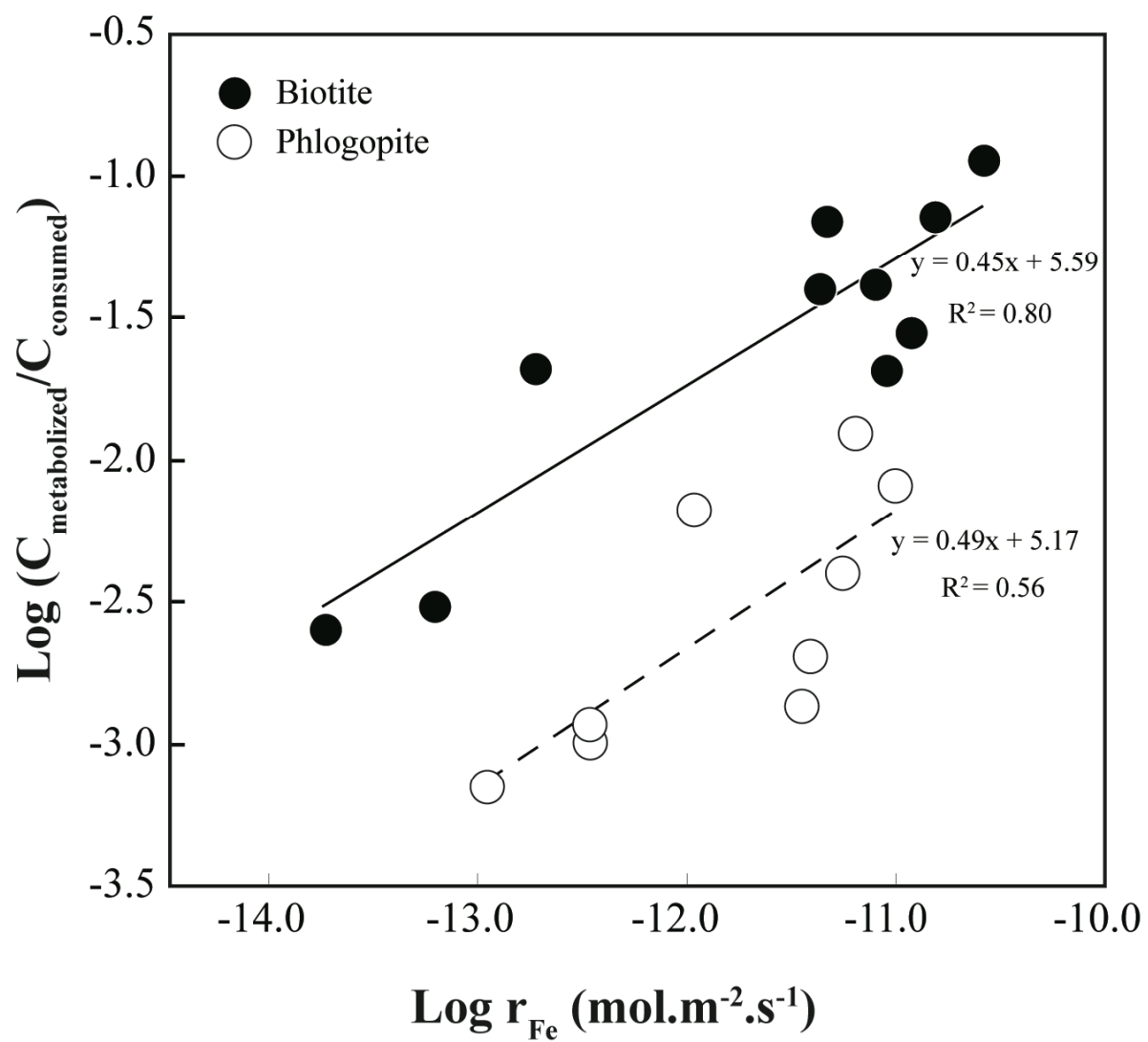


Figure 4.

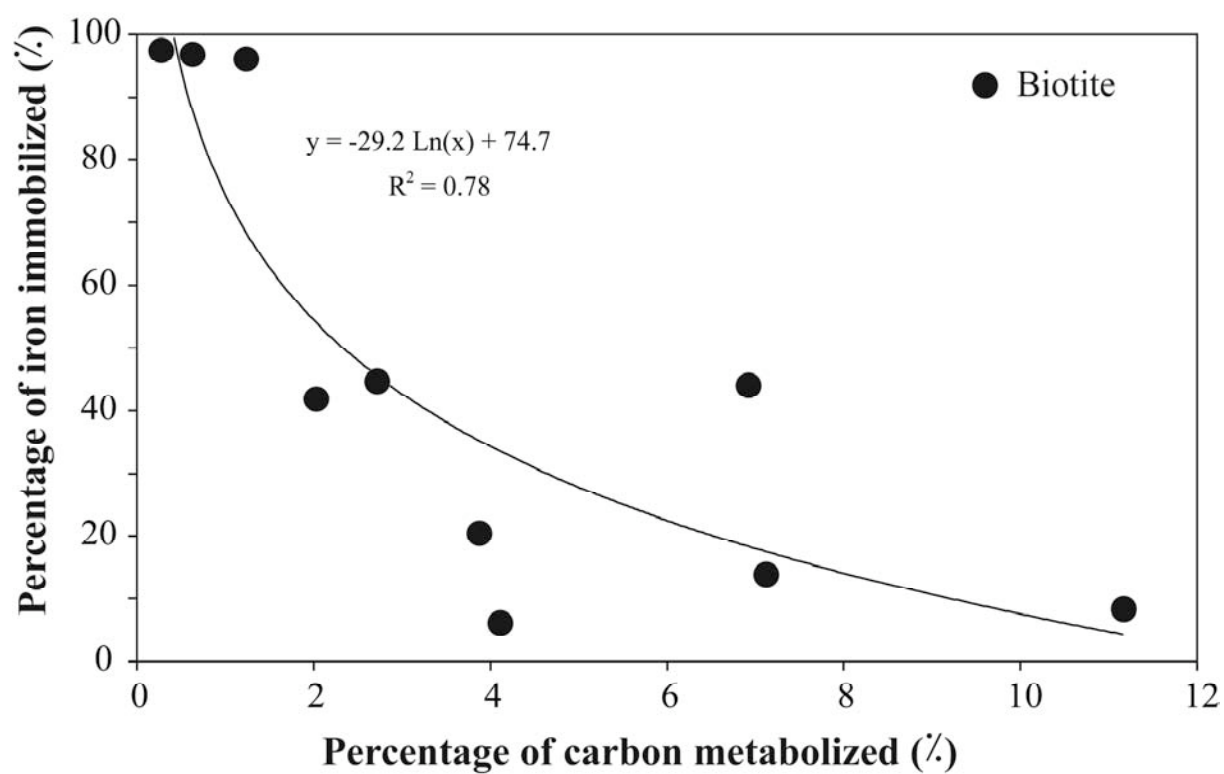


Figure 5.

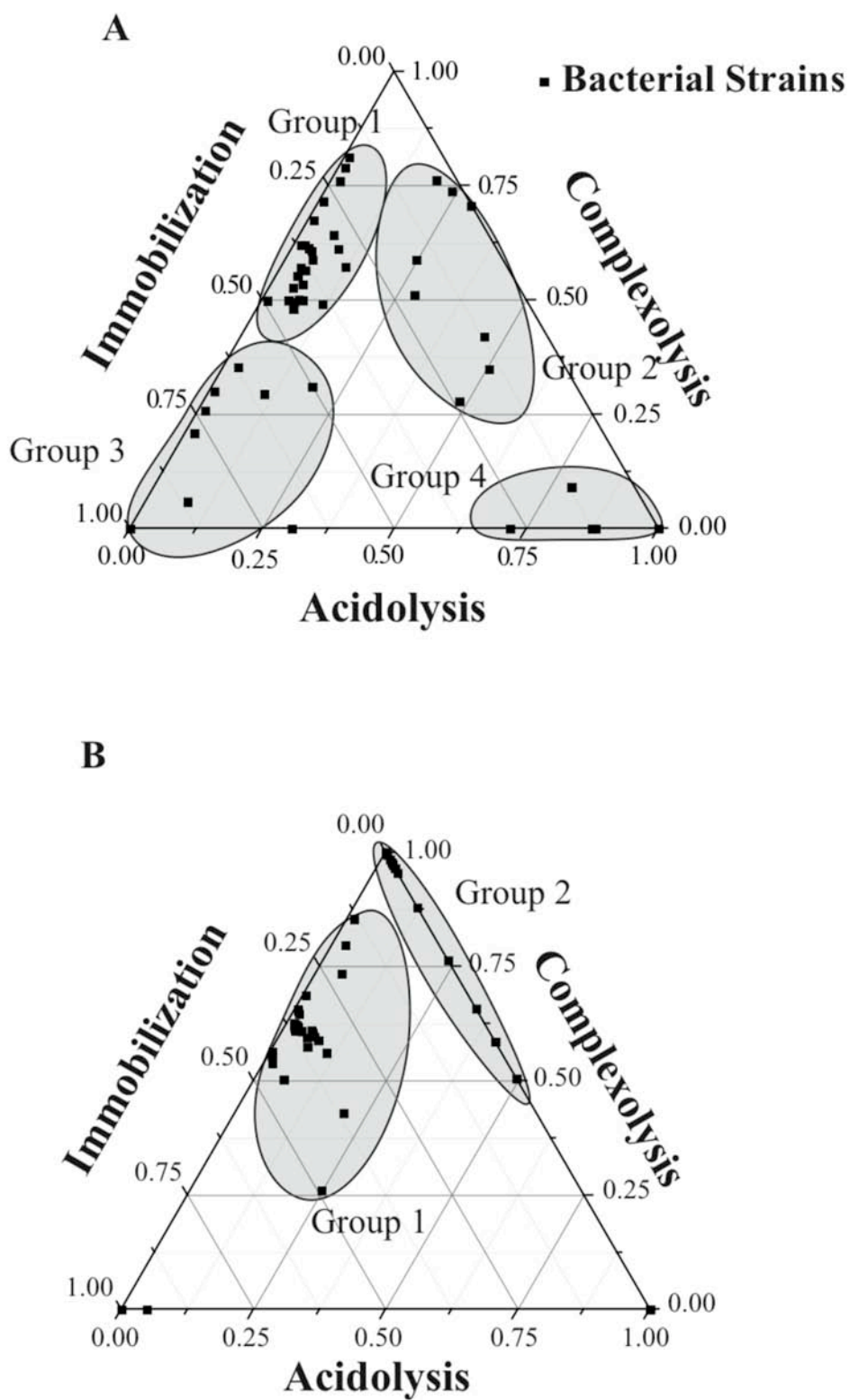


Figure 6.

ARTICLE 2

Characterization of elemental release and Mg isotopic signatures during bacteria-phlogopite interactions

Clarisse Balland¹, Anne Poszwa¹, Nathalie Vigier², Emile B. Bolou-Bi^{1,2} and Christian Mustin¹

¹ Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les Sols (LIMOS), Nancy-université-CNRS, P.O. Box 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

² Centre de Recherches Pétrologiques et Géochimiques (CRPG), 15 rue Notre Dame des Pauvres, 54501 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

ABSTRACT:

Phlogopite weathering experiments in aerobic conditions and in closed systems were carried out to study the potential fractionation processes linked to dissolution kinetics and processes (proton- and ligand-promoted dissolution) involved in the presence of four bacterial strains. Batch reactors were used at 24°C for 12 days with and without bacterial strains. Abiotic experiments were performed with organic and nitric acids in order to investigate and model the chemical processes linked to the weathering ability of the bacterial isolates. Citric and gluconic acids were used as a model of chelating agent, and nitric acid as a model of acidifying agent.

Results demonstrate that pH lowering and metabolites by produced during heterotrophic bacterial activities could greatly accelerate Mg and Si release from phlogopite. For a similar pH, the fraction of elements released in the solution was greater in presence of bacteria or citric acid when compared to nitric and gluconic acid experiments. Bacterial metabolism is different for one strain to another and induces substantial changes in solution pH; these changes had important consequences for the rate of elemental release from phlogopite compared to abiotic conditions. A very small Mg isotopic fractionation linked to phlogopite dissolution was highlighted in leached solution of all experiments. Two tendencies can be distinguished and appear more accentuated with higher leached Mg fractions. For experiments performed with HNO₃ and acidifying bacterial strain, the Mg leached into solution was

enriched in heavy isotope compared to phlogopite. For experiments performed with citric acid, the Mg leached into solution was enriched in light isotope compared to phlogopite. Moreover, the Mg isotopic composition of leached solution was correlated to the pH and the phlogopite dissolution rate with an enrichment in heavy isotope when pH is acid, except for experiments performed with chelating bacteria and citric acid where the Mg leached into solution from phlogopite was enriched in light isotopes.

Keywords: bacteria, phlogopite, organic acids, magnesium isotopic composition

1. INTRODUCTION

Mineral weathering is a key global process releasing mineral elements in soil profiles, controlling the composition of percolating waters and the formation of secondary mineral. In particular, weathering is a major source of magnesium in soils, plants and waters. At a more global scale, weathering processes influence the chemistry of rivers.

Ninety percent of minerals in the continental crust are silicate minerals. They represent the main reservoir of magnesium at the surface of Earth. Moreover, the weathering of silicate minerals plays an important role in the cycle of carbon, as released elements are involved in the storage of CO₂ through the formation of carbonates.

Two combined steps lead to the weathering of a mineral: physical disintegration and chemical dissolution more or less linked to biological processes. Silicate weathering is then considered to be the sum of complex set of reactions including mechanical, chemical and biochemical processes.

A lot of studies have demonstrated that bacteria can amplify aluminosilicate weathering reactions (ROBERT and BERTHELIN, 1986; LEYVAL et al., 1990; VANDEVIVERE et al., 1994; BARKER et al., 1998; WELCH and ULLMAN, 1999; HUTCHENS et al., 2003). However, these studies do not demonstrate if silicate dissolution must be considered as an indirect consequence of microbial metabolism (release of protons, metabolites or specific ligands) or as a specific strategy (i.e. dissolution serve some physiological functions) giving a competitive ecological advantage to colonizing bacteria (BENNETT et al. 2001). Few studies have been dedicated to the quantitative and qualitative impact of microbial diversity on silicate weathering in soils (BENNETT et al., 1996; BENNETT et al., 2001; ROGERS AND BENNETT, 2004). These experimental results lead the different authors to similar conclusions:

mineral chemistry influences strongly the colonization pattern of mineral and rocks by bacteria and their metabolic activities. The methods employed during these previous studies are analysis of elements released into the leach solution, bacterial colonization pattern of minerals and analysis of structural and chemical modification of minerals by microscopy or X-ray diffraction. With these methods, the direct effect of bacteria could not be distinguished of an indirect effect of the metabolites that bacteria produce.

Recent studies have shown that living organisms, by exchange at equilibrium and kinetic processes, can induce isotopic shifts for stable transition metal (Fe, Cu, ...) isotopes (BEARD, 1999; BRANTLEY, 2001; BEARD, 2002; ANBAR, 2003; BRANTLEY, 2004; MATHUR et al., 2005). The chemical behavior of iron and copper is very dependent of the redox conditions, which lead isotopic variations difficult to interpret. Magnesium is an element much less sensitive to the physicochemical conditions of the medium because the ion of magnesium (Mg^{2+}) has invariable oxidation state (+II). Recently, magnesium isotopes have been used in environmental studies. Results demonstrate that Mg isotopes could be a good tracer of weathering and of some biological processes. In nature, Mg isotope compositions ($\delta^{26}\text{Mg}$) vary from - 6 to 1 ‰. These variations were first used to study the Mg sources in natural samples such as soils, rocks and river (BRENOT et al., 2008; TIPPER et al., 2006; TIPPER et al., 2008). Mg isotopic compositions ($\delta^{26}\text{Mg}$) in silicate soils vary from -0.11 to 0.02 ‰, heavier than silicate rock (-0.4 to -0.8 ‰) and than rivers draining the same rock (-1.8 to -0.7 ‰), suggesting a fractionation during rock weathering. These studies didn't measure the impact of living organisms on these fractionation mechanisms. However, It is known that bacteria and plants have a crucial role on rocks weathering (BOYLE and VOIGT, 1973; HINSINGER et al., 1992; LEYVAL C. et al., 1990; ROBERT and BERTHELIN, 1986).

In marine environments, recent studies have highlighted different Mg isotopic compositions between marine microorganisms and seawater. For example, CHANG et al. (2004) and VON POGGE et al., (2008) showed that marine organisms have a Mg isotopic composition lighter ($\delta^{26}\text{Mg} = -1.9$ ‰) than seawaters ($\delta^{26}\text{Mg} = -0.8$ ‰). BLACK et al., 2006 and RA and KITAGAWA, 2007 indicate that marine phytoplankton chlorophyll molecules ($\delta^{26}\text{Mg}$ vary from 0.09 to -0.48 ‰) are slightly enriched in heavier Mg isotope relative to seawater ($\delta^{26}\text{Mg} = -0.83$ ‰). Chlorophyll molecules synthesis can induce Mg isotope fractionation, but the sense of this fractionation is still debated.

In continental systems, BLACK et al., (2008) and BOLOU BI et al., (accepted) have highlighted Mg isotope fractionations between plants and their source of nutrients. Plants

grown experimentally are systematically enriched in the heavy Mg isotope compared to their source of Mg. Fractionation processes during plant growth have been well investigated and seem to occur at two main levels: uptake by roots then translocation of Mg into plants. But eventual Mg fractionation processes during mineral dissolution were not studied. For example, in experiments of BOLOU-BI et al. (accepted) carried with silicate minerals as source of Mg, the Mg leached in solution was depleted in heavier Mg. They did not demonstrate that this was only due to the uptake of heavy Mg in plants. The knowledge of isotopic signature of solution at the interface bacteria/mineral could give some interesting complementary informations on the impact of microorganisms on Mg isotopic composition of soil solution, natural waters and rivers.

We investigate therefore the impact of bacterial activity on the Mg isotopic composition of solutions during the weathering of phlogopite minerals in closed systems, in aerobic conditions. Two types of leaching experiments were performed: (1) “bioleaching” with a mineral media in presence of bacterial strains and (2) chemical leaching experiments with nitric or organic acids in a sterile mineral media. The Mg, protons and Si fluxes released in the course of time were measured to distinguish the two main processes involved by bacteria: proton- and ligand- promoted dissolution through the determination and quantification of organic ligands by-produced (organic acids). Chemical and isotopic composition of solutions resulting from these two key processes and obtained in biotic conditions were compared to those released abiotically during chemical leaching experiments.

2. MATERIALS AND METHODS

Several phlogopite leaching experiments were performed with 4 bacterial strains (biotic experiments) isolated from rhizosphere of plants and acid soils according to their high weathering potential. To investigate and model the chemical processes linked to the weathering ability of the bacterial isolates, leaching experiments without bacteria were performed with different acids:

- citric acid (10^{-3} M, pH adjusted at 3.5 to 6)
- gluconic acid (10^{-3} M, pH adjusted at 3.5 and 5)
- nitric acid (concentration adjusted to be at pH 2.5, 3.5, 4, 5.5).

Citric and gluconic acids were used as a model of chelating agent, and nitric acid as a model of acidifying agent. Abiotic experimental conditions (pH, type and concentration of organic

acids) were based on experiments obtained in presence of bacteria to approach these biotic experimental conditions and to be able to compare more easily between them experiments performed with and without bacteria.

2.1. Minerals

The natural 2:1 phyllosilicate used in this study is a phlogopite (from Madagascar – Vohitrosy). The chemical composition of this mineral is as follows (g/kg): SiO₂ 390; Al₂O₃ 150; Fe₂O₃ 52; MnO 0.9; CaO 2.5; MgO 294; K₂O 110; TiO₂ 11.3; Na₂O 1.3; P₂O₅ 1.1 (LEYVAL et al., 1990). After wet grinding and sieving, phlogopite minerals were rinsed under sonication with distilled deionised water at circum neutral pH to remove ultrafine particles. The dried 50-100 µm fraction was selected to conduct experiments with phlogopite. A specific surface area of 0.5 (±0.3) m².g⁻¹ was determined by an N₂ adsorption Brunauer-Emmet-Teller method. Before starting experiments, the mineral powder was sterilized at 170°C during 2 hours under dry atmosphere.

2.2. Bacterial strains and cultivation

Soil bacteria were pre-selected according to their contrasted weathering abilities through the two main processes evolved for silicate minerals dissolution (1) proton-promoted dissolution by “acidifying” bacteria and (2) ligand-promoted dissolution - through the speciation of organic acids by-produced. Three heterotrophic strains of bacteria (*PA1*, *AR1*, *RA1*), previously isolated from rhizosphere of beech, pine and wheat, were chosen for their ability to dissolve mineral by acidification of the media (*AR1* and *PA1*) or to produce organic acids (*RA1* and *PA1*) (LEYVAL et al. 1991). A complementary strain (*PS2*) was isolated from an acidic soil i.e. podzol (WRB) located in the Vosges Mountains (north-eastern of France) and characterized as an acidifying bacteria (BALLAND et al., submitted).

The genus of the bacterial strains was determined by the amplification of 16S rRNA genes and sequencing. Polymerase chain reactions were performed using an universal set of primers in a total reaction volume of 50 µl containing 1x PCR mastermix (Eppendorf®), 0.1 µM of primers (966 F and 1401 F) and 1 µl cell extract (Fleske 1998). Before being sequenced by MWG biotech Company (Courtaboeuf, France), the PCR products (PCR product size: 433 base pair) were purified and concentrated using mini-columns (High Pure™ PCR product Purification Kit, Roche diagnostic). A blast program was used to compare the sequences with those of the GenBank databases (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). The following identification was made with a maximum identification of about 99 %:

Rhanella aquatilis (RA1), *Pantoea agglomerans* (PA1), *Agrobacterium radiobacter* (AR1) and *Pseudomonas* sp. (PS2).

All bacterial strains were cryopreserved at -80 °C in 30 % glycerol and then precultivated on Petri dishes containing Luna and Bertani agar (LB 20 g.l⁻¹ from Difco and 15 g.l⁻¹ agar). Strains were grown at 28 °C. Biotic experiments were conducted with actively growing culture of bacteria, freshly rinsed and conditioned as describe below. Prior to deposition in batch's reactors, bacterial isolates were recovered and cultivated in 2 ml LB liquid medium during 1 day. Cells suspension was rinsed three times in deionised water and then suspended in 10 ml of the BHm media in order to obtain 10⁷ cells per ml of suspension.

2.3. Experimental set-up

Biotic and abiotic or chemical leaching (without bacteria) experiments were performed in batch reactor closed systems in order to follow the variation with time of some parameters such as protons, elements released into solution and bacterial physiology (consumption of glucose, number of bacteria). Each batch reactor was sterilized with culture media by autoclaving at 110°C during 30 min.

2.3.1. Culture media

In all experiments, the usual mineral medium for bacterial cultures (Bushnell-Hass like) was used as a source of essential mineral nutrients in order to simulate a soil solution chemical composition. This medium was an iron and magnesium free, thus phlogopite was the only source of these elements for bacteria. Its depleted composition (20 mg.l⁻¹ KCl ; 20 mg.l⁻¹ NaH₂PO₄, 2H₂O ; 22.5 mg.l⁻¹ Na₂HPO₄, 2H₂O ; 65 mg.l⁻¹ (NH₄)₂SO₄ ; 100 mg.l⁻¹ KNO₃ ; 20 mg.l⁻¹ CaCl₂ in distilled deionised water) is reflected by its resulting low ionic strength (4.5 mM).

Microbial weathering of phyllosilicate was carried out in presence of glucose as sole source of carbon and energy. To avoid iron and magnesium input, glucose solutions (20 g.l⁻¹, 0.8 mM of carbon) were prepared with ultrapure deionised water (18MΩ.cm-1, Elga Purelab) and sterilized by filtration at 0.2 µm. All reactants were chosen according to their purity to minimize the contamination of Fe and Mg. The medium and the glucose solution were checked by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy analysis (ICP AES Jobin-Yvon 238 at LIMOS, France) and neither Fe nor Mg were detected at a detection limit 0.005 ppm.

2.3.2. Experimental procedure

In addition of the sterility precautions taken all along experiments, all laboratory material was precleaned (HNO_3 weakly concentrated) to avoid any mineral contamination. Biotic and abiotic experiments were run in batch reactors composed by glass flasks. Reactors have been agitated continuously on a shaker (Certomat.u, Braun 120 rpm) except for experiments R1, R4, P1, A1, H3 and C2 where flasks have been agitated manually once every day for approximatively 30 seconds. Experiments were conducted in aerobic conditions at a room temperature of 24°C. Each batch was “closed” with carded cotton and greaseproof paper that allow circulation of ambient air but protect to bacterial contaminations.

In biotic experiments, each reactor was filled with 3 g of phlogopite powder, 10 ml of cells suspension, 80 ml of BHm and 10 ml of glucose solution (Batch's concentration: 2 g.l⁻¹). Cells suspensions have been incubated in reactors for 6 to 12 days.

The number of bacterial cells in suspension ($\text{OD}_{600\text{nm}}$), the consumption of glucose, the nature and quantities of metabolites released and the leached elements concentrations were followed with time. All experiment set-up, days of sampling and specific parameters characterized are summarized in Table 1A. For chelating bacteria, four experiments were performed with RA1 (R1 to R4). A single experiment was performed in presence of strain PA1. For acidifying bacteria, two experiments were performed with strain Ps2, the former was stopped at 6 days (B1) and the second at 12 days (B2). A single experiment was performed in presence of AR1.

Chemical weathering experiments (without bacteria) were performed in the same type of glass flasks filled with phlogopite (3g), the mineral medium (100 ml) and different acids. Experiments setup (molarity and pH), time of sampling and specific parameters characterized are compiled in table 1B. Four experiments were performed with nitric acid (HNO_3) at various pH (H1 to H4). Four experiments were performed with gluconic acid (G1 to G4). Six experiments were performed with citric acid (C1 to C6).

After each sampling in biotic and abiotic reactors, solutions were collected, filtered at 0.2 μm and stored at 4 °C before analysis.

2.4. Elemental and physiological analyses

2.4.1. Determination of protons, glucose and number of cells

The quantitative analysis of the acidification processes during the experiments was accomplished with bromocresol green (1g.L⁻¹, BG, Sigma-Aldrich 114367) a very common acid sensitive dye. The pH was determined by adding 10 μl of bromocresol green to 200 μl of filtrate. Bromocresol green (BG) is yellow ($\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$) in acidic solution ($\text{pH} < 3.8$) and

blue ($\lambda_{\max} = 620 \text{ nm}$) in more basic solutions ($\text{pH} > 5.8$). The pH of the leaching solution was determined at two wavelengths close to both BG maxima (BESHIR et al., 2007). A microplate reader (SAFAS Xenius FLX) was used to measure the absorbance at these different wavelengths.

Consumption of glucose by bacteria was determined by measuring the glucose remaining in the 3 μl filtered solution after addition of 300 μl of GOD-PAP (enzymatic kit, BioLabo). After 20 min, the glucose concentration was measured at an absorbance of 520 nm. The detection limit for glucose was 0.1 ppm.

According to the manufacturer's instructions, calibration curves were built (data not shown) to determine the relationship between the absorbance and the amount of protons and glucose, respectively from the bromocresol green and GOD-PAP. These relationships were validated in the work of Uroz et al. (2007).

The concentration of planktonic bacteria was determined usually by measuring the absorbance of the cell suspension at a wavelength of 600 nm. A correlation between the number of cell and the absorbance was realized by enumerate directly the number of cell with a Thoma cell under microscopic observation in function of the optical density at 600 nm. For each bacterial strain, an equation was obtained giving an approximation of the number of cell suspension in function of the optical density (data not shown).

2.4.2. *Metabolites released in leaching solution*

Non-acidified samples (R1, B1 and B2) were stored at -18°C . Ten organic acids, the most usually released in solution by bacteria (formic, gluconic, butyric, pyruvic, citric, oxalic, propionic, acetic, succinic, malic, lactic and malonic acid), were determined and quantified. Measurements were realized with an ion chromatography using conductivity detection (ICS 3000, Dionex Corp.) and an analytical column (AS 11 HC, Dionex corp.). The sample was eluted with KOH solution of varying concentrations (0.9 mM to 60 mM) over time (step gradient) with a flow of 1.3 ml/min. The synthetic reference materials used were sodium formate, D-gluconic acid, Sodium butyrate, pyruvic acid sodium salt, sodium citrate tribasic, sodium oxalate, sodium propionate, Sodium acetate, Succinic acid disodium salt, DL-malic acid disodium salt (from Sigma-Aldrich) and Sodium-L-lactate and Malonic acid disodium salt (from fluka). Uncertainties were better than 0.5% for all organic acids measured.

2.4.3 *Mg and Si Concentrations*

Concentrations of cations (Mg and Si) released in the solution were analyzed by atomic absorption spectrometry (SAA Perkin Elmer 5000 at CRPG Nancy, France) and by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES Jobin-Yvon 238 at LIMOS Nancy, France). All solution samples were acidified with HNO_3 prior to analysis. The detection limit for Mg and Si was 0.05 ppm. Uncertainties with our medium were better than 5 %. Accuracy and reproducibility were controlled by repeated (5 times) analyses of Mg and Si synthetic reference materials (Spex-Certiprep).

2.4.4 Mg isotopes determination solution and phlogopite

Mg isotope composition was determined (i) on Mg in solutions collected from all experiments with no separation between the ionic or chelated Mg forms and (ii) on structural Mg contained in the initial phlogopite powder.

Mg isotope measurements were realized using two multiple collector inductively coupled plasma mass spectrometry (MC ICP-MS): the Isoprobe based at CRPG Nancy (France) and the Nu plasma based at ENS Lyon (France). The instrumental mass bias was corrected using standard-sample bracketing (GALY et al., 2001). To prepare for isotope analysis, a sample aliquot containing at least 50 μg of Mg was dried in Teflon cups. The elements in solution were dissolved with peroxide of hydrogen (H_2O_2 30%) and concentrated nitric acid to eliminate glucose.

A pure fraction of Mg was required for isotopic analysis to reduce interference and matrix effects (GALY et al., 2001). The method used to separate the Mg from all other elements in this work was validated and described by BOLOU-BI et al. (2009). Briefly, purified Mg fractions were obtained by ion chromatography liquid in two steps. Before these steps, the samples dissolved in 0.5 ml HCl 1N were loaded in the resin. The first step of separation was performed using an anion exchange resin (Bio-Rad AG[®] MP-1M, 100-200 mesh size) to remove the transition metals. The second step was performed using a cationic resin (Bio-Rad AG50W-X12, 200-400 mesh size), which separates Mg from all the other cations. It was necessary to realize several passages on this cationic resin to collect 100% of pure Mg initially in the samples. The more difficult was the separation between K and Mg as our samples have high K/Mg concentration molar ratios (varying between 0.5 and 17). Reference material NIST SRM980_{CRPG} was doped in K with a K/Mg ratio of 17 to control the efficiency of separation of Mg from the other elements. The data obtained ($\delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}} = -3,97 \pm 0.14$; $\delta^{25}\text{Mg}_{\text{DSM3}} = -2,01 \pm 0.15$) was in accordance with the value of the standard reference material NIST SRM980_{CRPG} ($\delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}} = -3,98 \pm 0.05$; $\delta^{25}\text{Mg}_{\text{DSM3}} = -2,04 \pm 0.05$). The

reference solution used was NIST SRM980_{CRPG} ($\delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}} = -3,98 \pm 0.05$; $\delta^{25}\text{Mg}_{\text{DSM3}} = -2,04 \pm 0.05$) using the following relation in the conventional delta unit defined by: $\delta^{26}\text{Mg} = [({}^{26}\text{Mg}/{}^{24}\text{Mg})_{\text{sample}} / ({}^{26}\text{Mg}/{}^{24}\text{Mg})_{\text{standard}} - 1] * 1000$

Our results were reported relative to a new reference material developed by Cambridge University: DSM3 (Dead Sea Magnesium) when the heterogeneity of the NIST SRM980_{CRPG} reference material was demonstrated (CARIGNAN et al., 2004 and GALY et al., 2003)

3. RESULTS

Preliminary experiments of phlogopite dissolution in the same conditions that those presented in the material and methods section were performed with the four bacterial strains. Strains RA1 and PS2 were the most efficient at released elements from this silicate mineral. These strains were then more precisely study.

3.1 Glucose consumption, bacterial growth and pH variations

In Table 2 are compiled data on pH, glucose, Mg, Si concentrations, and optical density (DO, linked to cells number) measured in the media and in all biotic reactors. The initial composition of the solution in each reactor (time = 0 days) was assumed to be equivalent to those of the growth media used. The change of the planktonic bacteria amount during experiments is given by the optical density at 600 nm ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) and represented on Figure 1a. Immediately after inoculation, all reactors with bacteria showed initial $\text{OD}_{600\text{nm}}$ of 0.05 corresponding to a cell number of $\approx 10^6$ bacteria. ml^{-1} . In experiments with bacterial strain RA1, cell numbers increased regularly up to a maximum OD at the end of experiments of 0.21 (5.10^7 bacteria. ml^{-1}), and 0.1 (10^7 bacteria. ml^{-1}) respectively for experiments R1 and R4. In experiment R3, the maximum OD value is reached at day 3 and slightly decreased after down to 0.12 (1.10^7 bacteria. ml^{-1}). In presence of bacterial strain Ps2, cell numbers only slightly increased with time, as shown by the OD variation up to a maximum of 0.06 ($\approx 10^6$ bacteria. ml^{-1}) and 0.08 (5.10^6 bacteria. ml^{-1}) respectively for experiments B1 and B2 at the end of the experiments. The bacterial strain Ps2 had a constant and weak growth during time in contrast to RA1, with a slow time generation.

Simultaneously, in presence of bacterial strain RA1, glucose concentrations decreased from 2 g. l^{-1} to 0, 1.02 and 1.07 g. l^{-1} respectively for experiments R1, R3 and R4 the 6th day (Table 2, Figure 1b). In presence of bacterial strain Ps2, glucose concentrations decreased

strongly below 1g.l^{-1} within the two first days suggesting that Ps2 consumed more glucose than RA1 at the beginning of the experiments. Concentrations decreased then more slightly down to 0.42 and 0.29 g.l^{-1} respectively for experiments B1 and B2 after the 6th day.

In all biotic reactors, the pH rapidly decreased within the two first days from an initial value of 6.5 (Figure 1c). The second day, the pH reached a value of 5.2, 5.0, 4.6 and 4.2 respectively for experiments R1, R2, R3 and R4 in presence of the chelating bacteria RA1 and 3.5 and 3.3 respectively for experiments B1 and B2 with acidifying bacteria PS2. Between days 2 and 12, the pH remained constant in all experiments, except in experiments R1 where the pH increased again the third day to a quite constant value of 6.5-6.7. This change in the experiment R1 compared to all other ones is linked to the almost total consumption of glucose by bacteria. For experiments P1 and A1, the pH values at 12 days were 3.9 and 4.5 respectively in presence of bacterial strains PA1 and AR1.

3.2 Organic acids released

Figure 2 represents the change with time of organic acids concentrations produced by bacterial strains RA1 (experiment R1) and PS2 (experiments B1 and B2) and measured in solutions. In all experiments, propionic, malic and malonic acids were below the detection limit. In experiments performed with the bacterial strain RA1 (experiments R1), the maximum concentrations were reached at the end of the second day for lactic acid (62 ppm), acetic acid (77 ppm), formic acid (2.5 ppm), succinic acid (23.5 ppm), oxalic acid (7.2 ppm) and citric acid (3.1 ppm). Between the second and the sixth day, concentrations of organic acids decreased slightly down to 37.1, 8.3, 4.2 and 5.4 ppm respectively for lactic, formic, succinic and oxalic acids. The maximum concentration were reached the first day for acetic acid (77 ppm), strongly decreased to reach about 0 the sixth day. Few ppm of citric acid (3.1 ppm) were detected only the first day. The bacterial strain Ps2 (experiments B2) produced only gluconic and butyric acids. Gluconic acid concentrations increased from 1600 ppm the second day to 2360 ppm the 6th day and 2486 ppm the 12th day. Butyric acid concentrations increased from 21 to 31 ppm the 6th day and 54 ppm the 12th day.

3.3 Dissolved elemental concentrations

The fraction of Mg and Si leached from phlogopite and measured in solution at the end of biotic and abiotic experiments are given respectively in Table 2 and Table 3. This fraction of Mg and Si is very low and Mg/ Si concentrations are well correlated whatever the experiments and bacteria present.

Figure 3 represents the fraction of Mg dissolved from phlogopite as a function of time for biotic and abiotic reactors. In abiotic conditions, for experiments performed with HNO_3 (Figure 3a), at the end of the sixth day, the fraction of dissolved Mg from phlogopite (F_{Mg}) reached values of 1.25 ‰ at pH 2.5 (experiment H1), 0.5 ‰ at pH 3.5 (experiment H4) and 0.2 ‰ at pH 4 (experiment H3). Protons concentration influenced strongly the Mg released. For experiments performed with gluconic acid, the fraction of dissolved Mg from phlogopite (F_{Mg}) reached same values of 0.43 and 0.49 ‰ at 6 days respectively in experiments G3 and G4. The fraction of dissolved Mg from phlogopite (F_{Mg}) reached value 0.30 and 0.53 ‰ at 6 days with citric acids respectively in experiments C3 and C4. At a given pH of 3.5, the presence of gluconic acid (G3, G4) permitted to release the same quantities of Mg from phlogopite than nitric acid (H4). For a given pH, about 6 at 10 days, F_{Mg} was three times more important in presence of citric acid (experiment C1 = 0.90‰) than nitric acid (experiment H3 = 0.27‰).

In biotic experiments, F_{Mg} increased slightly in the course of time and reached the sixth day a value of 0.29, 0.38, 0.43, 0.20 ‰ 0.80 and 0.76 ‰, respectively for experiments R1, R2, R3, R4, B1 and B2. The ninth day, F_{Mg} reached a value of 0.49, 0.51, 0.53 and 0.76 ‰ respectively for experiments R2, P1, A1, and B2. Strain Ps2 permitted to released two times more Mg and Si into solution from phlogopite than facultative anaerobic bacterial strains (PA1, RA1, AR1)

Comparing bioleaching and leaching experiments at similar pH, F_{Mg} was greater in presence of bacteria or citric acid than with nitric and gluconic acid experiments. Reactors agitated constantly during experiments released significantly more Mg and Si into solution than non-agitated experiments as previously observed in the experiments of BRANTLEY et al. (2004). This is very clear for experiments with strain RA1, experiments R2 and R3 (agitated) had two times more elements leached into solution from phlogopite than experiments R1 and R4.

3.4 Mg isotope compositions

The Mg isotopic composition of phlogopite and Mg leached into solution at the end of the experiments are summarized in Table 2 and Table 3. The Mg isotopic composition of phlogopite is $\delta^{26}\text{Mg} = -1.22 \pm 0.24$ (average realized from X samples). In biotic conditions, with strain RA1 (experiment R2), $\delta^{26}\text{Mg}$ values in solution were -1.41 and -1.31 at 3 and 6 days, with strain PA1 and RA1 (experiment P1 and A1) $\delta^{26}\text{Mg}$ values in solution were -1.39

and -1.23 at 12 days. Solutions with strains PS2 (experiments B1 and B2) had a $\delta^{26}\text{Mg}$ values of -1.09 and -0.88 at 6 and 12 days respectively.

In abiotic conditions, with nitric acid (experiment H1), the $\delta^{26}\text{Mg}$ in solution were -0.82 at sixth day. With gluconic acid (experiments G3 and G4), the $\delta^{26}\text{Mg}$ in solution were -1.02 and -1.22 respectively the ninth and the sixth day. The $\delta^{26}\text{Mg}$ values measured with citric acid in experiments C1, C3 and C4 respectively at 13, 6 and 6 days were, -1.52, -1.43 and -1.42. Except with HNO_3 at pH 2.5 (H1, 6 days), and with strain PS2 (B2 at 12 days), the magnesium isotopic compositions of solutions were very close between them and similar to the $\delta^{26}\text{Mg}$ value of phlogopite (about -1.22). In general results indicate no significant change of the isotopic composition of Mg leached into solution compared to that of Mg in phlogopite.

4. DISCUSSIONS

4.1. Origin of the acidity and organic acids in biotic experiments

The bacterial strains RA1 (chelating bacteria) and PS2 (acidifying bacteria) did not have the same behavior during experiments. The former strain had a low growth bacterial and consumed moderately the glucose. It released several organic acids such as lactic, acetic, formic, succinic, oxalic and citric acids acidified weakly the medium (pH = 4.5). The second strain had a very low growth bacterial but consumed a great part of the glucose. It released few type of organic acids (gluconic and butyric acids) but in great quantities and acidified strongly the medium (pH = 3.5).

The consumption of glucose, and the enhance of the cell numbers into solution were interpreted to reflect bacterial growth followed by a prolonged stationary phase most likely sustained by the internal recycling of organic matter and nutrients.

In our experiments, bacteria used glucose as both an energy source (electron donor) and a carbon source for biomass synthesis. There was a link between glucose consumption and acidification depending on bacterial metabolism. We explain the lowered pH was than bacteria produced organic acids. Previous works have shown that the partial glucose oxidation can lowered pH via the production of gluconic acid (VANDEVIVERE et al. 1994; WELCH and ULLMAN, 1999; WU et al., 2008). The metabolites produced by bacterial strains have been measured in our experiments (Figure 2). The production of organic acids depended on many factors such as the nutritional, physiological and growth conditions of cultures. In presence of

RA1, organic acids produced were citric, oxalic acid and especially lactic, formic and acetic acid. The organic acid produced mainly by aerobic bacteria Ps2 was gluconic acid.

For the facultative anaerobic bacteria (RA1 and PA1), under stress conditions, the oxidation continued beyond the glucose intermediate. The lack of required enzymes led some bacteria to accumulate or expel as waste various intermediate acids (GOTTSCALK, 1986), such as fumaric, citric, oxalic acid and especially lactic, pyruvic and acetic acid resulting from fermentation. Thus, these strains had an anabolism not very requiring in energy and consequently, a catabolism relatively not very effective requiring a low amount of initial carbon source. In the contrary, the strain Ps2 is an aerobic bacterial strain that had an anabolism requiring sufficient energy and a catabolism relatively effective requiring a great initial source carbon.

For experiments R1 performed with strain RA1, glucose was quickly and entirely consumed at 3 days, and pH increased strongly to 7 due to protons consumed by buffering capacity of phlogopite. At the end of the third day, following the lack of carbon source, bacterial activity decreased strongly and stopped and bacteria cannot maintain pH at 5. For consequence, this experiment will not be taken into account in the rest of this study.

As shown by protons and organic acids released, results confirmed that RA1 and PA1 are a chelating bacteria and PS2 an acidifying bacteria. These products induced by bacterial metabolism induced substantial changes in solution pH with important consequences for the elemental release from phlogopite compared to abiotic conditions.

4.2 Elemental release rates

The influence of pH, organic acids and bacteria on the release rate of Mg and Si was evaluated using the linear rate law described by MALMSTRÖM and BANWART, (1997) and MALMSTRÖM et al., (1996) and given by the following equation:

$$r_M = k_H (a_{H^+})^n + K_O + k_{OH} (a_{OH})^m + k_{L,M} (a_L)^l \quad (\text{eq 1})$$

where M is the element released (Mg or Si), k is the rate constant, a_{H^+} , a_{OH} and a_L are the activities of protons, hydroxyl and ligand respectively and n, m, and l are the orders of reactions experimentally obtained with respect to proton, hydroxyl and ligand. The model suppose that (1) the ligand-promoted process operates in parallel with and independently of the hydroxyl or proton-promoted processes, (2) ligand-promoted rates are additive. In the present study, the phlogopite weathering is done in acid environment and terms $K_{O,M} + k_{OH,M} (a_{OH})^{n,M}$ are negligible. Thus, experimental data were fitted to rate law yielding the following equation:

$$r_M = k_H (a_{H^+})^n + k_{L,M} (a_L)^l \text{ (eq. 2)}$$

The form of this empirical release rate equation is characteristic of dissolution rate laws with proton adsorption or ligand complexation at the mineral surface. In both biotic or abiotic experiments, the apparent initial release rates of Mg and Si were calculated using the equation 2 in the course of time. In all experiments, the release rate of Mg and Si decreased slightly with time (data not show). This was frequently observed in dissolution experiments using fresh mineral samples as in works of FURRER and STUMM, (1986) and MALMSTRÖM and BANWART, (1997). It could be attributed to a first step of quick dissolution of ultrafine particles then to a decrease of the dissolving surface area and more reactive surface sites.

Figure 4 represents the Mg (r_{Mg}) and Si (r_{Si}) release rates in function of average pH. The correlations observed confirmed that elemental release was largely pH controlled. The highest elemental release occurred at low pH, whereas the lowest rates occurred at near neutral pH.

Bioleaching and chemical leaching performed with citric acid permitted higher release rates relative to chemical leaching performed with HNO_3 and gluconic acid. For a given pH, Mg release rates were ~ 2 to 3 fold higher in bioleaching compared to chemical leaching performed with HNO_3 and Si release rates were also ~ 1.5 fold higher.

Acidifying bacteria (PS2 and AR1) amplified Mg and Si release rates compared to HNO_3 . As shown by organic acids analysis, strain PS2 produced into solution about 1 mM of gluconic acid leading to a pH of 3.5. At this given pH, Mg and Si release rates were lower and similar for chemical experiments performed with gluconic acid (G1, G2 and G3 at similar conditions that experiments with PS2 and $\sim 1.43 \cdot 10^{-10} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and HNO_3 (H4) (and $1.38 \cdot 10^{-10} \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$); At this pH, gluconic acid (pKa 3.86) acted like a strong acid. But enhanced elemental released rates in presence of PS2 and AR1 suggest that other process must be taken into account to interpret such variations. VANDEVIVERE et al., (1994) highlighted microreaction zones at the contact bacteria-mineral where the chemical compositions of the solution in these site was strongly different that the bulk solution with high protons and organic acids concentrations.

All bacterial strains used in this work, acidifying (PS2 and AR1) or chelating (PA1 and RA1) bacteria accelerate elemental (Mg and Si) release from phlogopite principally through pH lowering and the production of chelating agent such as organic acids. A similar conclusion was previously reported in several other studies (VANDEVIVERE et al., 1994; BAKER et al., 1998; WU et al., 2008).

The growth of bacteria measured in the course of time was not correlated to the Mg and Si released into solution during the phlogopite bioleaching. This suggest that the growth of

bacteria was not a crucial factor for highlighting bacterial effectiveness to weather phlogopite. The generation time of Ps2 was less important than RA1. Inversely, elemental release was more important in presence of bacterial strain Ps2 ($2.22 \cdot 10^{-10}$ and $2.51 \cdot 10^{-10}$ mol.m⁻².s⁻¹ respectively for Mg and Si release rates) than with bacterial strain RA1 ($1.06 \cdot 10^{-10}$ and $7.23 \cdot 10^{-11}$ mol.m⁻².s⁻¹). However, only planktonic bacteria were enumerated in our experiments, whereas adhering bacteria are known to play an important role in the enhancing mineral weathering (VANDEVIVERE et al. 1994).

Viable bacteria (in exponential and stationary growth phase) were necessary to maintain low pH in our experiments releasing protons, organic acids and CO₂ into solution (WELCH and ULLMAN 1993; VANDEVIVERE et al. 1994). As shown by experiments R1, in absence of glucose, bacteria in decline growth phase did not maintain production of protons and other organic acids, and pH increased due to the consumption of protons by phlogopite. Thus, the growth conditions of bacteria affect directly the chemistry of solution directly through the excretion of protons and organics acids and as an indirect consequence the elemental release during mineral dissolution (HUTCHENS et al. 2003).

4.3 Stoichiometry of dissolution

The reaction stoichiometry is illustrated in Figure 5 in the form of the ratios of the elements released (Mg and Si), together with the elements ratios of the initial phlogopite in the course of time. With HNO₃ at pH 2.5 and 3.5 respectively for experiments H1 and H4, the ratios of Mg/Si decreased slightly with increasing pH (0.98, 0.92 and 0.92 respectively at pH 2.5, 3.5 and 4 at 6 days). But they are similar to the bulk initial ratio of the phlogopite (0.97); These values of Mg/Si are in good agreement with those obtained by KALINOWSKI et al. (1994) during the phlogopite dissolution by HNO₃.

All other experiments (bio- and chemical leaching) had Mg/Si values below the bulk initial ratio of the phlogopite except for experiments performed with chelating bacterial strains RA1 (Mg/Si about 1.5). In presence of RA1 (experiments R2 and R3), Mg was preferentially released in comparison to Si. This indicates a greater dissolution of octahedron compared with tetrahedron. ACKER and BRICKER (1992) demonstrated that at pH superior to 3 (case of our experiments R1 to R4 with a pH close to 4.5), biotite octahedrons were preferentially destructed. Moreover, BARMAN et al., (1992) highlighted that biotite weathering in presence of strong chelating agent such as citric and oxalic acids preferentially released Mg into solution than Si; This was the case of our experiment R1, where low amounts of oxalic and citric acids were quantified (about 7 and 3 ppm respectively for oxalic and citric acid).

In the study of BARMAN et al. (1992), results of chemical leaching in presence of citric acid suggest a preferential release of Mg compare to Si due to the high solubility of Mg and that the localization of Mg in octaedron easily accessible to the solution. At pH 1, the authors demonstrated a preferential elemental released occurring in the following order: $Mg > Fe > Al > Si$.

In our study, during chemical leaching in presence of citric acid (experiments C1 to C6), Mg/Si ratios (0.95) were slightly below to the Mg/Si ratio of the phlogopite (0.97), indicating that in contrast to the obsevation of BARMAN et al., 1992, Si was preferentially released. At pH 3.5, the preferential elemental released occurring was $Fe > Al > Mg = Si$ with F_{Fe} 2.02; F_{Al} 1.82; F_{Mg} 0.53 and F_{Si} 0.56 ‰; The difference between our results and those of BARMAN et al., 1992 can be explain (i) by the fact that at this pH 3.5, only two carboxylic groups of citric acid were dissociated ($pK_a = 3.13; 4.76; 6.4$), and it is known that citrate have strong affinity for iron to the detriment of magnesium in comparison to experiments of BARMAN et al. 1992, where citric acid had all these carboxylic groups dissociated; (ii) by a high concentration of citric acid (1 mM) used in our chemical experiments and those of BARMAN et al., 1992 that didn't reflect the concentration in bioleaching experiments in presence of RA1 (about 3 ppm or 0.02 mM). High concentrations of organic acids can enhance surface complexation processes decreasing the number of surface reactive sites and consequently leading to a saturation of rates (GOLUBEV et al., 2006). These observations were confirmed by experiments C5 and C6 performed with high concentration of citric acid (10 to 100 mM) leading to Mg/Si ratios in solution significantly lower (about 0.7) than experiment C2 (0.95) but with a similar r_{Mg} value of $8.10^{-11} \text{ mol.m}^{-2}.\text{m}^{-1}$.

For experiments bacterial strain PS2 (B2) and with gluconic acid (G4), Mg/Si ratios were very close to the bulk ratio of phlogopite (0.97) as in experiment with HNO_3 (H4). This observation is in accordance with the results on Mg and Si released rate indicating that a pH control on Mg and Si leaching from phlogopite.

4.4 Magnesium isotopic fractionation with and without bacteria

The Mg isotope compositions of solutions during or at the end of bio- and chemical leaching experiments were always closed to to initial phlogopite particles ($-1.22 \text{ ‰} \pm 0.20$). However, two tendencies can be distinguished (Figure 6) in function of the fraction of dissolved Mg from phlogopite (‰).

First, the phlogopite weathering with HNO_3 (experiment H1) or acidifying bacterial strain Ps2 (experiments B1 and B2) released heavier Mg into solution leading to a $\delta^{26}Mg$

higher than phlogopite from -0.8 to -1.22. Second, Mg released during dissolution with citric acid was lighter than phlogopite by as much as 0.2 ‰.

For experiments performed with bacteria (RA1 et PS2), the $\delta^{26}\text{Mg}$ of Mg released tended to be lighter at day 6 than 9 suggesting a possible Rayleigh fractionation from phlogopite. Rayleigh fractionation is considered as the process that fractionates Mg isotopes in the most effective way. A series of curves were calculated to fit our data by a Rayleigh fractionation equation (Figure 5b) : $\delta^{26}\text{Mg}_{\text{sample}} = \delta^{26}\text{Mg}_{\text{phlogopite}} + 1000 (\alpha - 1) * \ln f$ (eq. 3), where f is the fraction of Mg released from phlogopite, α is the Mg isotopic fractionation factor between leached Mg and phlogopite. The lines represent Rayleigh distillation model that uses the more appropriated empirical α values comprised between 1.00002 and 0.9998; To fit the measured differences between leached solution and phlogopite, varying from 0.05 to -0.2 ‰. The best fractionation factor was $\alpha = 1.00002$. This value is very low indicating a negligible fractionation during bioleaching experiments. However, when the fraction of Mg leached is more important ($f > 1$ ‰ for H1 and B2), the fractionation factor required to fit the data is significantly greater ($\alpha = 0.9998$). These results suggest a greater Mg isotopic fractionation where more Mg is leached from phlogopite.

According to a very low fractionation factor with Rayleigh distillation equation, the data can be fitted by an equilibrium fractionation equation (Figure 5c) in a closed system: $\delta^{26}\text{Mg}_{\text{initial phlogopite}} = (\delta^{26}\text{Mg}_{\text{sample}} - \delta^{26}\text{Mg}_{\text{final phlogopite}}) \cdot x + \delta^{26}\text{Mg}_{\text{final phlogopite}}$ (eq. 4) where x corresponds to the element leached fraction. The value of $\delta^{26}\text{Mg}_{\text{final phlogopite}}$ that best fitted the data were comprised between -1.23 and -1.19 ‰ closed to the $\delta^{26}\text{Mg}_{\text{initial phlogopite}}$ (-1.22 ‰) indicating a very low fractionation between leached Mg and phlogopite ($\Delta = \delta^{26}\text{Mg}_{\text{final-phlogopite}} - \delta^{26}\text{Mg}_{\text{initial-phlogopite}}$ ranged from 0.01 to -0.03 ‰). To fit the data obtained in presence of HNO_3 , citric acid and PS2 (experiments H1, C1 et B2), it was necessary to reach a $\delta^{26}\text{Mg}_{\text{final-phlogopite}}$ value of 0.5 ‰ at the end of experiments. The Δ ($\delta^{26}\text{Mg}_{\text{final phlogopite}} - \delta^{26}\text{Mg}_{\text{initial phlogopite}}$) was 1.72 ‰. This value is in the same range of those found in the nature, thus the equilibrium fractionation can explained this variation.

Whatever the model used to fit our data and whatever experiments (bio- or chemical leaching), the Mg isotopic fractionation factor was very low indicating no or a very negligible fractionation during the first event of bioleaching of phlogopite. Several mechanisms could explain this low isotopic fractionation in the experiments: (1) the Mg leached fraction is weak during weathering of phlogopite, (2) the incorporation of Mg into bacterial cells, but the biomass obtained in our experiments was so weak and could not be explained our results.

In nature, the system is not closed but has an infinite reservoir and solutions replenished continuously. This could be permit a Mg released more important with several leaching events and perhaps a fractionation factor more significant. Moreover, if our results are representative, mineral leaching by bacteria would not explain the Mg isotopes signatures measured in river waters isotopically lighter compared to rock and soils (TIPPER et al., 2006a; TIPPER et al., 2006b; BRENOT et al., 2008; TIPPER et al., 2008).

Whatever the experiments (bio- or chemical leaching), the $\delta^{26}\text{Mg}$ generally increases with decreasing pH (Figure 7 a), with a correlation of 0.62. More pH is acid; more Mg released into solution is enriched in the heavy isotope.

In neutral to basic domains, POGGE VON STRANDMANN et al., (2008) suggested a pH dependency between the Mg isotopic composition of direct-runoff rivers and the formation and stability of secondary phases. Direct-runoff rivers with a high pH (about 10) have a $\delta^{26}\text{Mg}$ higher than the draining basalt. Direct-runoff rivers with a lower pH (about 8), more concentrated in Mg leached from the basalt have low $\delta^{26}\text{Mg}$ relative to this bedrock. In other word, on basalt, more pH is basic; more $\delta^{26}\text{Mg}$ relative were enriched in heavier isotopes relative to this bedrock (Figure 7b). In the study of POGGE VON STRANDMANN et al., (2008), the Mg isotopic composition in natural water would be controlled by pH of solutions that drained rock and soils. Moreover, the $\delta^{26}\text{Mg}$ could be correlated to the mineral dissolution rates that increase with decreasing pH.

In our study, inversely to the study of POGGE VON STRANDMANN et al., (2008), the $\delta^{26}\text{Mg}$ of Mg released into solution of all experiments generally increased with increasing mineral dissolution rate except for experiments performed with citric acid (C3 and C4) and experiment with chelating bacterial strain RA1 (R4), where Mg released into solution is enriched in the light isotope (Figure 7 b). This could be explained by the affinity of stronger chelates to lighter isotopes. This hypothesis is coherent with conclusions of BRANTLEY et al., (2001) on a study of iron isotope fractionation, where $\delta^{57}\text{Fe}$ decreased with increasing release rate of iron. Recently, BOLOU-BI et al., (accepted) have highlighted that during phlogopite weathering by plants, the Mg leached into solution was enriched in light isotopes and inversely the bulk plants were enriched in the heavy isotopes. They explained this Mg isotopic composition of the leached solution as the results of the heavy Mg incorporation in plants and adsorption on roots. In addition, the action of plant through the organic acids secretion (such as citric acid) is not negligible on the phlogopite weathering (HINSINGER et al., 1992). Both absorption and secretion by plants processes, together with the possible influence

of chelating bacteria on isotopic signature of Mg leached from phlogopite highlighted in this study, would explain the systematic light isotopic signature of waters compared to rock and soils.

Our results need to be completed (1) with experiment times occurred on a long-life to have several events bioleaching, (2) with the characterization of secondary phases formed in the course of experiments with several spectroscopic techniques such as X ray diffraction and (3) taking account the influence of plants versus bacteria on silicate weathering.

4. CONCLUSIONS

This study demonstrates that pH lowering and metabolites by produced during heterotrophic bacterial activities could greatly accelerate Mg and Si release from phlogopite. Comparing bioleaching and chemical leaching experiments at similar pH, the fraction of elements released into solution was greater in presence of bacteria or citric acid when compared with nitric and gluconic acids experiments. Bacterial metabolism differs for one strain to another and induces substantial changes in solution pH; these changes had important consequences on the rate of elemental release from phlogopite compared to abiotic conditions. In our experiments, aerobic bacterial strains were more efficient to leach Mg during phlogopite weathering than facultative anaerobe bacteria.

In most experiments, no or very small Mg isotopic fractionation linked to the phlogopite leaching was highlighted. However, two tendencies could be distinguished especially with the highest leached Mg fractions obtained: (1) for experiments performed with HNO_3 and acidifying bacteria PS2, the Mg leached into solution was enriched in heavy isotope compared to phlogopite; (2) For experiments performed with citric acid, the Mg leached into solution was enriched in light isotope compared to phlogopite. However, whatever the model used to fit the majority of the data, the Mg isotopic fractionation factor was very low indicating no or a negligible fractionation during our experiments corresponding to the first event of bioleaching of phlogopite (closed system). Moreover, where high phlogopite dissolution rate is correlated with low pH, the Mg isotopic composition of leached solution is enriched in heavy isotopes. In experiments performed with chelating bacteria and citric acid, the high phlogopite dissolution rate was enriched in light isotopes especially at weak acid pH (4-6).

5. ACKNOWLEDGEMENTS

6. REFERENCES CITED

- Acker, J.G. and Bricker, O.P., 1992. The influence of pH on biotite dissolution and alteration kinetics at low temperature. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 56(8): 3073-3092.
- Anbar, A.D., 2003. Iron stable isotopes : beyond biosignatures. *Earth and Planetary Science Letters* 217, p223-236.
- Babu-Khan, S. et al., 1995. Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3): 972-978.
- Barker, W., Welch, S., Chu, S. and Banfield, J., 1998. Experimental observations of the effects of bacteria on aluminosilicate weathering. *American Mineralogist* 83, p 1551-1563
- Barman A. K., Varadachari C., and Ghosh K. (1992) Weathering of silicate minerals by organic acids. I. Nature of cation solubilisation. *Geoderma* **53**(1-2), 45-63.
- Beard, B., Johnson, C., Cox L., Sun, H., Nealson, K., and Aguilar C., 1999. Iron isotope biosignatures. *Science* 285, p1889-1892.
- Beard, B., Johnson, C., Nealson, K., Skulan, J., Cox L., and Sun H., 2002. Application of Fe isotopes to tracing the geochemical and biological cycling of Fe. *Chemical Geology* 195, p87-117
- Bennett, P.C., Hiebert, F.K. and Joo Choi, W., 1996. Microbial colonization and weathering of silicates in a petroleum-contaminated groundwater. *Chemical Geology*, 132(1-4): 45-53.
- Bennett, P.C., Rogers, J.R. and Choi, W.J., 2001. Silicates, Silicate Weathering, and Microbial Ecology. *Geomicrobiology Journal*, 18: 3-19.
- Black J. R., Epstein E., Rains W. D., Yin Q. Z., and Casey W. H. (2008) Magnesium-isotope fractionation during plant growth. *Environmental science and technology* **42**(21), 7831-7836.
- Black J. R., Yin Q.-z., and Casey W. H. (2006) An experimental study of magnesium-isotope fractionation in chlorophyll-a photosynthesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **70**(16), 4072-4079.
- Black J. R., Epstein E., Rains W. D., Yin Q. Z., and Casey W. H. (2008) Magnesium-isotope fractionation during plant growth. *Environmental science and technology* **42**(21), 7831-7836.

- Bolou Bi E. B., Poszwa A., and Vigier N. (2008) Experimental determination of magnesium isotope fractionation during higher plant growth. *Geophysical Research Abstracts* **10**(EGU2008-A-08852).
- Bolou-Bi, E.B., Vigier, N., Brenot, A. and Poszwa, A., 2009. Magnesium Isotope Compositions of Natural Reference Materials. *Geostandards and Geoanalytical Research*, 33(1): 95-109.
- Boyle J. R. and Voigt G. K. (1973) Biological weathering of silicate minerals. *Plant and Soil* **38**(1), 191-201.
- Brantley, S., Liermann L., and Bullen T., 2001. Fractionation of Fe isotopes by soil microbes and organic acids. *Geology* 29, p535-538
- Brantley, S., Liermann L., Guynn R., Anbar A., Icopini G., and Barling J., 2004. Fe isotopic fractionation during mineral dissolution with and without bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68, p3189-3204.
- Brenot, A., Cloquet, C., Vigier, N., Carignan, J. and France-Lanord, C., 2008. Magnesium isotope systematics of the lithologically varied Moselle river basin, France. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(20): 5070-5089.
- Carignan, J. et al., 2004. Reflection on Mg, Cd, Ca, Li and Si Isotopic Measurements and Related Reference Materials *Geoanalytical Research*, 28: 139-148.
- Chang, V.T.C., Williams, R.J.P., Makishima, A., Belshaw, N.S. and O'Nions, R.K., 2004. Mg and Ca isotope fractionation during CaCO₃ biomineralisation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 323(1): 79-85.
- Galy, A., Bar-Matthews, M., Halicz, L. and O'Nions, R.K., 2002. Mg isotopic composition of carbonate: insight from speleothem formation. *Earth and Planetary Science Letters*, 201(1): 105-115.
- Galy, A., Belshaw, N.S., Halicz, L. and O'Nions, R.K., 2001. High-precision measurement of magnesium isotopes by multiple-collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 208(1-3): 89-98.
- Galy, A. et al., 2003. Magnesium isotope heterogeneity of the isotopic standard SRM 980 and new reference materials for magnesium isotope ratio measurements. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18, p 1352-1356.
- Ganor, J., Mogollón, J.L. and Lasaga, A.C., 1995. The effect of pH on kaolinite dissolution rates and on activation energy. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59(6): 1037-1052.

- Golubev, S.V., Bauer, A. and Pokrovsky, O.S., 2006. Effect of pH and organic ligands on the kinetics of smectite dissolution at 25°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(17): 4436-4451.
- Gottschalk, G., 1986. Bacterial metabolism. Springer-Verlag New York.
- Hinsinger P., Jaillard B., and Dufey J. E. (1992) Rapid weathering of a trioctahedral mica by the roots of ryegrass. *Soil Science Society of America Journal* 56(3), 977-982.
- Hutchens, E., Valsami-Jones, E., McEldowney, S., Gaze, W. and McLean, J., 2003. The role of heterotrophic bacteria in feldspar dissolution - an experimental approach. *Mineralogical Magazine*, 67(6): 1157-1170.
- Leyval, C., Laheurte, F., Belgy, g. and berthelin, J., 1990. Weathering of micas in the rhizosphere of maize, pine and beech seedlings influenced by myccorhizal and bacterial inoculation. *Symbiosis*, 9: 105-109.
- Malmström, M. and Banwart, S., 1997. Biotite dissolution at 25°C: The pH dependence of dissolution rate and stoichiometry. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61(14): 2779-2799.
- Malmström, M., Banwart, S., Lewenhagen, J., Duro, L. and Bruno, J., 1996. The dissolution of biotite and chlorite at 25°C in the near-neutral pH region. *Journal of Contaminant Hydrology*, 21(1-4): 201-213.
- Mathur, R. et al., 2005. Cu isotopic fractionation in the supergene environment with and without bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol 69, p 5233-5246.
- Murakami, T., Utsunomya, S., Yokoyama, T. and Kasama, T., 2003. Biotite dissolution processes and mechanisms in the laboratory and in nature: Early stage weathering environment and vermiculization. *American mineralogist* 88: 377-386.
- Ra, K. and Kitagawa, H., 2007. Magnesium isotope analysis of different chlorophyll forms in marine phytoplankton using multi-collector ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 22: 817-821.
- Robert, M. and Berthelin, J., 1986. Role of biological and Biochemical factors in soil mineral weathering. *Soil science society of america*, 12: 453-495.
- Rogers, J.R. and Bennett, nutrients from silicates. *Chemical Geology*, 203(1-2): 91-108.
- Tipper, E.T., Galy, A. and Bickle, M.J., 2006. Riverine evidence for a fractionated reservoir of Ca and Mg on the continents: Implications for the oceanic Ca cycle. *Earth and Planetary Science Letters*, 247(3-4): 267-279.

-
- Tipper, E.T., Galy, A. and Bickle, M.J., 2008. Calcium and magnesium isotope systematics in rivers draining the Himalaya-Tibetan-Plateau region: Lithological or fractionation control? *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(4): 1057-1075.
- Vandevivere, P., Welch, S.A., Ullman, W.J. and Kirchman, D.L., 1994. Enhanced dissolution of silicate minerals by bacteria at near-neutral pH. *Microbial Ecology*, 27(3): 241-251.
- Welch, S.A. and Ullman, W.J., 1999. The effect of microbial glucose metabolism on bytownite feldspar dissolution rates between 5° and 35°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63(19-20): 3247-3259.
- Wieland, E. and Stumm, W., 1992. Dissolution kinetics of kaolinite in acidic aqueous solutions at 25°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 56(9): 3339-3355.
- Wollast, R., 1967. Kinetics of the alteration of K-feldspar in buffered solutions at low temperature. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 31(4): 635-648.
- Wombacher, F., Eisenhauer A., Heuser A. and Weyer S., 2006. Magnesium stable isotope compositions in biogenic CaCO₃. *Geophysical Research abstracts*, 8, A06353.
- Wu, L., Jacobson, A.D. and Hausner, M., 2008. Characterization of elemental release during microbe-granite interactions at T=28°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(4): 1076-1095.

Table captions

Table 1. Analysis and operating conditions description of bio- and chemical leaching experiments.

Table 2. General characteristics of bioreactors solutions.

* “ppm”; ⁺ Ratios between Mg and Si leached into solution and Mg and Si contained in phlogopite, exprimed in permil; "-" below detection

\$ MC-ICP-MS data were obtained using the Nu instrument (ENS, Lyon, 2 σ external precision 0.15‰). Reported values are the means of two or more replicate analysis of each sample

Table 3. General characteristics of reactors solutions in abiotic conditions.

* “ppm”; ⁺ Ratios between Mg and Si leached into solution and Mg and Si contained in phlogopite, exprimed in permil ; "-" below detection

\$ MC-ICP-MS data were obtained using the Nu instrument (ENS, Lyon, 2 σ external precision 0.15‰). Except for data in italic, which were obtained, using the Isoprobe (CRPG, Nancy, 2s external precision 0.20 ‰). Reported values are the means of two or more replicate analysis of each sample. "#" Organic acid concentration of 0.001M; "##" Organic acid concentration of 0.01M; "###" Organic acid concentration of 0.1M

Figure captions

Figure 1. Optical densities at 600 nm (a), Glucose concentrations (b) and pH (C) versus time for biotic experiments reactors. Data for experiments AR1 and PA1 only appear in panel (c); data for RA1 exp d only appears in panels (b) and (c).

Figure 2. Organic acids concentrations versus time for R1 experiments performed with RA1 and B1 experiments performed with Ps2.

Figure 3. Fraction of Mg leached into solution from phlogopite versus time for bio- and chemical leaching experiments.

Figure 4. Mg and Si release rates versus pH for all experimental reactors.

Figure 5. Mg/Si ratio in the course of time for all experimental reactors.

Figure 6. $\delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}}$ versus the fraction of dissolved Mg from phlogopite for (A) all experimental reactors indicated in table 2 and table 3, (B) Rayleigh distillation model to fit data calculated from equation 3 and (C) equilibrium fractionation equation calculated from equation 4.

Figure 7. (a) $\delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}}$ and phlogopite dissolution rates versus pH for all experimental reactors, (b) Comparison of $\Delta \delta^{26}\text{Mg}_{\text{Mg leached in solution}} - \delta^{26}\text{Mg}_{\text{initial-rocks*}}$ and Mg leached in solution versus pH for our data and data of Pogge von Strandmann et al., (2008).

* rocks = phlogopite for our data and basalt for those of Pogge von Strandmann et al., (2008).

Table 1.

Weathering agents	Experiments names	Sampling time (days)	Analysis					
			pH	OD600nm	Mg, Si l concentrations	Glucose remaining	Organic acids	$\delta^{26}\text{Mg}$ / DSM3
RA1	R1	1,2,3,4,5,6	x	x	x	x	x	
RA1	R2	1,2,3,6,9,13	x	x	x			x
RA1	R3	2,3,5,6,7,8,9,10,12	x	x	x	x		
RA1	R4	1,3,4,5,6	x	x	x	x		
PA1	P1	9,12	x	x	x			
AR1	A1	9,12	x	x	x			
PS2	B1	2,4,6	x	x	x	x	x	x
PS2	B2	2,4,6,9,12	x	x	x	x	x	x
HNO ₃	H1	1,2,3,4,5,6	x		x			x
HNO ₃	H2	1,2,3,4,5,6	x		x			
HNO ₃	H3	6,9	x		x			
HNO ₃	H4	3,6,9,12	x		x			
Gluconic acid ^{##}	G1	2,3,6	x		x			
Gluconic acid ^{##}	G2	2,3,6	x		x			
Gluconic acid ^{##}	G3	2,3,6,9	x		x			x
Gluconic acid [#]	G4	1,2,3,4,5,6	x		x			x
Citric acid [#]	C1	10,13	x		x			x
Citric acid [#]	C2	6	x		x			
Citric acid [#]	C3	1,2,3,5,6	x		x			x
Citric acid [#]	C4	1,2,3,5,6	x		x			x
Citric acid ^{##}	C5	1,2,3,5,6	x		x			
Citric acid ^{###}	C6	1,2,3,5,6	x		x			

Table 2.

Bacterial strains	Experiments names	Times (day)	pH	DO _{600nm}	F _{Mg} ⁺	F _{Si} ⁺	glc *	Gluconate *	Lactate *	Acetate *	Butyrate *	Formate *	Succinate *	Oxalate *	Citrate *	$\delta^{26}\text{Mg}_{\text{DSM3}}$ [§]
RA1	R1	1	5.2	0.120			1100	-	15.0	38.3	-	1.3	4.7	3.4	3.1	
		2	5.2	0.125			900	-	62.0	77.1	-	2.5	23.5	7.2	-	
		3	6.7	0.140	0.19	0.23	250	-	54.2	152.4	-	16.8	6.2	4.9	-	
		4	6.7	0.210			200	-	41.0	36.8	-	11.0	5.3	4.7	-	
		5	6.5	0.200			150	-	43.1	2.9	-	9.8	4.3	5.1	-	
		6	6.7	0.210	0.29	0.30	100	-	37.1	0.0	-	8.3	4.2	5.4	-	
RA1	R2	2	5.0													
		3	5.1		0.30	0.19										-1.41 +/- 0.07
		6	4.8		0.38	0.29										
		9	4.7		0.49	0.31										-1.31 +/- 0.03
		13	4.6		0.59											
RA1	R3	2	4.6	0.118			1261									
		3	4.6	0.147	0.31		1231									
		5	4.8	0.127			1017									
		6	4.6	0.120	0.43	0.29	1020									
		9	4.6	0.127			970									
		10	4.4	0.118	0.57	0.40	900									
		13	4.5	0.117	0.60		800									
RA1	R4	3	4.2	0.076	0.15											
		4	4.2	0.081												
		5	4.2	0.091			1080									
		6	4.2	0.096	0.20	0.22	1070									
PA1	P1	9	4.7		0.51	0.35										
		12	3.9		0.74	0.57										-1.39 +/- 0.09
AR1	A1	9	4.5		0.53	0.39										
		12	4.5		0.56	0.44										-1.23 +/- 0.03
PS2	B1	2	3.5	0.050			940	1400.8	-	-	24	-	-	-	-	
		4	3.5	0.043	0.55	0.60	640	1635.3	-	-	44	-	-	-	-	
		6	3.5	0.055	0.80	1.01	420	1675.2	-	-	47	-	-	-	-	-1.09 +/- 0.03
PS2	B2	2	3.3	0.050			600	1607.8	-	-	21	-	-	-	-	
		4	3.5	0.054	0.53	0.58	450	2155.7	-	-	39	-	-	-	-	
		6	3.5	0.055	0.76	0.96	290	2360.1	-	-	31	-	-	-	-	
		9	3.5	0.050	0.97	1.21	280	2257.5	-	-	26	-	-	-	-	
		12	3.5	0.080	1.26		260	2486.4	-	-	54	-	-	-	-	-0.88 +/- 0.05

Table 3.

Weathering agent	Experiments names	Times (day)	pH	F _{Mg} ⁺	F _{Si} ⁺	Gluconate *	Citrate *	δ ²⁶ Mg _{DSM3} [§]
HNO ₃	H1	1	2.5	0.41	0.41			
		2	2.5	0.67	0.67			
		3	2.5	0.82	0.81			
		4	2.5	0.95	0.96			
		5	2.5	1.10	1.09			
		6	2.5	1.20	1.19			-0.82 +/- 0.02
HNO ₃	H2	1	4.0	0.05				
		2	4.2	0.14				
		3	4.0	0.18	0.19			
		4	4.0	0.19				
		5	4.0	0.20				
		6	4.0	0.21	0.22			
HNO ₃	H3	6	5.4					
		9	5.6	0.27				
HNO ₃	H4	3	3.5	0.32	0.35			
		6	3.6	0.51	0.56			
		9	3.5	0.57				
		12	3.5	0.63	0.67			
Gluconic acid ##	G1	2	3.4			1669		
		3	3.2	0.38	0.36	1669		
		6	3.5	0.45	0.42	1669		
Gluconic acid ##	G2	2	3.5			1669		
		3	3.4	0.32		1669		
		6	3.6	0.43		1669		
Gluconic acid ##	G3	2	3.4			1669		
		3	3.5	0.32	0.35	1669		
		6	3.4	0.49	0.52	1669		
		9	3.4	0.56	0.6	1669		-1.02 +/- 0.25
Gluconic acid #	G4	1	3.5			166.9		
		2	3.6			166.9		
		3	3.6	0.30	0.32	166.9		
		5	3.6			166.9		
		6	3.6	0.38	0.40	166.9		-1.22 +/- 0.05
Citric acid #	C1	10	5.7	0.9	0.94		163.9	
		13	6.2	0.9	0.98		163.9	-1.52 +/- 0.06
Citric acid #	C2	6	5.2	0.30			163.9	
Citric acid #	C3	1	4.6				163.9	
		2	4.6				163.9	
		3	4.6	0.25	0.24		163.9	
		5	4.6				163.9	
		6	5.7	0.30	0.31		163.9	-1.43 +/- 0.02
Citric acid #	C4	1	3.5				163.9	
		2	3.5				163.9	
		3	3.6	0.42	0.43		163.9	
		5	3.7				163.9	
		6	3.6	0.53	0.56		163.9	-1.42 +/- 0.07
Citric acid ##	C5	1	5.2				1639	
		2	5.3				1639	
		3	5.3	0.21	0.37		1639	
		5	5.2				1639	
		6	5.2	0.29	0.50		1639	
Citric acid ###	C6	1	5.3				16390	
		2	5.4				16390	
		3	5.3	0.23	0.39		16390	
		5	5.3				16390	
		6	5.3	0.3	0.51		16390	

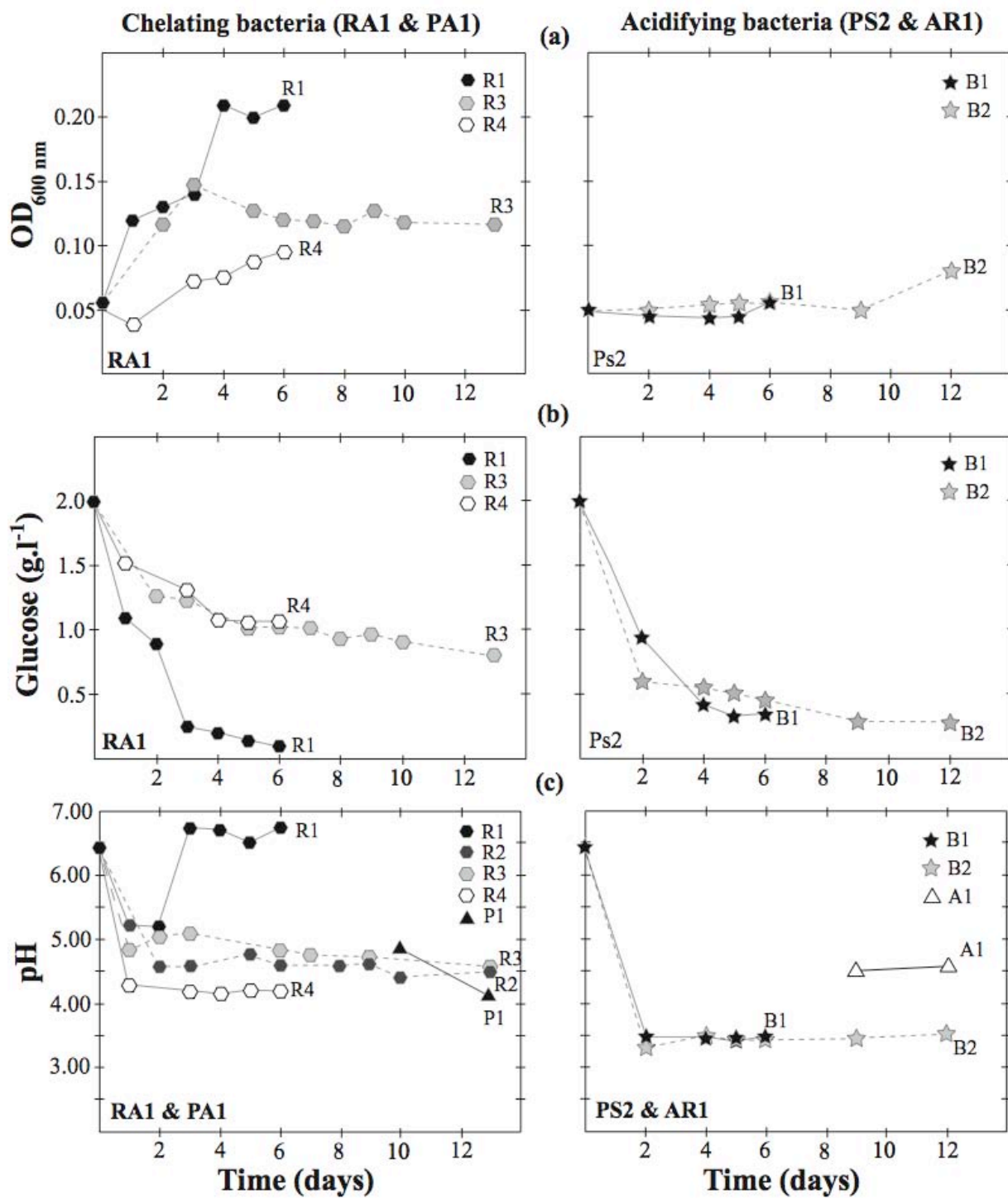


Figure 1.

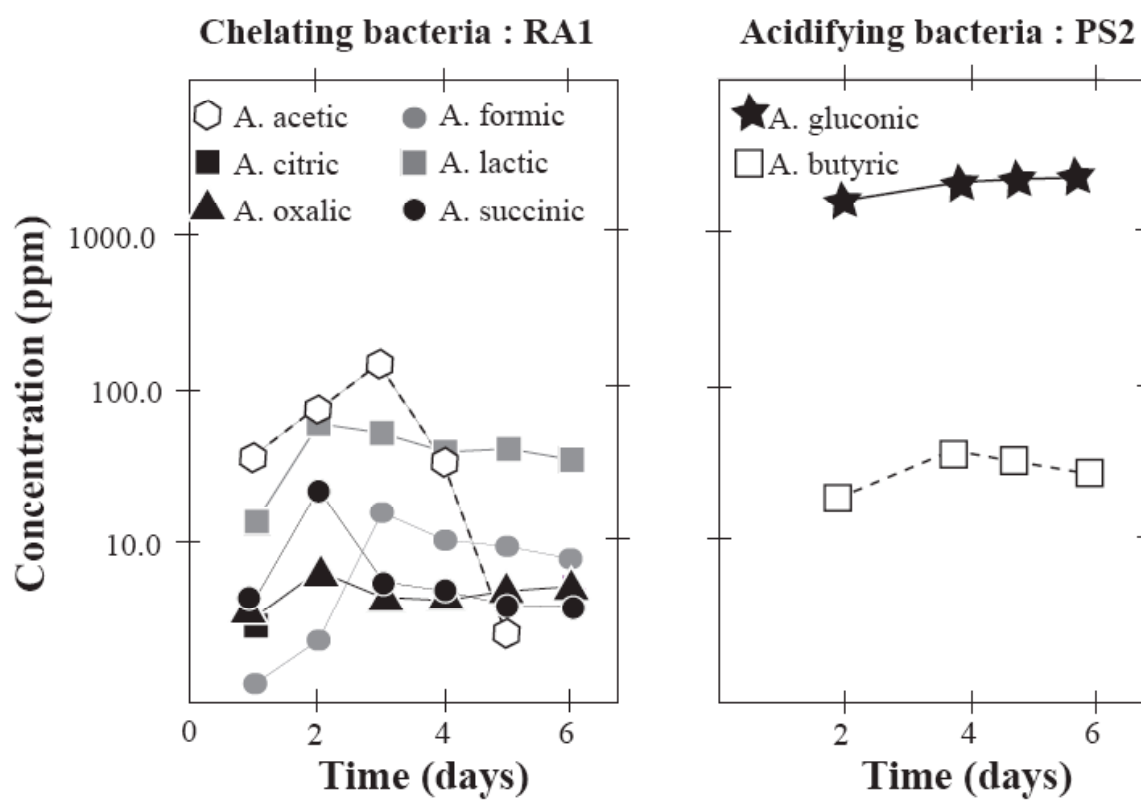


Figure 2.

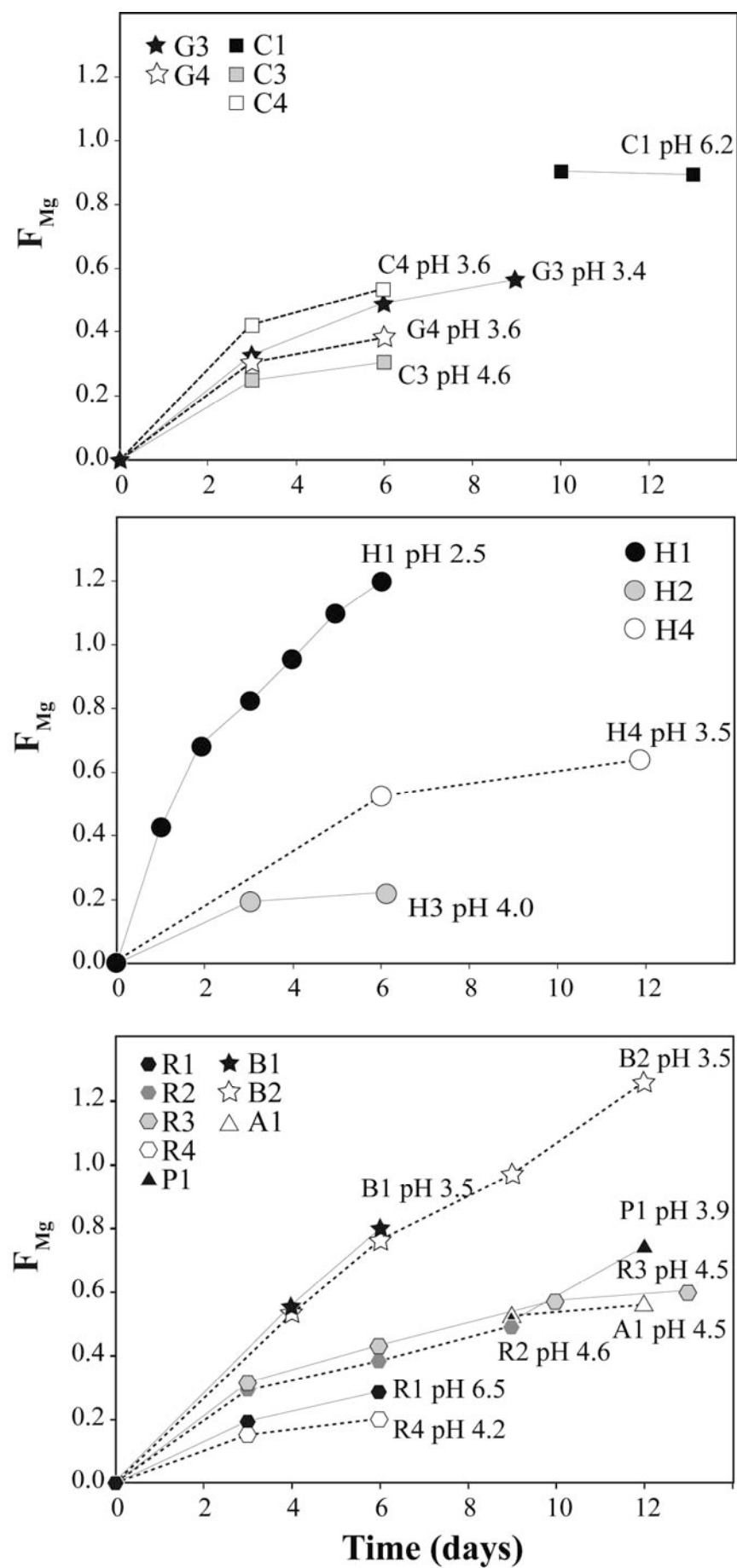


Figure 3.

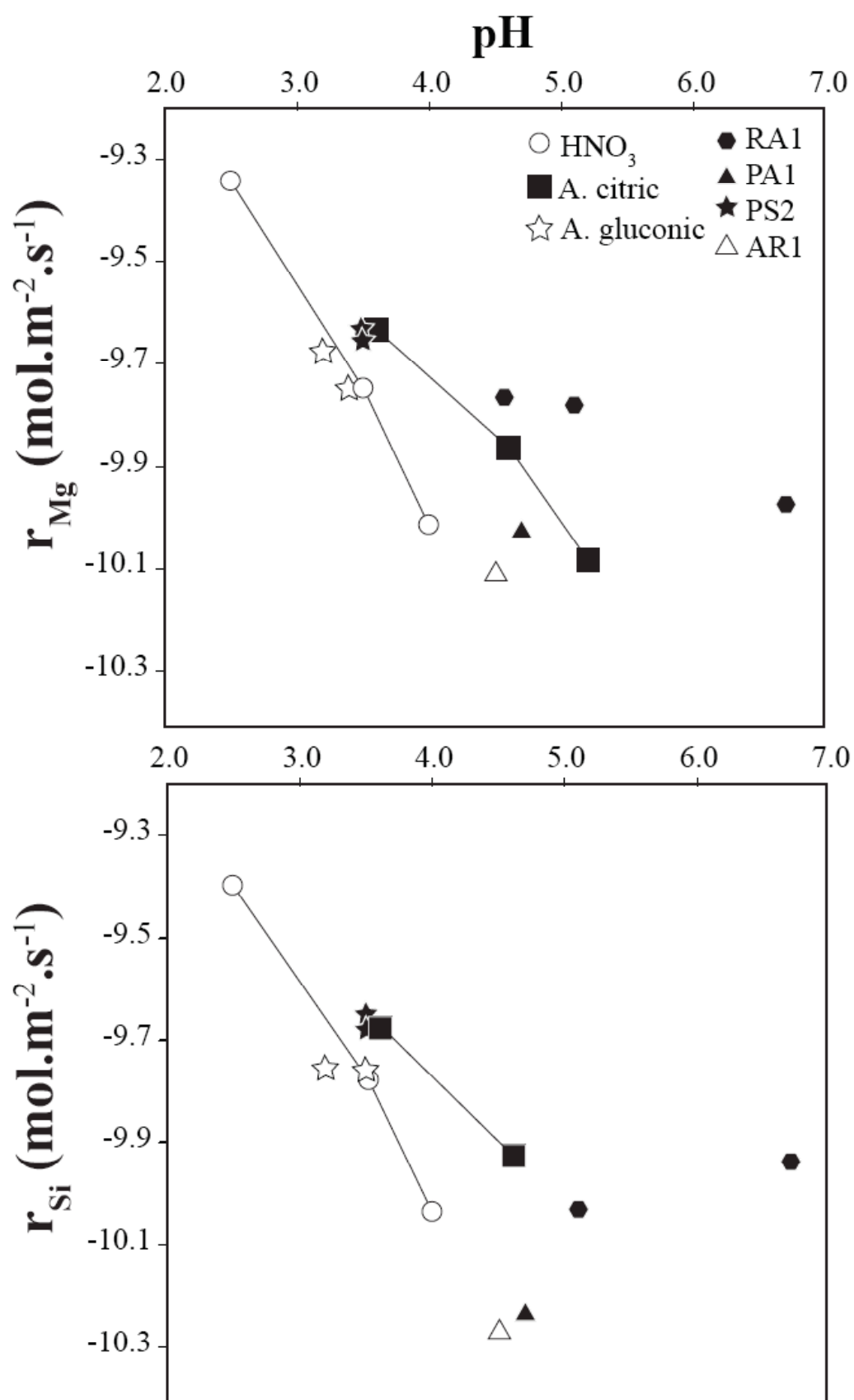


Figure 4.

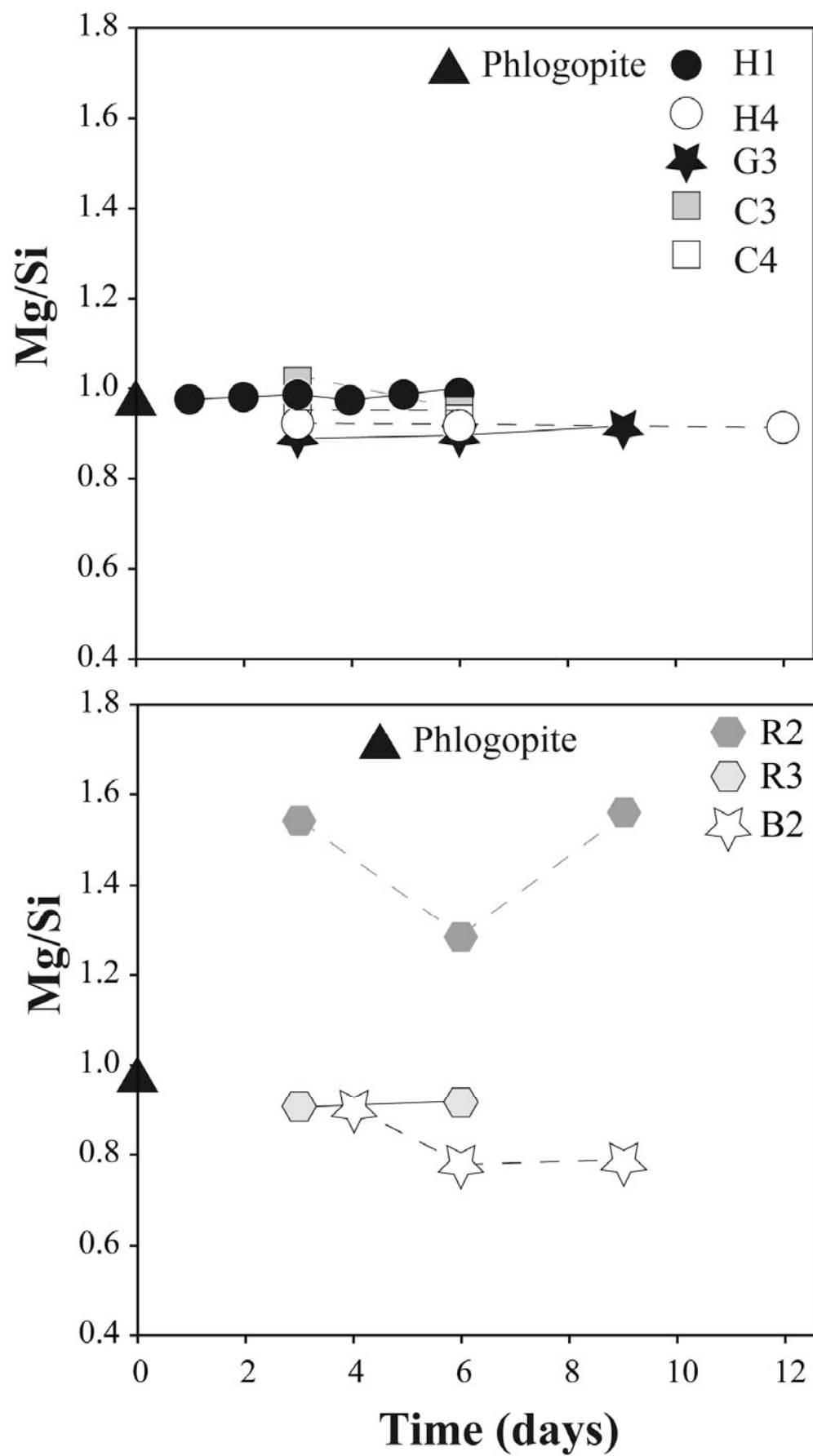


Figure 5.

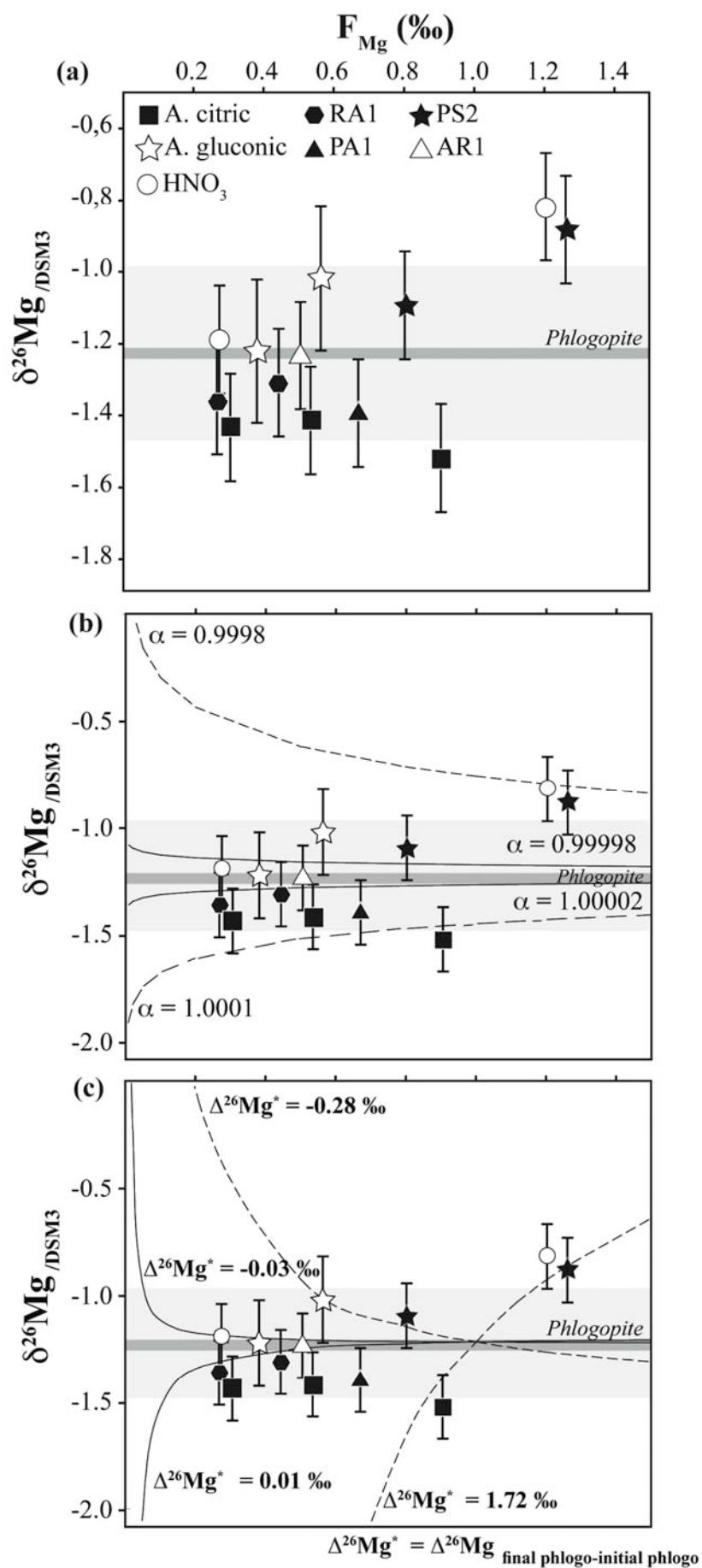


Figure 6.

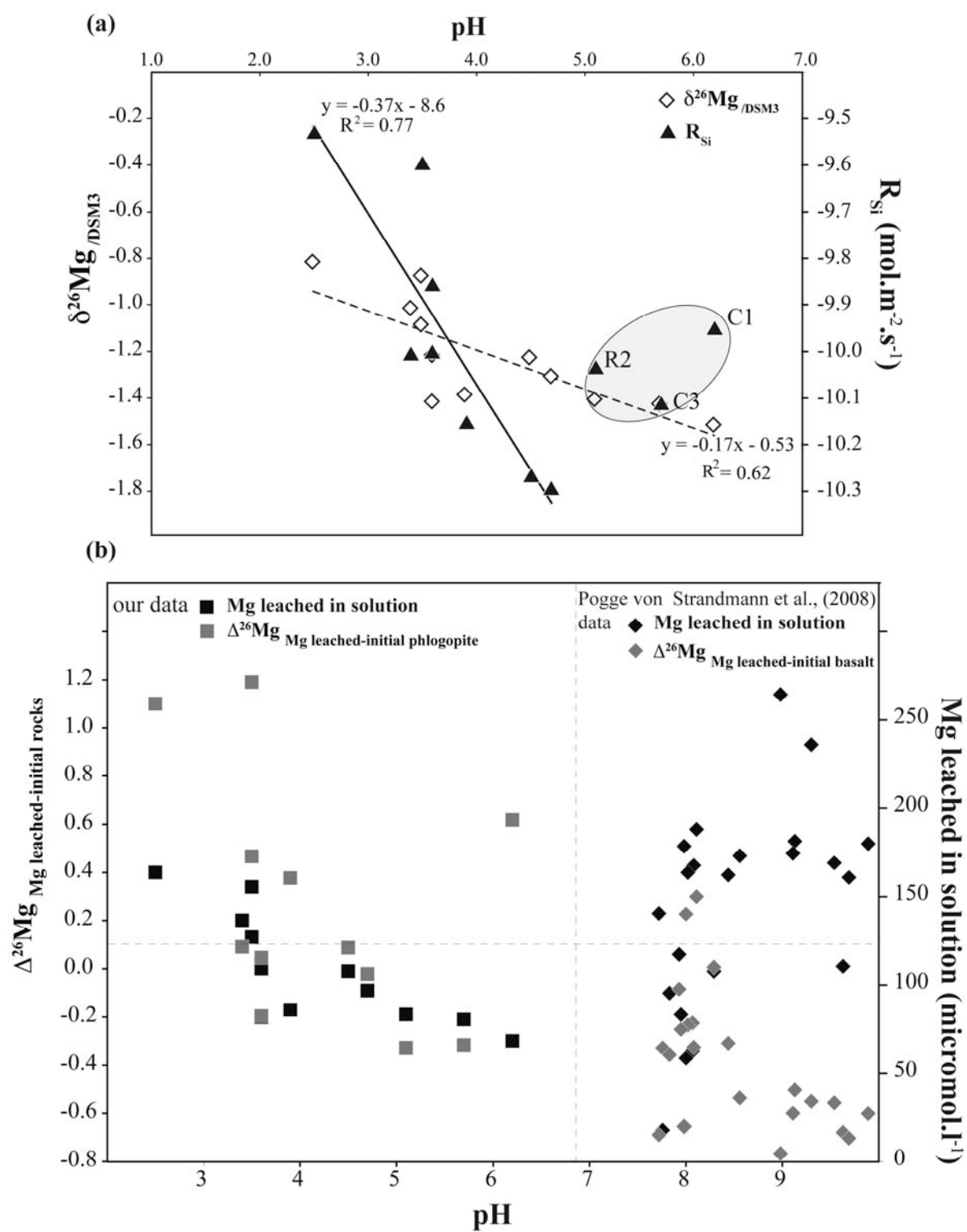


Figure 7

"Experimental characterization of the relationship between soil bacteria, phyllosilicates and solutions: modeling and role of environmental parameters".

Abstract:

The bacteria, through their diversity and activities play an important role in soil functioning. They are actively involved in the degradation of organic matter (OM) and this function is often used as an indicator of the biological quality of soils. The heterotrophic bacteria are also involved directly or not to the weathering of silicate minerals (group of primary and secondary minerals in soils). The silicate weathering controlled the leaching of essential major mineral elements (e.g. Fe, Mg) in solution, the neutralization of acids in soils (from atmospheric deposition, degradation of litter, biological activity) and the sequestration of atmospheric CO₂. This step is therefore essential to maintaining soil fertility in terrestrial ecosystems. However, although the main weathering processes of silicates are well known in aerobic (i.e. the proton- and ligand-promoted dissolution), this function of bacterial weathering of silicate minerals has never been used as a biological indicator of soil fertility. In fact, there is no simple standardized method to identify these processes, especially when they can be accelerated or enhanced by more or less specific root and / or microbial activities.

The first aim of this work was therefore to identify the process of weathering in two phyllosilicates (biotite, phlogopite) by heterotrophic bacteria and their variability. The originality of this work is to use an empirical model of silicates weathering based on the activity of protons and ligands to identify and study the interactions between bacteria and minerals. Tracing of weathering processes by isotopic approach using stable isotopes of magnesium has also been tested. The second aim of this work was to correlate the "silicate weathering" function of bacterial communities of various soils in field conditions.

This study confirms that the partial oxidation of glucose to organic acids is the predominant mechanism by which bacteria accelerate the leaching of elements (Fe, Mg...) under aerobic conditions during the weathering of biotite and phlogopite especially at pH close to neutrality. The results demonstrate that bacteria secrete organic acids. The nature and quantity of these acids depend on the nature of limiting nutrients and more generally the experimental conditions of growth. The empirical model used has been adapted to compare the initial release rate of iron (and other elements) in bacterial and abiotic weathering of mica to identify the two major processes (i.e. the proton- and ligand-promoted dissolution) involved. This approach highlighted the identification of phenotypes according to the metabolism and the competence of the bacterial strains used. The study with stable isotopes of Mg as tracers of weathering showed no fractionation during the proton- and ligand-promoted dissolution. Two tendencies could however be highlighted and appear accentuated when the fraction of Mg leached increases: (1) where the dominant process is the the proton-promoted dissolution, Mg leach solution is enriched in heavy isotopes compared to the isotopic composition of phlogopite (2) when the dominant process is the ligand-promoted dissolution, Mg leach solution is enriched in light isotopes compared with phlogopite.

Using the model in the second part of this work showed that the silicate weathering potential by microbial communities depends on their origin and in particular the contents of organic matter and nutrients (exchangeable cations) of soil horizons sampled. Two strategies of silicate weathering in these communities have been identified: (1) the bacterial communities isolated from organic and mineral nutrient-rich horizons released few organic acids, but very chelating. They have a slow metabolism (strategy = K) and very efficient, allowing a substantial release of iron, (2) communities isolated from organic and mineral nutrient-poor horizons release many low chelating organic acids. Their rapid metabolism (r = strategy) promotes the formation of new cells, but not an efficient release of iron.

Finally, the interdisciplinary approach proposed in this work to identify and characterize the weathering of phyllosilicates by soil heterotrophic bacteria or communities in different environments. It provides a original and promising tool for identifying functional to evaluate the quality of natural soils or follow the restoration of anthropic soil.

KEY WORDS: bacteria, phyllosilicates, weathering, organic acids, soil

« Caractérisation expérimentale des relations entre les bactéries des sols, les phyllosilicates et les solutions : modélisation et rôle des paramètres environnementaux ».

Résumé :

Les bactéries, via leur diversité et leurs activités, jouent un rôle important dans le fonctionnement des sols. Elles participent activement à la dégradation des matières organiques (MO) et cette fonction est souvent utilisée comme indicateur de la qualité biologique des sols. Les bactéries hétérotrophes participent aussi activement, directement ou indirectement, à l'altération des silicates, groupe prédominant de minéraux primaires et secondaires dans les sols. L'altération des silicates contrôle en partie la lixiviation d'éléments minéraux majeurs essentiels (Fe, Mg) en solution, la neutralisation d'acides dans les sols (issus des dépôts atmosphériques, de la dégradation des litières, de l'activité biologique), et la séquestration du CO₂ atmosphérique. Cette étape clé est donc essentielle au maintien de la fertilité des sols dans les écosystèmes continentaux. Cependant, même si les principaux processus d'altération des silicates sont bien connus en milieu aérobie (i.e. l'acidolyse et la complexolyse), cette fonction d'altération bactérienne des silicates n'a jamais été utilisée comme indicateur biologique de la fertilité des sols. En fait il n'existe pas de méthode simple standardisée d'identification de ces processus surtout lorsque ceux-ci peuvent être accélérés ou amplifiés par des activités racinaires et/ou microbiennes plus ou moins spécifiques.

Le premier objectif de ce travail de thèse a donc été d'identifier les processus d'altération de deux silicates modèles (biotite, phlogopite) par des bactéries hétérotrophes ainsi que leur variabilité. L'originalité de ce travail est d'utiliser un modèle d'altération empirique basé sur l'activité des protons et ligands pour identifier et étudier les interactions entre les bactéries et les minéraux. Le traçage des processus d'altération par une approche isotopique utilisant les isotopes stables du magnésium a également été testé. Le second objectif de la thèse a été de corrélérer la fonction d'altération de communautés bactériennes aux conditions naturelles rencontrées dans différents sols.

Ce travail confirme que l'oxydation partielle du glucose en acides organiques est le mécanisme prédominant par lequel les bactéries amplifient la lixiviation d'éléments (Fe, Mg...) en condition aérobie lors de l'altération de la biotite et de la phlogopite, surtout pour des pH proches de la neutralité. Les résultats démontrent que les bactéries sécrètent des acides organiques dont la nature et la quantité sont fonction de la nature des nutriments limitants et plus généralement des conditions expérimentales de croissances. Le modèle empirique utilisé a été adapté pour permettre de comparer les taux de libération initiaux du fer (et d'autres éléments) lors de l'altération abiotique et bactérienne de micas afin d'identifier les deux processus majeurs (acidolyse et complexolyse) impliqués. Cette approche a permis de mettre en évidence des phénotypes d'altération en fonction du métabolisme et la compétence des souches bactériennes utilisées. L'étude menée avec les isotopes stables du Mg comme traceurs d'altération n'a pas montré de fractionnements signant chaque processus. Deux tendances ont pu cependant être mises en évidence et semblent accentuées lorsque la fraction de Mg lixivié augmente : (1) lorsque le processus dominant est l'acidolyse, le Mg lixivié en solution est enrichi en isotopes lourds par rapport à la composition isotopique de la phlogopite (2) lorsque le processus dominant est la complexolyse, le Mg lixivié en solution est enrichi en isotopes légers par rapport à la phlogopite.

L'utilisation du modèle dans la seconde partie de ces travaux a permis de montrer que le potentiel d'altération des silicates par les communautés bactériennes dépend de leur origine et en particulier des teneurs en matière organique et en nutriments (cations échangeables) des horizons de sols échantillonnés. Deux stratégies d'altération des silicates par ces communautés ont pu être mises en évidence : (1) les communautés bactériennes isolées des horizons riches en MO libèrent peu d'acides organiques, mais très complexants. Elles ont un métabolisme lent (= stratégie K) et très efficace, permettant une libération importante de fer, (2) les communautés isolées d'horizons pauvres en MO libèrent beaucoup d'acides organiques avec un faible pouvoir complexant. Leur métabolisme rapide (= stratégie r) favorise la formation de nouvelles cellules, mais pas une libération efficace du fer.

Pour conclure, l'approche interdisciplinaire proposée dans ce travail permet d'identifier et de caractériser les processus d'altération de phyllosilicates par des bactéries ou des communautés hétérotrophes du sol dans différents environnements. Elle offre un outil d'identification fonctionnel original et prometteur pour évaluer la qualité des sols naturels ou suivre la restauration des sols anthropisés.

MOTS CLES : bactéries, phyllosilicates, altération, acides organiques, sols