



HAL
open science

Biominéralisation et réactivité de la rouille verte carbonatée par *shewanella putrefaciens* en système hétérogène fermé et en écoulement continu

Anne-Sophie Sergent

► **To cite this version:**

Anne-Sophie Sergent. Biominéralisation et réactivité de la rouille verte carbonatée par *shewanella putrefaciens* en système hétérogène fermé et en écoulement continu. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0355 . tel-01749665

HAL Id: tel-01749665

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749665>

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>



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

Ecole doctorale BioSe (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par Anne-Sophie SERGENT

**BIOMINERALISATION ET REACTIVITE DE LA ROUILLE VERTE CARBONATEE
PAR *SHEWANELLA PUTREFACIENS* EN SYSTEME HETEROGENE FERME ET EN
ECOULEMENT CONTINU**

Le 29 novembre 2012

MEMBRES DU JURY :

Rapporteurs :

Mme Mélanie DAVRANCHE

**MC HDR, Géosciences CNRS - Université de
Rennes 1**

Mr Philippe REFAIT

Pr, LaSIE, CNRS - Université de La Rochelle

Examineurs :

Mr Christian MUSTIN

DR, LIMOS, CNRS - Université de Lorraine

Mr Bruno LARTIGES

Pr, LMTG, CNRS - Université de Toulouse

Mr Frédéric JORAND

**MC HDR, LCPME, CNRS - Université de
Lorraine, directeur de thèse**

Mr Khalil HANNA

**Pr, Sciences Chimiques de Rennes, CNRS -
ENSC Rennes, co-directeur de thèse**

Il faut faire de la vie un rêve et faire d'un rêve une réalité.

Pierre Curie (1859-1906)

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Jean-Claude BLOCK et Monsieur Alain WALCARIUS de m'avoir acceptée en thèse au sein du Laboratoire de Chimie Physique Microbiologie pour l'Environnement.

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse et mon co-directeur de thèse, Monsieur Frédéric JORAND et Monsieur Khalil HANNA, pour m'avoir guidée tout au long de ce travail et de m'avoir accompagnée dans la réflexion et dans la rédaction de ce mémoire. Merci de m'avoir fait grandir scientifiquement et de m'avoir ouvert les yeux sur le monde.

Je remercie aussi toutes les personnes qui ont participé à ce travail, je pense à Jean-Sébastien MONDY, Sébastien GOURHAND (ICP-AES), Guirec OLLIVIER et Isabelle BIHANNIC (DRX), Jaafar GANBADJA (MET), Christelle DESPAS et Sébastien NAILLE (chromatographie ionique), Sandrine MATHIEU (MEB).

Je remercie également Kevin BARTHELEMY, Asfaw ZEGEYE, Majorie ETHIQUE, Mathieu ETIENNE, Jean-Paul MOULIN, Gérard PACQUOT, Christelle CHARBAUT, Marie TERCIER et Jacqueline DRUON pour toutes les discussions scientifiques ou non que nous avons pu avoir et votre sourire.

Merci à Alice, Fatima, Amandine et Hadrien pour leur travail et leur motivation. Merci à Carole, Claire, Jérhémy, Ludovic, Alexis

Remerciements

et Julien ainsi que tous les étudiants que j'ai eu le plaisir de rencontrer et grâce à qui j'ai découvert ma passion de l'enseignement.

Merci à Claire FOURREY de m'avoir encadrée pendant mes trois années de monitorat.

Je remercie sincèrement Erell LE GUEN et Paul-Philippe REMY pour tout ce que vous m'avez apporté tant personnellement que professionnellement.

Je remercie Hélène, Denis et Emeline pour leur soutien et leur encouragement.

Sandrine, Christophe, Pauline, Jérémy, Nicolas, Thierry, Angélique, Doriane, Margaux, Antoine, Aurélie, Hervé, Matthieu, Paul et Valentine, merci d'exister !!! Vous êtes ma force et mon courage.

Papa et Maman, les mots me manquent pour vous dire combien je tiens à vous et combien je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi. Chaque ligne de ce manuscrit est un petit bout de vous.

Merci à Arnaud (Bou) de m'avoir accompagnée et soutenue. Tu as été le premier à croire en moi et me dire que je pouvais y arriver. Tu as fait de moi quelqu'un de bien, tu es mon bonheur.

Remerciements

Je garde le meilleur pour la fin, à ma Lily-Rose. Tu es la plus belle chose qui me soit arrivée. Tu as participé avec moi à de nombreuses conférences et réunions quand tu étais dans mon ventre et puis tu m'as accompagnée tout au long de la rédaction de ce mémoire. Ton sourire et ta présence ont été une force et jamais un obstacle. Je suis fière d'être ta maman et de t'avoir donnée naissance en même temps que cette thèse.

Et merci à tous ceux que j'aurais pu oublier...

Anne-Sophie SERGENT

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	5
LISTE DES FIGURES	14
LISTE DES TABLEAUX	20
INTRODUCTION	23
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	27
I. LES OXYDES DE FER.....	28
1. LES OXYDES DE FE(III).....	31
a. La goethite α -FeOOH.....	31
b. La lépidocrocite γ -FeOOH.....	31
c. La ferrihydrite.....	34
2. LES OXYDES DE FE(II).....	34
a. Les carbonates ferreux : la chukanovite $\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$ et la sidérite (FeCO_3).....	34
b. La magnétite Fe_3O_4	36
c. Les rouilles vertes	37
II. FER ET BACTERIES.....	40
1. REDUCTION ASSIMILATRICE.....	41
2. REDUCTION DISSIMILATRICE	41
3. SHEWANELLA PUTREFACIENS.....	42
4. INTERACTION FER ET BACTERIES.....	44
III. SYNTHESE DE MINERAUX DE TYPE ROUILLE VERTE EN CONDITION « BATCH »	49
1. FACTEURS INFLUENÇANT LA FORMATION PAR VOIE MICROBIENNE DE ROUILLE VERTE OU DE MAGNETITE.....	49
2. SYNTHESE PAR VOIE ABIOTIQUE.....	53
IV. BIOMINERALISATION DE MINERAUX SECONDAIRES DU FER EN CONDITION DE FLUX.....	56
1. LA PLACE DES MINERAUX DANS LES SOLS.....	56
2. ETABLISSEMENT DE LA COLONNE SOUMIS EN FLUX HYDRAULIQUE	59
MATERIEL ET METHODES	63
I. PREPARATION DES CULTURES BACTERIENNES	64
II. SYNTHESE DES PHASES SOLIDES	67
1. LEPIDOCROCITE γ -FEOOH	67
2. LEPIDO-COATED-SAND (LCS)	67
III. ENUMERATION ET VIABILITE DES BACTERIES	69
1. ENUMERATION DES BACTERIES AU SYBR GREEN II.....	69
2. ESTIMATION DU NOMBRES DE CELLULES VIABLES : KIT DE VIABILITE BACLIGHT	69
3. EVALUATION DU NOMBRES DE BACTERIES RESPIRANTES : CTC.....	70

Sommaire

IV. METHODES D'ANALYSE DES SOLUTIONS	72
1. DOSAGE COLORIMETRIQUE DU FER	72
a. Dosage par la méthode de la phénanthroline	72
b. Dosage par ICP-AES.....	72
2. DOSAGE DES IONS FORMIATES : CHROMATOGRAPHIE IONIQUE.....	73
3. DOSAGE DES SILICATES : ICP-AES	73
V. METHODES D'ANALYSES DES SOLIDES.....	74
1. DIFFRACTION DES RAYONS X.....	74
2. SPECTROMETRIE MÖSSBAUER PAR TRANSMISSION	74
3. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (MET)	74
4. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (MEB)	75
CHAPITRE I : BIOREDUCTION DE LA LEPIDOCROCITE EN SYSTEME FERME PAR SHEWANELLA PUTREFACIENS.....	77
PARTIE A : BIOREDUCTION DE LA LEPIDOCROCITE EN SYSTEME FERME PAR SHEWANELLA PUTREFACIENS EN PRESENCE D'UNE PHASE « SILICE »	80
EFFECTS OF SI-BEARING MINERALS ON THE NATURE OF SECONDARY IRON MINERAL PRODUCTS FROM LEPIDOCROCITE BIOREDUCTION. CHEMICAL GEOLOGY 289(1-2): 86-97.....	81
ABSTRACT	81
I. INTRODUCTION.....	82
II. MATERIALS AND METHODS.....	85
1. CHEMICALS.....	85
2. PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF SOLID SAMPLES.....	85
3. PREPARATION OF DENSE SHEWANELLA PUTREFACIENS CELL SUSPENSION.....	87
4. BIOREDUCTION EXPERIMENTS.....	87
5. ABIOTIC SYNTHESIS OF CARBONATE GREEN RUST AND IMPACT OF AQUEOUS AND COLLOIDAL SILICA ON THE STABILITY OF CHEMICALLY FORMED GREEN RUST	89
III. RESULTS.....	90
1. INFLUENCE OF SILICA SAND LOADING AND PARTICLE SIZE DISTRIBUTION ON THE FORMATION OF SECONDARY MINERALIZATION PRODUCT.....	90
2. EFFECT OF AQUEOUS SILICATE CONCENTRATION ON THE SECONDARY IRON BIOMINERALIZATION	95
3. EFFECT OF SI ON THE FE(II) PRODUCTION RATE	98
4. EFFECT OF SI SPECIES ON THE STABILITY OF ABIOTIC SYNTHESIZED GREEN RUST	103
IV. DISCUSSION	105
1. STABILIZATION EFFECT OF SI.....	105
2. DECREASE OF INITIAL BIOREDUCTION RATE	109
3. HETEROAGGREGATION OF QUARTZ PARTICLES AND FE-OXIDES.....	110
V. CONCLUSIONS	113

Sommaire

PARTIE B. CONTRIBUTION DE POLYMERES NEUTRES OU ANIONIQUES A LA FORMATION DE ROUILLE VERTE CARBONATEE ISSUE DE LA BIOREDUCTION DE LEPIDOCROCITE PAR SHEWANELLA PUTREFACIENS.....	114
CONTRIBUTION OF ANIONIC VS NEUTRAL POLYMERS TO THE FORMATION OF GREEN RUST 1 FROM γ-FEOOH BIOREDUCTION.....	116
ABSTRACT	116
I. INTRODUCTION.....	117
I. MATERIALS AND METHODS.....	122
1. LEPIDOCROCITE STOCKS AND SYNTHESIS.....	122
2. PREPARATION OF THE RESTING CELL SUSPENSION.....	122
3. ORGANIC POLYMERS.....	123
4. BIOREDUCTION MEDIUM.....	123
5. INCUBATION FOR THE BIOTIC SYNTHESIS OF THE GR1(CO ₃ ²⁻).....	123
6. INCUBATION FOR THE ABIOTIC SYNTHESIS OF THE GR1(CO ₃ ²⁻).....	124
7. PHYSIC AND CHEMICAL ANALYSIS.....	124
a. Fe ^{II} analysis and reduction rate.....	124
b. Granulometric analysis.....	125
c. Electrokinetic Measurements.....	125
d. X-ray Diffraction (XRD), transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM).....	125
II. RESULTS.....	127
1. PHYSICAL INTERACTIONS OF CELLS AND POLYMERS WITH THE Γ -FEOOH.....	127
a. Effect of polyacrylic acid (PAA).....	127
b. Effect of polyacrylamide (PAM).....	128
c. Effect of the dead cells.....	129
2. BIOREDUCTION OF LEPIDOCROCITE.....	130
3. INFLUENCE OF ADDITIVES ON THE SECONDARY IRON MINERAL FORMATION (BIOTIC CONDITIONS).....	133
a. Effect of cell densities and autoclaved cells.....	133
b. Polyacrylic acid addition.....	133
c. Polyacrylamide.....	134
d. AQDS.....	137
e. Crystal morphology.....	137
4. INFLUENCE OF ADDITIVES IN ABIOTIC CONDITIONS.....	140
III. DISCUSSION	141
1. SURFACE INTERACTION OF PAA AND PAM WITH IRON OXIDE.....	141
2. THE EFFECT OF AGGREGATION.....	143
3. EFFECT OF POLYMERS AND CELLS ON THE GR STABILITY.....	143
4. CONCEPTUAL MODEL FOR GR AND MAGNETITE FORMATION.....	145
IV. CONCLUSION AND ENVIRONMENTAL IMPLICATIONS	148
ACKNOWLEDGEMENTS	148

Sommaire

CHAPITRE II : ETUDE DE LA REACTIVITE DE LA ROUILLE VERTE CARBONATEE SYNTHETISEE PAR VOIE MICROBIENNE ET PAR VOIE CHIMIQUE VIS-A-VIS D'UN POLLUANT ORGANIQUE ET D'UN POLLUANT METALLIQUE.153

I.	INTRODUCTION.....	157
II.	MATERIEL ET METHODES.....	160
1.	SYNTHESE DES ROUILLES VERTES CARBONATEES.....	160
2.	PREPARATION DE LA SOLUTION DE ROUGE DE METHYLE ET DOSAGE.....	160
3.	INCUBATION DU ROUGE DE METHYLE AVEC LES ROUILLES VERTES.....	161
4.	PREPARATION DE LA SOLUTION DE MERCURE ET DOSAGE.....	162
5.	INCUBATION DU MERCURE AVEC LES ROUILLES VERTES.....	162
III.	RESULTATS.....	164
1.	SUIVI DE LA REDUCTION DU ROUGE DE METHYLE.....	164
2.	SUIVI DE LA BIOREDUCTION DU MERCURE.....	167
IV.	DISCUSSION.....	170
1.	INFLUENCE DE L'ORIGINE DES ROUILLES VERTES SUR LA REACTIVITE.....	170
2.	INFLUENCE DES POLYMERES ET DES SILICATES SUR LA REACTIVITE DE LA ROUILLE VERTE.....	172
3.	INFLUENCE DE LA FORME DE FE SUR LA REDUCTION.....	172
V.	CONCLUSION.....	173

CHAPITRE III : BIOREDUCTION DE LA LEPIDOCROCITE PAR SHEWANELLA PUTREFACIENS DANS UN SYSTEME EN FLUX CONTINU177

I.	INTRODUCTION.....	177
II.	MATERIEL ET METHODES.....	179
1.	MILIEU POREUX CONTENU DANS LA COLONNE.....	179
2.	TRAÇAGE ET DETERMINATION DU REGIME HYDRODYNAMIQUE.....	179
a.	Dispositif expérimental et colonne de LCS.....	180
b.	Le traçage et caractérisation du régime hydrodynamique.....	182
3.	SUIVI DE LA BIOREDUCTION EN COLONNE.....	185
4.	ANALYSE DES SOLIDES DE LA COLONNE.....	187
c.	Microscopie électronique à transmission.....	187
d.	Diffraction aux rayons X.....	188
e.	Mössbauer.....	188
f.	Dosage du fer dans le solide à la phénanthroline.....	188
5.	ANALYSES DE LA SOLUTION EN SORTIE.....	188
III.	RESULTATS.....	189
1.	SUIVI DE LA COLORATION DE LA COLONNE AU COURS DE LA REACTION.....	189
2.	SUIVI DU PH.....	190
3.	CARACTERISATION DES MINERAUX SECONDAIRES OBTENUS.....	190
4.	CONCENTRATION EN FER DANS LES COLONNES.....	195
5.	SUIVI DE LA CONSOMMATION EN FORMIATE ET DE SILICE.....	198

Sommaire

6. CARACTERISATION MICROBIENNE.....	201
IV. DISCUSSION	204
1. METABOLISME MICROBIEN.....	204
2. FORMATION DES MINERAUX SECONDAIRES EN COLONNE.....	204
V. CONCLUSION	212
DISCUSSION GENERALE	213
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	223
ANNEXE I: « SUPPLEMENTARY INFORMATION » CHAPITRE I PARTIE B	241
ANNEXE II : PUBLICATIONS PARUES_OU_ACCEPTÉES.....	251
RESUME.....	254
SUMMARY	254

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Schéma représentant de manière simplifiée le cycle du fer dans les sols avec une alternance aérobie/anaérobie. La ligne en pointillés représente la limite entre la zone aérobie et la zone anoxique..... 29**
- Figure 2 : Représentation schématique de la goethite (a) et de la lépidocrocite (b). Dans ces oxyhydroxydes, le fer trivalent se trouve dans un environnement octaédrique comprenant quatre oxygènes O_{II} ainsi que deux groupements OH^- (oxygène O_I). (Gaboriaud et Ehrhardt, 2003) 32**
- Figure 3 : Cliché au microscope électronique à transmission de cristaux de lépidocrocite 33**
- Figure 4 : Cliché au microscope électronique à transmission de cristaux de chukanovite 36**
- Figure 5 : Modèles structuraux proposés pour les rouilles vertes : (a) RV1 (Cl^-) et (b) RV2 (SO_4^{2-}) (Refait et al., 1998; Simon et al., 2003) 38**
- Figure 6 : Photo en microscopie électronique à transmission de cristaux de rouille verte carbonatée (CO_3^{2-}) (Zegeye, 2006) 38**
- Figure 7 : Fougérite dans un sol hydromorphe de la forêt de Fougères (Trolard et al., 1996) 39**
- Figure 8 : Photo en microscopie électronique à balayage de cellules de *Shewanella putrefaciens* avec leur flagelle polaire (flèches) (Jorge Rodriguez, Université de Californie)..... 42**
- Figure 9 : Représentation schématique de la chaîne respiratoire de *Shewanella spp* et de *Geobacter spp.* (Weber et al., 2006) 44**
- Figure 10 : Réduction bactérienne du Fe(III) par transfert des électrons via : un contact direct (a), des pili conducteurs (nanowires) (b), des sidérophores(c), ou des navettes à électrons (d). Les ovales rouges représentent le Fe(II) (vides) ou le Fe(III) (pleins), les ovales verts représentent les transporteurs oxydés (pleins) ou réduits (vides), les ovales jaunes les sidérophores. (Gralnick et Newman, 2007)..... 45**
- Figure 11 : Cellules de *Shewanella oneidensis* avec leurs pili conducteurs (nanowires) par microscopie à balayage (A) ou optique sous épifluorescence (B) (source : Gorby et al., 2006) 46**

Figure 12 : Photo en microscopie électronique à balayage de <i>Shewanella putrefaciens</i> CN32 à la surface d'oxydes de fer (hématite Fe ₂ O ₃) (source : Environmental Molecular Sciences Lab, USA).....	47
Figure 13 : Suivi du changement de coloration au cours de la bioréduction de la lépidocrocite par <i>Shewanella putrefaciens</i> (Ona-Nguema, 2003).....	50
Figure 14 : Représentation schématique de l'association des constituants majeurs d'un sol.	57
Figure 15 : X-ray diffractograms of solids formed from microbial reduction of lepidocrocite in the presence of 0, 0.2, 4, and 6 mM of silicic acid at 20 d of incubation time (a), and in the presence of 2 mM of silicic acid versus incubation time (0-20 d) (b). "M", "Ck", "L" denotes magnetite, chukanovite and lepidocrocite, respectively..	91
Figure 16 : X-ray diffractograms of solids after microbial reduction of lepidocrocite (γ -FeOOH) by <i>Shewanella putrefaciens</i> in presence of 0 - 90 wt% of F ₁ quartz sand fractions with high cell density "HC" (a) or lower cell density "LC" (b). The analyses were done at 20 days of incubation time (30°C). "GR", "M" and "Q" denotes green rust, magnetite and quartz, respectively.....	92
Figure 17 : pH monitoring over time during the incubation of lepidocrocite under experimental conditions favourable for GR or magnetite biomineralization. No impact of Si species on the pH value of reaction medium was noted. Indeed, the pH final was found 9.1±0.1 when GR is formed regardless the sand fraction tested, while it was 8.8±0.1 when magnetite is formed.	93
Figure 18 : Schematic summary with the transition area separating at each side the secondary iron mineral green rust (right) or magnetite (left) from lepidocrocite bioreduction at LC density as a function of quartz sand proportions (0 - 70 wt%) for the fractions F ₁ , F ₂ or F ₃ and aqueous silica (H ₄ SiO ₄ : 0 - 6 mM). Aqueous concentration of silica ($\mu\text{M} \pm 2 \mu\text{M}$) determined at 30 days was presented below the axis.	94
Figure 19 : X-ray diffractograms of solids formed from microbial reduction of lepidocrocite in the presence of 0, 0.2, 4, and 6 mM of silicic acid at 20 days of incubation time (a), and in the presence of 2 mM of silicic acid versus incubation time (0-20 days) (b). "M", "Ck", "L" denotes magnetite, chukanovite and lepidocrocite, respectively. The concentrations of silicic acid refer to the amount of silicic acid initially added.	96

Figure 20 : Transmission electronic micrograph (a) and scanning electronic micrograph (b) of the chukanovite with magnetite produced from the bacterial reduction of the lepidocrocite in the presence of 2 mM H_4SiO_4 after 20 days. The incrustated image represents the electron diffraction of the chukanovite crystal. The chukanovite was also identified when lepidocrocite bioreduction was examined in the presence of sand F_3 (50 wt%) at 20d	97
Figure 21 : Production of Fe(II) during the bioreduction of 300 mM of lepidocrocite under LC density conditions in the presence and absence of sand F_1 (a), sand F_2 (b) and dissolved silica (c) at various concentrations. Lines are a visual aid only. Error bars indicate the average deviation.....	99
Figure 22 : Sorption isotherm of silicate on lepidocrocite at pH $7 \pm 0,2$. Silicate initial concentration (0-6 mM)	100
Figure 23 : (a) Total Fe(II) concentration (aqueous and solid) determined in all lepidocrocite bioreduction experiments. (b) Aqueous Fe(II) concentration determined in bioreduction experiments. LC density; 160 mM of formate and 300 mM of γ -FeOOH. Incubation time 30 days.....	102
Figure 24 : X-ray diffractograms of the abiotically formed carbonate GR and magnetite	103
Figure 25 : Scanning electron and/or transmission electron micrographs of solids produced during bacterial reduction of lepidocrocite in the presence of low cell density "LC" with silicic acid H_4SiO_4 (4 mM) (a, b), F_1 quartz sand fraction (70 wt.%) (c, d); F_2 quartz sand fraction (70 wt.%) (e).	106
Figure 26 : Scanning transmission electronic microscopy coupled with EDX analysis of a green rust crystal formed with low cell density ("LC") and F_1 quartz sand fraction, indicating the localization of Si, Fe and O elements.....	107
Figure 27 : Transmission electronic micrograph of a green rust crystal formed from incubation with F_1 (70%) (a), the EDX analysis was performed on the GR crystal and on Si-particle. Green rust crystals were covered by particles of silica. (b) and (c) are the scanning transmission electronic microscopy-EDX for F_2 70 % and H_4SiO_4 4 mM, respectively. The yellow line indicated the EDX scan reported for O, Si and Fe.....	108
Figure 28 : Sedimentation plots showing the behavior of 0.1 g/L suspensions of lepidocrocite at neutral pH solutions of 10 mM NaCl, in the presence and absence of sand quartz added at 0.1 g/L.	112

- Figure 29 : Increase of the mean equivalent diameter (d_{50}) of the lepidocrocite suspension in the bioreduction medium after addition of several doses (mg g^{-1} of equivalent Fe) of polyacrylic acid (paa), polyacrylamide (pam) or cells at low (LC) or high (HC) density. The results are expressed as a function of the initial d_{50} (control before addition of the solute or cells)128**
- Figure 30 : Electrophoretic mobility as a function of polymer dose at pH 7, for PAA (open square) or PAM (closed circles). Vertical bars represent standard deviation calculated based on the trajectory of 50 to 400 particles129**
- Figure 31 : Lepidocrocite bio-reduction as a function of the incubation time: a) in presence of polyacrylate (PAA); b) in presence of polyacrylamide (PAM). The assays correspond to experiments #1 and #3, respectively. LC stands for “low” cell density and HC for “high” cell density (see Table 5 for values). Controls are experiments realized without polymers. Among assays done with HC, only those run with 6 mg g^{-1} polymers have been represented, a similar trend is observed for all the concentrations tested. Lines are a visual aid only. Vertical bars correspond to the error measured on two or three independent incubations. The nature of the main secondary mineral after three weeks of incubation is given in brackets, M means magnetite, GR1 means green rust. See also Fig. 4 and SI-5.....132**
- Figure 32 : X-ray diffractograms of the solids after at least 30 days of bioreduction of γ -FeOOH with a low cell density (LC) and 0 to 30 mg g^{-1} Fe^{III} of polyacrylate (a, serial #1) or polyacrylamide (b, serial #3). The intensity is represented in an arbitrary unit (a.u.). GR1 means green rust 1, L, lepidocrocite, CK chukanovite and M, magnetite. See Table 5 for serial number and LC, HC values135**
- Figure 33 : X-ray diffractograms of the solids from bioreduction of γ -FeOOH in presence of polyacrylic acid 9 mg g^{-1} Fe and LC density: a) serial #5 after 5 days and 7 days of incubation time and, b) serial #6 after 6 days and 1 year of incubation time. The intensity is represented in an arbitrary unit (a.u.). GR1 means green rust 1, L, lepidocrocite, and M, magnetite. See Table 5 for serial number136**
- Figure 34 : TEM micrographs from experiment serial #1: a), nano magnetite particles from assay with 3 mg g^{-1} poly(ac), LC density, bar = $0.5 \mu\text{m}$); b), green rust crystal from assay with 6 mg g^{-1} poly(ac), LC density, bar = $4 \mu\text{m}$, the granular phase corresponds to γ -FeOOH; c), green rust crystal from assay with 30 mg g^{-1} poly(ac), LC density, bar = $1 \mu\text{m}$; d), green rust crystal from assay with 30 mg g^{-1} poly(ac), HC**

density, bar = 1 μm . All observations were made after at least 30 days of incubation time	138
Figure 35 : SEM picture of GR crystals from assays with 6 mg g ⁻¹ poly(ac) and LC density (a, b) and HC density (c, d). Oxygen atoms constituted the granular phase, Fe, and Na (~ 51, 42, 5.5 % atom), C atoms are also present.....	139
Figure 36 : Conceptual model of magnetite and green rust mineralization from bioreduction of lepidocrocite by dissimilatory iron reducing bacteria (<i>Shewanella spp.</i>).....	146
Figure 37 : Schéma de dégradation du rouge de méthyle (Remy et al., 2012)	157
Figure 38 : Concentration relative en rouge de méthyle en fonction du temps en présence de RV b + Si 4 mM, RV b HC, RV a + Si, RV a + HC, Fe 0,2 mM, LC, HC et blanc : pH = 6,9 \pm 0,1. T = 30 °C. [MR] ~ 10 μM	166
Figure 39 : Représentation de la concentration en Hg(II) en fonction du temps en présence de rouille verte chimique ou biotique et d'eau ou de Fe. [Hg]= 100 μM , T = 22 °C, pH = 7	169
Figure 40 : Photo du montage de la colonne et du système Aktaprime	180
Figure 41 : Courbe obtenue lors d'un traçage à travers une colonne de LCS. 5 mL de solution de KBr à 10 mM ; Vp = 25 mL.....	184
Figure 42 : Photo du montage de la colonne et du système Aktaprime	186
Figure 43 : Représentation schématique de la colonne montrant le découpage effectué après démontage de la colonne suivant le sens de flux	187
Figure 44 : Photos des colonnes à 18 jours I et I' (sans Si), II (0,2 mM de Si), III (1 mM de Si), IV (2 mM de Si). « RV » pour rouille verte, « M » pour magnétite et « L » pour lépidocrocite.....	189
Figure 45 : Suivi du pH des colonnes I et I' (0 mM de silicates), II (0,2 mM de silicates), III (1 mM de silicates) et IV (2 mM de silicates)	190
Figure 46 : Diffractogramme aux rayons X des solides présents dans les sections de la colonne I (0 mM de silicates, II (0,2 mM de silicates) et IV (2 mM de silicates). Sens du flux: E vers A. « GR » pour rouille verte, « M » pour magnétite, « L » pour lépidocrocite et « Q » pour quartz.	192
Figure 47 : Images en microscopie électronique à transmission des minéraux secondaires issus de la biominéralisation de la lépidocrocite par <i>Shewanella putrefaciens</i> en	

Sommaire

absence de Si (colonnes I et I'), en présence de 0,2 et 1 mM de Si (colonnes II et III), 2 mM de Si (colonne IV). « RV » pour rouille verte, « M » pour magnétite, « L » pour lépidocrocite et « Ck » pour chukanovite.....	193
Figure 48 : Clichés de diffraction au rayon X en microscopie électronique à transmission des minéraux secondaires issus de la biominéralisation de la lépidocrocite par <i>Shewanella putrefaciens</i> en absence de Si (Colonne I et I'), en présence de 0,2, 1 et 2 mM de Si (colonnes II, III et IV).....	194
Figure 49 : Spectre Mössbauer des produits de biominéralisation de la colonne I (0 mM de silicates) obtenus à température ambiante	195
Figure 50 : Quantité de Fe(II) et de Fe total pour 1 g de solide de la colonne I (0 mM de Si) en fonction des fragments considérés A, B, C, D et E.....	196
Figure 51 : Quantité de Fe(II) et de Fe total pour 1 g de solide de la colonne IV (2 mM de Si) en fonction des fragments considérés A, B, C, D et E.....	197
Figure 52 : Concentrations de Fe(II) _{aq} en sortie des colonnes I, II et III dosés par ICP-AES.	197
Figure 53 : Suivi de la concentration du formiate dosé par chromatographie ionique en sortie de colonne I (0 mM de Si), II (0,2 mM de Si) et IV (2 mM de Si).....	199
Figure 54 : Suivi de la concentration en silice dosée par ICP-AES en sortie des colonnes II (0,2 mM de Si), III (1 mM) et IV (2 mM de Si).....	199
Figure 55 : Nombre de bactéries dans quelques échantillons en sortie de la colonne IV (2 mM de Si).	201
Figure 56 : Nombre de bactéries par gramme de solide (Fe + sable) dans chaque fraction de la colonne I (0 mM de silicates).	202
Figure 57 : Image STEM (<i>scanning transmission electronic microscopy</i>) de la composition chimique d'un cristal de rouille verte associé à de la silice pour le fragment A de la colonne IV (2 mM de Si).....	207
Figure 58 : Schéma conceptuel de l'effet des silicates en système de flux sur la bioréduction de la lépidocrocite par <i>Shewanella putrefaciens</i>	209
Figure 59 : Schéma récapitulatif des hypothèses de l'effet de la présence de silicates ou de polymères bactériens sur la bioréduction de la lépidocrocite par <i>Shewanella putrefaciens</i> et sur sa réactivité. Les ovales foncés représentent les silicates ou les polymères.....	218

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principaux oxydes et oxyhydroxydes de fer dans les sols 30

Tableau 2 : Composition du milieu de base pour 1L 65

Tableau 3 : Caractéristiques des différents types de sable quartz 67

Table 4 : Kinetic rate constants (k_{obs}) and initial reduction rate ($V_{initial}$) for lepidocrocite bioreduction under various experimental conditions. Only the fitting values with correlation coefficient $r^2 > 0.95$ are given. ND = not determined.101

Table 5: Reduction rate and secondary minerals obtained from biomineralization experiments. LC = low cell density, HC = high cell density, PAA = polyacrylic acid, PAM = polyacrylamide, M = magnetite, GR = green rust, CK = chukanovite. ($\pm M$), means that magnetite was evidenced by the magnetic tip test but not by XRD; from relative intensity of the major peak, (+M), means that the mineral is considered to be a minor and “GR + M”, means that the minerals were considered in the same proportion. All assays were done with 100 μM AQDS except when it was specified. Control means experiments performed without addition of any polymers or autoclaved cells.149

Table 6 :Abiotic mineralization of M or GR at 30°C from co-precipitation of Fe^{II} and Fe^{III} salts, NaOH and Na₂CO₃ in presence of PO₄³⁻, polyacrylic acid (PAA), polyacrylamide (PAM) or a heat-killed cell suspension at “LC” or “HC” density. M = magnetite, GR = green rust. Each experiment was reproduced 3 to 10 times. The solids were characterized by XRD after 2 or 3 days.....151

Tableau 7 : Valeurs de k_{obs} (équations de premier ordre) obtenues à partir des cinétiques de réduction du rouge méthyle dans différentes conditions.....165

Tableau 8 : Cinétique de réduction du mercure par la rouille verte ou les agents stabilisants168

Tableau 9 : Caractéristiques du conditionnement d'une colonne de LCS181

Tableau 10 : Caractéristiques hydrodynamiques d'une colonne de LCS.....185

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le fer est un élément essentiel dans l'environnement et dans le fonctionnement des organismes. Il est le quatrième élément le plus abondant de la croûte terrestre, il participe à la structure de nombreux minéraux (Andrews, 2004) et est impliqué dans le métabolisme de la plupart des êtres vivants. Lorsqu'il entre dans la constitution de molécules biologiques comme par exemple les cytochromes et les noyaux hèmes, les besoins d'une cellule bactérienne sont relativement faibles, de l'ordre de quelques dizaines de $\mu\text{g g}^{-1}$ de matière sèche cellulaire (Abdul-Tehrani et al., 1999). Par contre, dans la respiration anaérobie chez les bactéries ferriréductrices, c'est quelques dizaines de grammes qui doivent être réduits pour produire 1 gramme de biomasse sèche (sur la base des données de Caccavo et al., 1994). Ce métabolisme, qui se singularise par ailleurs par un transfert d'électrons d'une cellule vers un solide (oxyde de fer), est alors susceptible de transformer des quantités non négligeables de matière pouvant conduire à la formation d'une diversité intéressante de minéraux ferreux. Ainsi, la magnétite (Fe_3O_4), la vivianite ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$), la sidérite (FeCO_3) sont autant d'exemples de minéraux dont l'accumulation dans l'environnement résulterait de l'activité de ces bactéries (Konhauser, 2009). Parmi ces minéraux ferreux, les rouilles vertes présentent une réactivité chimique particulièrement intéressante et font l'objet d'un intérêt croissant ces quinze dernières années. Ce sont des hydroxysels mixtes de Fe(II) et de Fe(III) appartenant à la famille des hydroxydes doubles lamellaires et de formule générale $[\text{Fe}(\text{II})_4\text{Fe}(\text{III})_2(\text{OH})_{12}\text{X}_x, n \text{H}_2\text{O}]$. Il existe deux types de rouille verte définis par l'anion interfoliaire inséré entre les feuillettes : la rouille verte de type 1 (CO_3^{2-} , Cl^-) et la rouille verte de type 2 (SO_4^{2-}).

Les rouilles vertes tiennent leur réactivité chimique de leur métastabilité et de la présence de Fe(II) dans leur structure. Elles réduisent des polluants organiques et métalliques, ce qui conduit en général à donner une forme moins toxique. C'est ainsi le cas de composés chlorés, de Cr(VI) ou de Hg(II) (O'Loughlin et al., 2003b), mais pas de l'arsenic qui est plus toxique sous sa forme réduite As(III). Les propriétés de ces minéraux semblent prometteuses pour la mise en place de systèmes de remédiation des eaux et des sédiments notamment par le biais de barrières réactives perméables (PRB)

Introduction

entourant les zones polluées comme les décharges (Gaber et al., 2002; Phillips et al., 2003). Les hydroxydes de fer à valence mixte Fe(II)-Fe(III) pourraient remplacer le Fe⁰ un agent réducteur bien connu mais présentant une perméabilité moindre dans les systèmes naturels complexes.

La structure des rouilles vertes est liée à celle de la fougérite, l'équivalent structural mis en évidence à l'état naturel dans les sols hydromorphes de la forêt de Fougères en Bretagne (IMA 2003-057). Il a été suggéré que ce minéral se formait via un processus microbien (Berthelin et al., 2006). Mais les mécanismes et les paramètres environnementaux impliqués restent encore peu documentés. Dans les environnements hydromorphes anaérobies soumis à une activité bactérienne ferriréductrice, l'occurrence de rouilles vertes plutôt que de minéraux ferreux plus stables, tels que la magnétite, est inattendue. Dans la perspective d'utiliser ces minéraux dans des procédés de dépollution, ou simplement pour des raisons fondamentales, il apparaît alors intéressant de maîtriser leur synthèse et de comprendre les facteurs favorisant leur formation.

En laboratoire, la synthèse de rouilles vertes en condition anaérobie est bien maîtrisée dans un système fermé constitué de bactéries ferriréductrices, d'un oxyde de Fe(III) et d'un donneur d'électrons tel que le formiate (Zegeye et al., 2007). La densité bactérienne, la structure des agrégats (de particules bactériennes et d'oxydes de fer), sont des paramètres qui ont été identifiés comme influençant la formation des rouilles vertes (Zegeye et al., 2007 ; Zegeye et al., 2010). Les bactéries influenceraient alors la formation du minéral pas uniquement en apportant le Fe(II) entrant dans sa constitution mais créeraient aussi un environnement favorable à la formation du minéral. Dans les environnements où sont observées les rouilles vertes, celles-ci peuvent se retrouver associées à des bactéries et de la matière organique, mais également d'autres constituants du sol tels que le quartz, l'argile ou autres. Enfin, le milieu n'est pas fermé comme dans un réacteur batch et est soumis à des contraintes hydrauliques et sous écoulement de flux. Identifier les facteurs qui favorisent la formation de rouille verte afin de mettre en place des systèmes conduisant à leur production sous écoulement de flux est un des objectifs de ce travail de thèse. En d'autres termes, il est nécessaire de comprendre et de maîtriser la synthèse des rouilles vertes dans un milieu

Introduction

plus complexe que les réacteurs batch évoqués ci-dessus. Cela permettra d'une part d'étudier la réactivité, la formation et la stabilité des rouilles vertes issues de l'activité bactérienne dans un système soumis à un flux continu (colonne de sable) dans la perspective d'utiliser les rouilles vertes dans des procédés de remédiation d'effluents contaminés par des polluants organiques et métalliques. D'autre part, en se rapprochant des conditions environnementales, cela permettra de comprendre comment la fougérite peut être formée.

Après avoir présenté une analyse bibliographique sur les oxydes de fer, la réduction bactérienne du fer et la biominéralisation des rouilles vertes, ce manuscrit présentera une synthèse de la méthodologie utilisée au travers des trois chapitres majeurs autour desquels il s'articule. La partie « matériel et méthodes » est non exhaustive et rassemble les méthodes communes aux trois chapitres. Dans chaque chapitre seront développées plus en détail les méthodes utilisées. Dans un premier temps nous avons cherché à optimiser les conditions favorisant la formation des rouilles vertes carbonatées en réacteur batch et à partir de Fe(II) généré par des bactéries ferriréductrices (*Shewanella putrefaciens* CIP 8040). Les polymères bactériens, les phosphates et les anions silicates sont décrits comme des facteurs favorisant la formation des rouilles vertes « biologiques » mais les mécanismes selon lesquels agissent ces composés restent encore mal cernés. Nous avons cherché à mieux définir le mode d'action de ces facteurs en nous focalisant d'une part sur les ions silicates et le sable quartz, et d'autre part sur des polymères organiques de synthèse servant de modèles (acide polyacrylique PAA et polyacrylamide PAM). Nous montrerons que ces facteurs stabilisent les cristaux de rouilles vertes et devraient être de bons candidats pour prolonger la « durée de vie » des rouilles vertes sous flux continu.

Toutefois, ces agents stabilisants peuvent aussi en diminuant leur stabilité, affecter leur potentiel réactif. Aussi, au travers du Chapitre II, nous avons comparé la réactivité des rouilles vertes ainsi stabilisées, vis-à-vis de deux polluants, l'un organique, le rouge de méthyle, le second inorganique, le mercure sous forme Hg(II). Enfin, avant une discussion générale sur l'ensemble de ces résultats, la synthèse de la rouille verte en colonne de sable (sable de Fontainebleau) et en flux continu sera décrite Chapitre III.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES OXYDES DE FER

Les oxydes de fer sont les oxydes métalliques les plus abondants dans les sols. Ils sont présents dans les sols de différentes régions climatiques sous des formes minérales variées et des niveaux de concentrations variables. Les minéraux d'oxydes de fer se forment sous l'influence de facteurs communs des sols (température, humidité, pH, E_h ,...) et leur nature reflète les conditions pédo-environnementales sous lesquelles ils ont été formés (Cornell et Schwertmann, 2003).

Même à des concentrations faibles dans les sols, les oxydes de fer ont un fort pouvoir de pigmentation et peuvent déterminer la couleur des sols. La nature chimique et la surface spécifique des particules d'oxydes de fer leur confèrent la capacité de sorber des éléments comme des anions inorganiques (silicate, phosphate, molybdate), des anions et des molécules organiques (citrate, acides humiques,...) ainsi que des cations (Al, Cu, Pb, Zn, Co, Cr, Ni,...). Ces derniers peuvent être adsorbés en surface des oxydes ou incorporés dans leur structure. Les oxydes de fer influent également sur la structure du sol en induisant la formation d'agrégats et la cimentation (réaction électrochimique de réduction d'un cation en présence de fer métallique) de composants majeurs du sol (Schwertmann et Taylor, 1989).

Ils sont formés dans les sols sous l'influence de différents processus physico-chimiques ou microbiens présentés dans la **Figure 1**.

Le **Tableau 1** présente les principaux oxydes et oxyhydroxydes de fer présents dans les sols. Ceux qui ont été mentionnés et utilisés dans ce travail seront décrits ci-après.

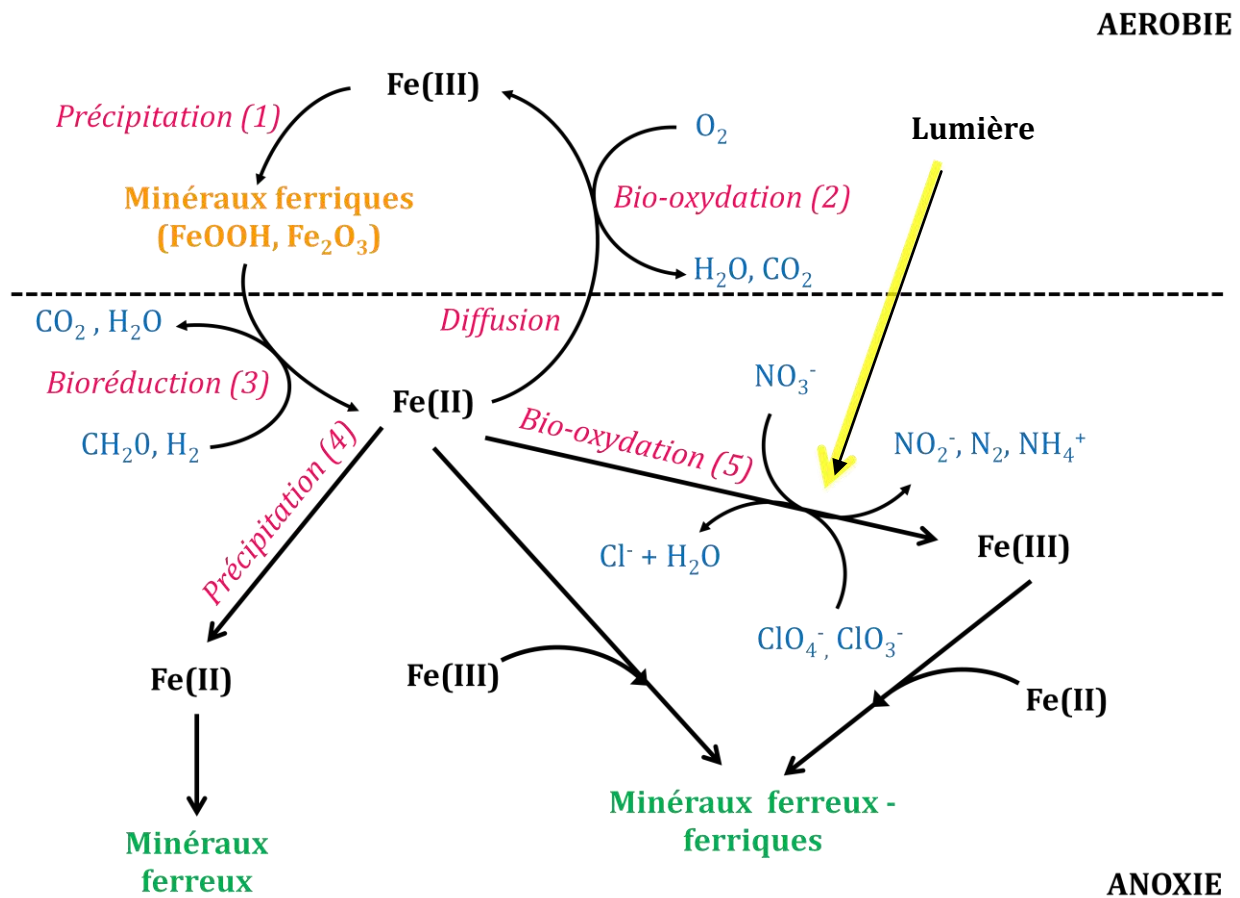


Figure 1 : Schéma représentant de manière simplifiée le cycle du fer dans les sols avec une alternance aérobie/anaérobie. La ligne en pointillés représente la limite entre la zone aérobie et la zone anoxique.

- (1) Précipitation du Fe(III) en minéraux ferriques
- (2) Bio-oxydation du Fe(II) en Fe(III) par des bactéries couplée à la réduction de O_2
- (3) Bioréduction des minéraux ferriques en Fe(II) par des bactéries ferriréductrices couplée à la réduction de CH_2O
- (4) Précipitation du Fe(II) en minéraux ferreux
- (5) Bio-oxydation du Fe(II) en Fe(III) par des bactéries ferri-oxydantes couplée à la réduction de nitrates

Analyse bibliographique

Tableau 1 : Principaux oxydes et oxyhydroxydes de fer dans les sols

Oxydes de fer	Formule	Substitution alumineuse maximale (%)	Produit de solubilité pKs	Principales raies de DRX (nm)	Couleur	Ordre magnétique	Références
Hématite	$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$	15-16	42,5	0,269-0,251- 0,184-0,169	rouge vif	antiferromagnétique (basse température) ferromagnétique (haute température)	Schwertmann et Taylor, 1989
Goethite	$\alpha\text{-FeOOH}$	33	43	0,418-0,269- 0,245	ocre	antiferromagnétique	Schwertmann et Taylor, 1989
Maghémite	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	existe	40,5	0,295-0,251- 0,160-0,147	noir	ferrimagnétique	Schwertmann et Taylor, 1989
Magnétite	Fe_3O_4	n.d	n.d	0,297-0,253- 0,210-0,162- 0,148	noir	ferrimagnétique	Schwertmann et Taylor, 1989
Fougérite	$\text{Fe(II)}_4\text{Fe(III)}_2(\text{OH})_{12}\text{X}_n$ $n \text{ H}_2\text{O}$	n.d	n.d	0,753-0,376- 0,267	bleu vert	ferromagnétique	Trolard et al., 1998
Lépidocrocite	$\gamma\text{-FeOOH}$	faible	41	0,626-0,329- 0,247-0,194	orange	antiferromagnétique	Schwertmann et Taylor, 1989
Feroxyhite	$\delta\text{-FeOOH}$	n.d	n.d	0,256-0,223- 0,170-0,147	brun rougeâtre	ferrimagnétique	Schwertmann et Taylor, 1989
Ferrihydrite	$5\text{FeOOH}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	15	38	0,250-0,221- 0,196	brun rougeâtre	/	Schwertmann et Taylor, 1989
Vivianite	$\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2\cdot 8(\text{H}_2\text{O})$	/	n.d	0,673-0,489- 0,407	bleu foncé	antiferromagnétique	Schwertmann et Taylor, 1989
Chukanovite	$\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$	n.d	n.d	0,614-0,513- 0,373-0,265	bleu vert	/	Pekov et al., 2007
Sidérite	FeCO_3	n.d	n.d	0,359-0,279- 0,235	variable	antiferromagnétique	Schwertmann et Taylor, 1989

1. LES OXYDES DE Fe(III)

L'unité de base structurale de tous les oxydes de fer est un octaèdre, dans lequel chaque atome de fer est entouré par six oxygènes ou par des ions oxygènes et hydroxydes.

a. La goethite α -FeOOH

La goethite (α -FeOOH) de couleur jaune-brun est l'oxyhydroxyde le plus stable thermodynamiquement dans l'environnement (Cornell et Schwertmann, 2003). C'est pourquoi, il est sans doute l'oxyde de fer le plus représenté dans l'environnement, dans les lacs et les sédiments marins et les milieux aérés (van der Zee et al., 2003).

La goethite possède une symétrie orthorhombique de paramètre de maille $a=0,459$ nm, $b=0,994$ nm et $c=0,301$ nm et elle est composée d'entités comprenant deux octaèdres $\text{FeO}_3(\text{OH})_3$ reliés entre eux par une arête OH-OH (**Figure 2a**). Le Fe^{3+} , de la goethite retrouvée dans les sols, est souvent substitué par Al^{3+} et cette substitution est directement liée aux conditions de formation du minéral (Cornell et Schwertmann, 2003).

b. La lépidocrocite γ -FeOOH

La lépidocrocite (γ -FeOOH) de couleur orange se présente sous forme de cristaux en aiguilles (**Figure 3**). Dans l'environnement, la présence de lépidocrocite se limite presque exclusivement aux sols hydromorphes, elle est beaucoup moins abondante que la goethite. Elle se forme dans les sols où le drainage est limité, et alterne avec des périodes d'anaérobiose et d'aérobiose en fonction des saisons. La formation de lépidocrocite dans les sols est donc en relation avec des conditions redox variables. Dans des conditions de réduction, le Fe(III) est réduit en Fe(II), puis le Fe(II) est oxydé et hydrolysé en γ -FeOOH en condition d'oxydation. Autrement dit, lors de période de pluie, les conditions d'anaérobiose se forment et permettent la formation de Fe^{2+} , qui s'oxyde au contact de l'air et qui précipite en γ -FeOOH. La formation de lépidocrocite peut alors

Analyse bibliographique

montrer des zones où le Fe^{2+} se forme de façon temporaire (Cornell et Schwertmann, 2003). La formation de lépidocrocite $\gamma\text{-FeOOH}$ peut être empêchée par la présence d' Al^{3+} ce qui expliquerait la rareté de ce minéral dans les sols acides généralement riches en aluminium. De plus, la présence de carbonates favorise la précipitation de goéthite au dépend de la lépidocrocite, ce qui justifie son absence dans les sols calcaires. La lépidocrocite (comme la ferrihydrite) est un oxyde ferrique facilement réductible par les bactéries ferriréductrices (Zachara et al., 2011).

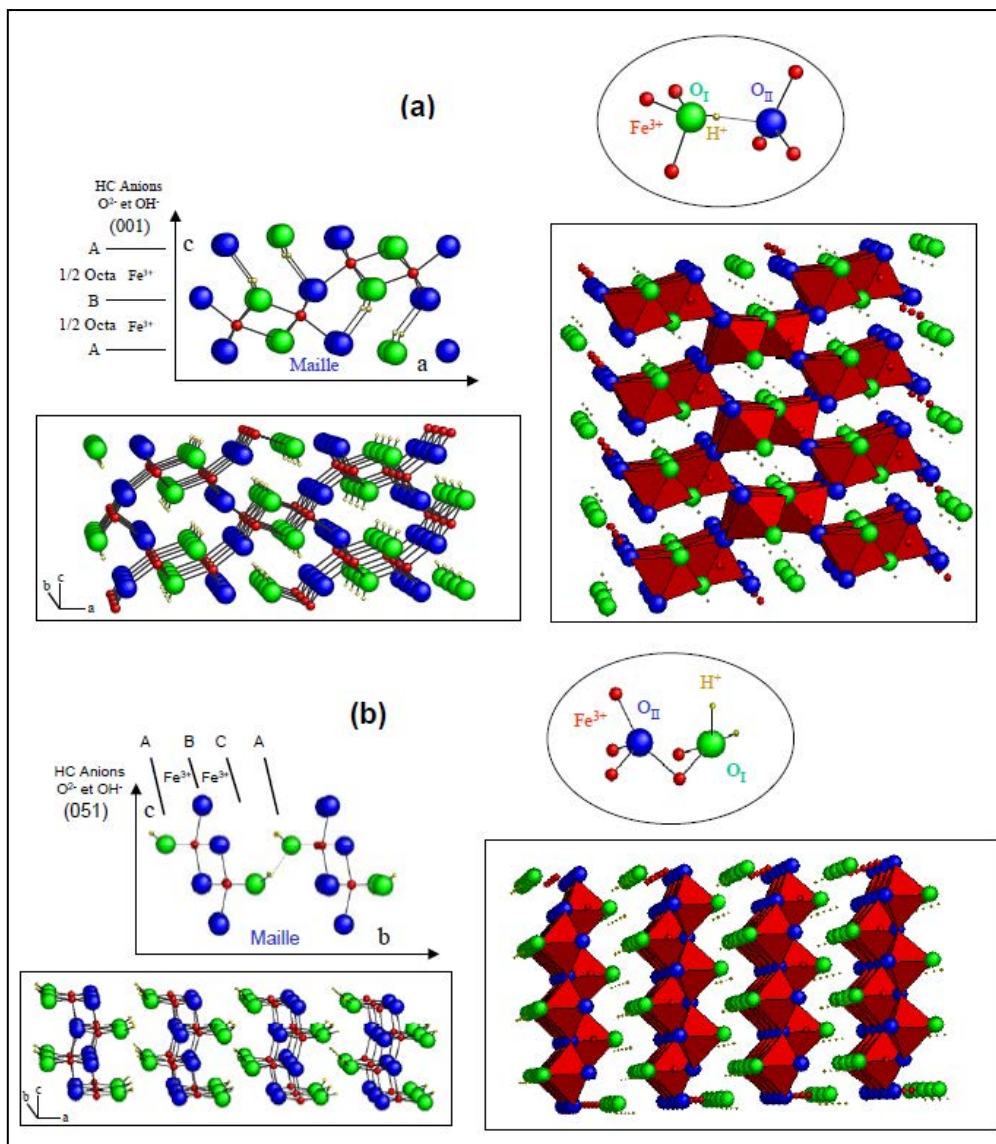


Figure 2 : Représentation schématique de la goéthite (a) et de la lépidocrocite (b). Dans ces oxyhydroxydes, le fer trivalent se trouve dans un environnement octaédrique comprenant quatre oxygènes O_{II} ainsi que deux groupements OH^- (oxygène O_{I}). (Gaboriaud et Ehrhardt, 2003)

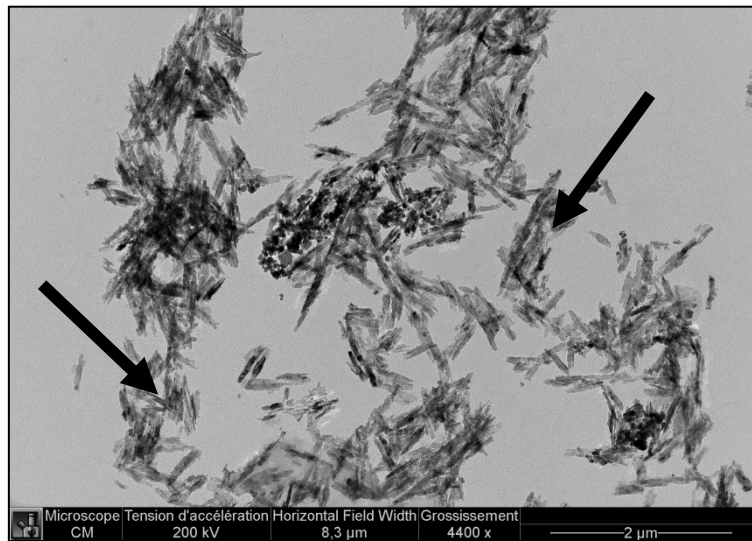


Figure 3 : Cliché au microscope électronique à transmission de cristaux de lépidocrocite

La lépidocrocite cristallise dans un système orthorhombique avec des paramètres de maille $a=0,306$ nm, $b= 1,254$ nm et $c=0,384$ nm. La structure de la lépidocrocite est constituée d'octaèdres $FeO_4(OH)_2$ reliés par quatre arêtes, pour donner naissance à des feuillets ondulés perpendiculaires à l'axe b (**Figure 2b**). La surface spécifique et la forme des cristaux sont en fonction des conditions de formations.

La lépidocrocite est rarement présente dans les sols des forêts et des prairies. Ceci s'explique probablement par une forte activité des bactéries ferriréductrices, qui favorise la formation de ferrihydrite ou du feroxyhyte plutôt que de la lépidocrocite. En même temps, la lépidocrocite est présente dans les toundras froides où l'activité bactérienne est réduite due à la température qui est inférieure à $4-8^{\circ}C$ (Cornell and Schwertmann, 2003). La lépidocrocite est répandue dans les environnements suboxiques tels que les sols hydromorphes et est le produit typique de l'oxydation de la rouille verte (Schwertmann et Taylor, 1989).

Il a également été montré que la lépidocrocite était le principal produit de l'oxydation du $Fe(II)$ par des bactéries ferri-oxydantes couplée à la réduction de nitrate (Laresse-Casanova et al., 2010).

c. La ferrihydrite

La ferrihydrite est un oxyhydroxyde ferrique mal cristallisé ayant une ébauche de structure cristalline, voisine de celle de l'hématite mais perturbée par de nombreux défauts. La ferrihydrite est un nano oxyde de Fe(III) hydraté ubiquitaire des environnements de surface terrestre variés. Son désordre structural est à l'origine de sa forte réactivité vis-à-vis des ions organiques et minéraux qui transitent dans les sols (Schwertmann et Taylor, 1989). Elle est capable par des réactions de sorption, de contrôler la mobilité des polluants organiques et inorganiques car c'est un minéral très largement répandu dans l'environnement avec fréquemment des particules sorbées et une large réactivité de surface des petites particules (1-7 nm). La ferrihydrite est présente dans les sols et les sédiments des environnements d'eau douce et marins à des pH proches de la neutralité. La ferrihydrite est généralement classée selon le nombre de raies dans le diffractogramme par DRX : ferrihydrite 2-raies et ferrihydrite 6-raies respectivement pour les variantes très mal et mieux cristallisées (Jambor et Dutrizac, 1998). De nombreuses formules ont été proposées pour cet oxyhydroxyde ferrique hydraté et peuvent se réduire à $5\text{FeOOH} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Benali et al., 2001).

La ferrihydrite peut intervenir dans des processus de biominéralisation et peut être réduite par des bactéries ferriréductrices ce qui va conduire dans des conditions environnementales particulières à la formation de minéraux secondaires comme la magnétite et la rouille verte (Zachara et al., 2011)

2. LES OXYDES DE Fe(II)

a. Les carbonates ferreux : la chukanovite $\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$ et la sidérite (FeCO_3)

• *La sidérite (FeCO_3)*

La sidérite est une espèce minérale composée de carbonate de fer de formule brute FeCO_3 avec des traces de Mn, Mg, Ca, Zn, Co. Rarement pure, la sidérite contient souvent du magnésium et du manganèse. Elle est de couleur marron, brun jaune à

grisâtre, gris jaunâtre à verdâtre. Elle cristallise dans un système rhomboédrique et possède des paramètres de mailles $a = 0,472 \text{ nm}$, $c = 1,546 \text{ nm}$. Elle est commune dans les roches sédimentaires, dans les veines hydrothermales, associée avec plusieurs gîtes métalliques (Ag, Fe, Cu, Pb).

La sidérite est très présente dans des sols (sédiments lacustres, estuariers, sources riches en carbonates) et s'étend jusqu'aux sous-sols profonds (roches, minéraux et sédiments). Elle a aussi été identifiée dans les matériaux extraterrestres (météorites, poussières interplanétaires). Elle peut être formée par voie biologique ou par voie abiotique (Roh et al., 2003).

- *La chukanovite $\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$*

La première description de l'hydroxyde ferreux carbonaté (HFC, $\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$) est issue de l'étude des dépôts de corrosion formés sur l'acier entre pH 9 et 11 à 180°C (Erdoes et Altorfer, 1976). Puis récemment sur des objets archéologiques enfouis (Rémazeilles et Refait, 2009). D'après Kukkadapu et al. (2005), les HFC sont formés par une lente bioréaction de la magnétite produisant des carbonates avec du Fe(II) en excès.

L'hydroxyde ferreux carbonaté a récemment été nommé chukanovite (Pekov et al., 2007) suite à la découverte de sa présence dans les cavités de plusieurs fragments d'une météorite découverte à 350 km au sud de Moscou, Russie. La chukanovite est un minéral souvent présent dans les barrières perméables réactives contenant du fer zérovalent et Kukkadapu et al., (2005) suggèrent que cette phase serait communément présente dans les sédiments anoxiques. La chukanovite se présente sous la forme de cristaux en plaquette allongée (**Figure 4**).

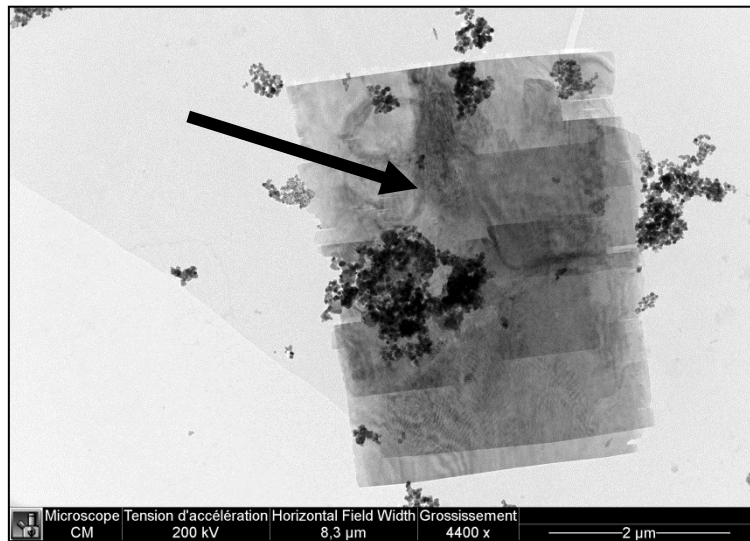


Figure 4 : Cliché au microscope électronique à transmission de cristaux de chukanovite

b. La magnétite Fe_3O_4

La magnétite Fe_3O_4 se présente sous la forme de grains de couleur noire. C'est un oxyde de fer à valence mixte Fe(II)-Fe(III), qui peut avoir, dans l'environnement, une origine pédogénique ou lithogénique (Cornell et Schwertmann, 2003). Les cristaux de magnétite sont de forme octaédrique. La structure cristalline de la magnétite est de type spinel inverse avec un réseau cubique à face centrée d'ions O^{2-} (Belleville et al., 1992). En laboratoire, sa formation peut se faire par coprécipitation des ions Fe^{2+} et Fe^{3+} en milieu basique (Gehin et al., 2002), par oxydation des rouilles vertes ou de $Fe(OH)_2$ (Misawa et al., 1974; Benali et al., 2001), par adsorption d'ions Fe^{2+} sur la ferrihydrite (Tronc et al., 1992) ou sur la lépidocrocite (Tamura et al., 1983). Mais son origine peut-être aussi biologique du fait de l'activité des bactéries magnétotactiques qui contrôlent la formation intracellulaire de magnétite organisée en chaînettes de magnétosomes (Bazylinski et al., 2007). La production de magnétosomes dans les bactéries est optimale lorsque le taux d'oxygène est autour de 1%. Ils permettent aux bactéries magnétotactiques de se déplacer selon le champ magnétique de la terre et ainsi de rejoindre des environnements microaérobies.

La magnétite est relativement stable mais néanmoins elle peut servir d'accepteur d'électrons pour des bactéries ferriréductrices dans certaines conditions et peut

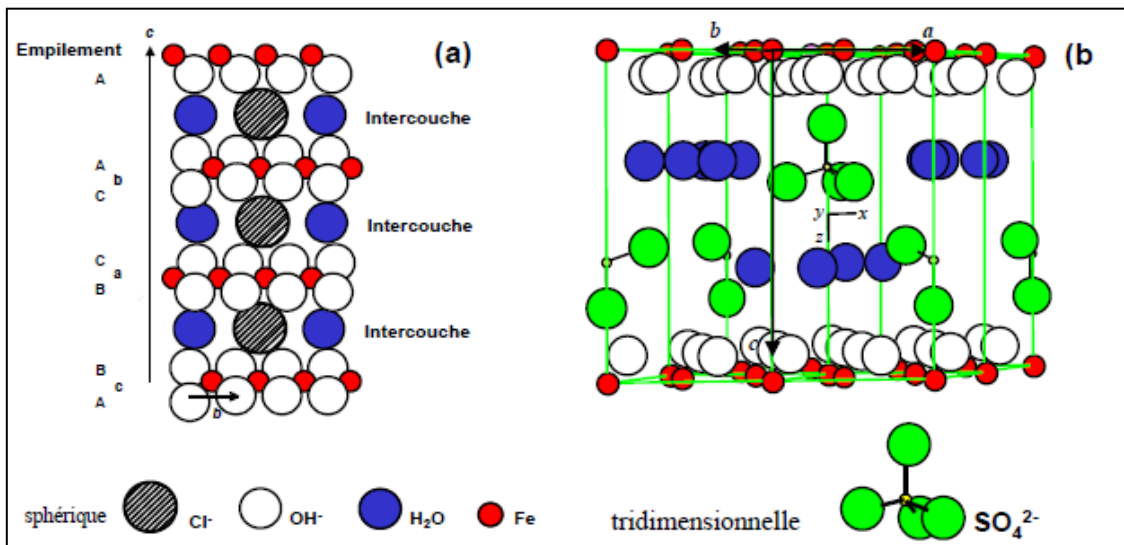
conduire en présence de phosphate à la production de vivianite (Dong et al., 2000). C'est aussi un minéral formé par voie bactérienne par des bactéries ferri réductrices à partir d'oxydes de Fe(III) tels que la lépidocrocite γ -FeOOH (Zegeye et al., 2007) ou la ferrihydrite.

c. Les rouilles vertes

Les rouilles vertes sont des hydroxydes doubles lamellaires (HDL) et font partie de la famille des hydroxysels mixtes Fe(II)-Fe(III). La première caractérisation de ce composé, hors d'un laboratoire date de 1969 (Stampfl, 1969), où une rouille verte a été identifiée comme produit de corrosion d'une canalisation d'eau d'un réseau urbain. D'autres travaux ont montré que la rouille verte existe également comme produit de corrosion de l'acier en milieu marin associé à des bactéries sulfato-réductrices et d'autres minéraux tels que la magnétite et des sulfures de fer (Olowe et al., 1989; Olowe et al., 1992; Refait et al., 2003).

- *Structure de la rouille verte*

Une rouille verte (**Figure 5**) est constituée de feuillets d'ions hydroxydes et d'atomes de Fe(II) et de Fe(III), ce qui lui confère une charge positive. Pour restaurer la neutralité électrique, des anions (Cl^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} ...) s'insèrent entre les feuillets d'hydroxyde de fer. Par analyses en diffraction des rayons X, Bernal et al. (1957) montrent l'existence de deux types de rouilles vertes : une rouille verte de type 1 (RV1) et de type 2 (RV2). Dans la rouille verte 1, l'anion interfoliaire, de géométrie sphérique et plane (CO_3^{2-} , Cl^-), forme une seule couche avec les molécules d'eau. Tandis que dans la rouille verte 2, l'anion est de géométrie tétraédrique (SO_4^{2-}) et forme deux plans intercalaires successifs en se combinant avec des molécules d'eau. Stampfl (1969) établit un lien entre la rouille verte 1 carbonatée et le minéral pyraurite, un hydroxycarbonate de magnésium et de fer, de composition $\text{Mg}^{16}\text{Fe(III)}_2(\text{OH})_{16}\text{CO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, et ainsi propose une formule chimique générale pour la rouille verte $^{x+} \cdot ((x/n)\text{A}^{n-}(\text{p}/n)\text{H}_2\text{O})^{x-}$. Cette formule a ensuite été confirmée (Drissi et al., 1995; Génin et al., 1996).



En microscopie, la rouille verte se présente sous forme de cristaux parfaitement hexagonaux de plusieurs micromètres (**Figure 6**).

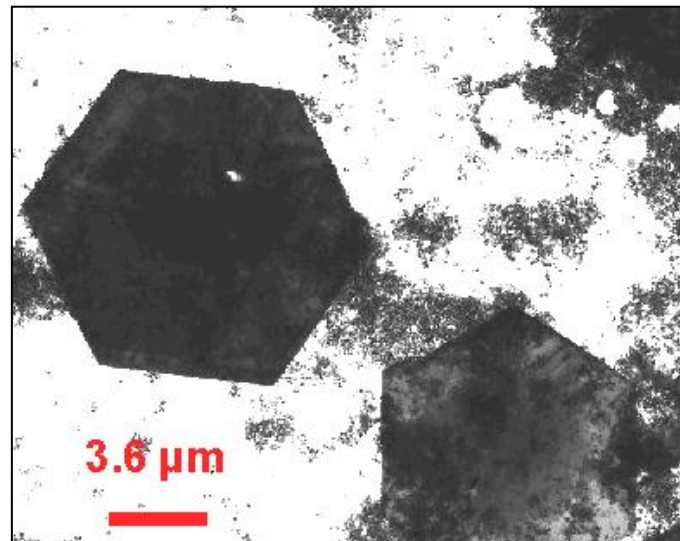


Figure 6 : Photo en microscopie électronique à transmission de cristaux de rouille verte carbonatée (CO₃²⁻) (Zegeye, 2006)

- *Occurrence des rouilles vertes dans les sols*

Il existe un équivalent naturel des rouilles vertes, la fougérite, découverte en association avec la goethite et la lépidocrocite entre autres, dans des sols hydromorphes de la forêt de Fougères en Bretagne (**Figure 7**) (Trolard et al., 1996; Trolard et al., 1997; Abdelmoula et al., 1998). Cette découverte est la première qui a mis en évidence la formation d'une rouille verte dans le milieu naturel sans intervention anthropique. Elle est rencontrée dans les sols hydromorphes développés sur granite et sur schiste (Bourrié et al., 1999). Les sols hydromorphes se caractérisent par des phénomènes de réduction ou de ségrégation locale du fer, liés à une saturation temporaire ou permanente de l'eau provoquant un déficit en oxygène (Duchaufour, 1998). Les conditions de formation du minéral dans l'environnement ne sont pas encore établies. Les rouilles vertes ont été identifiées dans des gleys ou pseudogleys avec un pH compris entre 5,2 et 6,3 et un potentiel redox d'environ -250 mV. La voie la plus envisageable pour expliquer l'occurrence des rouilles vertes dans l'environnement est microbienne, les bactéries ferriréductrices, par leur capacité à générer du Fe(II) par réduction des oxydes de fer, seraient impliquées dans la formation de la rouille verte (Berthelin et al., 2006).

© M. Abdelmoula

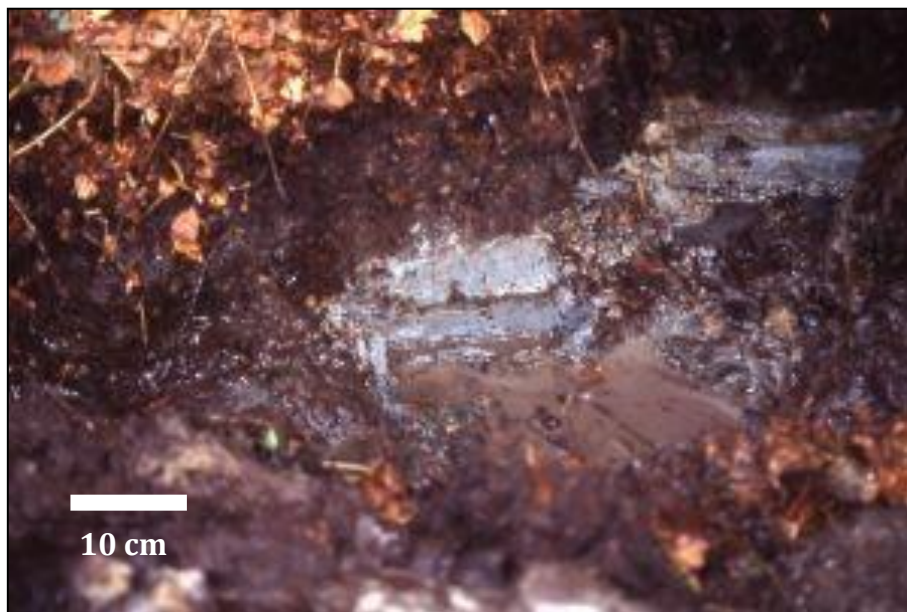


Figure 7 : Fougérite dans un sol hydromorphe de la forêt de Fougères (Trolard et al., 1996)

- *Réactivité de la rouille verte*

Il a été montré que la rouille verte sulfatée abiotique est capable de réduire Ag(I), Au(III), Cu(II) et Hg(II) (O'Loughlin et al., 2003b) ainsi que des composés chlorés tels que le CCl₄ et CHCl₃ (Erbs et al., 1999), le nitrate (Hansen et Koch, 1998), des composés azotés aromatiques (Kone et al., 2009). Loyaux-Lawinczak et al. puis Bond et Fendorf (2000; 2003) ont étudié la transformation du chrome hexavalent Cr(VI) en présence de rouille verte sulfatée et chlorurée et ont observé que les deux rouilles vertes étaient très réactives vis-à-vis du chrome et réduisaient complètement et rapidement le Cr(VI) en Cr(III) beaucoup moins soluble et relativement immobile dans l'environnement. D'autres auteurs ont également travaillé sur la réactivité de la rouille verte vis-à-vis du sélénium, de l'uranium et du mercure (Myneni et al., 1997; Refait et al., 2000). L'uranium U(IV) est réduit en une forme insoluble UO₂ (O'Loughlin et al., 2003a). Toutes ces réactions montrent l'importance que pourrait avoir la rouille verte dans des sols contaminés.

Tout comme de nombreux solides contenant du Fe(II) dans leur structure (Elsner et al., 2004) ou sorbé (Charlet et al., 2007), les rouilles vertes sont de puissants réducteurs naturels grâce à leur Fe(II) structural. En effet, le Fe(II) structural comme celui des rouilles vertes pourrait jouer un rôle significatif dans l'atténuation de contaminants réductibles dans les sols. Il est capable de réduire des polluants organiques et métalliques. Parmi les espèces ferreuses réactives, les rouilles vertes sont les plus réactives (Elsner et al., 2004). Ces HDL jouent également le rôle de catalyseur dans la réaction de Fenton modifiée (Hanna et al., 2009). La réaction de Fenton peut être effectuée à pH neutre en présence de rouille verte et de peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Le Fe(II) présent dans la structure de la rouille verte réagit avec le peroxyde d'hydrogène et produit des espèces réactives de l'oxygène qui vont interagir avec les polluants et les dégrader. L'intérêt de cette réaction de Fenton modifiée réside dans le fait que cette réaction peut se faire à pH neutre et être utilisée dans la bioremédiation des sols contrairement à la réaction de Fenton initiale qui a lieu aux pH inférieurs à 4. En raison de grand contenu en Fe(II), la rouille verte est plus efficace que la magnétite dans la réaction de Fenton modifiée (Hanna et al., 2009).

II. FER ET BACTERIES

Il existe trois types d'interactions des bactéries avec le fer. La première concerne son utilisation comme nutriment de constitution, le fer représente en effet la partie prosthétique de plusieurs protéines essentielles du métabolisme. On parle alors de réduction assimilatrice car c'est sous sa forme ferreuse qu'il est associé aux protéines. Sous sa forme oxydée, il sert d'accepteur d'électrons à certains groupes métaboliques bactériens, on parle dans ce cas de réduction dissimilatrice car le Fe(II) une fois réduit n'est pas fixé par la bactérie ; la réaction se produit par ailleurs à l'extérieur de la cellule. Enfin, d'autres groupes métaboliques bactériens catalysent l'oxydation du Fe(II), qui sert alors de donneurs d'électrons, il s'agit dans ce dernier cas d'oxydation dissimilatrice. Nous allons développer ci-dessous ces différentes relations bactéries – fer en insistant davantage sur la réduction dissimilatrice puisque c'est elle qui a essentiellement été sollicitée dans nos travaux.

1. REDUCTION ASSIMILATRICE

La réduction assimilatrice est un processus au cours duquel le fer est utilisé comme nutriment. L'assimilation du fer par les bactéries aérobies est rendue possible grâce à un ensemble biochimique constitué de Fe(III)-réductases et de sidérophores. Certaines bactéries relarguent des sidérophores dans l'environnement pour fixer le fer (Gram, 1994; Little et al., 1998). Les ions Fe^{3+} complexés par les sidérophores sont réduits en Fe^{2+} soit au niveau des membranes, soit dans un environnement proche de la bactérie par le biais de réductases ferriques extracellulaires (Nealson et Saffarini, 1994). Le sidérophore est alors libéré lorsque l'ion Fe^{3+} est réduit en Fe^{2+} .

2. REDUCTION DISSIMILATRICE

La respiration anaérobie est un processus au cours duquel l'accepteur terminal de la chaîne de transport des électrons est une molécule oxydée autre que l' O_2 . Les microorganismes qui réduisent les métaux par voie dissimilatrice sont aussi capables en général d'utiliser une grande variété d'accepteurs terminaux d'électrons pour la respiration anaérobie, dont les oxydes de fer (Venkateswaran et al., 1999). La respiration anaérobie est plus avantageuse que la fermentation car elle produit plus

d'ATP grâce à la phosphorylation oxydative. Cette synthèse d'ATP est par contre moins efficace que celle de la respiration aérobie.

3. *SHEWANELLA PUTREFACIENS*

La bactérie *Shewanella putrefaciens* (**Figure 8**) est un bacille Gram négative anaérobie facultative non fermentative. Elle mesure 2 à 3 μm de long et a un diamètre compris entre 0,4 et 0,7 μm (Venkateswaran et al., 1999).

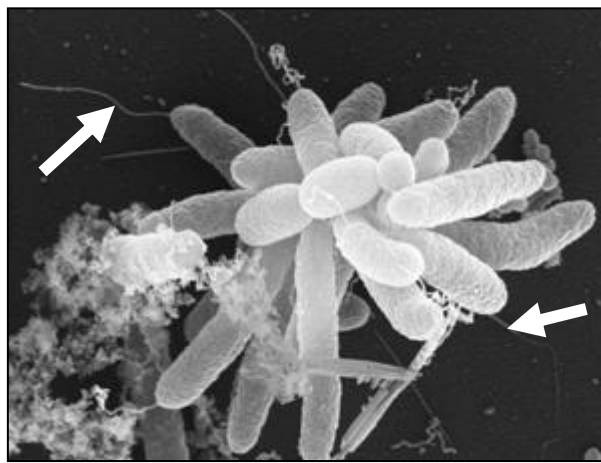


Figure 8 : Photo en microscopie électronique à balayage de cellules de *Shewanella putrefaciens* avec leur flagelle polaire (flèches) (Jorge Rodriguez, Université de Californie).

Shewanella putrefaciens fait partie de la subdivision gamma des protéobactéries (Woese et al., 1985). Elle est capable de coupler, en atmosphère anaérobie, la réduction du Fe(III) à l'oxydation de composés donneurs d'électrons afin d'obtenir l'énergie nécessaire à sa croissance (Nealson et Saffarini, 1994) comme le fumarate (qui peut également jouer le rôle d'oxydant en anaérobie), le nitrate, le triméthylamine N-oxyde, les oxydes de manganèse (III/IV), les oxydes de fer (III) et d'autres (Myers et Myers, 1997). La capacité des microorganismes à croître en utilisant le Fe(III) comme accepteur final d'électrons en atmosphère anaérobie est largement représentée par les bactéries présentes au sein de ce groupe (Lovley, 1997) mais cette capacité se retrouve aussi chez le genre *Geobacter* (Weber et al., 2006). Sa température optimale de croissance se situe entre 25 et 35 °C et l'intervalle de pH optimal est compris entre 7 et 8. Elle est halotolérante et peut donc se développer sur des milieux contenant jusqu'à 0,3 M de

NaCl (Venkateswaran et al., 1999). En fin de croissance sur milieu gélosé, les jeunes colonies sont de couleur rosâtre et de forme circulaire (Venkateswaran et al., 1999). *Shewanella putrefaciens* est une bactérie avec un seul flagelle polaire (**Figure 8**) (Holt et al., 2005).

Le caractère ubiquitaire de *Shewanella putrefaciens* est dû à sa capacité de pouvoir exploiter un large panel de composés comme accepteurs finaux d'électrons (Scott et Nealson, 1994). *Shewanella putrefaciens* développe un système complexe de transport des électrons (**Figure 9**) qui facilite sa capacité à utiliser divers composés comme accepteurs pour la respiration anaérobie tels que les oxydes de Fe(III), Mn(IV), NO₃⁻, NO₂⁻, S₂O₃²⁻, SO₃²⁻, S⁰, U(IV), Te(VII), fumarate, organo-chlorures, triméthylamine N-oxyde, glycine, diméthyl sulfoxyde (Myers et Nealson, 1988; Nealson et Saffarini, 1994; Venkateswaran et al., 1999).

La chaîne respiratoire des bactéries ferriréductrices permet de transférer les électrons provenant de l'oxydation de la matière organique ou de l'H₂ vers l'accepteur extracellulaire sous forme solide (**Figure 9**). Le flux d'électrons d'un donneur organique vers le Fe(III) par l'intermédiaire de la chaîne respiratoire provoque une translocation des protons dans l'espace périplasmique. Le retour des protons vers le cytoplasme dû à la force proton-motrice entraîne la formation de l'ATP via une ATPase. Les électrons doivent traverser l'espace périplasmique et la membrane externe pour réduire l'accepteur final d'électron, le Fe(III) solide.

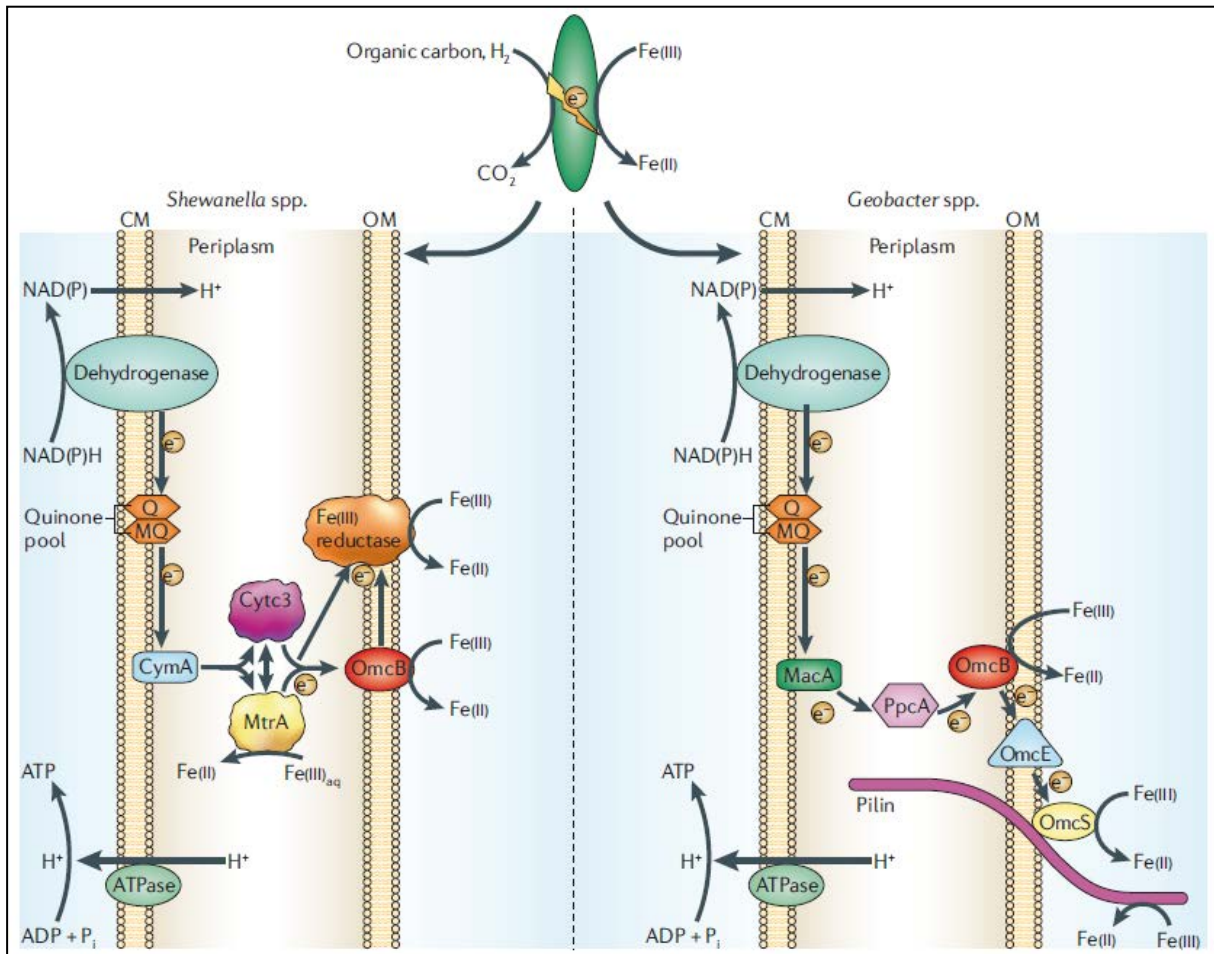


Figure 9 : Représentation schématique de la chaîne respiratoire de *Shewanella* spp et de *Geobacter* spp. (Weber et al., 2006)

Afin de pouvoir utiliser le Fe(III) sous forme solide, *Shewanella putrefaciens* utilise différents mécanismes.

4. INTERACTION FER ET BACTERIES

Les bactéries étant capables d'utiliser le Fe(III) solide comme source d'électrons pour la respiration, elles ont mis en place différentes stratégies afin d'interagir avec les minéraux (Figure 10).

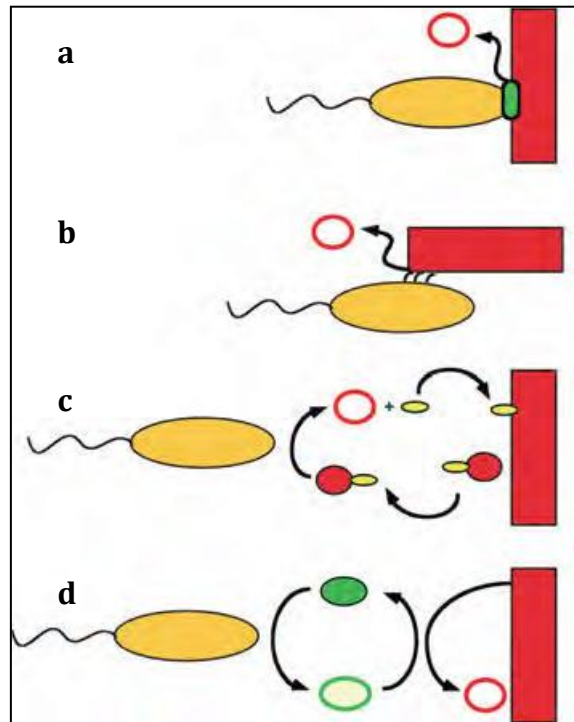


Figure 10 : Réduction bactérienne du Fe(III) par transfert des électrons via : un contact direct (a), des pili conducteurs (nanowires) (b), des sidérophores(c), ou des navettes à électrons (d). Les ovales rouges représentent le Fe(II) (vides) ou le Fe(III) (pleins), les ovales verts représentent les transporteurs oxydés (pleins) ou réduits (vides), les ovales jaunes les sidérophores. (Gralnick et Newman, 2007)

Différentes stratégies ont été proposées comme le contact direct entre la bactérie et la surface du Fe(III) solide (**Figure 10a**). Il semble que les cytochromes-c, majoritairement situés dans la membrane cytoplasmique en conditions aérobies soient délocalisés vers la membrane externe en absence d'oxygène (Myers et Myers, 1992). C'est donc dans la membrane externe que serait localisée l'enzyme responsable de la réduction du fer et les cytochromes présents serviraient de transporteurs d'électrons de la membrane cytoplasmique vers la membrane externe via le périplasme. Le transport d'électrons s'accompagne alors d'une translocation de protons nécessaire à la production d'ATP, selon le principe chimiosmotique de Mitchell.

Chez *Shewanella* et *Geobacter* le mécanisme de transport d'électrons peut, dans certaines conditions, être complété par l'intervention de pili spécifiques ou «nanowires» qui conduisent les électrons à l'extérieur de la cellule (**Figure 10b et Figure 11**)(Gorby et al., 2006).

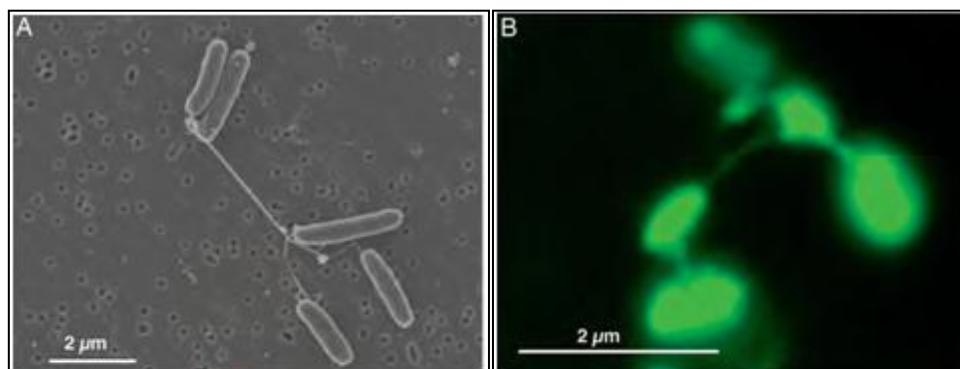


Figure 11 : Cellules de *Shewanella oneidensis* avec leurs pili conducteurs (nanowires) par microscopie à balayage (A) ou optique sous épifluorescence (B) (source : Gorby et al., 2006)

Les bactéries peuvent aussi faire intervenir des sidérophores (**Figure 10c**), ce sont des chélateurs, molécules de faible poids moléculaire ayant une forte affinité avec le Fe^{3+} qui vont permettre aux microorganismes en formant des complexes [sidérophore- Fe^{3+}] d'internaliser le fer. La bactérie utilise ce ligand organique qui en solubilisant le Fe(III) le rend plus disponible pour la respiration anaérobie des oxydes de Fe(III) (Taillefert et al., 2007). Cependant, cette voie n'apparaît pas une stratégie majeure des bactéries ferriréductrices, elle permet d'augmenter la quantité de Fe^{III} réduite mais ne serait pas assez « rentable » énergétiquement.

Une autre voie consiste à utiliser une navette à électrons (**Figure 10d**), c'est-à-dire une molécule soluble qui peut diffuser de la bactérie vers l'oxyde de fer en transportant les électrons. La réduction du Fe(III) est alors non enzymatique. Leur présence accélère la vitesse de réduction du Fe(III) et permet la réduction de sites inaccessibles aux bactéries (Lovley et al., 1998). L'antraquinone disulfonate (AQDS) est souvent utilisée comme une molécule modèle de l'action de ces navettes à électrons. Ces composés peuvent être sécrétés par la bactérie comme par exemple la ménaquinone, une mélanine extracellulaire chez *Shewanella alga* BrY (Turick et al., 2002).

Des composés exogènes et plus particulièrement les substances humiques peuvent aussi être utilisés par les bactéries. Il s'agit de molécules de haut poids moléculaire, issues de la dégradation incomplète de la matière organique. Ces substances sont réduites par les bactéries et réduisent le Fe(III) par voie abiotique (Lovley et al., 1996a).

Analyse bibliographique

A pH neutre, la majorité des oxydes de fer est sous forme solide avec des constantes de solubilité très faibles. C'est pourquoi, le Fe(III) ne diffuse pas à l'intérieur de la cellule pour servir comme accepteur d'électrons comme c'est le cas pour l'O₂. La chaîne respiratoire des bactéries ferriréductrices doit alors permettre de transférer les électrons provenant de l'oxydation de la matière organique ou de l'H₂ vers l'accepteur extracellulaire sous forme solide.

Ces propriétés métaboliques ouvrent des perspectives d'applications intéressantes comprenant par exemple la mise au point de piles à combustible microbiennes (*microbial fuel cell*) dont le catalyseur (la bactérie) se développe et se régénère de façon autonome en restant stable des semaines voire des mois. La diversité du monde microbien permet d'envisager l'exploitation de sources de matières organiques très variées : sédiments marins, effluents industriels et urbain, déchets agricoles, etc., comme sources d'électrons. Cette approche permettrait à la fois de produire de l'énergie tout en valorisant des déchets (Bergel, 2009).

Le transport des bactéries dans le sol est contrôlé en partie par leur adhésion à la surface des solides (**Figure 12**).

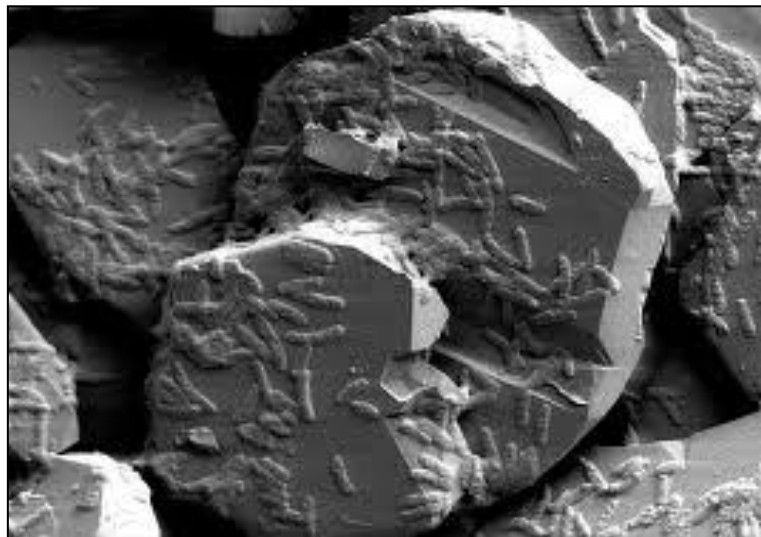


Figure 12 : Photo en microscopie électronique à balayage de *Shewanella putrefaciens* CN32 à la surface d'oxydes de fer (hématite Fe₂O₃) (source : Environmental Molecular Sciences Lab, USA)

Par exemple, l'adhésion d'*E. coli* a été étudiée sur deux minéraux représentatifs du sol que sont le quartz et la lépidocrocite. Il a été montré que l'adhésion des bactéries diminue avec des pH élevés en réponse à une baisse de l'attraction électrostatique entre les cellules bactériennes et la surface du minéral (Krack et al., 2007).

Shewanella putrefaciens se sert de pili ou de polymères pour rester attachée aux oxydes de Fe(III) facilitant sa réduction (Roberts et al., 2006). Pourtant, Caccavo Jr et al., (1997) n'avaient pas mis en évidence de lien entre l'adhésion au Fe(III) et la vitesse à laquelle il est réduit par la bactérie. De plus, selon la nature de la source de carbone (pyruvate, uridine, lactate, formiate) qu'elle utilise, *Shewanella putrefaciens* est responsable de la formation de minéraux différents (sidérite, hydroxyde de fer carbonaté hydraté, magnétite)(Salas et al., 2009). Myers et Myers (1992a; 1992b) ont montré que la localisation des cytochromes de type-c nécessaires à la respiration est variable en fonction des conditions de culture. En effet, lorsque la bactérie est cultivée en aérobie, la majorité des cytochromes de type-c est localisée dans la membrane. Par contre, en anaérobie, plus de 80% des cytochromes de type-c se trouvent associés à la membrane externe. D'autre part, plus de 55% de l'activité ferriréductrice observée dans les membranes de cellules cultivées en anaérobie sont associées à la membrane externe. Ce résultat indiquerait que l'enzyme Fe(III)-réductase est localisée dans la membrane externe. DiChristina et al. (2002) ont montré la présence d'une protéine de 90 KDa dans la membrane externe, qui permettrait à *Shewanella oneidensis* MR-1 d'établir un contact physique avec le Fe(III) et d'y transférer les électrons (Myers et Myers, 1992b; Beliaev et al., 2001).

En utilisant le Fe(III) solide comme source d'électrons les bactéries vont être indirectement responsables de la formation de minéraux secondaires dont la nature est différente selon les conditions environnementales. En laboratoire ces biosynthèses et en particulier celle de la rouille verte, qui nous intéresse plus particulièrement ici, ont été étudiées afin de mettre en évidence les conditions de formation de ces minéraux et ainsi comprendre les mécanismes de formation dans l'environnement mais également maîtriser la synthèse de ces minéraux afin de pouvoir utiliser leur éventuelle capacité réductrice.

III. SYNTHÈSE DE MINÉRAUX DE TYPE ROUILLE VERTE EN CONDITION « BATCH »

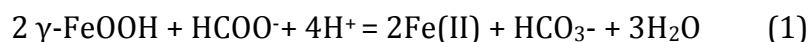
Dans cette partie seront développées les conditions de synthèse de la rouille verte en batch par voie microbienne (biominéralisation) et par voie chimique.

Le processus de biominéralisation comme nous l'entendons est l'intervention de bactérie dans la formation de minéraux secondaires à partir d'une phase minérale primaire. Les bactéries jouent un rôle dans ce processus de biominéralisation, elles sont indispensables mais il est important de nuancer leur fonction. En effet, les bactéries ne sont pas directement responsables de la formation de minéraux secondaires. Ce sont elles qui produisent le Fe(II) mais la transformation du minéral primaire se fait selon des processus physico-chimiques. Elles ont donc une action indirecte.

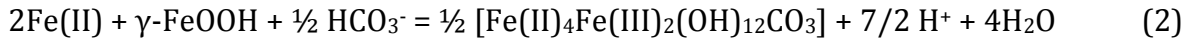
Afin de comprendre et d'expliquer l'occurrence de la rouille verte dans l'environnement, d'étudier sa réactivité ou de déterminer les conditions permettant sa synthèse par l'activité bactérienne, plusieurs travaux ont été menés en laboratoire.

1. FACTEURS INFLUENÇANT LA FORMATION PAR VOIE MICROBIENNE DE ROUILLE VERTE OU DE MAGNETITE

La synthèse de la rouille verte par voie microbienne est étudiée depuis plusieurs années et est parfaitement maîtrisée (Ona-Nguema et al., 2002a; Zegeye et al., 2007). Elle peut expliquer l'occurrence des rouilles vertes dans l'environnement (Berthelin et al., 2006). Le modèle bactérien utilisé est *Shewanella putrefaciens*, une bactérie ferriréductrice présente dans les sols et facile à cultiver. A partir de lépidocrocite γ -FeOOH et de formiate de sodium HCOONa, il a été montré que deux minéraux secondaires peuvent alors être formés, la rouille verte carbonatée (**Figure 13**) et la magnétite (Ona-Nguema et al., 2002a; Zegeye et al., 2007). La réduction du Fe(III) est associée à l'oxydation du formiate en condition stœchiométrique : 1 mole de formiate réduit 2 moles de Fe(III) selon l'équation suivante :



Le Fe(II) ainsi produit précipite avec le Fe(III) solide et les carbonates en rouille verte (2) ou en magnétite (3).



ou

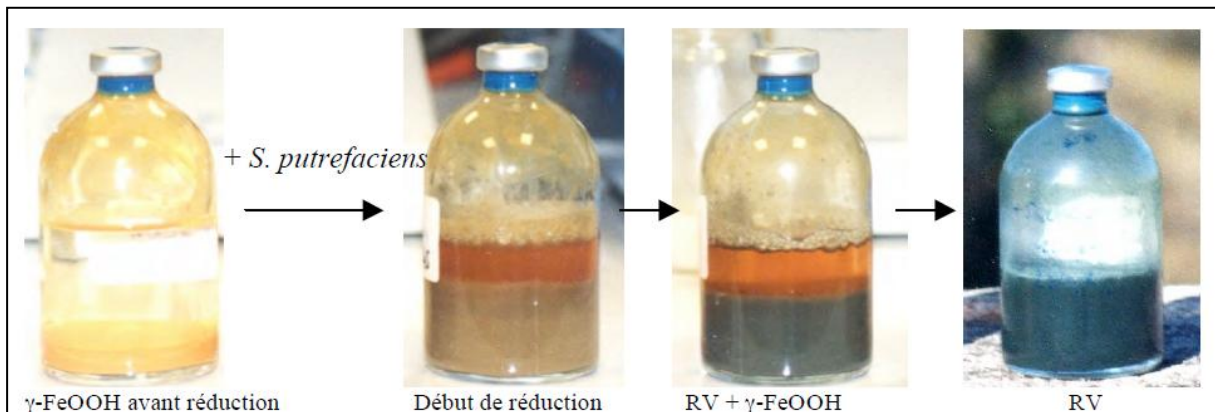
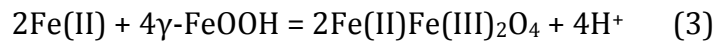


Figure 13 : Suivi du changement de coloration au cours de la bioréduction de la lépidocrocite par *Shewanella putrefaciens* (Ona-Nguema, 2003)

Il a alors été mis en évidence plusieurs facteurs qui influenceraient la formation de la rouille verte ou de la magnétite.

- *Influence de la concentration cellulaire*

Des études précédentes sur la synthèse des rouilles vertes à partir de lépidocrocite en présence de formiate (Ona-Nguema et al., 2002a; Zegeye et al., 2007) ont montré que la concentration bactérienne était un paramètre clé dans la formation de celles-ci. En effet, il existe une concentration limite ($2,2 \times 10^9$ cellules ml^{-1}) en dessous de laquelle la rouille verte ne se forme pas et « laisse place » à la magnétite. Il a également été montré que l'ajout de bactéries « mortes » (préalablement autoclavées 15 min à 121 °C) permet d'orienter le minéral secondaire en rouille verte avec une densité bactérienne en dessous de la concentration limite mise en évidence précédemment. Zegeye et al., (2010) ont montré par microscopie confocale et par analyses géostatistiques des images obtenues, que la densité cellulaire jouait un rôle sur la

formation de deux types d'agrégats qui se différencient au niveau de l'organisation des particules bactériennes et de la lépidocrocite qui les constituent. Avec une forte concentration cellulaire, les agrégats formés sont très compacts, ce qui pourrait limiter la diffusion des différentes espèces et conduire à la formation de micro environnements où sont concentrés les ions Fe^{2+} , CO_3^{2-} ce qui serait alors favorable à la formation de rouille verte carbonatée. Par contre, avec une faible densité cellulaire, les agrégats sont plus lâches, ce qui limiterait moins la diffusion des espèces chimiques, ce qui favoriserait la formation de magnétite par une transformation topotactique due à l'adsorption des ions Fe^{2+} sur l'oxyhydroxyde ferrique (Tamaura et al., 1983; Tronc et al., 1992).

- *Influence des polymères organiques*

Zegeye et al. (2010) ont mis en avant le rôle que pouvait jouer la concentration cellulaire sur la formation du minéral secondaire. Dans cet ordre d'idée, des essais ont été effectués en remplaçant une partie de l'inoculum par des bactéries préalablement autoclavées 15 minutes à 121 °C. Les résultats ont montré que l'ajout de bactéries mortes favorisait la formation de rouille verte. Les bactéries étant considérées comme « mortes » et donc sans aucune activité bactérienne, c'est donc les corps bactériens, c'est à dire les polymères organiques, qui sont responsables de la formation de rouille verte.

Afin de poursuivre les investigations et de comprendre le rôle des polymères organiques issus des corps bactériens, des essais ont été menés en remplaçant les bactéries mortes par des polymères organiques synthétiques provenant du commerce. En effet, des études préliminaires ont été menées avec un polymère anionique, le polyacrylate (PAA) afin d'évaluer si celui-ci permet ou non l'orientation de la formation du minéral secondaire en rouille verte. Les résultats ont effectivement montré que le PAA pouvait, à partir d'une certaine concentration, jouer un rôle dans la formation de la rouille verte. Ces essais ont été poursuivis dans la présente étude et font l'objet de la deuxième partie du chapitre I.

- *Influence des oxyanions*

L'effet de certains oxyanions comme l'arsenate, le borate, le molybdate, le phosphate, le silicate et le tungstate ont été testés sur la bioreduction de la lépidocrocite par *Shewanella putrefaciens* (O'Loughlin et al., 2010) Les auteurs ont émis l'hypothèse que la sorption compétitive des anions sur les oxydes de fer bloquait l'accès aux cellules bactériennes, empêchant ainsi l'action des navettes à électrons entre la surface des oxydes de fer, limitant ainsi le taux de bioréduction, favorisant ainsi la synthèse de rouille verte.

La présence de phosphate ou plus directement la sorption de phosphate sur les oxydes de Fe(III) a été identifiée comme facteur clé dans la formation de rouille verte, plutôt que de magnétite, dans la bioréduction de la ferrihydrite par *Shewanella putrefaciens*. Cependant, le mécanisme par lequel le phosphate conduit à la formation de rouille verte n'est pas clairement établi.

Zegeye et al. (2007) proposent que la formation de rouille verte vs magnétite serait contrôlée par le taux de réduction de la lépidocrocite. Lorsque que la concentration en Fe(III) est supérieure à celle du Fe(II), la magnétite est formée et le taux de réduction est faible. Par contre lorsque que la concentration en Fe(II) est plus importante que celle du Fe(III), la rouille verte est alors formée et le taux de réduction est faible.

- *Influence de l'espèce bactérienne de Shewanella*

Des auteurs se sont intéressés à l'influence de la souche bactérienne sur la nature du minéral secondaire formé. O'Loughlin et al., (2007) ont testé 10 souches du genre *Shewanella* et n'ont pas observé de différence significative sur le produit final (rouille verte). Cependant la densité bactérienne de chaque essai n'est pas indiquée avec précision ($\sim 5 \times 10^9$ cellules mL⁻¹). Par contre Salas et al. (2010) montrent que sur 3 souches de *Shewanella* ($\sim 10^8$ cellules mL⁻¹) donnent des minéraux secondaires différents, seule celle formant des biofilms « robustes » conduit à la formation de rouille verte, les deux autres donnant la magnétite. Sachant que les exopolymères sont

impliqués dans la formation des biofilms, il est probable qu'ils soient également impliqués dans la nature du minéral secondaire.

- *Influence du donneur d'électrons*

Salas et al. (2009) ont également montré que la nature du donneur d'électron avait un impact sur la formation des minéraux secondaires à partir de HFO par *Shewanella putrefaciens*. Avec le pyruvate, le minéral secondaire est la sidérite, avec l'uridine, la rouille verte est obtenue et avec le lactate, les minéraux secondaires formés sont la magnétite et la rouille verte. Avec un donneur d'électron inorganique (H₂), la rouille verte sulfatée peut également être obtenue (Zegeye et al., 2005).

- *Influence de l'accepteur d'électrons*

Dans notre étude, la lépidocrocite a été utilisée car la fougérite a été découverte associée à la goethite et à la lépidocrocite. La lépidocrocite étant un des produits d'oxydation de la rouille verte (Abdelmoula et al., 1996), et celle-ci vieillissant en goethite, il a été suggéré qu'elle serait la « matière première » pour la formation de la fougérite. De plus, la lépidocrocite γ -FeOOH a l'avantage de ne pas être modifiée suite aux traitements stérilisants par la chaleur (121°C). La ferrihydrite convient également pour produire de la rouille verte par voie microbienne par contre la réduction microbienne d'autres oxyhydroxydes de Fe(III) comme la goethite ne conviendrait pas à la formation de rouille verte (Ona-Nguema, 2003).

2. SYNTHÈSE PAR VOIE ABIOTIQUE

- *Par coprécipitation*

La synthèse des rouilles vertes carbonatées peut se faire par voie abiotique par coprécipitation de sels de Fe(II) et de sels de Fe(III) stabilisées par les ions phosphates (Bocher et al., 2004). La synthèse des rouilles vertes sulfatées se fait également par coprécipitation de Fe(II) et de Fe(III) en solution sulfatée.

- *Par oxydation chimique partielle de Fe(II) aqueux ou de Fe(OH)_{2(s)}*

L'oxydation chimique partielle de Fe(II) soluble ou Fe(OH)_{2(s)} est la méthode la plus commune pour synthétiser une grande quantité de rouille verte. Généralement, l'oxydation est effectuée en introduisant un flux contrôlé d'oxygène dépourvu de CO₂ dans le système. A part l'oxygène, de puissants oxydants tels que le persulfate de sodium peuvent être aussi utilisés (Legrand et al., 2004). Un suivi constant du pH et du potentiel redox est important pendant la synthèse afin d'identifier la fin de celle-ci. Il faut cependant faire attention à ce que le taux d'oxydation ne soit pas trop rapide afin d'éviter la formation de magnétite ou de goethite. La synthèse des rouilles vertes carbonatées peut aussi se faire par oxydation d'hydroxydes de Fe(II) en présence de phosphates (Refait et al., 2007).

- ✓ *Oxydation électrochimique partielle de Fe⁰ ou de Fe(II) aqueux.*

Legrand et al. (2004) ont étudié la formation de rouille verte par oxydation électrochimique de Fe⁰, introduit sous forme de disques de fer dans une solution de bicarbonate/carbonate à pH neutre (8,5 à 9,8) (Legrand et al., 2000; Legrand et al., 2001a; Legrand et al., 2001b). Le dispositif expérimental consiste en une cellule électrochimique remplie avec une solution électrolytique de bicarbonate/carbonate et avec un disque de fer placé au sommet de la cellule. Après un traitement anodique, la rouille verte précipite sur le disque. De la rouille verte carbonatée est obtenue dans 0,4 M de solution électrolytique sous un potentiel compris entre 0,77 à 0,7 V. La rouille verte produite électrochimiquement a un ratio Fe(II)/Fe(III) égal à 1. La rouille verte chlorurée avec un ratio similaire de Fe(II)/Fe(III) est produite par oxydation d'un disque de fer submergé dans une solution alcaline, à pH 9 de 1M de KCl à un potentiel de -0,35 V (Refait et al., 1998).

- ✓ *Réduction dissolutive d'hydroxydes de Fe(III) par le Fe(II) aqueux.*

Il a été observé que la rouille verte peut être formée comme produit de réduction dissolutive d'oxydes de fer tels que la ferrihydrite et la lépidocrocite par le Fe(II) aqueux

(Tamura, 1985; Hansen et al., 1994). De même que la méthode de coprécipitation, les mécanismes de formation de la rouille verte dépendent de l'adsorption d'espèces ferriques partiellement hydroxylées sur la surface d'oxyhydroxydes de fer fraîchement précipités, ainsi causant sa transformation en rouille verte (Hansen et al., 1994; Ruby et al., 2006a). Pour former la rouille verte, les réactions requièrent un milieu basique (pH 7-9), un excès de Fe(II) pour empêcher la formation de magnétite et des anions appropriés qui facilitent le transfert d'électrons provenant des espèces ferriques adsorbées sur l'oxyde ferrique (Tronc et al., 1992).

IV. BIOMINÉRALISATION DE MINÉRAUX SECONDAIRES DU FER EN CONDITION DE FLUX

1. LA PLACE DES MINÉRAUX DANS LES SOLS

Les minéraux ferreux-ferriques constituent seulement une petite fraction de la masse totale de la phase solide dans les sols, les sédiments aquatiques et marins et dans les environnements aquifères. Ces minéraux agissent pourtant sur le cycle des éléments traces métalliques, influencent le cycle du soufre, du carbone, du phosphore et peuvent équilibrer le pH et le E_h de la phase aqueuse. Le cycle du fer dans ces environnements est contrôlé par l'interaction entre les constituants de l'eau des pores du sol et la phase solide, et est souvent couplé à des processus microbiens. L'enfouissement, l'inondation ou le transport de matière organique ou d'autres agents réducteurs dans les sédiments ou dans les sols peuvent initialiser la réduction et la dissolution d'hydroxydes ferriques (Stumm et Sulzberger, 1992). Dans beaucoup de sols et de sédiments aquifères, les hydroxydes de fer sorbés sur la surface du sable sont la ferrihydrite, la goethite et la lépidocrocite (Wang et al., 1993). L'attachement de ces « sorbats » à la surface des silicates est généralement fort à cause des ponts Si-O-Si qui peuvent se former entre les grains de quartz et le dépôt d'oxyde de fer (Scheidegger et al., 1993; Rusch et al., 2010a). Dans les sols et dans les sédiments, les oxydes de fer et les silicates sont souvent associés à d'autres minéraux.

En conditions oxydantes, le Fe(III) prédomine et il est principalement séquestré dans des phases hydroxydes ferriques solubles. L'enfouissement, l'inondation ou le transport de matière organique ou d'autres agents réducteurs dans les sédiments et les sols peut initier la réduction et la dissolution des hydroxydes ferriques (Stumm et Sulzberger, 1992). Dans des environnements non sulfurés, la réduction des hydroxydes ferriques est catalysée par des bactéries réductrices du fer. La dissolution réductive des hydroxydes de fer peut relarguer dans l'environnement du fer ferreux dans l'eau contenue dans les pores et/ou promouvoir la précipitation de minéraux secondaires.

Les hydroxydes de fer les plus récurrents dans les sols sont la ferrihydrite, la lépidocrocite, la goethite et l'hématite (Cornell et Schwertmann, 2003). La précipitation

primaire produit généralement des phases plus solubles comme la lépidocrocite et la ferrihydrite, cependant ces minéraux sont souvent transformés en de formes plus stables et moins solubles comme la goethite et l'hématite (Cornell et Schwertmann, 2003). Tandis que l'hématite et la goethite sont les phases les plus abondantes et stables dans beaucoup d'environnements, les hydroxydes les moins stables jouent un rôle important dans la formation par voie microbienne d'espèces du Fe(II) (Lovley et Phillips, 1987; Roden et al., 2000). Lors de la réduction, le Fe(II) est relargué dans l'eau contenue dans les pores et des phases minérales secondaires sont formées. Le minéral secondaire produit lors de la bioréduction du Fe(III) dépend de l'état cristallin de la phase hydroxyde initiale, de la présence d'ions sorbés ou coprécipités, de la composition de la solution en particulier de la concentration en Fe(II) (Fredrickson et al., 1998; Zachara et al., 2002).

En observant l'environnement, de manière simplifiée, les oxydes de fer sont associés à des bactéries, de la matière organique et du sable (silice) formant un système poreux (**Figure 14**). C'est pourquoi, il convient d'envisager la synthèse de rouille verte dans un système complexe qui se rapprocherait de ce qui peut être observé dans l'environnement mais relativement simple afin de pouvoir analyser les paramètres un à un. De plus, la maîtrise de la synthèse des rouilles vertes en colonne permettrait d'envisager son utilisation dans la dépollution des sols et des eaux.

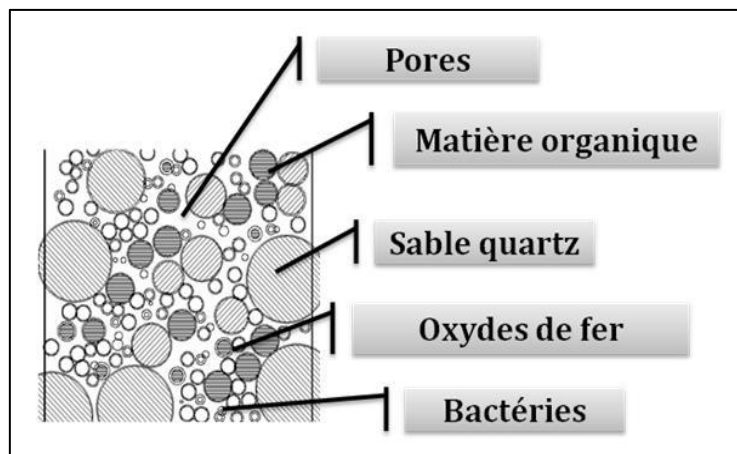


Figure 14 : Représentation schématique de l'association des constituants majeurs d'un sol.

Nous voulons tester la synthèse de rouille verte en colonne afin d'établir un montage qui permettrait à terme d'utiliser le potentiel dépollueur des rouilles vertes mais aussi de comprendre et d'expliquer l'occurrence des ces rouilles vertes dans l'environnement. Pour comprendre ce qui se passerait dans un système dynamique, nous pouvons partir de l'observation d'un système en batch.

Zachara et al. (2002), ont travaillé sur la biominéralisation d'oxydes de Fe(III) tels que la ferrihydrite par des bactéries ferriréductrices afin de mettre en évidence les facteurs contrôlant la nature du minéral secondaire. Zachara et al., ont suggéré que la nature du minéral secondaire formé lors de la biominéralisation d'oxyde de Fe(III) dépendait de la concentration en Fe(II). Le minéral spécifique issu de la réduction microbienne du Fe(III) dépend de la l'état de cristallisation de la phase initiale de l'hydroxyde, de la présence d'ions sorbés ou coprécipités, de la composition chimique de la solution en particulier de la concentration en Fe(II) (Zachara et al., 2002). Le processus de biominéralisation apparait comme un processus indirecte où le Fe(II) biogénique catalyse la transformation à travers un processus de réaction de surface (complexation de surface, transfert d'électrons) avec la ferrihydrite résiduelle et des ions sorbés comme les phosphates PO_4^{3-} et carbonates HCO_3^- . La nature des produits issus de la biominéralisation est sensible à la concentration totale et au taux de production de Fe(II), au pH et influencée par la dissolution de l'oxyde de Fe(III).

A partir de ces observations, nous pouvons comprendre l'importance que peut avoir la composition chimique de la phase aqueuse. Si la composition chimique de l'eau contenue dans les pores et les réactions cinétiques sont les facteurs déterminants, il semble que le mouvement de l'eau et le transport des produits issus de la réaction de la dissolution réductive aient un impact sur la composition et la formation des phases solides produites.

2. ETABLISSEMENT DE LA COLONNE SOUMIS EN FLUX HYDRAULIQUE

Roden et al. et Hansel et al. (2000; 2003) se sont d'ores et déjà intéressés à la biominéralisation d'oxydes de Fe(III) sous influence d'un régime hydraulique ainsi qu'aux facteurs qui pouvaient favoriser la formation de rouille verte.

La réduction dissimulatrice de Fe(III) de la goethite sorbée sur du sable par *Shewanella putrefaciens* a été étudiée dans des réacteurs en colonne en flux continu et en batch. Il a alors été montré que la quantité de Fe(III) restant était beaucoup plus faible dans le cas d'un système en flux continu qu'en batch. En effet, 95 % du Fe(III) a été réduit et perdu en solution en condition de flux alors que seulement 13 % de Fe(III) a été réduit et libéré dans la phase aqueuse avant que la réduction ne s'arrête (Roden et al., 2000). Roden et al., (2000) ont également mis en évidence une interaction entre le transport de l'eau et les réactions de surface au niveau de l'interface bactérie-minéral impliquée de manière fondamentale dans le contrôle du taux de réduction de Fe(III) mais aussi dans la croissance des bactéries ferriréductrices et leur transport dans les sédiments de surface. Précédemment, Roden et Urrutia (1999) ont montré que l'élimination du Fe(II) par le transport de l'eau pouvait jouer un rôle sur la réduction du Fe(III) par les bactéries en particulier favoriser leur croissance. Ce sont des informations à prendre en considération dans un système en colonne où l'on peut supposer que le Fe(II) produit peut être transporté en dehors du système étudié dû à l'établissement du flux.

L'établissement d'un système en colonne nécessite de travailler avec de la silice (quartz) afin de créer un milieu poreux hydrauliquement conducteur et ainsi permettre un processus d'écoulement.

Kukkadapu et al. (2003) ont travaillé sur la biotransformation de la ferrihydrite sorbée sur de la silice par *Shewanella putrefaciens* en particulier sur l'effet combiné de la présence de phosphate et de silice. Ils ont conclu sur le fait que la présence de silice n'avait aucun effet sur la biotransformation de la ferrihydrite en rouille verte et ont montré que la présence de phosphate dans le milieu favorise la formation de rouille verte carbonatée (Kukkadapu et al., 2003).

De plus, ils ont mis en évidence le rôle que pouvait jouer le phosphate dans un système en colonne sur l'interaction entre les bactéries et les oxydes de fer sorbés sur du sable quartz. Selon sa concentration, la présence de phosphate peut favoriser ou au contraire défavoriser l'attachement des bactéries sur les oxydes de fer et le quartz (Park et al., 2009). Les auteurs s'intéressent au phosphate car il favorise la croissance des bactéries mais aussi la formation de vivianite au détriment de la rouille verte.

Une autre question se pose sur le lessivage des bactéries dans un système en colonne où les bactéries sont soumises à un régime hydraulique en flux continu. Il a été montré que le transport et la rétention de bactéries (*E. coli*) pouvaient être influencés par la charge négative des grains de quartz, par le pH et par la force ionique (Kim et al., 2008a; Kim et al., 2008b).

Après ces observations, une question reste en suspend : la formation de la rouille verte est-elle possible dans un tel système ? Certains auteurs s'y sont intéressés : Hansel et al. (2003) ont observé la rouille verte comme phase minoritaire transitoire dans la minéralisation secondaire de la ferrihydrite par *Shewanella putrefaciens* en conditions hydrodynamiques. La rouille verte disparaît après plusieurs jours de réaction suggérant qu'elle se forme comme produit initial et qu'ensuite elle est dissoute ou convertie. Les minéraux secondaires formés sont alors la magnétite et la goéthite. La concentration en Fe(II) serait un facteur déterminant dans la minéralisation secondaire de la ferrihydrite. La goéthite précipiterait via un mécanisme de dissolution/reprécipitation et la magnétite proviendrait de la conversion en état solide initiée par la sorption de Fe(II) sur la ferrihydrite. Les auteurs ont également observé un impact de la vitesse de flux dans la colonne. La distribution des minéraux secondaires formés lorsque le flux est plus lent est différente, jouant sur la concentration en Fe(II) qui est alors plus faible dans la colonne entraînant une accumulation de goéthite et une inhibition de la formation de magnétite. Les auteurs ont également suivi le nombre de bactéries au cours de la réaction. Leur nombre décroît ainsi que le taux d'oxydation du lactate. Les auteurs proposent différentes explications potentielles pour justifier la décroissance du nombre de bactéries : la passivation de la surface de la ferrihydrite par la sorption du Fe(II), la passivation des cellules microbiennes par la sorption de Fe(II) et/ou l'incrustation de

goethite, la séquestration de Fe(III) dans la structure relativement stable de la magnétite, le déclin de la surface spécifique due à la conversion en magnétite et en goethite ou le manque de phosphate.

Borch et al. (2007) ont mis en évidence le rôle des oxyanions tels que les ions phosphates dans la bioréduction de la ferrihydrite par *Shewanella putrefaciens* en condition de flux en comparaison avec des conditions en batch. En batch, en absence de phosphate, les phases minérales secondaires observées sont la magnétite, la rouille verte et la goethite. La goethite disparaît lorsque la concentration en phosphate est plus importante et lorsque le phosphate recouvre 100 % de la ferrihydrite, seule la rouille verte est obtenue. En comparaison, les auteurs ont testé le rôle du phosphate en colonne avec différents recouvrements sur la réduction de la ferrihydrite et sur la bioformation du minéral secondaire. La phase majoritaire est la magnétite avec seulement une phase minoritaire de vivianite et/ou de rouille verte pendant la réduction dissimilatrice du fer de la ferrihydrite recouverte de phosphate. En absence de phosphate, contrairement à ce qu'il a été observé en batch, la goethite n'est pas formée. Le phosphate inhibe la formation de goethite en empêchant la ferrihydrite de se dissoudre.

Hansel et al. (2004) ont comparé la capacité de réduction et les mécanismes de séquestration du Fe(II) de la goethite, de l'hématite et de la ferrihydrite sous condition advective dans un milieu imitant l'eau des sols supplémentée avec du carbone organique en présence de *Shewanella putrefaciens*. L'absence de précipités secondaires détectables suggère que le Fe(II) séquestré dans la goethite et l'hématite se fait en grande partie sous forme de complexes de sorption à la surface des (hydr)oxydes et /ou des bactéries. Le taux de Fe(III) réduit diffère entre la ferrihydrite, la goethite et l'hématite.

La rouille verte n'a donc jamais été observée et caractérisée comme minéral secondaire issu de la biominéralisation d'un oxyde de Fe(III) par une souche bactérienne ferriréductrice. Notre objectif est donc de mettre à en place un système avec des paramètres permettant la formation de rouille verte. L'état de l'art nous montre que c'est une phase métastable et la mise en place d'un flux engendrant la mobilisation du Fe(II) ne semble pas être un facteur favorisant. Il faudra donc jouer sur la stabilisation

Analyse bibliographique

de la rouille verte si elle apparait comme phase minérale transitoire et surtout optimiser les paramètres comme la nature du donneur d'électrons, la souche bactérienne et la densité cellulaire pour ainsi favoriser sa formation.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

I. PREPARATION DES CULTURES BACTERIENNES

Shewanella putrefaciens est une bactérie qui a la capacité de croître facilement dans différents types de milieux qu'ils soient liquides ou solides. La souche de *Shewanella putrefaciens* CIP 8040 (équivalent à ATCC 8071) est obtenue à partir de la collection de l'Institut Pasteur (Paris, France). Les bactéries sont conservées au congélateur à -80°C sur des billes immergées dans du glycérol à 20%, un agent perméabilisant et cryoprotecteur (APC). Les bactéries congelées sont recultivées sur de l'agar trypticase soja (TSA, BioMérieux®, 51044 Marcy l'Etoile, France). Deux subcultures à 30°C pendant 48 heures sont réalisées. L'identité de la souche est régulièrement confirmée par identification sur galerie API 20 NE (BioMérieux, 20050). Le code est obtenu en 48 heures d'incubation de la galerie à 30°C.

Les cultures sont ensuite réalisées en aérobiose sur bouillon. Une suspension bactérienne de densité optique de $0,5 \pm 0,1$ ($\lambda = 600$ nm) est préparée à partir de la deuxième subculture. Vingt millilitres de cette suspension servent à inoculer 200 mL de bouillon trypticase soja (TSB, BioMérieux®, 51019). Les cellules sont cultivées, agitées continuellement à 300 rpm, à 30°C et récoltées après 14 h de culture par centrifugation ($10\,000 \times g$ à 20°C pendant 10 min) puis concentrées dans 30 mL de TSB. Vingt millilitres de cette solution sont injectés dans un réacteur batch contenant 1,5 L de TSB. Le réacteur est agité continuellement à 300 rpm et barboté par de l'air stérilisé à travers un filtre de 0,22 μm (Millex FG50, Millipore Billerica, MA, USA). Les cellules atteignent en 24 heures leur phase stationnaire de croissance et sont alors récoltées par centrifugation, lavées 2 fois avec NaCl 0,7% et concentrées dans 40 mL du milieu de base (**Tableau 2**). Les cellules sont purgées pendant 30 min par de l'azote N₂ (pureté, 99,99% alphagaz 1, Air Liquide Paris, France).

Matériel et méthodes

Tableau 2 : Composition du milieu de base pour 1L

	Formule chimique	Concentration (mM)	Moles	Masse molaire (g mol⁻¹)	Masse (g L⁻¹)
Chlorure d'ammonium	NH ₄ Cl	2,20 × 10 ¹	2,20 × 10 ⁻²	5,35 × 10 ¹	1,18
Chlorure de sodium	NaCl	1,50	1,50 × 10 ⁻³	5,84 × 10 ¹	8,76 × 10 ⁻²
Chlorure de potassium	KCl	1,20	1,20 × 10 ⁻³	7,46 × 10 ¹	8,95 × 10 ⁻²
Sulfate de magnésium heptahydraté	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,10	1,10 × 10 ⁻³	2,46 × 10 ²	2,71 × 10 ⁻¹
Nitrilotriacétique acide	NTA	7,10 × 10 ⁻¹	7,10 × 10 ⁻⁴	1,91 × 10 ²	1,36 × 10 ⁻¹
Chlorure de calcium	CaCl ₂	6,70 × 10 ⁻¹	6,70 × 10 ⁻⁴	1,11 × 10 ²	7,44 × 10 ⁻²
Sulfate de manganèse monohydraté	MnSO ₄ ·H ₂ O	2,70 × 10 ⁻¹	2,70 × 10 ⁻⁴	1,69 × 10 ²	4,56 × 10 ⁻²
Chlorure de zinc	ZnCl ₂	8,60 × 10 ⁻²	8,60 × 10 ⁻⁵	1,36 × 10 ²	1,17 × 10 ⁻²
Sulfate de cobalt heptahydraté	CoSO ₄ ·7H ₂ O	3,80 × 10 ⁻²	3,80 × 10 ⁻⁵	2,81 × 10 ²	1,07 × 10 ⁻²
Sulfate de fer heptahydraté	FeSO ₄ ·7H ₂ O	3,20 × 10 ⁻²	3,20 × 10 ⁻⁵	2,78 × 10 ²	8,90 × 10 ⁻³

Matériel et méthodes

			5		
Molybdate de sodium dihydraté	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$9,30 \times 10^{-3}$	$9,30 \times 10^{-6}$	$2,42 \times 10^2$	$2,25 \times 10^{-3}$
Chlorure de Nickel hexahydraté	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$9,10 \times 10^{-3}$	$9,10 \times 10^{-6}$	$2,38 \times 10^2$	$2,16 \times 10^{-3}$
Tungstate de sodium dihydraté	$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$6,80 \times 10^{-3}$	$6,80 \times 10^{-6}$	$3,30 \times 10^2$	$2,24 \times 10^{-3}$
Sulfate de cuivre pentahydraté	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$3,60 \times 10^{-3}$	$3,60 \times 10^{-6}$	$2,50 \times 10^2$	$8,99 \times 10^{-4}$
Sulfate d'aluminium potassium dodecahydraté	$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	$1,90 \times 10^{-3}$	$1,90 \times 10^{-6}$	$4,74 \times 10^2$	$9,01 \times 10^{-4}$
Acide borique	H_3BO_3	$1,50 \times 10^{-3}$	$1,50 \times 10^{-6}$	$6,10 \times 10^1$	$9,15 \times 10^{-5}$

II. SYNTHÈSE DES PHASES SOLIDES

1. LEPIDOCROCITE γ -FeOOH

La lépidocrocite est synthétisée par oxydation de sels de Fe(II) par une très forte agitation. Seize grammes de NaOH sont dissous dans 1 L d'eau osmosée (0,4 M). Cette solution de soude est mélangée avec une solution de 500 mL contenant 42 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,4 M). La solution de $\text{Fe}(\text{OH})_2$ obtenue, agitée en présence d'oxygène (1000 rpm), se transforme progressivement en rouille verte chlorurée, puis en oxyhydroxyde ferrique au bout de 3 h. Au cours de l'oxydation, la couleur du milieu passe du vert foncé à l'orange (lépidocrocite). La lépidocrocite est ensuite lavée trois fois à l'eau osmosée par centrifugation ($10\,000 \times g$, 10 minutes) pour enlever le chlorure de sodium. Le culot est ensuite séché à l'étuve à 50°C. Elle est ensuite caractérisée par diffraction des rayons X.

2. LEPIDO-COATED-SAND (LCS)

La lépidocrocite γ -FeOOH sorbée sur le sable est synthétisée à partir de lépidocrocite synthétisée précédemment et de sable. Trois types de sables sont utilisés : Chempur, Roth et Fontainebleau ayant chacun une taille de grains et une surface spécifique différentes (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Caractéristiques des différents types de sable quartz

	Surface spécifique ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	Taille des grains (μm)
Chempur F ₁	5 – 6	0,3 – 10
Roth F ₂	0,83 – 1	1,5 – 15
Fontainebleau F ₃	0,06	150 – 300

La fraction F₁ (Chempur) est la plus petite avec une taille de grains comprise entre 0,3 et 10 μm , la fraction F₃ (Fontainebleau) est la plus grossière avec une taille de grains comprise entre 150 et 300 μm .

Matériel et méthodes

Le degré de recouvrement (*coating*) de la lépidocrocite γ -FeOOH est calculé par rapport à la masse totale de lépidocrocite + sable et varie entre 0 et 100 % en sachant que la quantité de lépidocrocite γ -FeOOH est fixée à 1,07 g ce qui correspond à 300 mM. La lépidocrocite et le sable sont pesés et 200 mL de NaCl (10 mM) sont ajoutés au mélange. Le pH est ensuite ajusté à 4-5 avec HCl. Le mélange est passé 30 secondes aux ultrasons puis agité pendant 72 heures à 160 rpm. Le mélange est ensuite centrifugé et le culot est mis à sécher 48 heures à l'étuve à 50°C puis broyé au mortier.

III. ENUMERATION ET VIABILITE DES BACTERIES

1. ENUMERATION DES BACTERIES AU SYBR GREEN II

La concentration en bactéries de l'inoculum bactérien est évaluée par comptage au microscope à épifluorescence après marquage par un fluorochrome, le SYBR Green II. Le SYBR Green II RNA est un marqueur d'acides nucléiques et plus spécifiquement de l'ARN. Il est excité de façon maximale à 497 nm. L'émission de fluorescence de SYBR Green II RNA est centrée à 520 nm.

Après dilution en cascade de l'échantillon, les cellules sont marquées par le SYBR Green II. L'échantillon est ensuite filtré sur rampe de filtration sur une membrane noire en polycarbonate de porosité 0,2 µm et de diamètre 47 mm (Millipore, GTBP04700). Le filtre est ensuite monté entre lame et lamelle. Après séchage, une goutte de glycérine tamponnée est déposée par capillarité sur le filtre pour réhydrater la membrane. L'observation se fait au microscope à épifluorescence à l'objectif ×100 plan à immersion. Les microorganismes ayant fixés le SYBR Green II fluorescent dans le vert (515 nm) lorsqu'ils sont excités avec une lumière bleue (488 nm). Les bactéries sont dénombrées sur la surface du champ correspondant au réticule. Le résultat obtenu est un nombre de bactéries par champ. Un calcul permet ensuite de déterminer un nombre de bactéries présentes dans l'échantillon.

2. ESTIMATION DU NOMBRES DE CELLULES VIABLES : KIT DE VIABILITE *BacLight*

Le kit de viabilité *BacLight* est un test rapide qui met en évidence les dommages membranaires des cellules bactériennes qui emploient deux marqueurs d'acide nucléiques : le SYTO 9 qui fluoresce dans le vert et le iodide de propidium qui fluoresce dans le rouge. Ces marqueurs diffèrent dans leur capacité à pénétrer dans les cellules bactériennes. Le SYTO 9 met en évidence les cellules avec et sans dommages membranaires, alors que le iodide de propidium rentre seulement dans les cellules avec des dommages membranaires réduisant ainsi la fluorescence du SYTO 9 lorsque les deux fluorochromes sont présents. Les cellules intactes fluorescent donc dans le vert (520

nm) et les cellules avec dommages membranaires fluorescent dans le rouge (620 nm) et le vert. La superposition des deux permet donc de mettre en évidence les cellules présentant des dommages membranaires supposant ainsi qu'elles ne sont plus viables.

3. EVALUATION DU NOMBRES DE BACTERIES RESPIRANTES : CTC

Le chlorure de 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium (CTC) est un colorant d'oxydoréduction du type monotetrazolium qui produit un formazan fluorescent (CTF) quand il est réduit par voie chimique ou biologique. Le CTF se dépose à l'intérieur de la cellule. Jusqu'à une époque récente, le CTC avait seulement été employé comme indicateur d'oxydoréduction cellulaire de l'activité respiratoire (c'est-à-dire avec transport d'électrons) dans les expériences cytochimiques sur les ascites de cellules tumorales d'Ehrlich. Une étude récente décrit la première application du CTC pour la visualisation microscopique des bactéries respirant activement dans des échantillons prélevés dans l'environnement à l'état naturel ou enrichis par amendement et dans des biofilms bactériens déposés sur des lames de microscope. Ce composé se comporte comme un colorant d'oxydoréduction vital, mais est plus facilement détecté à l'intérieur de la cellule en raison de sa fluorescence rouge vif quand il est éclairé par une lumière UV de grande longueur d'onde (>350 nm). De plus, la nature fluorescente du composé facilite son utilisation dans l'étude des bactéries respirant fixées sur des filtres noirs, ou des bactéries sur biofilms à surfaces opaques.

Le CTC est habituellement utilisé en conditions aérobies, c'est pourquoi, nous avons dû adapter le protocole en conditions anaérobies. Nous avons utilisé le formiate de sodium comme donneur d'électrons et le fumarate comme accepteur. Les bactéries sont incubées pendant 4 heures sous atmosphère anaérobie en présence de formiate de sodium, de fumarate et de CTC. Après incubation, du SYBR green II est ajouté afin de marquer l'ensemble des bactéries. L'échantillon est ensuite filtré sur rampe de filtration sur une membrane noire en polycarbonate de porosité 0,2 µm et de diamètre 47 mm de diamètre (Millipore, GTBP04700). Le filtre est ensuite monté entre lame et lamelle. Après séchage, une goutte de glycérine tamponnée est déposée par capillarité sur le filtre pour réhydrater la membrane. L'observation se fait au microscope à

Matériel et méthodes

épifluorescence à l'objectif $\times 100$ plan à immersion. Les microorganismes ayant fixés le SYBR Green II fluorescent dans le vert (515 nm) lorsqu'ils sont excités avec une lumière bleue (488 nm). Les microorganismes ayant fixés le CTC fluorescence dans le rouge (450 nm) lorsqu'ils sont excités par une lumière bleue (488 nm).

IV. METHODES D'ANALYSE DES SOLUTIONS

1. DOSAGE COLORIMETRIQUE DU FER

a. Dosage par la méthode de la phénanthroline

Le dosage des différentes formes de fer se fait par mesure des concentrations en Fe(II) total sous forme soluble et solide et en Fe total également sous forme soluble et solide par spectrométrie UV-visible. Les concentrations en Fe(III) sont déterminées par différences entre le Fe(II) et le Fe total. Le Fe(II) est dosé selon la méthode à la phénanthroline modifiée (Fadrus et Maly, 1975). Une solution d'acide nitrilotriacétique (NTA) est utilisée au cours du dosage pour complexer le Fe(III) du milieu, en l'empêchant ainsi de réagir avec la phénanthroline.

Le dosage du Fe total se fait par la méthode à la phénanthroline (Standard Methods for Water and Wastewater Analysis, 1998). Le Fe est solubilisé et réduit en Fe(II) sous ébullition en présence d'acide chlorhydrique et d'hydroxylamine, puis il est traité avec une solution de 1,10-phénanthroline à pH 3,2 à 3,3. Un complexe rouge-orange se forme dont l'intensité de la coloration obéit à la loi de Beer-Lambert et est indépendante du pH entre 3 et 9. La lecture se fait à 510 nm, longueur d'onde d'adsorption du complexe phénanthroline-Fe(II).

b. Dosage par ICP-AES

La méthode consiste à ioniser l'échantillon en l'injectant dans un plasma d'argon, ou parfois d'hélium, c'est-à-dire que les atomes de la matière à analyser sont transformés en ions par une sorte de flamme extrêmement chaude : jusqu'à 8 000 K. On utilise le fait que les électrons des atomes excités (ionisés), lorsqu'ils retournent à l'état fondamental, émettent un photon dont l'énergie est caractéristique de l'élément. La lumière émise par le plasma est en ce cas analysée par un ou plusieurs monochromateurs, par un réseau polychromateur, ou encore une combinaison des deux.

La lumière émise par l'élément recherché est alors détectée et mesurée, et son intensité comparée à celle émise par le même élément contenu dans un échantillon de concentration connue analysé dans les mêmes conditions. Avant de passer les échantillons, une gamme étalon contenant l'élément mesuré est préparée puis analysée. Pour le fer, une gamme étalon contenant du Fe(III) dilué dans l'acide nitrique 0,1 % est ainsi utilisée. La gamme étalon est établie en estimant la concentration en fer dans notre échantillon afin de rester dans la gamme de concentration. Les échantillons sont dans certains cas dilués dans l'acide nitrique 0,1 % pour rester dans les concentrations de la gamme étalon. D'autre part, tous les échantillons sont filtrés sur filtre millipore 0,22 µm.

2. DOSAGE DES IONS FORMIATES : CHROMATOGRAPHIE IONIQUE

L'ion formate HCOO^- est dosé par chromatographie ionique. La chromatographie ionique est un type de chromatographie en phase liquide permettant d'isoler une substance chargée électriquement. Les phases stationnaires utilisées en chromatographie à ions sont des résines échangeuses d'ions synthétiques, soit des matériaux polymériques de masse molaire élevée qui contiennent de nombreux groupements fonctionnels ioniques par molécule. En chromatographie ionique, une phase stationnaire peut contenir soit des groupements fonctionnels anioniques (pour les échanges de cations), soit cationiques (pour les échanges d'anions). Les échantillons sont filtrés puis dilués avant d'être analysés. Une gamme étalon est également préparée avec du formiate de sodium (HCOONa).

3. DOSAGE DES SILICATES : ICP-AES

La méthode de dosage des silicates par ICP-AES employée est identique à celle du dosage du dosage du fer, la gamme étalon est seulement préparée avec de l'acide silicique H_4SiO_4 .

V. METHODES D'ANALYSES DES SOLIDES

1. DIFFRACTION DES RAYONS X

La diffraction des rayons X est une méthode d'analyse non destructive qui permet de déterminer l'ordre à grande distance dans la structure d'un échantillon solide généralement polycristallin sous forme de poudre. L'échantillon à analyser est prélevé puis centrifugé à $10\,000 \times g$. La pâte humide est ensuite étalée sur une plaque de verre et est ensuite enduite de glycérol pour prévenir de l'oxydation (Hansen, 1989). Les diffractogrammes sont enregistrés à température ambiante dans un intervalle de 1 à 80° pour 2θ en utilisant une anode de cobalt ($\lambda_{\text{K}\alpha 1} = 0,17889$ nm) selon la géométrie de Bragg-Brentano, l'échantillon tourne d'un angle θ , alors que le goniomètre tourne de 2θ .

2. SPECTROMETRIE MÖSSBAUER PAR TRANSMISSION

La spectrométrie Mössbauer du ^{57}Fe (SM) est utilisée pour caractériser les minéraux à base de fer. C'est une technique qui permet l'identification et la quantification des oxydes et des oxyhydroxydes de fer dans les sols et les sédiments. La spectrométrie Mössbauer du ^{57}Fe n'est sensible qu'aux atomes de fer et fournit une information sur l'état de valence, sur les liaisons formées avec les atomes voisins, les sites cristallographiques dans la structure des noyaux qu'elle sonde. Elle permet l'étude des propriétés magnétiques de l'échantillon. La caractérisation par spectrométrie Mössbauer s'effectue à une température fixée. Le choix de la température est déterminant. En effet, les différentes phases du fer peuvent se distinguer les unes par rapport aux autres sans ambiguïté en réalisant des spectres à diverses températures.

3. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (MET)

La microscopie électronique est une technique de caractérisation physique à des échelles comprises entre le micromètre et le nanomètre grâce à un microscope Philips CM 20[®] opérant à 200 kV, équipé d'un spectromètre à dispersion d'énergie de photons X (EDX). Cette technique permet d'obtenir des informations structurales, morphologiques

et chimiques. Le principe est basé sur les interactions entre les électrons du faisceau incident et l'échantillon. Une goutte de suspension de particules à analyser est rapidement déposée sur une grille de carbone amorphe et introduite dans le détecteur d'analyse du microscope sous vide.

4. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (MEB)

Un microscope Philips XL 30[®] couplé à une méthode de microanalyse chimique élémentaire (EDX) KEVEX Sigma[®] a été utilisé pour visualiser la morphologie des cristaux et des particules de quartz. La surface de l'échantillon est balayée par un faisceau focalisé d'électrons monocinétiques accélérés à une tension de 10 à 30 kV.

**CHAPITRE I : BIOREDUCTION DE LA
LEPIDOCROCITE EN SYSTEME FERME PAR
*SHEWANELLA PUTREFACIENS***

**CHAPITRE I : BIOREDUCTION DE LA LEPIDOCROCITE EN SYSTEME FERME
PAR SHEWANELLA PUTREFACIENS**

Ce chapitre est constitué de deux parties, la première (A) sur l'effet de la silice et la seconde (B) sur l'effet des polymères sur la bioréduction de lépidocrocite γ -FeOOH en système fermé par *Shewanella putrefaciens*.

La partie A est la version intégrale de l'article paru dans Chemical Geology (exceptés le « supplementary information » qui est ici intégré dans le corps de l'article : Sergent AS., Jorand F., Hanna K. Effects of Si-bearing minerals on the nature of secondary iron mineral products from lepidocrocite bioreduction. Chemical Geology 289(1-2) : 86-97.

La partie B est la version intégrale de l'article soumis à Geomicrobiology Journal (en révision pour des corrections mineures) : Jorand F., Sergent A-S., Remy P-Ph., Bihannic I., Ghanbaja J., Lartiges B., Hanna K., Zegeye A. Contribution of anionic vs neutral polymers to the formation of green rust 1 from γ -FeOOH bioreduction. Les figures de la section « supplementary informations » sont placées dans les annexes à la fin du manuscrit de thèse.

PARTIE A : BIOREDUCTION DE LA LEPIDOCROCITE EN SYSTEME FERME PAR SHEWANELLA PUTREFACIENS EN PRESENCE D'UNE PHASE « SILICE »

Une des finalités de ce travail de thèse est de montrer qu'il est possible d'aboutir à la formation de rouille verte dans un système en colonne. Le sable quartz, en plus d'être dans l'environnement associé aux oxydes de fer et aux bactéries, permet l'établissement d'un système poreux en colonne. C'est pourquoi dans un premier temps, il est nécessaire de déterminer si la formation de rouille verte est compatible avec la présence de silice. Nous avons tout d'abord travaillé dans un système fermé en batch.

Cette étude traite de l'influence de l'ajout d'une phase « silice » sur la formation de rouille verte carbonatée par la bioréduction de lépidocrocite, un oxyde de Fe(III) par *Shewanella putrefaciens* dans un système fermé (en batch). La présence de silice dans le système est-elle favorable ou non à la formation de rouille verte ? La silice est ajoutée sous forme d'une phase solide : sable (quartz), 3 types de sables avec des tailles de grains et des surfaces spécifiques différentes ont été utilisés mais aussi sous forme soluble : l'acide silicique (H_4SiO_4). Différentes concentrations de chaque phase ont été testées. Les résultats ont montré que la présence de silice sous forme de sable quartz favorise la formation de rouille verte dans des conditions qui normalement produisent de la magnétite lorsque la taille des grains est inférieure à 15 μm et que le pourcentage de sable est supérieur à 30 % en masse totale de solide ou que la concentration d'acide silicique ajoutée est supérieure à 4 mM. Trois hypothèses pourraient expliquer la formation de rouille verte vs magnétite : (1) les silicates seraient à l'origine d'un phénomène d'hétéroagrégation créant des microenvironnements où la concentration de certaines espèces telles que les carbonates ou le Fe^{2+} seraient favorables à la formation de rouille verte, (2) la silice en se sorbant sur la lépidocrocite empêcherait l'accès des bactéries à l'oxyde de Fe(III) diminuant le taux de réduction ayant un impact positif sur la formation de la rouille verte, (3) la fixation de silicates sur les faces latérales des cristaux de rouilles vertes empêcheraient sa dissolution et sa recristallisation en d'autres espèces minérales. Le sable quartz est compatible avec la formation de rouille verte et dans certaines conditions, il favorise la synthèse et la stabilisation de celle-ci.

EFFECTS OF SI-BEARING MINERALS ON THE NATURE OF SECONDARY IRON MINERAL PRODUCTS FROM LEPIDOCROCITE BIOREDUCTION. CHEMICAL GEOLOGY 289(1-2): 86-97.

Sergent AS., Jorand F., Hanna K.

Chemical Geology 289(1-2): 86-97.

ABSTRACT

Lepidocrocite (γ -FeOOH) bioreduction by *Shewanella putrefaciens* was examined in systems containing different kinds of quartz silica sand with different solid contents ranging from 5 to 70 wt%. The results notably demonstrated that the formation routes of secondary iron minerals from microbial reduction of γ -FeOOH in silica mineral assemblages are dependent on quartz sand loading and particle size distribution. Biomineralization experiments with several concentrations of aqueous silica showed that a lower Si concentration (less than 2 mM) led to magnetite or magnetite/chukanovite, while higher concentrations resulted in the formation of green rust (GR).

Dissolution of very fine quartz particles may have promoted the formation of biogenic GR instead of magnetite. This behavior could be explained by the sorption of dissolved silicate on the lepidocrocite surface, which might limit the bioreduction rate and promote GR formation. As observed with the chemically synthesized GR, the interactions of dissolved or colloidal Si with the lateral faces of the GR crystals could stabilize the GR structure, thus preventing its transformation into other products. Furthermore, complex physical and chemical distribution at the surfaces and within hetero-aggregates of mixed mineral phases may affect the diffusion processes of species and therefore the biomineralization mechanism.

I. INTRODUCTION

Green rusts (GRs) are mixed ferrous-ferric hydroxides that have layered structures consisting of alternating positively charged hydroxide layers and hydrated anion layers (Schwertmann et Fechter, 1994; Génin et al., 1998; Hansen et al., 2001). Because of their structural Fe(II), GRs are very reactive compounds and play a central role in the redox cycling of iron in the aquatic and terrestrial environments where they are present (Schwertmann et Fechter, 1994; Génin et al., 1998; Hansen et al., 2001). They are found as corrosion products of Fe metal (Refait et al., 2003), in ochre sludge (Koch et Morup, 1991), as minerals in hydromorphic soils (Trolard et al., 1997; Génin et al., 1998) or ground water (Christiansen et al., 2009). They can be synthesized in the laboratory by partial oxidation of Fe(II) or by co-precipitation of Fe(II) and Fe(III) salts in aqueous solutions (Schwertmann et Fechter, 1994; Génin et al., 1998; Hansen et al., 2001) by electrochemical way (Legrand et al., 2001a) and also by biological processes (Fredrickson et al., 1998; Ona-Nguema et al., 2002a; Ona-Nguema, 2003; O'Loughlin et al., 2007). The bioreduction of Fe(III) to Fe(II) is possible depending on the nature of the Fe-oxide and bacteria nature under anoxic conditions. The formation of "biogenic" GR from bioreduction of lepidocrocite or ferrihydrite has been observed using organic acids or H₂ as electron donors for Fe(III) respiration by *Shewanella* spp. (Fredrickson et al., 1998; Ona-Nguema et al., 2002a; Ona-Nguema, 2003; Zegeye et al., 2005; O'Loughlin et al., 2007). The factors controlling secondary iron mineralization in incubation experiments are cell amount, electron donor concentration, solution chemistry, presence of polymers or organic and inorganic ligands, etc. (Lovley et Phillips, 1987; Ona-Nguema, 2003; Kukkadapu et al., 2005; O'Loughlin et al., 2007; Zegeye et al., 2007; Zegeye et al., 2010).

In general, the main solid-phase end products of microbial reduction of Fe(III) oxides were Fe(II)-bearing products including magnetite, siderite, vivianite, green rust and chukanovite (Lovley et Phillips, 1987; Fredrickson et al., 1998; Ona-Nguema et al., 2002a; Kukkadapu et al., 2005; O'Loughlin et al., 2007; Zegeye et al., 2010; Jorand et al., 2011).

Bioreduction de la lépidocrocite en système fermé par Shewanella putrefaciens en présence d'une phase « silice ».

Although the microbial-promoted generation of GR is widely demonstrated, the mechanisms and factors governing the GR formation as the major secondary iron mineral at the expense of other products in lab-scale investigations or environmental systems are largely unknown (O'Loughlin et al., 2010; Zegeye et al., 2010).

In the subsurface soils and sediments, iron oxides generally do not occur as homogeneous assemblages. Frequently, the iron oxides are present as coatings on less soluble or less reactive soil particles such as silica sand (Ryan et Gschwend, 1994). In some soils and aquifer sediments, iron hydroxide coatings on the sand surface were characterized as ferrihydrite, goethite and lepidocrocite (Wang et al., 1993). The attachment of these coatings to the silicate surface is generally strong because Si-O-Fe bonds can form between the quartz grain and the iron oxide deposit (Scheidegger et al., 1993; Rusch et al., 2010a). In addition, silicon loss is to be expected in the surface of almost all soils as rain water infiltrates and moves through the surface layer (Ryan et Gschwend, 1994). Due to the decomposition of weatherable silicate minerals and/or dissolution of small-sized quartz particles in environmental systems, Si species were expected to be in association with many reducible mineral constituents (Rusch et al., 2010a and the references therein). The presence of non-reducible mineral phases such as silica in soils and sediments may affect the bioreduction processes of Fe(III)-oxides. Moreover, silicate ions have been previously reported to impair the transformation of GR into α -FeOOH (Kwon et al., 2007). Therefore, the mineralogical transformations of Fe-phases in environmental settings, where iron oxide and silica minerals are often associated with one another merit investigation.

On the other hand, iron oxide coated sand has been largely synthesized to mimic natural Fe-coated subsurface materials and then used as a porous reactive material in engineering application (Scheidegger et al., 1993; Benner et al., 2002; Rusch et al., 2010b, 2010a). As GR is an effective reductant for several contaminants (Erbs et al., 1999; Hansen et al., 2001; O'Loughlin et al., 2003a; Kone et al., 2009), its use in the coated sand filter system with a structurally stable and hydraulically conductive porous medium is of great importance. Therefore, the formation routes leading to GR formation in complex iron oxide/silica sand assemblages should be addressed, from both the

Bioreduction de la lépidocrocite en système fermé par Shewanella putrefaciens en présence d'une phase « silice ».

environmental and engineering points of view. While the bioreduction studies of individual ferric oxyhydroxides phases are numerous, the generation routes of GR as secondary mineralization products from microbial reduction of Fe(III) oxide in silica mineral assemblages are not well known.

This study focuses in particular on the influence of silica sand loading and particle size distribution on the biomineralization process in different Fe/Si systems. The lepidocrocite bioreduction rate resulting from *Shewanella putrefaciens* activity was also determined in different systems containing Si-species (colloidal or aqueous silica). The effect of aqueous silicate and silica sand on the stability of chemically synthesized carbonate GR was also investigated. The solid phase transformations of lepidocrocite (γ -FeOOH) were monitored by X-ray diffraction (XRD), transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM).

II. MATERIALS AND METHODS

1. CHEMICALS

Ferric chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), ferrous sulfate heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), ferrous chloride tetrahydrate ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) and sodium phosphate ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) were purchased from Sigma Aldrich. Quartz sands, called fractions F_1 and F_2 , were purchased respectively from Chempur (99.9%, Karlsruhe, D) and Carl Roth (> 99 %, Karlsruhe, D). The mineralogy of the sands was characterized by X-ray diffraction and Raman spectroscopy and was found to be exclusively quartz. The granulometric distribution was measured with a Malvern Mastersizer laser beam diffraction granulometer and specific surface area by multipoint N_2 -adsorption BET method. Fontainebleau sand (Prolabo, France), with a grain size range of 100–300 μm (Fraction F_3) was also used.

2. PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF SOLID SAMPLES

Lepidocrocite ($\gamma\text{-FeOOH}$) was prepared by aerobic oxidation of FeCl_2 in sodium hydroxide solution as previously described in (Ona-Nguema et al., 2002a). The mineral suspension was washed three times with pure water to remove salts, dried and then stored at ambient temperature for further use. The obtained particles were characterized by grain size and X-ray diffraction (XRD) analyses. The specific surface area determined by BET method was $54 \pm 2 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.

Experiments were conducted on mixtures of lepidocrocite and quartz with different sand loadings ranging from 0 to 70 wt% (or from 0 to 90 % for the sand F_1). A higher sand loading was not tested due to the inability to resolve the XRD peaks of iron oxides from the dominant silica peaks.

The three fractions of quartz sand exhibited a wide range of surface area and grain size: F_1 ($5.6 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$; 0.1-8 μm), F_2 ($0.88 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$; 2-15 μm) and F_3 ($0.06 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$; 100-300 μm). Surface area was highest for F_1 and lowest for F_3 , and increasing surface area was

Bioreduction de la lépidocrocite en système fermé par Shewanella putrefaciens en présence d'une phase « silice ».

correlated with decreasing particle size. All sand samples were washed with HCl, H₂O₂ and then pure water several times to remove all impurities.

Prior to biomineralisation experiments, two types of samples were tested: lepidocrocite coated sand (LCS) and simple mixture of lepidocrocite with sand (L+S). For LCS sample, the heterogeneous suspension reaction method where the silica sand was mixed with iron oxide was followed as recommended by (Scheidegger et al., 1993) and recently used by (Hanna, 2007).

A suspension of lepidocrocite with a desired amount of quartz sand in 10 mM NaCl was stirred to obtain a homogeneous mixture then the suspension was brought to pH 5 with HCl and was stirred for 72 hours. Liquid was removed and the remaining solid was dried. The final solid was stored at ambient temperature for further use. The (L+S) samples were prepared by mixed the two oxides directly in the incubation medium, before biological reaction was initiated. The mineralogy of the coating phases in both samples was verified by X-ray diffraction and Raman spectroscopy. The obtained particles were characterized by grain size, N₂ adsorption measurements and chemical analysis. Note that the same behavior was observed when LCS sample was used instead a simple mixture of lepidocrocite with sand (L+S) in the biotransformation experiments. Indeed, the nature of secondary iron mineral formed was similar and no significant difference was noted, for instance in terms of the initial iron reduction rate (0.016 and 0.017 h⁻¹ for LCS and L+S, respectively, at 50 wt% of F₁) (**Table 4**). The mineral produced by the biomineralization experiments and abiotic tests were centrifuged in an anoxic (N₂:H₂, 98:2) chamber. The wet paste was spread out on a glass plate and coated with glycerol to prevent oxidation. The XRD data were collected with a D8 Bruker diffractometer, equipped with a monochromator and position-sensitive detector. The X-ray source was a Co anode ($\lambda = 0.17902$ nm). The diffractograms were recorded in the 3–64° 2 θ range, with 0.0359° step size and a collecting time of 3 s per step.

For transmission electronic microscopy (TEM) examination, one drop of the mineral suspension was laid on an amorphous carbon-coated grid and the sample was loaded into the microscope (Philips CM20/STEM). For scanning electronic microscopy (SEM)

Bioreduction de la lépidocrocite en système fermé par Shewanella putrefaciens en présence d'une phase « silice ».

examination, one drop of the sample was laid onto 2 cm² plates and loaded into the microscope (Hitachi S-4800 FEG SEM).

3. PREPARATION OF DENSE *SHEWANELLA PUTREFACIENS* CELL SUSPENSION

The culture medium for the lepidocrocite bioreduction experiments was prepared as described by Zegeye et al. (2007). *S. putrefaciens* CIP 8040T (equivalent to ATCC 8071, the reference strain) was revived from a frozen stock at – 80 °C, under aerobic conditions on tryptic soy agar (51044, BioMérieux, Marcy l'Étoile, France). The colonies retrieved from two successive sub-cultures were used to prepare a suspension of resting cells. Briefly, a 2 L batch bioreactor (Biolafitte & Moritz-Pierre Guerin SAS, Mauze, France) containing 1.5 L of tryptic soy broth (51019, BioMérieux) was inoculated with 20 mL of an overnight culture of *S. putrefaciens*. After 24 h of aerobic incubation at 30 °C, cells were harvested by centrifugation (10 min at 10,000 × *g*) and washed with sterile NaCl 0.7% in ultra-pure water. The pellet of cells was resuspended in 40 mL of the NaCl solution in order to get a stock of a very dense cell suspension ($6 \times 10^{10} \pm 1 \times 10^{10}$ cells mL⁻¹, final concentration). This cell stock was purged for 30 min with filter-sterilized N₂ (99.99%) prior to be used in the different batch runs for the lepidocrocite bioreduction. Bacterial cells were counted by epifluorescence microscopy using SYBR Green II fluorochrome (S7586, Invitrogen-Molecular Probes).

4. BIOREDUCTION EXPERIMENTS

The culture medium for the lepidocrocite bioreduction assays contained 160 mM of sodium formate (HCOONa) as the sole electron donor, and 300 mM of γ -FeOOH as the sole electron acceptor for *S. putrefaciens*. In this experimental setup, the electron donor that is in slight excess as regards to the electron acceptor cannot be a limiting factor, according to the Fe(III) bioreduction reaction where 1 mol of formate reacts with two moles of Fe(III) (Ona-Nguema et al., 2002a and Zegeye et al., 2007). The basal medium consisted of (purity grade for analysis): 22 mM NH₄Cl, 1.5 mM NaCl, 1.2 mM KCl, 1.1 mM MgSO₄·7H₂O, 0.67 mM CaCl₂, 0.27 mM MnSO₄·H₂O, 86 μ M ZnCl₂, 38 μ M CoSO₄·7H₂O, 32 μ M FeSO₄·7H₂O, 9.3 μ M Na₂MoO₄·2H₂O, 9.1 μ M NiCl₂·6H₂O, 6.8 μ M Na₂WO₄·2 H₂O,

Bioreduction de la lépidocrocite en système fermé par Shewanella putrefaciens en présence d'une phase « silice ».

3.6 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1.9 μM $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1.5 μM H_3BO_3 and 100 μM of anthraquinone-2,6-disulfonate acid (AQDS) (ACROS, 10495-1000). The medium was purged with N_2 and dispensed into 50 or 100 mL flasks, with butyl rubber stoppers, crimp sealed and heat sterilized, except for the AQDS and the formate which were filtered sterilized. It has to be noted that no pH buffer was added to the medium. Moreover, no phosphate was added to avoid vivianite precipitation. Consequently, the absence of phosphorous as a nutrient will also limit the cell growth. AQDS was used as an electron shuttle to increase the rate and extent of iron reduction as described by Lovley et al. (1998).

Since a ratio of $[\text{cells}]/[\gamma\text{-FeOOH}]$ above or below 1×10^{10} cells mM^{-1} of $\gamma\text{-FeOOH}$ was shown to produce GR or magnetite according to Zegeye et al., 2007 and Zegeye et al., 2010, a final cell density corresponding to $7.8 \times 10^9 \pm 1.0 \times 10^9$ cells mL^{-1} and about 5 times lower cell density corresponding to $1.6 \times 10^9 \pm 0.2 \times 10^9$ cells mL^{-1} were used. These two cell densities were named high cell (HC) and low cell (LC) densities. They correspond to the required ratio of $[\text{cells}]/[\gamma\text{-FeOOH}]$ for GR and magnetite biomineralization, 2.6×10^{10} and 0.55×10^{10} cells mM^{-1} respectively (Zegeye et al., 2010). The flasks were incubated at 30 °C in darkness, aliquots were removed at selected time intervals to measure Fe(II) production and to characterize the secondary iron minerals. The bioreduction experiments were performed 3 times (three independent experiments).

HCl-extractable Fe(II) was obtained by placing 1 mL of the sample directly into 1 mL of 2 M HCl. Then, 2 mL of HCl 12 M was added. The concentration of Fe(II) was determined after 1 week using the modified 1,10-phenanthroline method (Fadrus and Maly, 1975). All experiments were performed in an anoxic chamber ($\text{N}_2:\text{H}_2$, 98:2) (Coy Laboratory Product Inc., Grass Lake, MI, USA). Dissolved Si was measured by ICP-AES (Inductive Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry) (Jobin Yvon-ULTIMA).

5. ABIOTIC SYNTHESIS OF CARBONATE GREEN RUST AND IMPACT OF AQUEOUS AND COLLOIDAL SILICA ON THE STABILITY OF CHEMICALLY FORMED GREEN RUST

Hydroxycarbonate GR was synthesized by precipitation from a mixture of Fe(II) and Fe(III) salts with sodium hydroxide according to the method of Bocher et al. (2004). Carbonate was incorporated in the LDH structure through addition of Na₂CO₃ to the solution. Ferrous sulfate heptahydrate FeSO₄·7H₂O and ferric sulfate pentahydrate Fe₂(SO₄)₃·5H₂O were dissolved in 50 mL of pure water. A [Fe(II)]/[Fe(III)] ratio of 2 was chosen with ([Fe(II)] + [Fe(III)]) = 0.3 M. Magnetic stirring ensured a fast and complete dissolution at a rotation velocity of 500 rpm. Sodium carbonate Na₂CO₃ ([CO₃²⁻] = 0.35 M) was dissolved in 50 mL of a 0.6 M NaOH solution corresponding to a [OH⁻] / ([Fe(II)] + [Fe(III)]) = 2. The carbonate solution was added to the solution of iron under the same conditions of magnetic stirring. A ratio ([CO₃²⁻]/[SO₄²⁻]) = 1 higher than 1/5 was chosen to prevent the formation of hydroxysulphate green rust GR(SO₄²⁻) (Bocher et al., 2004).

The first set of experiments served as controls to evaluate the stability of GR(CO₃²⁻) without the addition of a stabilizing agent. In the second set of experiments, Fe(II-III) coprecipitation was done as described above but with the addition of 3 mM Na₂HPO₄·7H₂O (Bocher et al., 2004). In the third set of experiments, a series of Fe(II)-Fe(III) coprecipitation reactions were performed in the presence of variable quantities of Si species (silicic acid (0-6 mM) or silica sand (0-70 wt.%)). All experiments were carried out in an anoxic (N₂:H₂, 98:2) chamber to avoid any oxidation.

In the case of silicic acid, the residual concentration of silicate after GR synthesis was determined by ICP-AES, and the corresponding sorbed amount onto GR was estimated by the depletion method. The adsorption isotherm of silicate on lepidocrocite was also determined. For the biogenic GR, the precipitate was centrifuged and analyzed by XRD. The synthesis and sorption experiments were performed 3 times.

III. RESULTS

1. INFLUENCE OF SILICA SAND LOADING AND PARTICLE SIZE DISTRIBUTION ON THE FORMATION OF SECONDARY MINERALIZATION PRODUCT

Three size fractions of quartz sand were used to explore the effect that Si-minerals may have on the extent of bacterial Fe(III) reduction by *S. putrefaciens*. The experimental conditions that are known to promote the formation of GR or magnetite from lepidocrocite reduction, were tested here under a wide range of sand loading (0–70 wt.%). In agreement with previous works (Zegeye et al., 2007 and Zegeye et al., 2010), GR and magnetite were effectively obtained in the absence of quartz sand under HC density and LC density, respectively (**Figure 15**). At HC density, GR formed as secondary iron mineral in all biomineralization experiments including all three sand fractions F1, F2 or F3 (data for F₂ or F₃ not shown).

The XRD analysis showed that the GR was the dominant secondary mineral generated independently of the sand amount (0–90 wt.%) (**Figure 15a for the fraction F₁**). These results indicate that quartz sand does not affect the GR biomineralization process in our experimental system at HC density. Under LC density condition, the bioreduction process of lepidocrocite is quite different. Magnetite was formed as secondary mineral in the absence of quartz sand and also at 5 and 10 wt.% of sand F1. Interestingly, GR was identified when the amount of sand F₁ exceeded 20 wt.% (**Figure 15b**). GR was also identified in the presence of sand F₂ but only from 30 wt.% (**Figure 16a**). Magnetite was however still present in the F₃ system regardless of the amount of sand tested (**Figure 16b**).

Bioreduction de la lépidocrocite en système fermé par Shewanella putrefaciens en présence d'une phase « silice ».

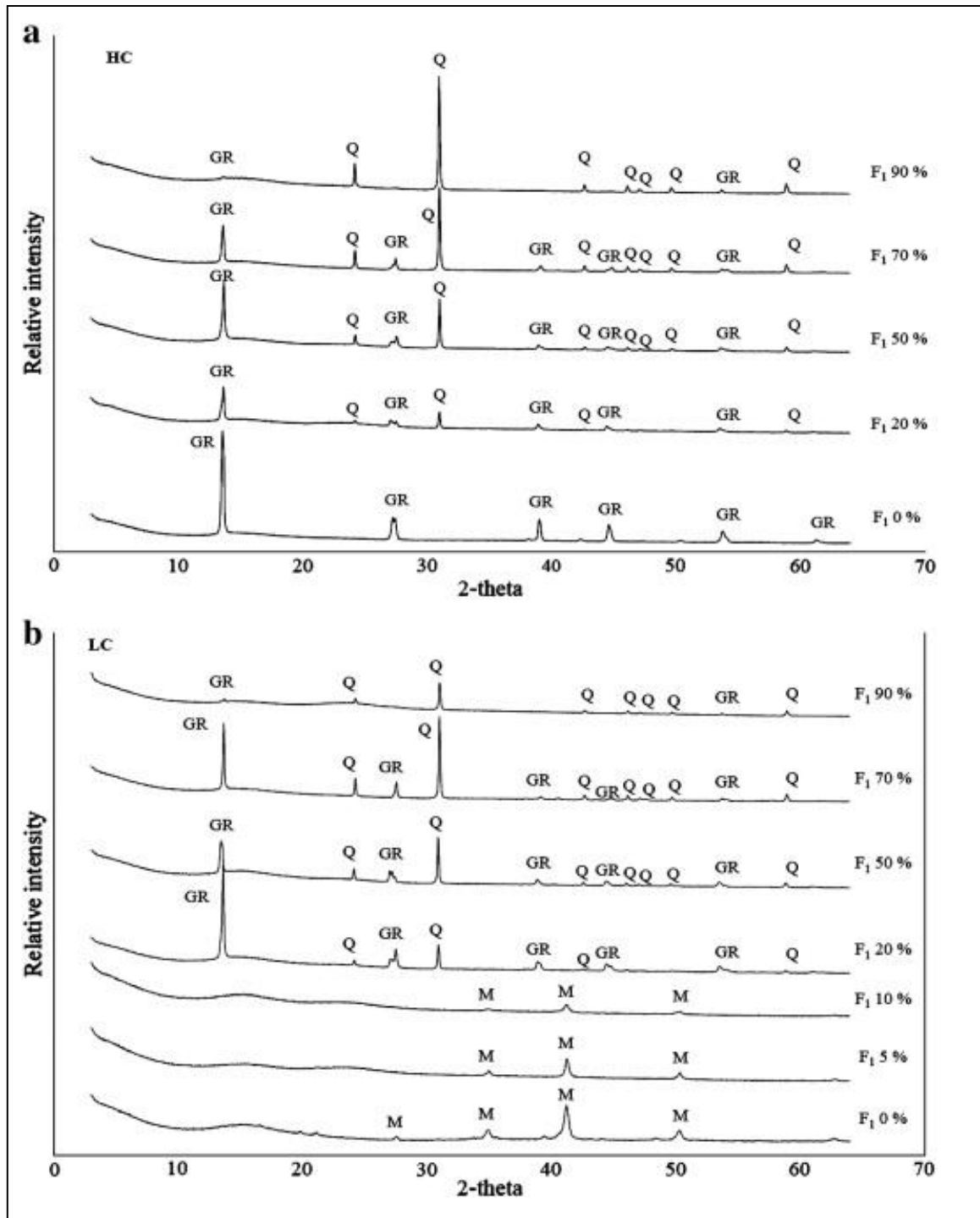


Figure 15 : X-ray diffractograms of solids after microbial reduction of lepidocrocite (γ -FeOOH) by *Shewanella putrefaciens* in presence of 0 - 90 wt% of F₁ quartz sand fractions with high cell density "HC" (a) or lower cell density "LC" (b). The analyses were done at 20 days of incubation time (30°C). "GR", "M" and "Q" denotes green rust, magnetite and quartz, respectively.

Bioreduction de la lépidocrocite en système fermé par Shewanella putrefaciens en présence d'une phase « silice ».

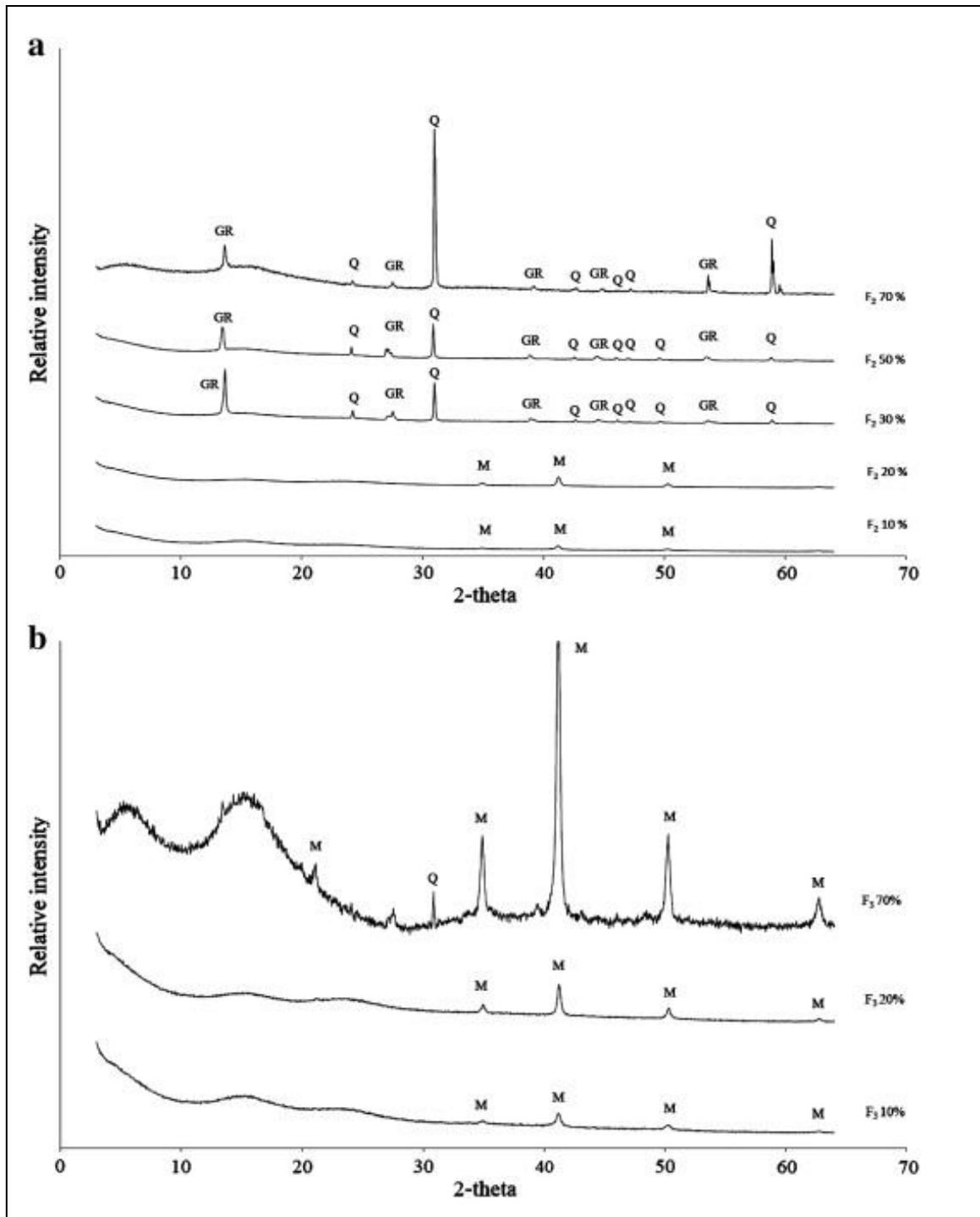


Figure 16 : X-ray diffractograms of solids after microbial reduction of lepidocrocite (γ -FeOOH) by *Shewanella putrefaciens* in presence of 0 - 90 wt% of F₂ (a) and F₃ (b) quartz sand fractions with lower cell density "LC". The analyses were done at 20 days of incubation time (30°C). "GR", "M" and "Q" denotes green rust, magnetite and quartz, respectively.

Bioreduction de la lépidocrocite en système fermé par Shewanella putrefaciens en présence d'une phase « silice ».

The pH of the aqueous suspension before bacteria inoculation was 6.3 ± 0.1 . The pH was measured versus incubation time for all experiments and found to be mainly dependent on the nature of formed product (**Figure 17**).

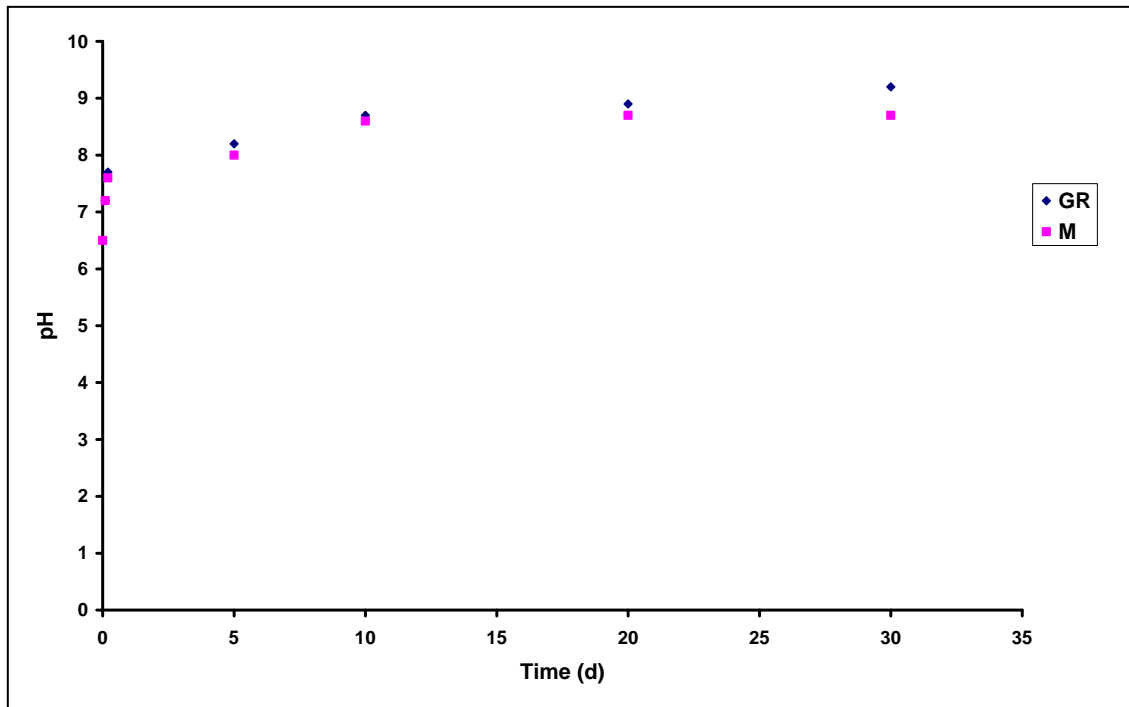


Figure 17 : pH monitoring over time during the incubation of lepidocrocite under experimental conditions favourable for GR or magnetite biomineralization. No impact of Si species on the pH value of reaction medium was noted. Indeed, the pH final was found 9.1 ± 0.1 when GR is formed regardless the sand fraction tested, while it was 8.8 ± 0.1 when magnetite is formed.

Note that quartz sand has no significant effect on the pH of incubation medium. The final pH was 9.1 ± 0.1 when GR was formed regardless of the sand fraction tested, while it was 8.8 ± 0.1 when magnetite was identified.

Figure 18 summarizes the results of experiments conducted at LC density of the three quartz sand fractions together with the experimental conditions (wt.% of each tested fraction). The gray vertical bar represents the transition area separating the zones of quartz sand loading where magnetite (left) or GR (right) was identified as the main secondary mineral. Inspection of all data suggested that the biomineralization process was dependent on both the sand size fraction and the amount. Indeed, the smaller the

Bioreduction de la lépidocrocite en système fermé par *Shewanella putrefaciens* en présence d'une phase « silice ».

quartz particles (or the higher specific surface area), the lower the amount of quartz sand needed to promote GR biomineralization instead of magnetite (**Figure 18**).

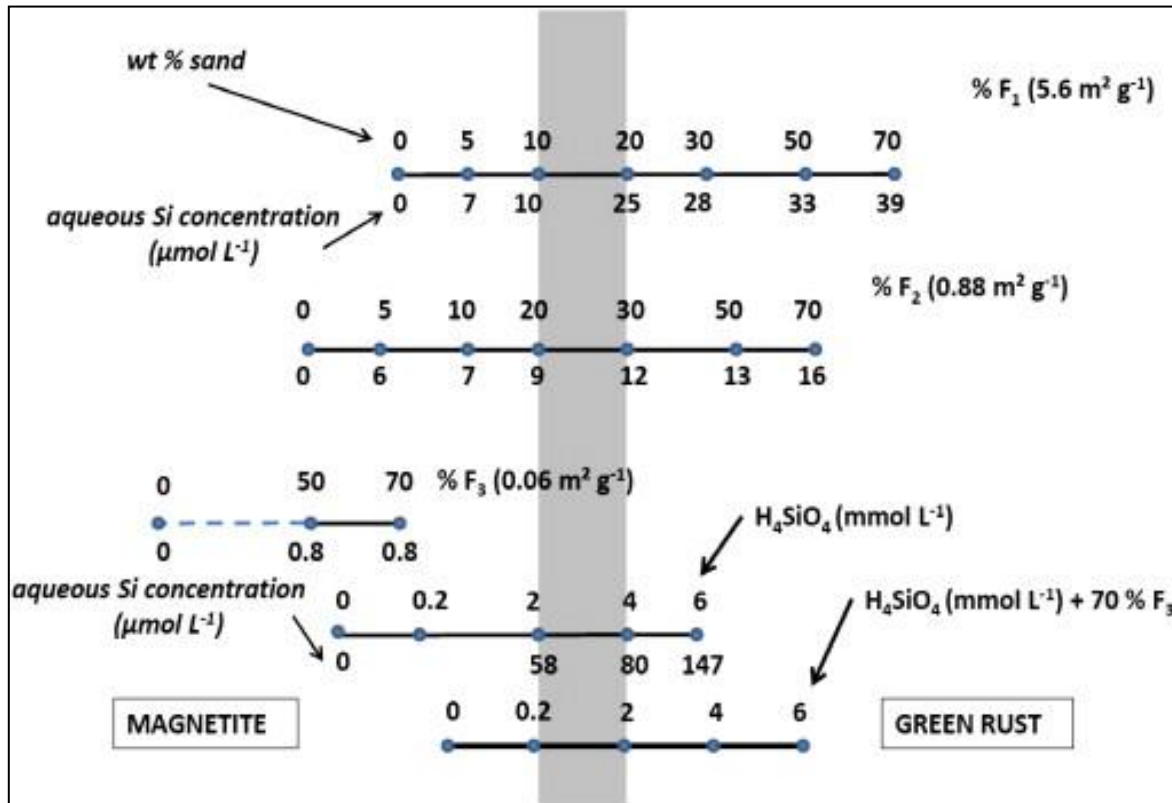


Figure 18 : Schematic summary with the transition area separating at each side the secondary iron mineral green rust (right) or magnetite (left) from lepidocrocite bioreduction at LC density as a function of quartz sand proportions (0 - 70 wt%) for the fractions F₁, F₂ or F₃ and aqueous silica (H₄SiO₄: 0 - 6 mM). Aqueous concentration of silica (μM ± 2 μM) determined at 30 days was presented below the axis.

Because the solubility of quartz can be affected by particle size, specific surface area and/or solution chemistry (Bennett, 1991 and Xu et al., 2009), the concentration of aqueous Si was measured in the bioreduction medium after one month of incubation time and presented in **Figure 18**. These measurements showed that the concentration of dissolved silica increased with increasing amount of the finest quartz particles (F₁ or F₂). No significant concentration of aqueous Si was however detected in the F₃ system (**Figure 18**). Therefore, dissolved Si seems to contribute to GR formation at the expense of other products such as magnetite. To test this hypothesis, bioreduction of γ-FeOOH

Bioreduction de la lépidocrocite en système fermé par Shewanella putrefaciens en présence d'une phase « silice ».

was performed under various concentrations of aqueous Si added as silicic acid (H_4SiO_4).

2. EFFECT OF AQUEOUS SILICATE CONCENTRATION ON THE SECONDARY IRON BIOMINERALIZATION

Lepidocrocite bioreduction was also examined relative to silicic acid concentration (0–6 mM). Note that this concentration refers to the amount of silicic acid initially added ($t = 0$). From 0 to 2 mM of silicic acid, magnetite was identified as the secondary iron mineral while GR appeared at higher silicic acid concentrations (i.e. 4 and 6 mM) (**Figure 19a**). This indicates that aqueous silica promotes GR formation and this biomineralization process should be dependent on the dissolved silicate concentration. Lepidocrocite bioreduction was however not completed at 6 mM of Si as lepidocrocite peaks were still significant at the end of the experiment (**Figure 19a**).

At a silicate concentration of 2 mM, the biomineralization process seems quite different. Both GR and magnetite were identified after 5 days of incubation time, whereas a ferrous compound, chukanovite ($\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$) appeared after 20 days (**Figure 19b**). XRD analysis showed the occurrence of both minerals, magnetite (nanosized particles) and chukanovite (flaky shape) after 20 days (**Figure 19b**). TEM and SEM images also showed platy crystallites of chukanovite mineral after 20 days (**Figure 20**). Note that the chukanovite was also identified when lepidocrocite bioreduction was examined in the presence of sand F_3 (50 wt.%) after 20 days.

Chukanovite is a ferrous hydroxy carbonate mineral primary found on meteorite (Pekov et al., 2007) and also found as a secondary mineral from ancient iron based corroded archeological tools (Rémazeilles et Refait, 2009). It has also been identified as a biogenic mineral from non-stoichiometric magnetic transformation (Kukkadapu et al., 2005) or $\gamma\text{-FeOOH}$ bioreduction by *S. putrefaciens* (O'Loughlin et al., 2010 and Zegeye et al., 2010). In these later works, the authors reported that in the absence of oxyanions (O'Loughlin et al., 2010) or densely packed aggregation (Zegeye et al., 2010) the microbial reduction

Bioreduction de la lépidocrocite en système fermé par Shewanella putrefaciens en présence d'une phase « silice ».

of lepidocrocite led rapidly to magnetite, which over time was partially transformed to chukanovite.

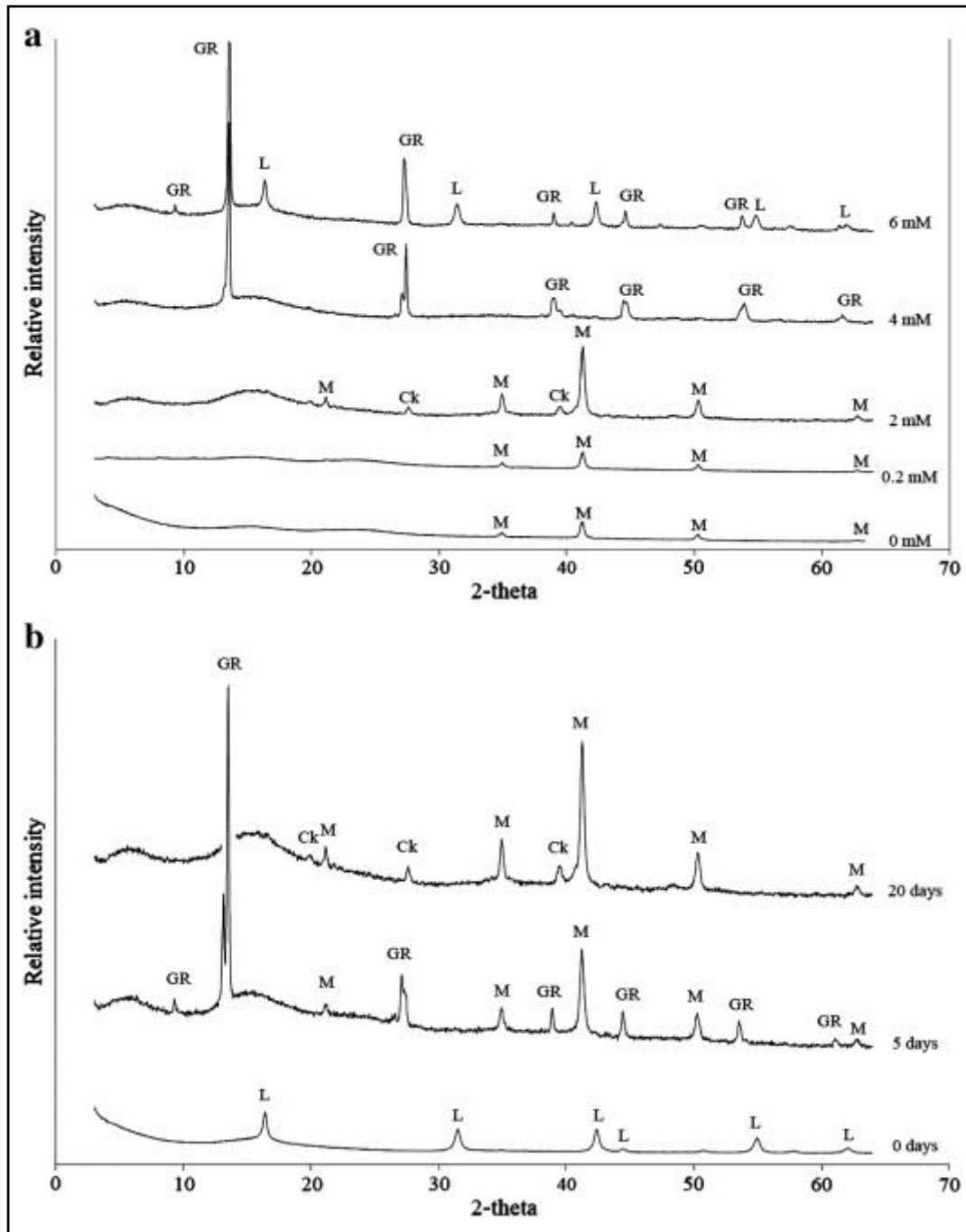


Figure 19 : X-ray diffractograms of solids formed from microbial reduction of lepidocrocite in the presence of 0, 0.2, 4, and 6 mM of silicic acid at 20 days of incubation time (a), and in the presence of 2 mM of silicic acid versus incubation time (0-20 days) (b). "M", "Ck", "L" denotes magnetite, chukanovite and lepidocrocite, respectively. The concentrations of silicic acid refer to the amount of silicic acid initially added.

Bioreduction de la lépidocrocite en système fermé par Shewanella putrefaciens en présence d'une phase « silice ».

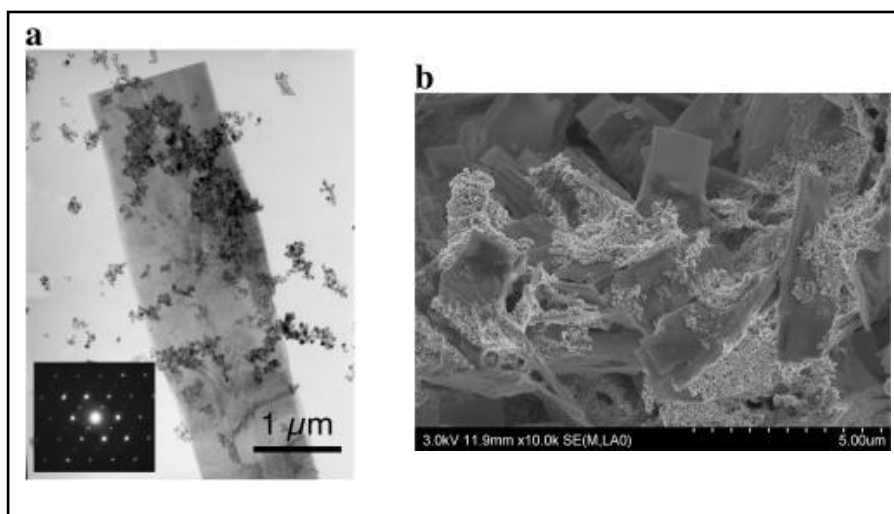


Figure 20 : Transmission electronic micrograph (a) and scanning electronic micrograph (b) of the chukanovite with magnetite produced from the bacterial reduction of the lepidocrocite in the presence of 2 mM H_4SiO_4 after 20 days. The incrustated image represents the electron diffraction of the chukanovite crystal. The chukanovite was also identified when lepidocrocite bioreduction was examined in the presence of sand F₃ (50 wt%) at 20d

As for the sand loading variation, a transition area was placed between 2 and 4 mM representing the range of Si aqueous concentration that promotes the formation of GR vs magnetite (**Figure 18**). The aqueous silica concentration measured in all experiments after 30 days incubation time was also reported in **Figure 18**. A preliminary dissolution kinetic experiment showed that 30 days is sufficient time for all three quartz samples to reach a steady-state with respect to dissolution. The dissolution extent of F₁, F₂ and F₃, determined in our incubation medium but without lepidocrocite and bacteria (not shown), did not exceed respectively 10, 3 and 0.1 $\mu\text{mol g}^{-1}$ of sand. Inspection of these data suggested that the silicate concentration that can be released from the sand amount corresponding to the transition zone (i.e. 20 wt.% of F₁ or 30 wt.% of F₂) was much lower than that added as silicic acid to promote GR formation (i.e. 4 mM). However, the decrease in dissolved Si resulting from uptake of Si by GR, lepidocrocite or biomass can be offset by further dissolution of quartz to maintain the system at equilibrium. Therefore, the aqueous phase Si concentrations remain constant, while an increase of quartz dissolution relative to the control system may occur.

Bioreduction de la lépidocrocite en système fermé par Shewanella putrefaciens en présence d'une phase « silice ».

The bioreduction of lepidocrocite versus silicic acid concentration (0–6 mM) was performed again as previously explained but by adding of sand F₃ (70 wt.%). The transition area, separating the zones where magnetite or GR was identified, was shifted for the lower silicate concentrations (**Figure 18**). The GR was identified as the dominant secondary iron mineral at 2 mM of H₄SiO₄ and was found to be stable against incubation time. This suggests that the quartz sand particles play a joint role with aqueous silica in the stabilization of GR formed.

3. EFFECT OF SI ON THE FE(II) PRODUCTION RATE

The lepidocrocite bioreduction kinetic was determined for the initial period (0–6 days) (**Figure 21**). The experimental data was best fitted with the first order kinetic model (**Table 4**), which is in agreement with previous works (Ona-Nguema et al., 2002, Zegeye et al., 2007, 2010). Although the nature of the secondary iron mineral was different, the kinetic rate constant k_{obs} was found to be almost constant ($0.017 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$) regardless of the sand loading (0–90 wt.% of F₁ or 0–70 wt.% for F₂). However, the initial reduction rate ($V_{initial}$) determined as $V_{initial} = k_{obs} [\text{Fe(II)}]_{max}$ at 6 days of incubation time decreased at higher sand loadings (> 50 wt.%), indicating a sand effect on the determination of the initial reduction rate. The same behavior was observed for the aqueous silica where such an effect was observed at the highest Si concentration (i.e. 6 mM) (**Table 4**). This behavior could be explained by an increase of silicate surface coverage, which may hinder the reactive iron sites (i.e. the active surface sites available to the bioreduction reaction) and decrease the iron reduction rate. Indeed, the sorption isotherm of silicate on lepidocrocite showed an increase of sorbed silicate with increasing aqueous silicate concentration without reaching a saturation plateau (**Figure 22**).

Bioreduction de la lépidocrocite en système fermé par *Shewanella putrefaciens* en présence d'une phase « silice ».

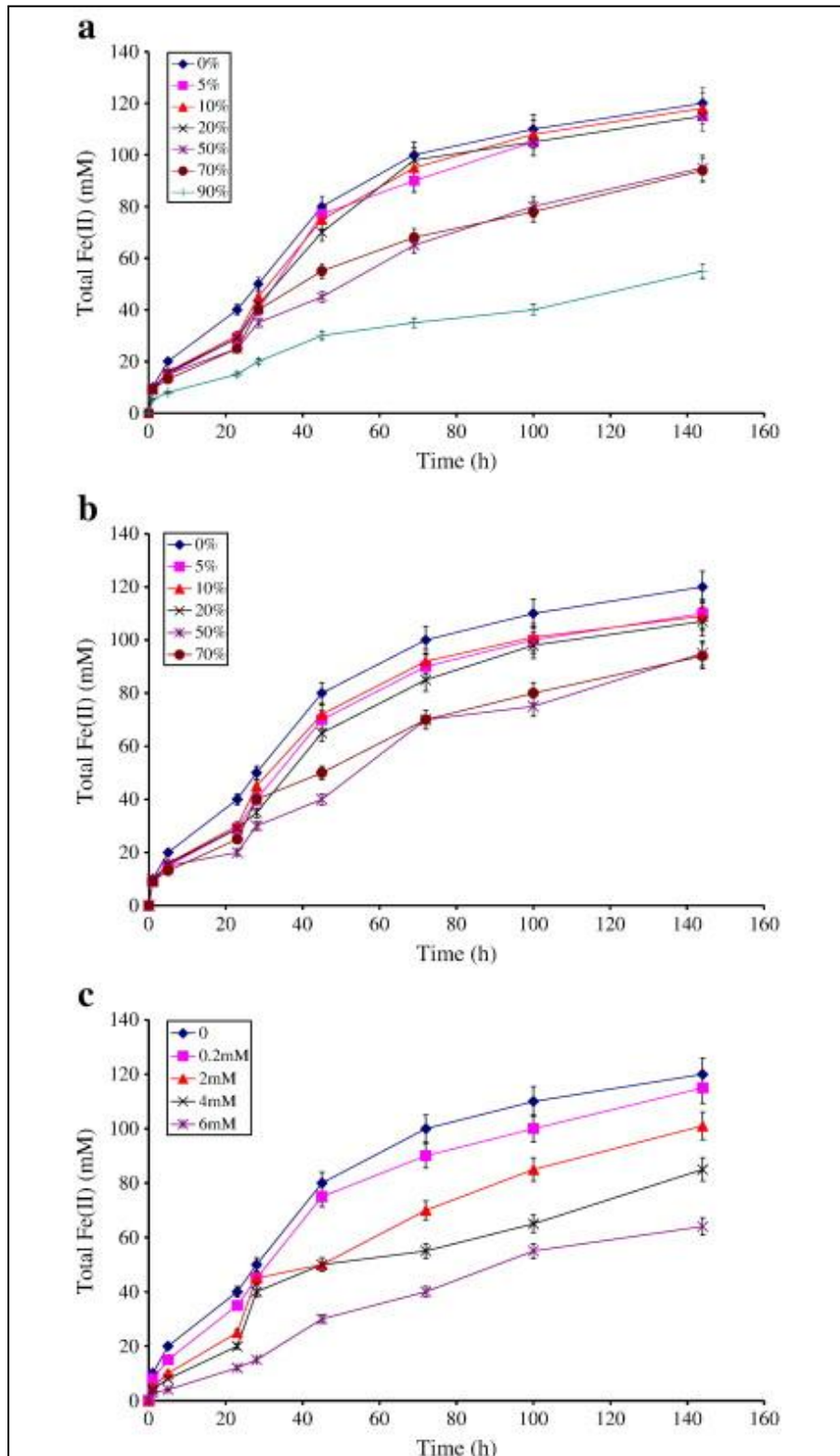


Figure 21 : Production of Fe(II) during the bioreduction of 300 mM of lepidocrocite under LC density conditions in the presence and absence of sand F₁ (a), sand F₂ (b) and dissolved silica (c) at various concentrations. Lines are a visual aid only. Error bars indicate the average deviation.

Bioreduction de la lépidocrocite en système fermé par Shewanella putrefaciens en présence d'une phase « silice ».

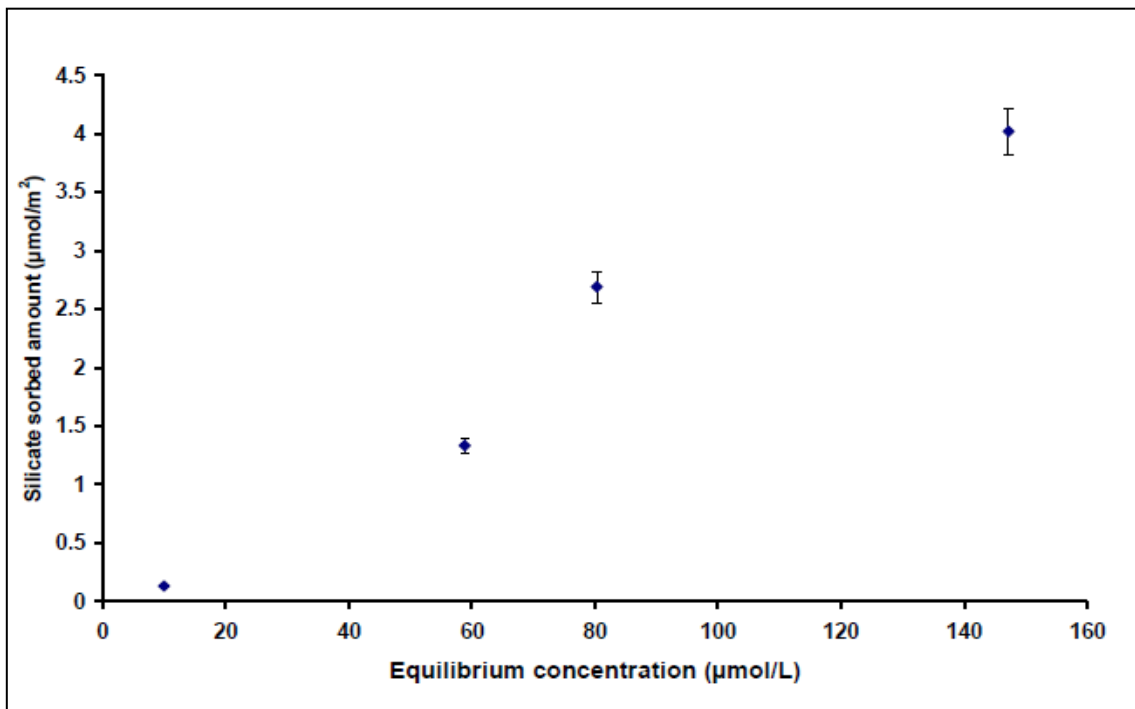


Figure 22 : Sorption isotherm of silicate on lepidocrocite at pH $7 \pm 0,2$. Silicate initial concentration (0-6 mM)

The extent of silicate sorption on lepidocrocite could be correlated with the bioreduction kinetic rate or with the nature of secondary iron mineral. In fact, bioreduction of lepidocrocite resulted in the formation of GR at high Si concentrations, while lower Si concentration led to magnetite or magnetite/chukanovite (**Figure 18**). This minimal effect of Si could be explained by the low sorption density ($< 1 \mu\text{mol m}^{-2}$) on the lepidocrocite surface (**Figure 22**), which did not prevent a faster bioreduction rate and then the magnetite formation. Furthermore, a higher sorption density ($\sim 4 \mu\text{mol m}^{-2}$) may explain why lepidocrocite bioreduction was not completed at 20 days of incubation time (**Figure 19 and Figure 22**).

However, there is an increase of total Fe(II) amount at 30 days when GR was identified as the dominant secondary mineral product instead of magnetite, except at 6 mM of aqueous Si (**Figure 23**). As GR contains more Fe(II) than magnetite, an increase in total Fe(II) amount is consistent with GR formation. The amount of soluble Fe(II) remains, however, relatively low regardless of the investigated system (**Figure 23**).

Bioreduction de la lépidocrocite en système fermé par *Shewanella putrefaciens* en présence d'une phase « silice ».

Table 4 : Kinetic rate constants (k_{obs}) and initial reduction rate (V_{initial}) for lepidocrocite bioreduction under various experimental conditions. Only the fitting values with correlation coefficient $r^2 > 0.95$ are given. ND = not determined.

F ₁ wt.%	0%	5%	10%	20%	50%	70%	90%
Rate constant k_{obs} (h^{-1}) $\pm 0.001 \text{ h}^{-1}$ (r^2)	0.018 (0.98)	0.016 (0.97)	0.017 (0.98)	0.016 (0.96)	0.018 (0.95)	0.017 (0.97)	ND (~ 0.92)
$V_{\text{initial}} = k_{\text{obs}} [\text{Fe(II)}]_{\text{max}}$ ($\text{mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) ± 0.10	2.16	1.92	1.92	2.04	1.7	1.7	–
F ₂ wt.%	0%	5%	10%	20%	50%	70%	
Rate constant k_{obs} (h^{-1}) $\pm 0.001 \text{ h}^{-1}$ (r^2)	0.018 (0.98)	0.017 (0.98)	0.017 (0.98)	0.016 (0.98)	ND (~ 0.92)	0.018 (0.97)	
$V_{\text{initial}} = k_{\text{obs}} [\text{Fe(II)}]_{\text{max}}$ ($\text{mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) ± 0.10	2.16	2.16	2.16	2.04	–	1.7	
Dissolved silica (mM)	0	0.2	2	4	6		
Rate constant k_{obs} (h^{-1}) $\pm 0.001 \text{ h}^{-1}$ (r^2)	0.018 (0.98)	0.017 (0.99)	0.016 (0.96)	ND (~ 0.91)	0.015 (0.95)		
$V_{\text{initial}} = k_{\text{obs}} [\text{Fe(II)}]_{\text{max}}$ ($\text{mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) ± 0.10	2.16	1.92	1.76	–	1.05		

Bioreduction de la lépidocrocite en système fermé par *Shewanella putrefaciens* en présence d'une phase « silice ».

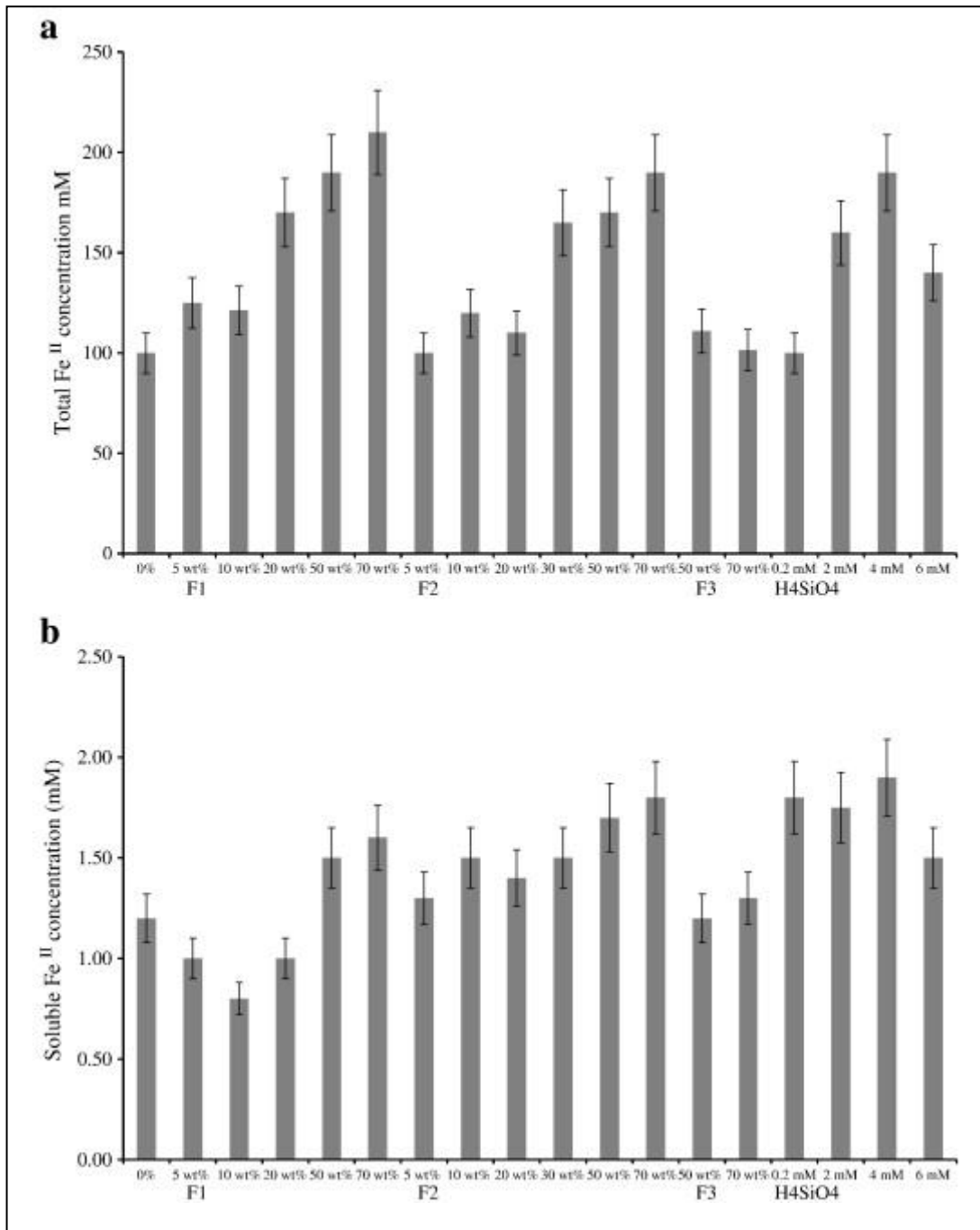


Figure 23 : (a) Total Fe(II) concentration (aqueous and solid) determined in all lepidocrocite bioreduction experiments. (b) Aqueous Fe(II) concentration determined in bioreduction experiments. LC density; 160 mM of formate and 300 mM of γ -FeOOH. Incubation time 30 days

Bioreduction de la lépidocrocite en système fermé par Shewanella putrefaciens en présence d'une phase « silice ».

4. EFFECT OF SI SPECIES ON THE STABILITY OF ABIOTIC SYNTHESIZED GREEN RUST

The impact of silicate on the stability of abiotic GR was tested using the Fe(II)–Fe(III) coprecipitation synthesis in the presence of various quantities of silicic acid (0–6 mM) or silica sand (0–70 wt.%) for all fraction sands. Initial, blank tests showed that without a stabilizing agent hydroxycarbonate GR was unstable and transformed quickly into magnetite. However, the presence of a low amount of phosphate maintains the structure of hydroxycarbonate GR and prevents its conversion into magnetite.

As for biomineralization experiments, threshold values for dissolved silicate and quartz sand required for GR preservation have been obtained. In the presence of silicate (4 or 6 mM) at pH around 8, GR did not transform to magnetite (**Figure 24**).

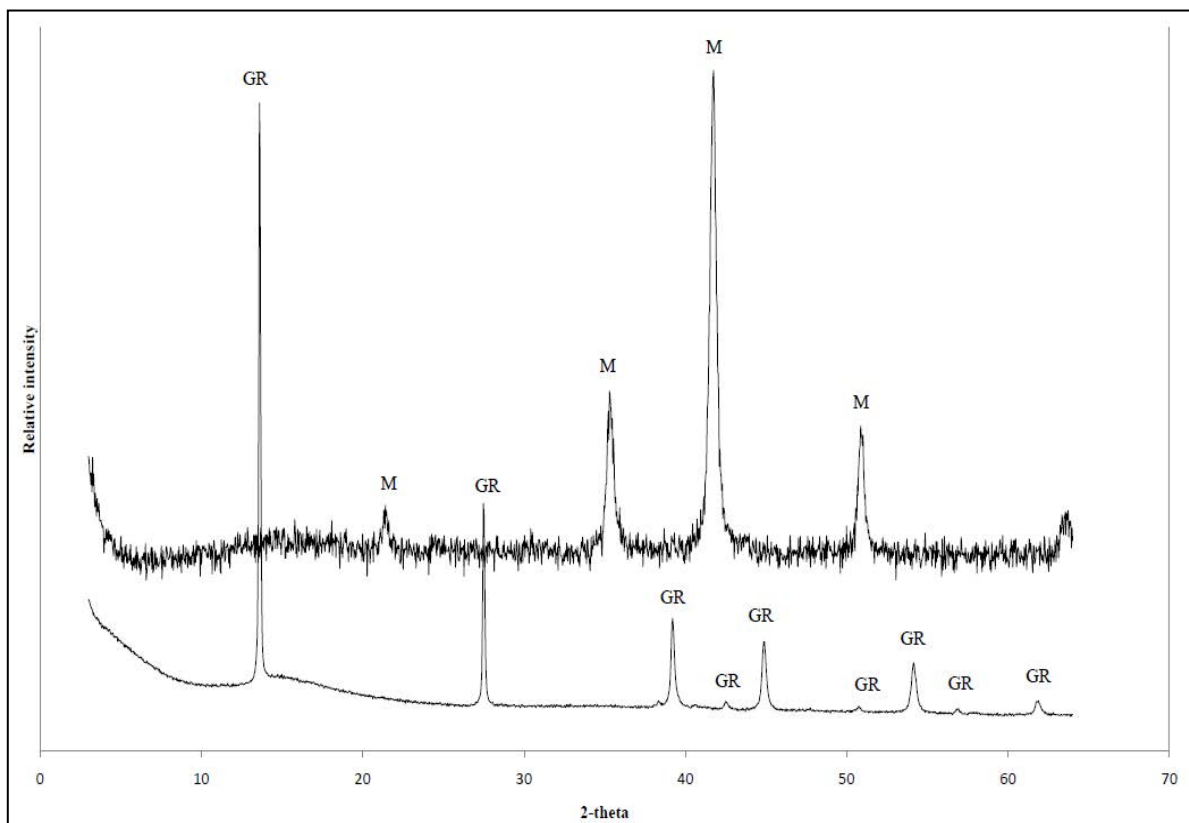


Figure 24 : X-ray diffractograms of the abiotically formed carbonate GR and magnetite

However, with a low concentration (i.e. 2 mM) the transformation occurred in less than 1 h. All these results confirmed the role of Si as stabilizing ligand for the preservation of

Bioreduction de la lépidocrocite en système fermé par Shewanella putrefaciens en présence d'une phase « silice ».

GR. They are consistent with previous findings where stabilization effect of anions like phosphates, silicates and arsenate was observed for the abiotic carbonate GR (Benali et al., 2001; Bocher et al., 2004; Ruby et al., 2006b; Su et Wilkin, 2006; Kwon et al., 2007).

The stability of abiotically formed carbonate GR was also evaluated by using quartz sand as a stabilizing agent. In the presence of F1 or F2 fractions (50 or 70 wt.%), GR did not transform into magnetite. However, tests conducted with a low loading of sand fractions F₁ or F₂ (10, 20 or 30 wt.%) or with the sand fraction F₃(regardless the amount tested) did not shown any stabilization effect of the carbonate GR. In fact, the negatively charged quartz particles (pzc ~ 3) can interact with the positively charged external surface of GR. These results show that in addition to aqueous Si, GR can also be stabilized by the addition of anionic colloidal silica.

IV. DISCUSSION

1. STABILIZATION EFFECT OF Si

Although some factors such as cellular material (i.e. autoclaved cells and/or bacterial polymers), synthetic anionic polymers or oxyanions have been identified to control the route of the GR mineralization as secondary mineral (O'Loughlin et al., 2007; Jorand et al., 2009; O'Loughlin et al., 2010), the main mechanisms leading to GR formation at the expense of other products such as magnetite remained unknown. As GR is expected to be an intermediate phase produced by biotic reductive dissolution of ferric oxyhydroxides, adsorbed anions could stabilize GR phases and inhibit the formation of thermodynamically favored iron phases such as magnetite. For chemically synthesized carbonate GR, the presence of Si species (aqueous or colloidal silica) preserves the GR structure and prevents its transformation into magnetite.

In incubation experiments, the partial dissolution of the finest quartz particles involved the release of sufficient silicate to stabilize the GR structure. The sorption of silicate on the external faces of GR crystals preserves the GR via stabilization of the surface bonding environment. The sorbed amount estimated by depletion method was found between 0 and 10 $\mu\text{mol m}^{-2}$ when aqueous Si concentration varied between 0 and 6 mM. A value of 20 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ was used for the external surface area of GR, corresponding to the theoretical and experimental external surface areas of related layered double hydroxide including GR-Cl and hydrotalcite (Liang et Butler, 2010).

Silicate bound to iron oxyhydroxides by inner sphere surface complexation and Si polymerization may occur on the surface at high Si loading (Rusch et al., 2010a). SEM imaging of biogenic GR produced in presence of 4 mM of H_4SiO_4 showed the formation of a silica polymer (**Figure 25a and b**), which may support the stabilization effect of silica on the GR. Si is an element of relative low atomic number and thus appears as gray in **Figure 25 b**. However, the white patches are indicative of the coating which contains elements of high atomic number i.e. Fe. The STEM-EDX and elemental analysis of this

Bioreduction de la lépidocrocite en système fermé par Shewanella putrefaciens en présence d'une phase « silice ».

polymer indicated also a composition of Si, Fe and O, suggesting the formation of a mixed silica/iron polymer (**Figure 26 and Figure 27**).

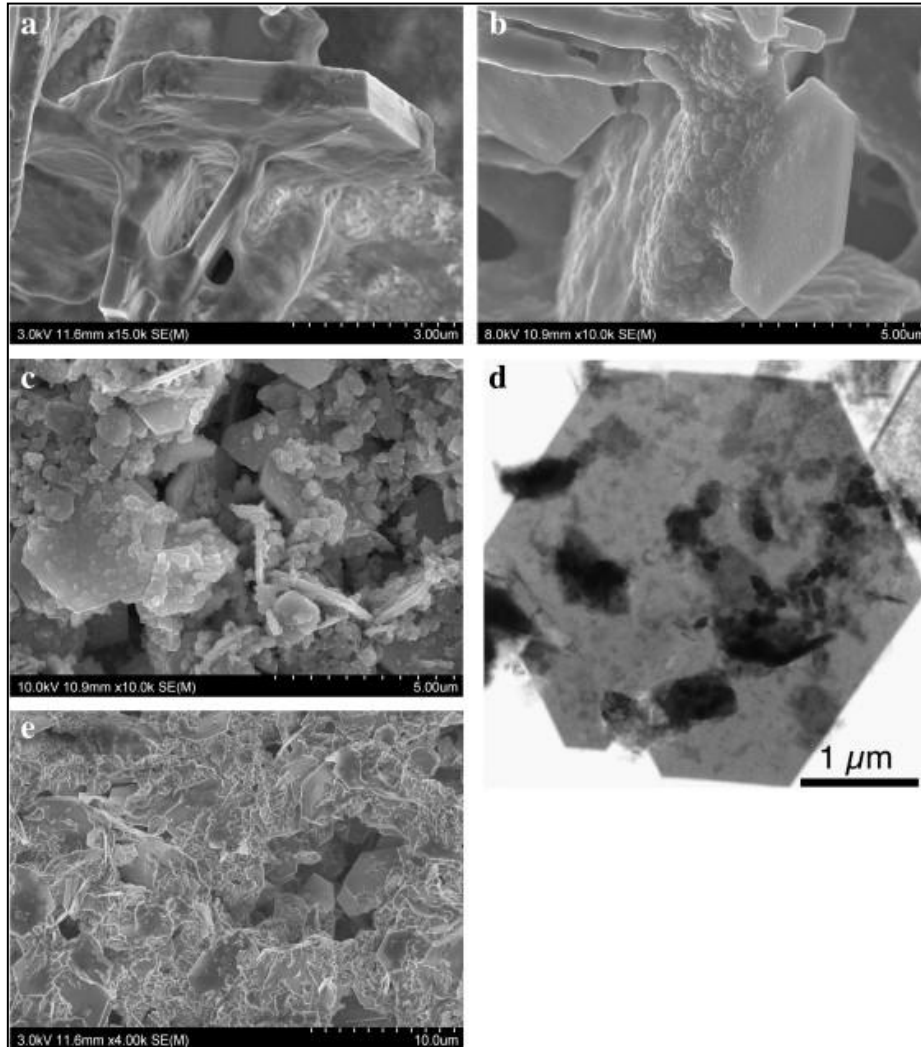


Figure 25 : Scanning electron and/or transmission electron micrographs of solids produced during bacterial reduction of lepidocrocite in the presence of low cell density “LC” with silicic acid H_4SiO_4 (4 mM) (a, b), F₁ quartz sand fraction (70 wt.%) (c, d); F₂ quartz sand fraction (70 wt.%) (e).

As for dissolved silicate, the nanoparticles of quartz can also bind by sorption/deposition process to the external faces of GR. SEM and TEM imaging suggest that the hexagonal GR crystals could be surrounded by small sand particles (**Figure 25c, d and e**). Quartz and GR were also confirmed by EDX analysis and electron diffraction patterns (**Figure 27**). All these observations suggested that the interactions of Si-species with the lateral faces of GR can improve its stability.

Bioreduction de la lépidocrocite en système fermé par Shewanella putrefaciens en présence d'une phase « silice ».

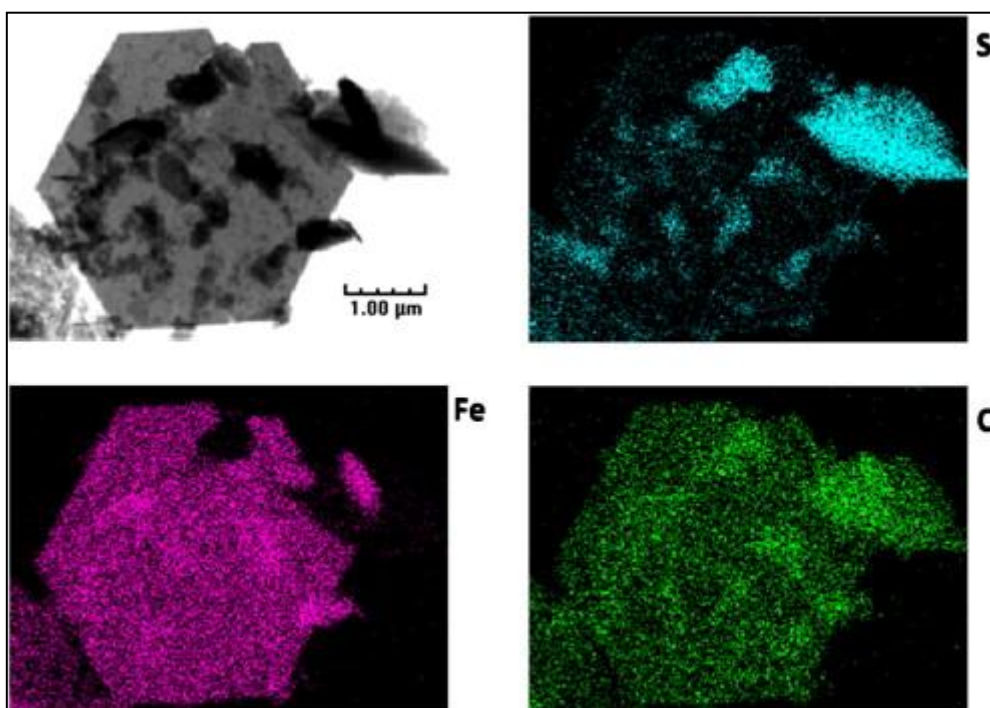
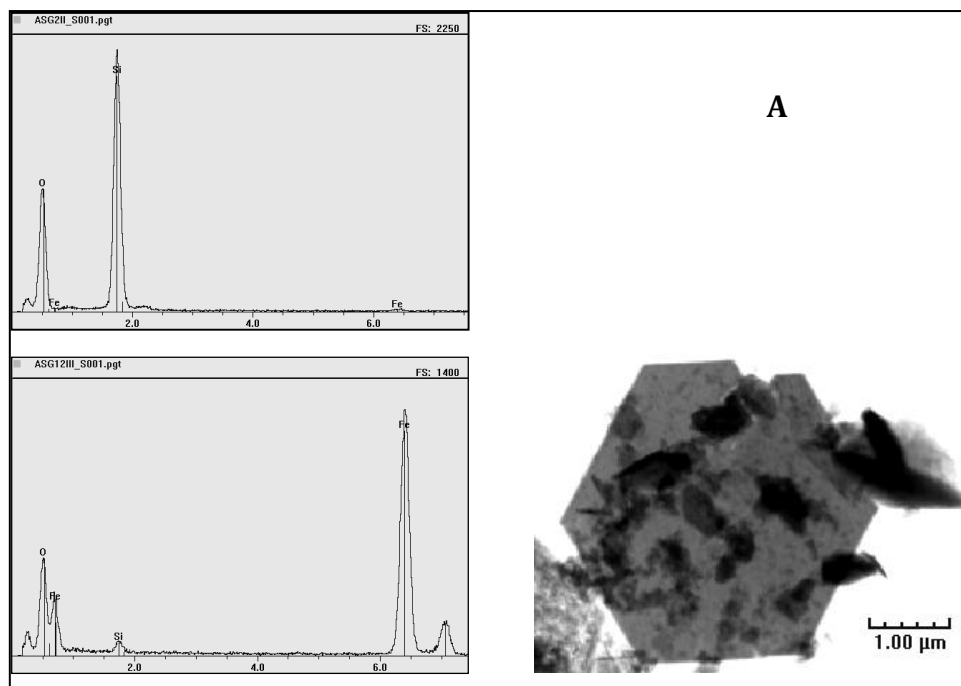


Figure 26 : Scanning transmission electron microscopy coupled with EDX analysis of a green rust crystal formed with low cell density ("LC") and F1 quartz sand fraction, indicating the localization of Si, Fe and O elements.



Bioreduction de la lépidocrocite en système fermé par Shewanella putrefaciens en présence d'une phase « silice ».

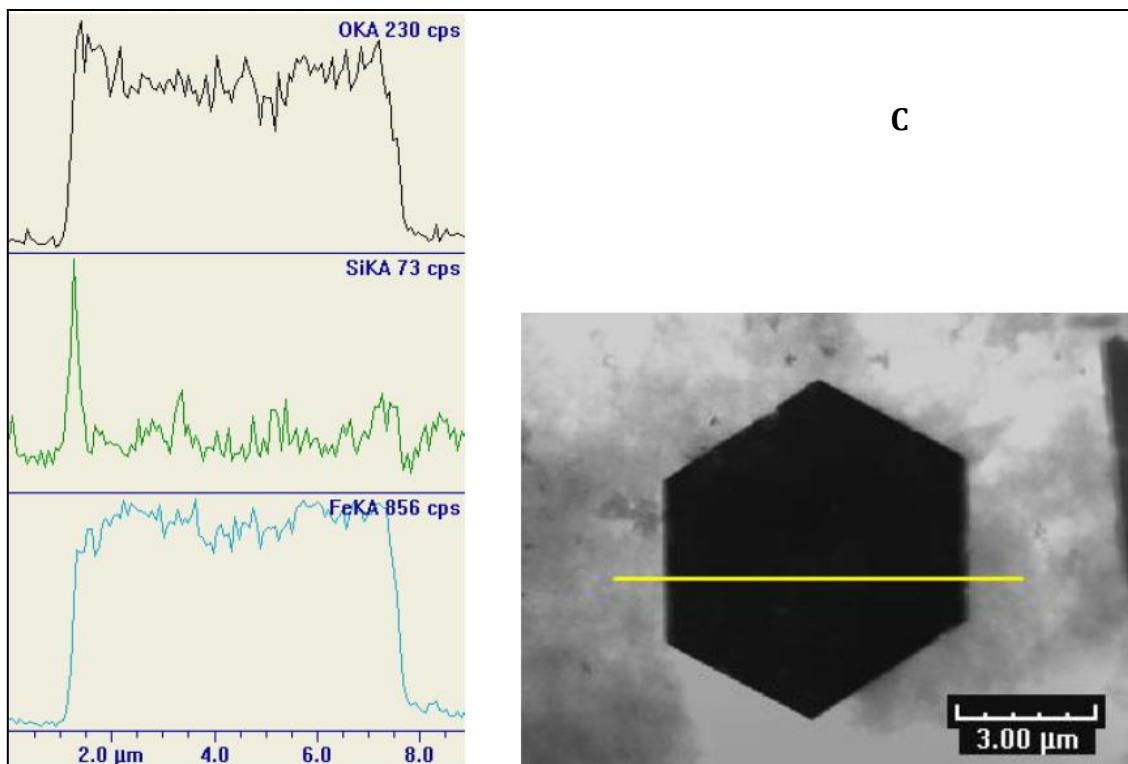
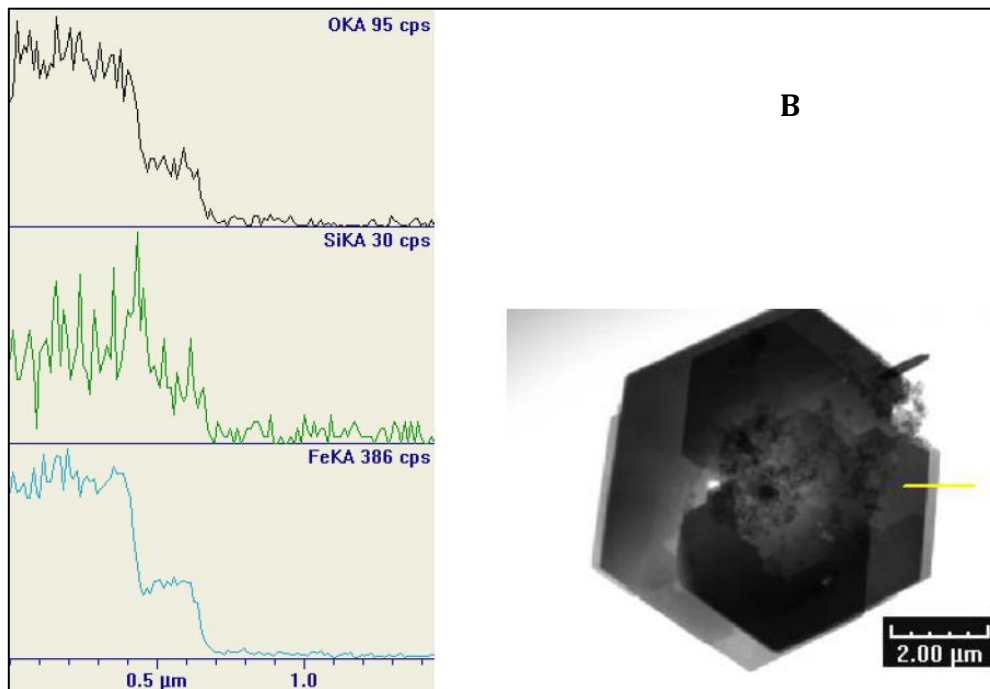


Figure 27 : Transmission electronic micrograph of a green rust crystal formed from incubation with F_1 (70%) (a), the EDX analysis was performed on the GR crystal and on Si-particle. Green rust crystals were covered by particles of silica. (b) and (c) are the scanning transmission electron microscopy-EDX for F_2 70 % and H_4SiO_4 4 mM, respectively. The yellow line indicated the EDX scan reported for O, Si and Fe.

2. DECREASE OF INITIAL BIOREDUCTION RATE

An increase in silicate surface coverage may decrease iron reduction rate of lepidocrocite, leading to GR formation. These observations are consistent with previous findings where the effect of silicate (Si) and/or phosphate (P) on the bioreduction of lepidocrocite or ferrihydrite has been investigated (Kukkadapu et al., 2004, Borch et al., 2007 and O'Loughlin et al., 2010). O'Loughlin et al. (2010) suggested that the strong sorption of oxyanions blocks access of bacterial cells and/or electron-shuttling compounds to iron surface sites, thereby limiting the rate of bioreduction. They showed that the addition of 0.5 mM of silicate or phosphate decreased the initial reduction rate of lepidocrocite but ultimately resulted in greater overall Fe(II) production leading to the GR formation. Recently, it was shown that the production of GR was dependent on bacteria cell density and/or polymer addition and not only on iron reduction rates (Zegeye et al., 2010 and references therein). Kukkadapu et al. (2004) reported that the presence of Si (1 or 5 mol% Si) had a small effect on the biotransformation of ferrihydrite in terms of rate and extent. Borch et al. (2007) showed that increase of phosphate surface coverage decrease the Fe(III) reduction extent, affecting bioreduction and mineralization pathways of ferrihydrite. However, whether the iron reduction rate is the consequence or the cause of the secondary iron mineral formation remains to be elucidated.

Although Si and P bind to iron oxides via inner-sphere complexation, the relative strength of the binding constants and their surface speciation are highly variable. Phosphate binds strongly to Fe(III) oxides through monodentate and/or multidentate–mononuclear surface complexes and exhibits a higher affinity than silicate (Dzombak and Morel, 1990). However, the surface speciation of silicate on the Fe(III) oxides differ significantly and at lower Si concentration, it was present as a loosely bound surface complex. At higher concentration, silica polymers formed discrete islands or surface clusters that grew away from the iron oxide surface (Eick et al., 2009 and Rusch et al., 2010a). Consistently, Eick et al. (2009) showed minimal changes in the quantity of reactive surface sites and the dissolution rate of goethite when initial silica solution concentrations increased from 0.5 mM to 5 mM. These interpretations help us to

Bioreduction de la lépidocrocite en système fermé par Shewanella putrefaciens en présence d'une phase « silice ».

understand why phosphate was shown to have a profound effect on extent of Fe(III) oxide biotransformation or the stability of abiotic GR even though at lower concentration while that of Si was minimal (Kukkadapu et al., 2004, Borch et al., 2007 and O'Loughlin et al., 2010).

On the other hand, Si was shown to kinetically retard and prevent the Fe(II)-catalyzed transformation of Fe(III)-oxides to more crystalline, thermodynamically stable forms of Fe(III) (Mayer et Jarrell, 1996; Jones et al., 2009). The inhibition effect of Si on the abiotic transformation of Fe(III) minerals can be explained by the fixation of Si on the oxide surface: (i) reducing the direct adsorption of aqueous Fe(II) and then the extent of interfacial electron transfer, and/or (ii) blocking dissolution sites on the Fe(III) mineral or (iii) hindering nucleation of more stable Fe(III) phases upon recrystallisation or dissolution/re-precipitation (Doelsch et al., 2000; Jones et al., 2009)

In our system, one can imagine that the adsorption of silicate (Si) might inhibit the Fe(II)-catalyzed transformation of lepidocrocite by the freshly biogenerated Fe(II) and then prevent the formation of less reactive products or more crystallized iron oxides such as goethite and hematite (Pedersen et al., 2005; Yee et al., 2006). In this case, the inhibition effect of Si may be considered as positive for the bioreduction process, because the Fe in crystalline Fe(III) oxides was shown to be relatively unavailable for reduction by Fe(III)-reducing bacteria (Roden et Zachara, 1996; Liu et al., 2001). However, the overall mechanism leading to GR biomineralization as secondary iron mineral (i.e. dissolution–reprecipitation or solid-state transformation) is still a matter of debate and therefore the contribution of Si in each step cannot be fully highlighted.

3. HETEROAGGREGATION OF QUARTZ PARTICLES AND Fe-OXIDES

Bacterial cells are known to interact strongly with iron species (Roden et Zachara, 1996; Urrutia et al., 1998) and to promote the aggregation of γ -FeOOH (Zegeye et al., 2010). The relative loading of cell/lepidocrocite or the presence of anionic polymers in reaction medium was suggested to affect both the aggregate structure and the nature of the secondary iron mineral (Zegeye et al., 2010). The formation of such

Bioreduction de la lépidocrocite en système fermé par Shewanella putrefaciens en présence d'une phase « silice ».

aggregates was assumed to contribute to the formation of the GR as secondary mineral by limiting the diffusion of reactive species and thus creating a favorable microenvironment for GR formation (Zegeye et al., 2010). Indeed, these confined sPAAEs (i.e. aggregates) may offer suitable chemical conditions such as pH, redox potential and concentration of reaction byproducts (e.g. Fe(II) and carbonate) required for the biomineralization of GR. The possible occurrence of high local concentrations of electron shuttle and/or exopolymeric materials in such dense microenvironments may also affect the biomineralization process. However, the exact mechanism was not determined and remains open to speculation.

In our experimental system, the Si-species together with bacteria cells could also contribute to the formation of densely packed aggregates by neutralizing the positive charge of the iron oxide. Sorption of divalent cations such as Fe²⁺ reduces the surface charge of colloidal silica leading to aggregation and then sedimentation (Kobayashi et al., 2005; Johnson et al., 2008). A colloidal heteroaggregation of quartz particles and Fe-oxides may also occur as has been widely observed in surface water studies (Findlay et al., 1996). Herein, the heteroaggregation effect was highlighted by determining the sedimentation rate of lepidocrocite suspensions before and after quartz addition at neutral pH using UV-visible spectrophotometer (**Figure 28**). Attractive electrostatic interactions between the negatively charged quartz particles (pzc ~ 3) and the positively charged iron oxides (pzc ~ 8) played a role in determining the particle aggregation behavior. Because of its higher surface area or lower particle size, the sedimentation or aggregation was more pronounced in the case of F₁ (**Figure 28**).

Bioreduction de la lépidocrocite en système fermé par Shewanella putrefaciens en présence d'une phase « silice ».

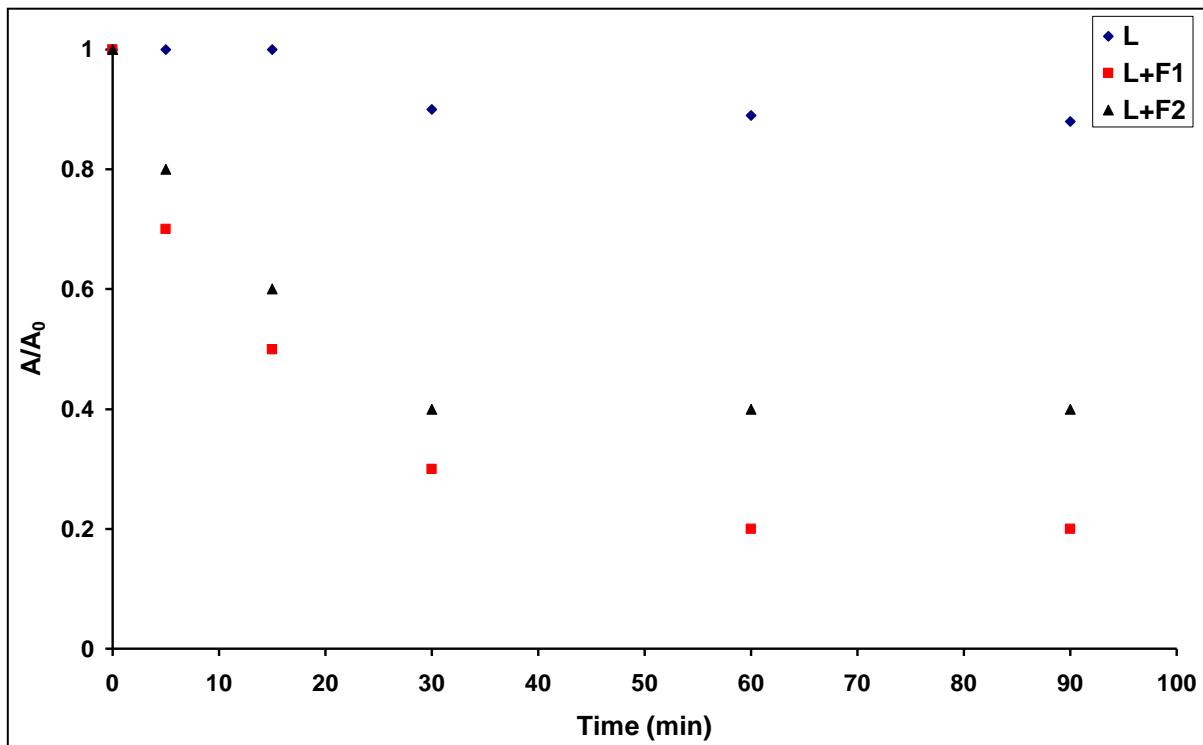


Figure 28 : Sedimentation plots showing the behavior of 0.1 g/L suspensions of lepidocrocite at neutral pH solutions of 10 mM NaCl, in the presence and absence of sand quartz added at 0.1 g/L.

Finally, small particle sizes, irregular surfaces and patchy distribution of nanoporous aggregates may affect the diffusion processes (i.e., the access of actives compounds to iron oxide sites) and therefore the biomineralization mechanisms. Additional investigations along these lines would certainly be needed to evaluate the mineral aggregation effects on the formation/stability of the GR product.

V. CONCLUSIONS

This work contributes to our understanding of the processes leading to the green rust formation in environmental systems and in particular in natural silica mineral composites.

We notably demonstrate that the formation routes of Fe(II)-bearing secondary mineralization products from microbial reduction of Fe(III) oxide in silica mineral assemblages are dependent on silica sand loading and particle size distribution. The sorption of aqueous or colloidal silica on the external faces of GR crystals stabilized the GR structure, thus preventing its transformation into other products. The sorption of dissolved silicate on the lepidocrocite surface may limit the bioreduction rate and promote GR formation. Finally, heteroaggregation of mixed mineral phases may affect the diffusion processes of species, creating a suitable microenvironment for GR biomineralization.

These findings regarding GR biomineralization in iron oxides/silica mineral complexes and the pathways involved are relevant to many subsurface environments, and have important implication for the natural attenuation of contaminants in soils and sediments. In addition, the presence of Si improves the stability of GR in natural environment and may affect its reaction with molecular oxygen or contaminant oxidants. As GR is an effective reductant for several contaminants, the factors controlling the GR formation should be taken into account in prediction studies of pollutant fate and transport.

PARTIE B. CONTRIBUTION DE POLYMERES NEUTRES OU ANIONIQUES A LA FORMATION DE ROUILLE VERTE CARBONATEE ISSUE DE LA BIOREDUCTION DE LEPIDOCROCITE PAR *SHEWANELLA PUTREFACIENS*

Ce chapitre est la version intégrale de l'article soumis à Geomicrobiology Journal : Jorand F., Sergent A-S., Remy P-Ph., Bihannic I., Ghanbaja J., Lartiges B., Hanna K., Zegeye A. Contribution of anionic vs neutral polymers to the formation of green rust 1 from γ -FeOOH bioreduction.

Ce travail est le fruit d'une collaboration avec deux étudiants du master Microbiologie, Paul-Philippe Remy (M2) et Fatima Boutaara (M1) que j'ai eu le plaisir d'encadrer. Ce projet avait été amorcé par le Master Géosciences de Florian Landry en collaboration avec Bruno Lartiges (LEM). Mon implication dans ce travail a été de reproduire les expérimentations avec le polyacrylate (PAA) et de l'étendre au polyacrylamide (PAM) et à l'anthraquinone disulfonate (AQDS) lors de la biominéralisation de la rouille verte et de la magnétite.

Ce chapitre traite de l'influence de la présence d'un polymère organique sur l'orientation et la formation du minéral secondaire dans la bioréduction de la lépidocrocite par *Shewanella putrefaciens*. De précédentes études (Zegeye et al., 2010) ont montré l'influence que pouvait avoir la présence de corps bactériens issus des cellules bactériennes autoclavées sur la formation du minéral secondaire à partir de lépidocrocite. En effet, dans des conditions favorables à la formation de magnétite, l'ajout de cellules bactériennes autoclavées (15 min à 121 °C) oriente la formation du minéral secondaire en rouille verte. Des analyses complémentaires ont montré que la floculation résultante de la présence de ces corps bactériens expliquerait la formation de rouille verte vs magnétite (Zegeye et al., 2010). En effet, la présence de polymères favoriserait un phénomène d'hétéroagrégation créant des microenvironnements où la concentration des ions serait favorable à la formation de rouille verte. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'ajout de polymères organiques synthétiques afin de mimer des polymères bactériens.

Nous avons choisi deux polymères : un polymère anionique (PAA) et un polymère neutre (PAM) ayant un pouvoir flocculant différent et nous avons testé l'effet de leur ajout sur la réduction de la lépidocrocite par *Shewanella putrefaciens*. Ces deux polymères ont des propriétés flocculantes importantes mais présentes des propriétés électriques différentes : le polyacrylate (PAA) porte des charges négatives (groupe carboxylique) à pH neutre et est susceptible de réagir avec des cations ferriques mais est beaucoup moins flocculant que le polyacrylamide (PAM), un polymère non chargé. Dans ces conditions, nous avons testé différentes concentrations en polymère (de 10 à 1000 mg L⁻¹). Si la formation de rouille verte est dépendante de l'agrégation des cellules avec les particules d'oxydes de fer, le PAM devrait promouvoir la rouille verte au dépend de la magnétite. Si la formation de rouille verte dépend des propriétés électriques des polymères, le PAA devrait promouvoir la formation de rouille verte au lieu de la magnétite. Nous avons également testé l'effet de ces polymères organiques sur la synthèse chimique de la rouille verte carbonatée. La rouille verte carbonatée synthétisée par voie abiotique est instable en l'absence d'agent stabilisant tel que le phosphate.

Nous avons alors montré que les polymères et en particulier le PAA, stabilisaient la rouille verte carbonatée (CO₃²⁻). Ce serait donc par stabilisation des cristaux de rouille verte que les polymères, et par extension les corps bactériens, favoriseraient la formation de rouille verte au dépend de la magnétite. Cette dernière rappelons-le, peut provenir de la recristallisation des Fe²⁺ issus de la rouille verte.

CONTRIBUTION OF ANIONIC VS NEUTRAL POLYMERS TO THE FORMATION OF GREEN RUST 1 FROM γ -FeOOH BIOREDUCTION

Jorand F., Sergent AS., Remy PPh., Bihannic I., Ghanbaja J., Lartiges B., Hanna K., Zegeye A.

ABSTRACT

In order to assess the effect of polymeric substances on the biomineralization and stabilization of green rust (GR), we tested the effect of two organic polymers on the transformation of γ -FeOOH to GR vs magnetite in presence of *Shewanella putrefaciens*. These two polymers, generally used as flocculants, are polyacrylic acid (PAA), which bears negatively charged carboxylic groups at neutral pH and is expected to react with cationic hydrolyzed iron species, and polyacrylamide (PAM), which is a neutral polymer that may develop hydrogen bonds with iron nanocolloids. The bioreduction of lepidocrocite by *S. putrefaciens* was performed under conditions known to yield either magnetite or GR. Each operational condition of interest was investigated with various polymer concentrations (from 10 to 1000 mg L⁻¹). The final product was characterized using X-ray diffraction and electronic microscopy. The results showed that the formation of GR is favored, with respect to magnetite, to a lesser extent with PAM than with PAA. These results indicated that the polymers influence the chemical stability of GR and/or guide the route of biomineralization. The polymer properties, in addition to both silica and phosphate concentrations are then critical parameters that control the secondary iron mineral biomineralization from iron-reducing bacteria.

Keywords: iron reduction, biominerals, green rust, polyacrylic acid, polyacrylamide, lepidocrocite, *Shewanella*, magnetite

I. INTRODUCTION

Green-rusts (GR) are lamellar Fe^{II}-Fe^{III} hydroxysalts primarily identified as intermediate products during the wet corrosion of iron-based materials (Bernal et al., 1959). Currently, they have been described in several anthropised (Koch et Morup, 1991; Pineau et al., 2008; Swietlik et al., 2012) or natural environments (Trolard et al. 1997; Christiansen et al. 2009; Zegeye et al. in press). The GR structure is related to that of the mineral fougérite (IMA 2003-057) found in hydromorphic soils (Génin et al., 2005; Trolard et al., 2007) where it was assumed that microbial activities promote its formation (Berthelin et al. 2006). The general formula of GRs is $[\text{Fe}^{\text{II}}_{(1-x)}\text{Fe}^{\text{III}}_x(\text{OH})_2]^{x+} \cdot [(x/n)\text{A}^{n-}] \cdot m\text{H}_2\text{O}]^{x-1,2}$ where x is $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}_{\text{total}}$, A^{n-} is the interlayer anions with charge n , and m represents moles of water molecules. Several anions (e.g.: Cl^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , lactate, formate, selenate, etc) can be intercalated in the structure, and based on the X-ray diffraction (XRD) pattern two types of GR, GR1 or GR2, can be segregated depending on the anion geometry (Bernal et al. 1959; Refait et al. 1998; Simon et al. 2003). Currently, only the occurrence of two types of GR are mainly reported in sub-oxic environments: the GR1(CO_3^{2-}) (e.g. : $\text{Fe}_4^{\text{II}}\text{Fe}_2^{\text{III}}(\text{OH})_{12}(\text{CO}_3^{2-}) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) and the GR2(SO_4^{2-}) (e.g. : $\text{Fe}_4^{\text{II}}\text{Fe}_2^{\text{III}}(\text{OH})_{12}(\text{SO}_4^{2-}) \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) (Herbillon, 2006). These two types of GR were also found as secondary minerals in laboratory based experiments resulting from either iron-reducing bacteria (Fredrickson et al. 1998; Parmar et al. 2001; Ona-Nguema et al. 2002a; Zegeye et al. 2005) or iron-oxidizing bacteria (Pantke et al., 2012) in anoxic conditions.

The scientific community has shown a growing interest in green rusts since (i) they have been recognized to significantly contribute to the biogeochemical cycle of iron and related elements (Herbillon, 2006), and (ii) they could act as reducing agents of several organics as well as inorganics pollutants (Elsner et al., 2004; Borch et al., 2010). Moreover, it has been shown that they can act as catalysts during the Fenton-like reactions (Kone et al., 2009). GRs represent then promising compounds in environmental engineering for remediation processes of contaminated water and soils. For this purpose, the control and the formation mechanisms of these compounds deserve a thorough investigation.

GRs can be obtained by various chemical procedures including: i) the controlled oxidation of ferrous hydroxide (Bernal et al., 1959), ii) the solid state transformation of iron oxides with Fe^{2+} (Hansen, 1989) and, iii) the co-precipitation of Fe^{3+} with Fe^{2+} in alkali medium (Bocher et al. 2004). However, the resulting GRs, and especially $\text{GR1}(\text{CO}_3^{2-})$, are relatively unstable and additives such phosphate are required to stabilize them (Bocher et al. 2004). On the other hand, the amount of microbiologically precipitated GR may reach $\sim 90\%$ of the total iron and it remains stable in aqueous suspension for several years even in the absence of phosphate (Jorand et al., 2011). Therefore, the use of bacterial iron reducing activity for GR production and for regenerating its oxidized counterpart (Jorand et al., 2007), could be an appropriate and alternative method to the purely chemically synthesized compounds.

The factors controlling the formation of secondary minerals by bacterial activity (i.e. biomineralization), and *in extenso* the biological processes affecting the stability of iron oxides are well documented. In laboratory experiments, a large diversity of ferrous compounds other than GR can be formed as secondary minerals from bacterial iron-reducing activities (Lovley et Phillips, 1987; Fredrickson et al., 1998; Jorand et al., 2000; Kukkadapu et al., 2004; Zegeye et al., 2007). However, magnetite (Fe_3O_4) and GR remain by far the two main minerals produced by iron reducing bacteria in laboratory experiments and with *Shewanella* spp as the iron respiring bacterial model. The medium composition and phenomena occurring at interfaces are key factors influencing the nature of the mineral formed during the bacterial culture. Thus, phosphate has previously been shown to promote the formation of GR and vivianite ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) in 1,4-piperazinediethane-sulfonic acid (PIPES) buffered medium (Fredrickson et al. 1998; Parmar et al. 2001; Kukkadapu et al. 2004). A possible role of phosphate is its adsorption on the edge of GR crystals contributing to the stabilization of the GR (Bocher et al., 2004; Refait et al., 2007). However, in non-buffered medium and in absence of phosphate, GR can also be produced microbiologically in a high cell density culture (Ona-Nguema et al. 2002a). Experiments with several cell densities, supplemented by metabolically inactive cells (heat-killed cells) or exo-cellular polymers (EPS) indicated that oxyanions, cell bodies and /or EPS, silica and quartz particles promoted GR mineralization during the bioreduction of lepidocrocite by *Shewanella putrefaciens*

Contribution de polymères neutres ou anioniques à la formation de rouille verte carbonatée issue de la bioréduction de lépidocrocite par Shewanella putrefaciens

(Zegeye et al., 2007; O'Loughlin et al., 2010; Zegeye et al., 2010; Sergent et al., 2011). Therefore, one could expect that GR formation would be associated with the capacity of the bacteria to produce or to bear a large amount of EPS. Thus, the cell density threshold necessary to “initiate” GR formation is lower with *S. putrefaciens* ATCC 8071 (equivalent to CIP 8040) than with *S. putrefaciens* CN32 (O'Loughlin et al. 2010). This is consistent with the surface properties of these bacteria since *S. putrefaciens* ATCC 8071 exhibits a larger polymeric fringe (~60 nm thick, (Gaboriaud et al., 2006)) than *S. putrefaciens* CN32 exhibiting none or a very thin layer (0 – 5 nm) of polymeric fringe (Korenevsky et al., 2002). Salas *et al.* (2010) showed that the strain of *Shewanella* forming a “robust biofilm” (strain W3-18-1) led to the formation of GR rather than magnetite unlike to strains CN32 and MR-4. Recently it was shown that extracts from environmental biofilms promote GR (Jorand et al. 2011); this is consistent with an effect of EPS on GR, EPS being a major constituent of biofilms (Flemming et Wingender, 2010).

On the other hand, the pattern of iron reduction suggests that the formation of GR is controlled by the rate of Fe^{II} production, faster rates promoting magnetite, and slower rates promoting GR (Ona-Nguema et al. 2002a). However, in some cases, the iron reduction rate and the nature of the secondary mineral could not be related (Zegeye et al. 2010; O'Loughlin et al. 2010; Sergent et al. 2011). As still emphasized (O'Loughlin et al. 2010), one cannot exclude that the Fe^{II} production rate would be a consequence of the routes for the secondary mineral formation rather than a controlling factor.

The formation of magnetite could be the result of a solid-state reaction of sorbed Fe²⁺ with iron oxide (Tronc et al. 1992). The oxyanions and bacterial cell surfaces have also a strong affinity for iron oxide surfaces (Urrutia et al. 1998; Liu et al. 2001; O'Loughlin et al. 2010) and it was suggested that a competitive sorption between Fe²⁺ and EPS or oxyanions for the iron oxide surface, would influence the nature of (bio)mineralization products (Roden and Urrutia, 2002; O'Loughlin et al. 2010).

The chemically synthesized GR1(CO₃), is well known to be metastable with respect to the two-phase system siderite – magnetite (FeCO₃ – Fe₃O₄) (Benali et al. 2001; Sumoondur et al. 2008). Ferrous carbonate and siderite as well as chukanovite, are

frequently found associated with magnetite following iron oxide bioreduction by *Shewanella* (Fredrickson et al. 1998; Ona-Nguema et al. 2002a; Kukkadapu et al. 2005; Salas et al. 2010; Zegeye et al. 2010; Sergent et al. 2011). This observation emphasizes that the formation of green rust instead of magnetite could not proceed through two “competitive” pathways, but suggests strongly only one route where GR could be a precursor for magnetite. Thus, it has been suggested that cells or polymeric cell materials, could stabilize GR1 in the same way as phosphate or silica while impairing the transformation of GR into the more stable magnetite (Jorand et al., 2009). However, it is still unclear whether magnetite is always produced from the GR dissolution or if magnetite could be directly produced from iron oxide reduction.

As stated before, there could be a link between the biofilms or/and EPS production and the nature of secondary mineral (Salas et al., 2010; Jorand et al. 2011). Cell surfaces and/or EPS can drive biomineralization by providing nucleation sites (Konhauser et al., 1994). Additionally, the biofilm environment could also influence biomineralization by diffusional constraints, changing the solute concentration with regard to the bulk. Indeed, when bacteria and iron oxide particles are densely packed, it was found that GR formation is favored at the expense of magnetite (Zegeye et al. 2010). It was suggested that a limited diffusion occurs within the aggregates thus determining a locally high concentration of bicarbonate and ferrous iron which could then trigger the nucleation of GR1(CO₃²⁻), rather than the precipitation of magnetite. This is consistent with experiments under advective flow, assumed to remove the bacterial products, where magnetite was produced but not GR (Hansel et al. 2003).

In order to investigate the effect of polymeric substances on biomineralization and stabilization of GR1, we aim in the present work to test two organic polymers with different charge and flocculating properties. Polyacrylic acid (PAA) is negatively charged at neutral pH and is less flocculant than the non-charged polyacrylamide (PAM). If GR formation is dependent on the aggregation of cells with iron oxide particles, PAM should promote GR rather than magnetite. If GR formation is more dependent on the electrical properties of polymers, then PAA should promote GR rather than magnetite. The cell density of *S. putrefaciens* was defined either to produce magnetite (i.e. with a low cell

Contribution de polymères neutres ou anioniques à la formation de rouille verte carbonatée issue de la bioréduction de lépidocrocite par Shewanella putrefaciens

concentration named “LC”), or to produce GR1 (i.e. with a high cell concentration, named “HC”). Each operational condition was tested with various concentrations of the two polymers (from 0.6 to 60 mg g⁻¹ Fe). The final product was characterized by X-ray diffraction and electron microscopy and compared with abiotic formation of either GR or magnetite from co-precipitation experiments of Fe^{II} and Fe^{III}. The results stress that organic polymers influence the route of GR formation preferably to magnetite, but can also strongly prevent further transformation of GR1.

I. MATERIALS AND METHODS

1. LEPIDOCROCITE STOCKS AND SYNTHESIS

Lepidocrocite (γ -FeOOH) was prepared by aerobic oxidation of FeCl₂ in sodium hydroxide solution as previously described (Zegeye et al. 2005). The mineral suspension was washed three times with pure water (MilliQ+/Helix 40, Millipore, Billerica, MA, USA) to remove excess salt and was treated by ultra-sonication. The mean specific surface area was measured by N₂ adsorption (BET treatment of the adsorption data) at 77 K, with a 24 h out-gassing under a pressure of 5×10^{-2} Pa at 353 K.

Pools of γ -FeOOH were numbered from #1 to #7 (**Table 5**) and were analyzed by XRD. The suspensions of γ -FeOOH always exhibited d-values consistent with the literature data (e.g. SI-1), and they were free of crystallographic impurities at a level discernible by XRD. The observations by TEM and SEM revealed acicular crystals of 20 nm width and 100 nm length associated together within aggregates of 5 to 10 crystals each (SI-1). The specific surface area by BET analysis yielded a surface area of about 52 ± 5 m² g⁻¹.

2. PREPARATION OF THE RESTING CELL SUSPENSION

Shewanella putrefaciens CIP 8040^T (=ATCC 8071), the reference strain, was revived from a -80 °C frozen stock and cultured as previously indicated (Zegeye *et al.* 2005). Briefly, cells were grown aerobically to a stationary growth phase (24 h) in tryptic soy broth (TSB, 51019, BioMérieux®, Marcy l'Etoile, France), harvested by centrifugation, washed twice with sterile 0.7% NaCl and concentrated in 40 mL of TSB medium. Cells were purged with N₂ (Alphagaz 1, Air Liquide) before use in the different batches run for bioreduction at a defined cell density. For each batch run, two cell concentrations were defined, i.e. a “lower” cell concentration ($\leq 2.2 \times 10^9$ cells mL⁻¹) and a “higher” cell concentration ($\geq 2.5 \times 10^9$ cells mL⁻¹). As in the study by Zegeye *et al.* (2010), this range of concentration is referred to as LC or HC respectively hereafter (**Table 5**). For each set of experiments the HC level was at least 4 times higher than the LC level.

3. ORGANIC POLYMERS

Stock solutions of 2 g L⁻¹ polyacrylic acid (PAA) (C₃H₄O₂)_n (Mw 2,000 g mol⁻¹, Aldrich, 323667) and polyacrylamide (PAM) (C₃H₅NO)_n (Mw 600,000 – 1,000,000 g mol⁻¹, Polysciences Inc., 19901) were prepared in the basal medium (see below).

4. BIOREDUCTION MEDIUM

A series of bioreduction assays containing 300 mM of γ -FeOOH (lepidocrocite) suspension as the final electron acceptor were prepared in a basal medium. The basal medium consisted of (purity grade for analysis): 22 mM NH₄Cl, 1.5 mM NaCl, 1.2 mM KCl, 1.1 mM MgSO₄•7H₂O, 0.67 mM CaCl₂, 0.27 mM MnSO₄•H₂O, 86 μ M ZnCl₂, 38 μ M CoSO₄•7 H₂O, 32 μ M FeSO₄•7H₂O, 9.3 μ M Na₂MoO₄•2H₂O, 9.1 μ M NiCl₂•6H₂O, 6.8 μ M Na₂WO₄•2H₂O, 3.6 μ M CuSO₄•5 H₂O, 1.9 μ M AlK(SO₄)₂•12 H₂O, 1.5 μ M H₃BO₃. The mineral suspension was heat sterilized, purged with filter-sterilized N₂ (100%), and dispensed into sterile 100 mL flasks with butyl rubber stoppers, and then crimp sealed. When specified, PAA or PAM were added to the medium in the 10 – 1000 mg L⁻¹ concentration range which corresponds to 0.6 – 60 mg of polymers g⁻¹ Fe given with the concentration of FeOOH (300 mmol L⁻¹). Solutions of sodium methanoate (160 M HCOONa, final concentration) as the electron donor, and sodium anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS 100 μ M, final concentration) as electron shuttle [previously sterilized by filtration (filter pore size 0.2 μ m) and purged with filter-sterilized N₂ (99.99%)] were introduced into the culture medium under aseptic conditions. The pH, measured after all components were mixed, was between 6.8 and 7.2. When specified, AQDS was omitted.

5. INCUBATION FOR THE BIOTIC SYNTHESIS OF THE GR1(CO₃²⁻)

A given volume of *S. putrefaciens* stock suspension was added to the medium to obtain LC or HC concentrations for each run. The bioreduction experiments were incubated at 30°C in darkness and the microbial reduction of γ -FeOOH was monitored for 30 to 95 days. A cell-free control was included in each set of experiments. During the incubation period, aliquots were sequentially removed from the medium to determine

the total Fe(II) concentration (solid and aqueous Fe²⁺). Solid phase analyses were performed at the end of the experiment (in the general case after 3 weeks of incubation time).

6. INCUBATION FOR THE ABIOTIC SYNTHESIS OF THE GR1(CO₃²⁻)

The chemical synthesis of the GR1(CO₃²⁻) was performed according to the method described by Bocher *et al.* (2004). Briefly, a solution of FeSO₄•7H₂O and Fe₂SO₄•5H₂O (0.267 and 0.133 mol L⁻¹, respectively) was mixed with NaOH 0.8 mol L⁻¹ with Na₂CO₃ 0.466 mol L⁻¹ in anoxic chamber with a defined ratio of carbonate and sulfate to avoid the formation of GR2(SO₄²⁻). A dark-green precipitate formed that was identified as GR1(CO₃²⁻) by X-ray diffraction. Phosphate (4 mmol L⁻¹, Na₂HPO₄•7H₂O) or, when specified, other compounds (PAA, PAM or heat-inactivated cells), were added to stabilize the GR.

7. PHYSIC AND CHEMICAL ANALYSIS

a. Fe^{II} analysis and reduction rate.

To quantify lepidocrocite reduction, samples were analyzed for Fe(II) concentration (1 M HCl-extractable) in an anoxic chamber (N₂/H₂, 98/2) (Coy Laboratory Product Inc., Grass Lake, MI, USA) at selected time points using the modified 1,10-phenanthroline method (Fadrus and Maly 1975). Since the dissolution of magnetite is slow under such conditions in comparison to that of lepidocrocite or to GR, the Fe(II) measurements were performed after 1 week of incubation time at ambient temperature in the dark. The initial rate of reduction was computed from the first derivative of a nonlinear curve fit for Fe(II) *versus* time data to the following equation: Fe(II)_t = Fe(II)_{max} [1 - e^(-k_{obs}t)], where Fe(II)_t is the concentration of total Fe(II) produced at time t, Fe(II)_{max} is the maximum Fe(II) concentration observed at the end of the reduction period, and k_{obs} is the pseudo-first order constant.

b. Granulometric analysis.

The particle size distribution was measured using a Malvern Mastersizer particle sizer in the 0.5 – 180 μm size range. The results are volume based and are represented as particle volume versus sphere diameter of equivalent particle volume. The median diameter d_{50} (i.e. 50% of particles are smaller than d_{50}) was used to represent the size distribution.

c. Electrokinetic Measurements.

The electrophoretic mobility of particles was measured using a Zetaphorometre IV (SEPHY-CAD Instrumentations, France). This apparatus is equipped with a quartz suprasil cell in which a constant field is generated by two palladium coated electrodes. The suspended particles are illuminated by laser reflection, and their motion is recorded via an optical microscope mounted with a CCD camera. The recorded images are then processed (Zetaphorometer 4.30 CAD Instrumentation) to calculate the mobility from the displacement of particles subject to a constant direct current electric field (800 V/m). All particle suspensions were first diluted in 0.1 M NaCl solution. When specified, sodium-formate solution was added (0.15 M).

d. X-ray Diffraction (XRD), transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM).

The mineral was retrieved by filtration through a 0.45 μm membrane in the anaerobic chamber. The wet paste was then spread out on a glass plate and coated with glycerol to prevent oxidation. The XRD data were collected with a D8 Bruker diffractometer equipped with a position-sensitive detector. The X-ray source was a Co anode ($\lambda = 0.17902$ nm). The diffractograms were recorded in the 3 – 64° 2θ range, with a 0.0359° step size and a collecting time of 3 seconds per point. One drop of the suspension was placed on an amorphous carbon-coated grid and the sample was loaded into the microscope (Philips CM20/STEM) for TEM examination, or one drop of the

Contribution de polymères neutres ou anioniques à la formation de rouille verte carbonatée issue de la bioréduction de lépidocrocite par Shewanella putrefaciens

sample was sprinkled onto 2 cm² plates for SEM examination (Hitachi S-4800 FEG Scanning Electron Microscopy).

II. RESULTS

1. PHYSICAL INTERACTIONS OF CELLS AND POLYMERS WITH THE γ -FeOOH

In order to examine the effect of polymers on the colloidal stability of the γ -FeOOH suspensions, the particle size distributions were measured before and after addition of various polymer concentrations (**Figure 29**). Since the particle size distributions are monomodal, the median diameter d_{50} can be used as a proxy to assess the variation of the iron oxide particle size. The averaged d_{50} from all lepidocrocite suspensions used in the bioreduction medium (BM), gave a mean value of $2.6 \pm 1.2 \mu\text{m}$ ($n=14$). All experiments were conducted in duplicate and numbered from #1 to #14.

a. Effect of polyacrylic acid (PAA).

The addition of PAA, an anionic polymer at neutral pH, increased the d_{50} from $\sim +20\%$ up to $\sim +50\%$ with 2.4 to 6 mg g^{-1} Fe respectively (**#1 - #3, Figure 29**). With higher concentrations, the increase of the d_{50} was less and less significant (**#4 - #8, Figure 29**) and became negative ($\sim -30\%$) with 60 mg g^{-1} Fe of PAA indicating a stabilization of the lepidocrocite suspension. This was supported by flocculation tests where the optimum dose of PAA was also found around 6 mg g^{-1} Fe (**SI-3**). Indeed, the electrophoretic mobility measurements of γ -FeOOH at neutral pH did not drastically change up to 6 mg g^{-1} Fe of PAA. For 30 and 60 mg g^{-1} Fe, the mobility increased in magnitude indicating a surface charge becoming more and more negative (**Figure 30**). This clearly indicates that the γ -FeOOH particle surfaces become saturated with the sorbed PAA when the polymer concentration was greater than 6 mg g^{-1} Fe, which is consistent with the observed re-stabilization effect.

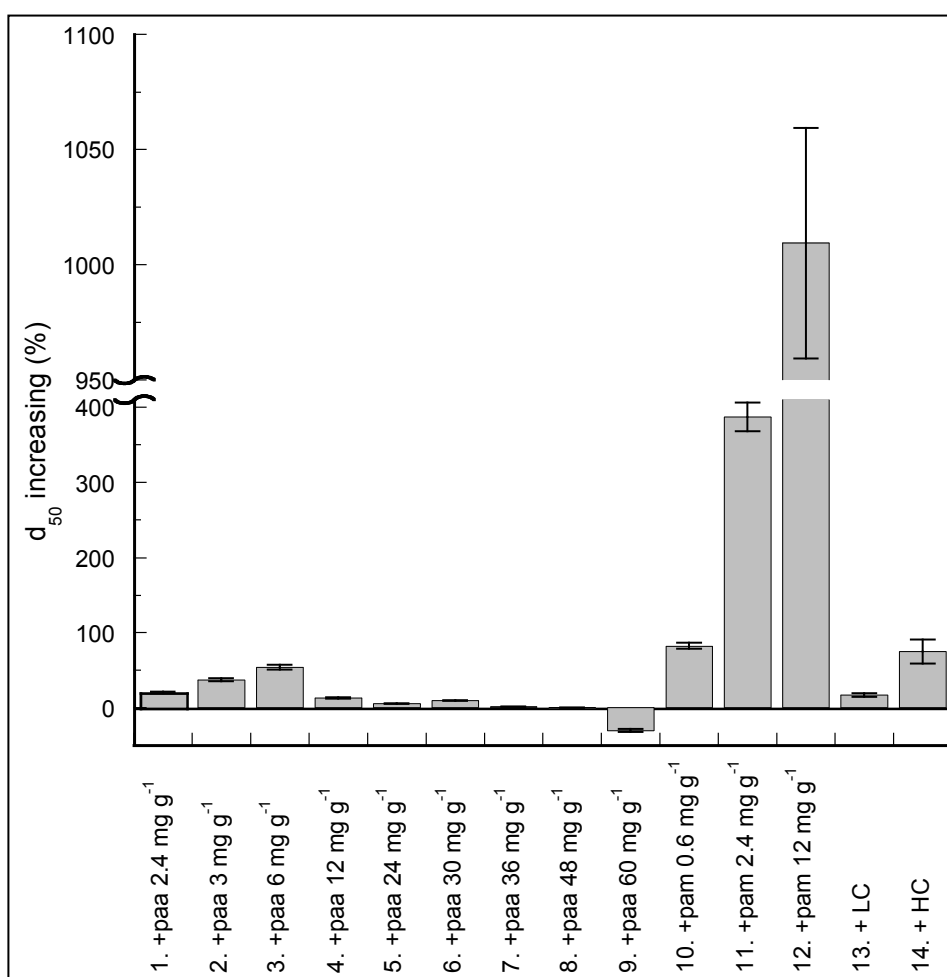


Figure 29 : Increase of the mean equivalent diameter (d_{50}) of the lepidocrocite suspension in the bioreduction medium after addition of several doses (mg g^{-1} of equivalent Fe) of polyacrylic acid (PAA), polyacrylamide (PAM) or cells at low (LC) or high (HC) density. The results are expressed as a function of the initial d_{50} (control before addition of the solute or cells)

b. Effect of polyacrylamide (PAM).

The addition of PAM, a non ionic polymer, affected d_{50} to a much larger extent than PAA. Thus, with only 0.6 mg g^{-1} Fe, the d_{50} increased twofold and by a factor of 4 and of 10 with 2.4 and 12 mg g^{-1} Fe, respectively (**Figure 29 1, #10 - #12**). Nevertheless, the electrophoretic mobility seems to be unaffected by PAM addition in the low concentration range ($\leq 2.4 \text{ mg g}^{-1}$ Fe) (**Figure 30**), thus suggesting that the polymer is adsorbed in a flat conformation at the solid/solution interface. However, at higher PAM concentration (15 mg g^{-1} Fe), the electrophoretic mobility decreased, which is in accordance with a reconfiguration of the sorbed polymer to a train and loop/tail

structure that displaces the shear plane during electrophoretic mobility measurements. Such behavior is consistent with the conformational properties adopted by a neutral polymer at the solid/liquid interface (Napper, 1983).

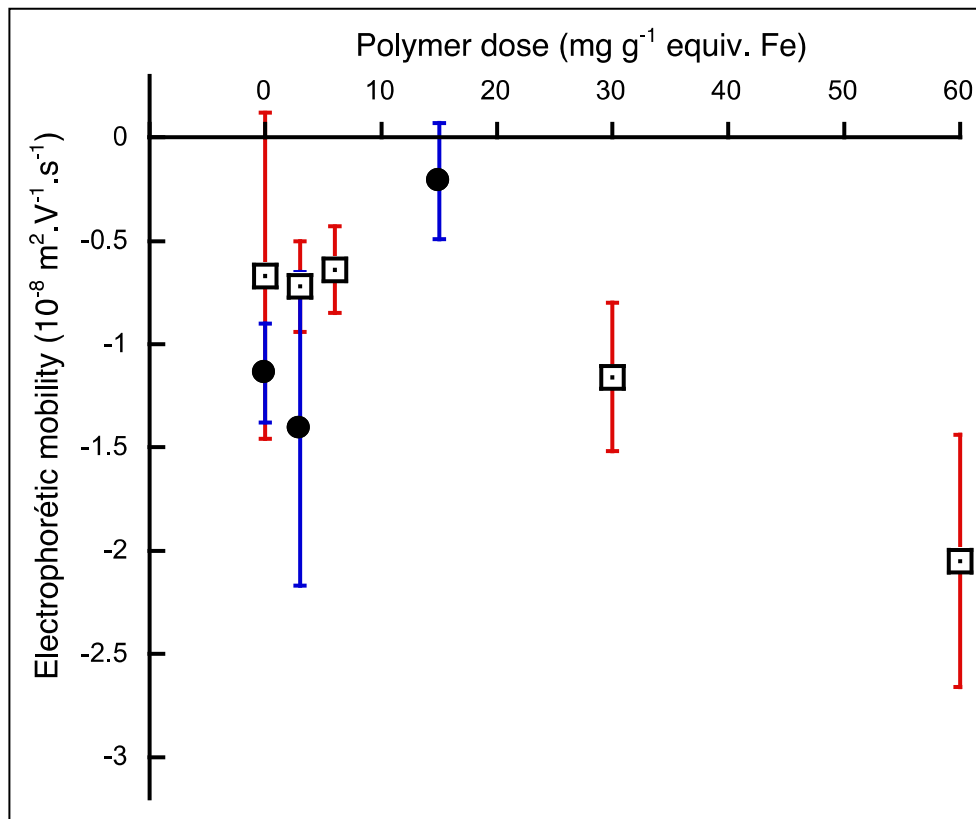


Figure 30 : Electrophoretic mobility as a function of polymer dose at pH 7, for PAA (open square) or PAM (closed circles). Vertical bars represent standard deviation calculated based on the trajectory of 50 to 400 particles

c. Effect of the dead cells.

Two ranges of cell densities were tested in this section (1.1×10^9 and 4.5×10^9 cells mL⁻¹ referred to as LC and HC, respectively). Knowing that 27 g L⁻¹ of γ -FeOOH (300 mmol L⁻¹) are mixed with the cells, the average amount of bacteria associated with lepidocrocite varies in the 13-52 mg g⁻¹ Fe range (assuming that the dry weight of one cell is 0.2 pg). The LC density induced an increase of d_{50} of the same extent as that observed with 2.4 mg g⁻¹ Fe of PAA (Figure 29, compare #1 with #13). Whereas the d_{50} increase associated with the HC density is similar to that obtained with 6 mg g⁻¹ Fe of PAA or 0.6 mg g⁻¹ Fe of PAM (Figure 29, compare #3 with #10 and #14). Therefore, the

suspension of dead cells also destabilizes the lepidocrocite suspension similarly to PAA. As the *S. putrefaciens* cell surface bears negative charges at neutral and alkaline pH, its aggregation behavior is comparable with that of PAA rather than that of PAM. However, the hydrophobic surface character and the thick polymeric fringe (~ 60 nm) of the cells (Gaboriaud et al. 2006) should also contribute to the lepidocrocite flocculation (i.e. an increase of d_{50}).

However, these present results cannot be used, *stricto sensu*, to mime the physical behavior of cells since the heat treated cells do not show a similar pattern of electrophoretic mobility to those of untreated cells (more negative surface charge) (data not shown). This suggests that the heat treatment has significantly modified the cell surfaces probably by altering the polysaccharidic fringe arrangement increasing the cells' mobility. As a result, the "behavior" of the heated suspension remains relatively far from that of the untreated cell suspension in terms of surface properties and capacity to aggregate iron oxide particles.

Finally, no significant change of d_{50} was observed when polymers (PAA, 3 – 6 mg g⁻¹ Fe) were added to LC or HC densities (data not shown), suggesting that the effects of cells and polymers, on the flocculation process, are not additive.

2. BIOREDUCTION OF LEPIDOCROCITE

The Fe^{III} bio-reduction rates of lepidocrocite were drastically different between the assays and varied from 0.3 to 68 mmol l⁻¹ h⁻¹ according to the cell density [0.54×10^9 – 8.7×10^9 cells ml⁻¹] independently of the presence of polymers (**Table 5**). In the general case, γ -FeOOH reduction was initiated with a high reduction rate when the secondary mineral was magnetite, or followed by a pseudo-plateau and then a lower rate when the secondary mineral was GR (**Figure 31**). This was already shown in a previous work (Ona-Nguema et al., 2002b) and also reported in further papers (Zegeye et al. 2007; Zegeye et al. 2010; O'Loughlin et al. 2010). However, such pattern was not systematic and in presence of polymers, a profile of bio-reduction can match that of green rust but ultimately yield magnetite (see assay with LC + PAA 3 mg g⁻¹, **Figure 31 a**

and assay with LC + PAM 30 m g⁻¹, **Figure 31 b**). Run to run, there was no evident relationship between the cell densities or the polymer concentrations, with the iron reduction rate. Nevertheless, by considering each run independently, the rate of iron reduction is always lower with the HC density with regard to the LC density (**Table 5**). Overall, in the presence of polymers, the iron reduction rates were significantly affected only with the highest PAA and PAM concentrations (**Table 5**) and a fraction of lepidocrocite remained at the end of the assay with the highest concentration of PAA as indicated by X-ray diffraction patterns and relative intensity of peaks (**Figure 32a**). When γ -FeOOH was replaced by ferric citrate (50 mM), a soluble form of Fe^{III} easily reducible by *S. putrefaciens*, the iron reduction rate is essentially unaffected by the polymers doses (10 - 1000 mg L⁻¹). Thus, only the solid form of Fe^{III} is affected by the presence of polymers (**SI-5**).

**Contribution de polymères neutres ou anioniques à la formation de rouille verte carbonatée issue de la bioréduction de
lépidocrocite par *Shewanella putrefaciens***

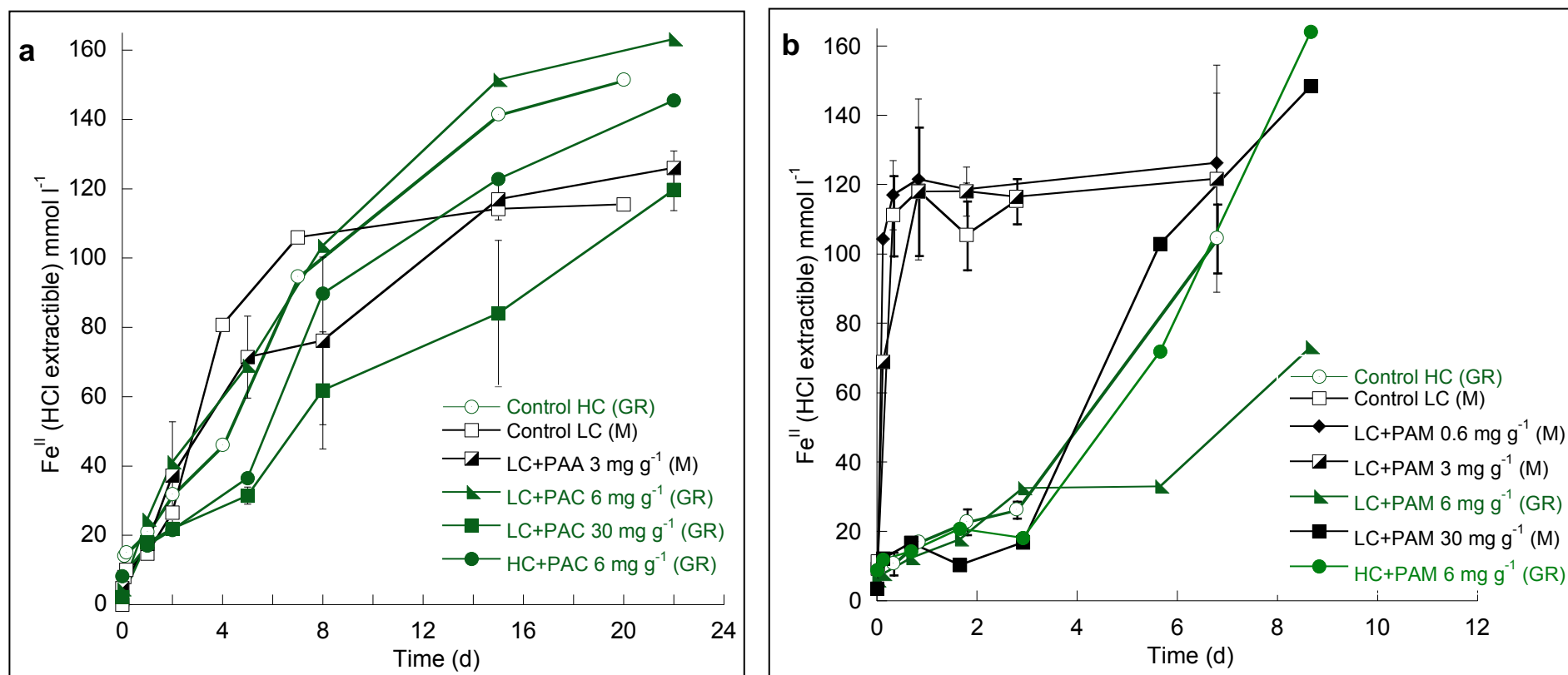


Figure 31 : Lepidocrocite bio-réduction as a function of the incubation time: a) in presence of polyacrylate (PAA); b) in presence of polyacrylamide (PAM). The assays correspond to experiments #1 and #3, respectively. LC stands for “low” cell density and HC for “high” cell density (see Table 5 for values). Control experiments were performed without polymers. Among assays done with HC, only those run with 6 mg g⁻¹ Fe polymers are performed, a similar trend is observed for all the concentrations tested. Lines are a visual aid only. Vertical bars correspond to the error measured on two or three independent incubations. The nature of the main secondary mineral after three weeks of incubation is given in parentheses, M means magnetite, GR1 means green rust. See also Fig. 4 and SI-5.

3. INFLUENCE OF ADDITIVES ON THE SECONDARY IRON MINERAL FORMATION (BIOTIC CONDITIONS)

a. Effect of cell densities and autoclaved cells.

The characterization of minerals was performed by XRD and by TEM during the first week of lepidocrocite reduction and at the end of the run (4 weeks to 6 months). The bioreduction of lepidocrocite with LC density ($\leq 2.2 \times 10^9$ cells ml⁻¹) systematically lead to magnetite as the main secondary mineral whereas GR1 was obtained after 1 week or more of incubation when using HC density ($\geq 2.5 \times 10^9$ cells ml⁻¹) (**Table 5**). The supplementation of a suspension of LC density (viable cells) with heat-killed cells (in order to give a total cell density equivalent to HC), changed the nature of the secondary mineral produced. Thus, GR1 was the only discernable mineral after several weeks or months (**Table 5, #1 & #3**). The iron reduction rate appeared also to be affected and remained rather low with regard to the iron reduction rate with only LC. This confirms previous results obtained with autoclaved cells (Zegeye et al., 2007 & 2010) and bacterial polymers (O'Loughlin et al. 2010). These results suggest that physico-chemical processes rather than bacterial activity influence the routes for secondary mineral GR or magnetite.

In contrast, when LC density was used, only magnetite was precipitated and no discernable GR was identified at any time during the first week of reduction (data not shown).

b. Polyacrylic acid addition.

With HC densities, the addition of PAA did not significantly affect the nature of the secondary mineral (GR1) in the 0.6 - 60 mg g⁻¹ concentration range (**Table 5 and SI-10**). In contrast, with LC densities, PAA had the same effect as autoclaved cells, i.e. GR1 was produced at the expense of magnetite (**Table 5, Figure 32 a**). When 6 mg g⁻¹ Fe of PAA were added to a LC density of 1.1×10^9 cells ml⁻¹, GR1 was produced, but if the same amount of PAA was added to half that cell concentration (0.55×10^9 cells ml⁻¹),

magnetite remained the (bio)mineral formed (**Table 5, see serial #1**). Therefore, PAA strongly promoted the formation of GR1 at the expense of magnetite, but this behavior depends also on cell density. In this assay, the effect of PAA and the amount of cell bodies seems to be additive. A too low amount of cells can then be compensated by a higher PAA dose to lead to the formation of GR.

Moreover, for PAA/LC density assays, GR1 is easily detected during the first week of incubation but then disappeared with respect to magnetite and chukanovite in the following days as illustrated in **Figure 33**. PAA also could slow down the GR transformation into magnetite and chukanovite when the cell density is too low ($< 10^9$ cells ml⁻¹) to promote the stabilization of GR. In addition, with HC density GR is stable for several years, but below this threshold, there is a fuzzy limit where GR is formed but not very stable and can be transformed into magnetite and chukanovite. For instance, for a cell density $\leq 10^9$ cells ml⁻¹, the amount of PAA required to observe GR during the first weeks of bioreduction is greater than 6 mg g⁻¹ Fe (**see #1 & #5, Table 5**), but after several days only magnetite with chukanovite were obtained. For assays #1 and #2, GR remained stable for several years.

c. Polyacrylamide.

As for PAA with HC density, PAM did not change the nature of biomineral generated (**SI-6**). However, in the case of LC density suspensions, the influence of PAM on the biomineral produced is considerably different. Overall, magnetite was obtained with LC density, but for one case, GR was the main secondary mineral with magnetite as a minor phase (discernable by relative intensity of peaks with XRD) (**Figure 32 b**). In that case (**PAM 6 mg g⁻¹ Fe, serial #3, Table 6**), the iron reduction rate was around two orders of magnitude lower than those observed in the other assay of the same PAM serial.

All in all, we observed that PAM contributes to the GR formation but not as strongly as PAA. PAM can also increase the half-life of GR, but does not prevent at all its degradation and the subsequent formation of magnetite and chukanovite.

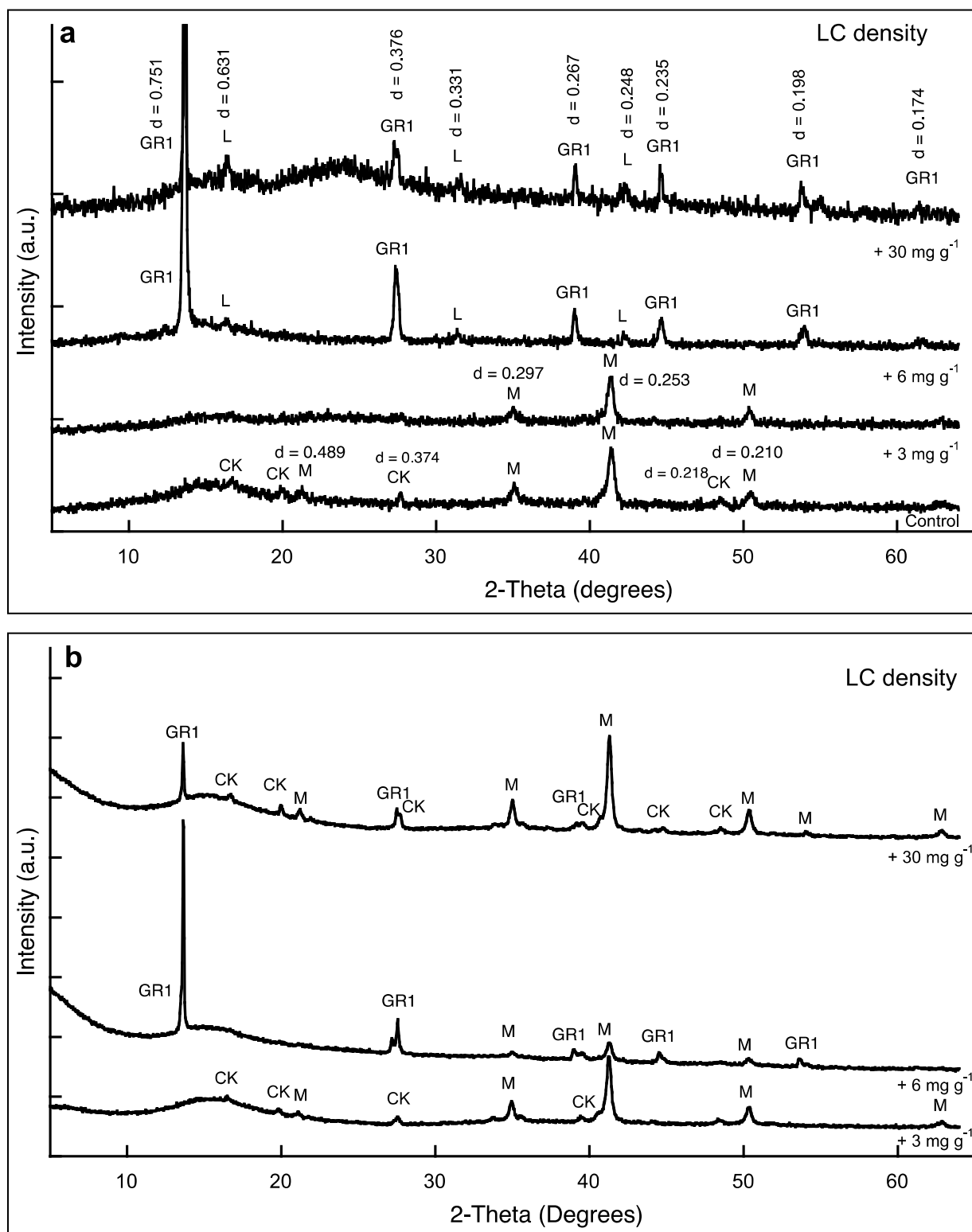


Figure 32 : X-ray diffractograms of the solids after at least 30 days of bioreduction of γ -FeOOH with a low cell density (LC) and 0 to 30 mg g⁻¹ Fe^{III} of polyacrylate (a, serial #1) or polyacrylamide (b, serial #3). The intensity is represented in an arbitrary unit (a.u.). GR1 means green rust 1, L, lepidocrocite, CK chukanovite and M, magnetite. See Table 5 for serial number and LC, HC values

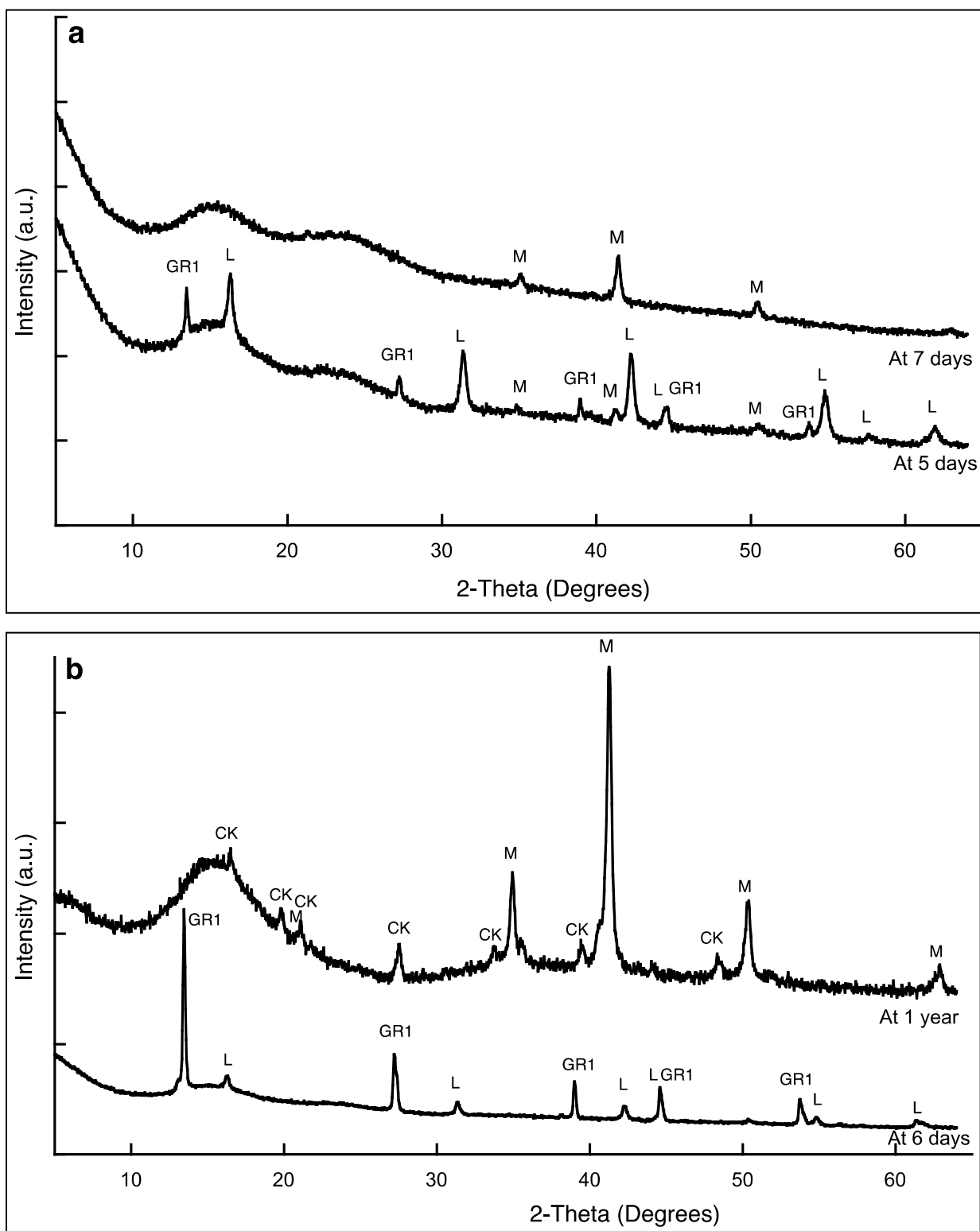


Figure 33 : X-ray diffractograms of the solids from bioreduction of γ -FeOOH in presence of polyacrylic acid $9 \text{ mg g}^{-1} \text{ Fe}$ and LC density: a) serial #5 after 5 days and 7 days of incubation time and, b) serial #6 after 6 days and 1 year of incubation time. The intensity is represented in an arbitrary unit (a.u.). GR1 means green rust 1, L, lepidocrocite, and M, magnetite. See Table 5 for serial number

d. AQDS.

Anthraquinone disulfonate (AQDS) plays the role of an electron shuttle and is frequently used as a model for the quinone moieties in humic substances. It was previously stated that AQDS is not required for GR formation (Parmar et al. 2001; Ona-Nguema et al. 2002b; Zegeye et al. 2007; O'Loughlin et al. 2007), even though, other studies proposed that AQDS mediates such formation (Fredrickson et al., 1998). At 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, AQDS did not indeed influence the nature of the secondary mineral with both LC and HC densities. However, in the presence of PAA, AQDS is required to produce GR as the main secondary mineral. However, with PAM, magnetite is produced independently of the presence of AQDS (**#4 and #6, Table 5**). It was noticed that with PAA the remaining fraction of the lepidocrocite seems to increase (from relative intensity of major peaks by X-ray diffraction) with the amount of polymers. AQDS, in the 100 – 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ concentration range increases the extent of lepidocrocite reduction, in other words, it counterbalances the effect of PAA on the reducible fraction of Fe(III). Therefore, AQDS promoted the GR formation both by increasing the amount of GR formed (i.e. by increasing the extent of lepidocrocite reduction), and by influencing the routes of mineral formation.

e. Crystal morphology.

The crystals of magnetite were always nanosized (**Figure 34 a**) whereas GR1 exhibited large ($\geq 5 \mu\text{m}$) hexagonal crystals (**Figure 34b**) as it is usually the case for biomineralized GR1 (Ona-Nguema et al. 2002a). However, at the highest polymer concentrations (e.g. 60 mg g^{-1} Fe), the individual crystals appeared rounded (**Figure 34 c, d**). O'Loughlin et al. (2007) have also noted some discrepancies between the shape of the GR crystal produced by several strains of *Shewanella* spp. but no particular relationship with any parameters was proposed. More investigations and a statistical analysis are needed to confirm if this observation can really be related to the presence of polymers.

Contribution de polymères neutres ou anioniques à la formation de rouille verte carbonatée issue de la bioréduction de lépidocrocite par Shewanella putrefaciens

SEM observations showed stacking of several crystals in presence of polymers (**Figure 35**). Again, further investigation is needed to indicate whether such stacking is due to the presence of polymers since the approach followed here remains qualitative.

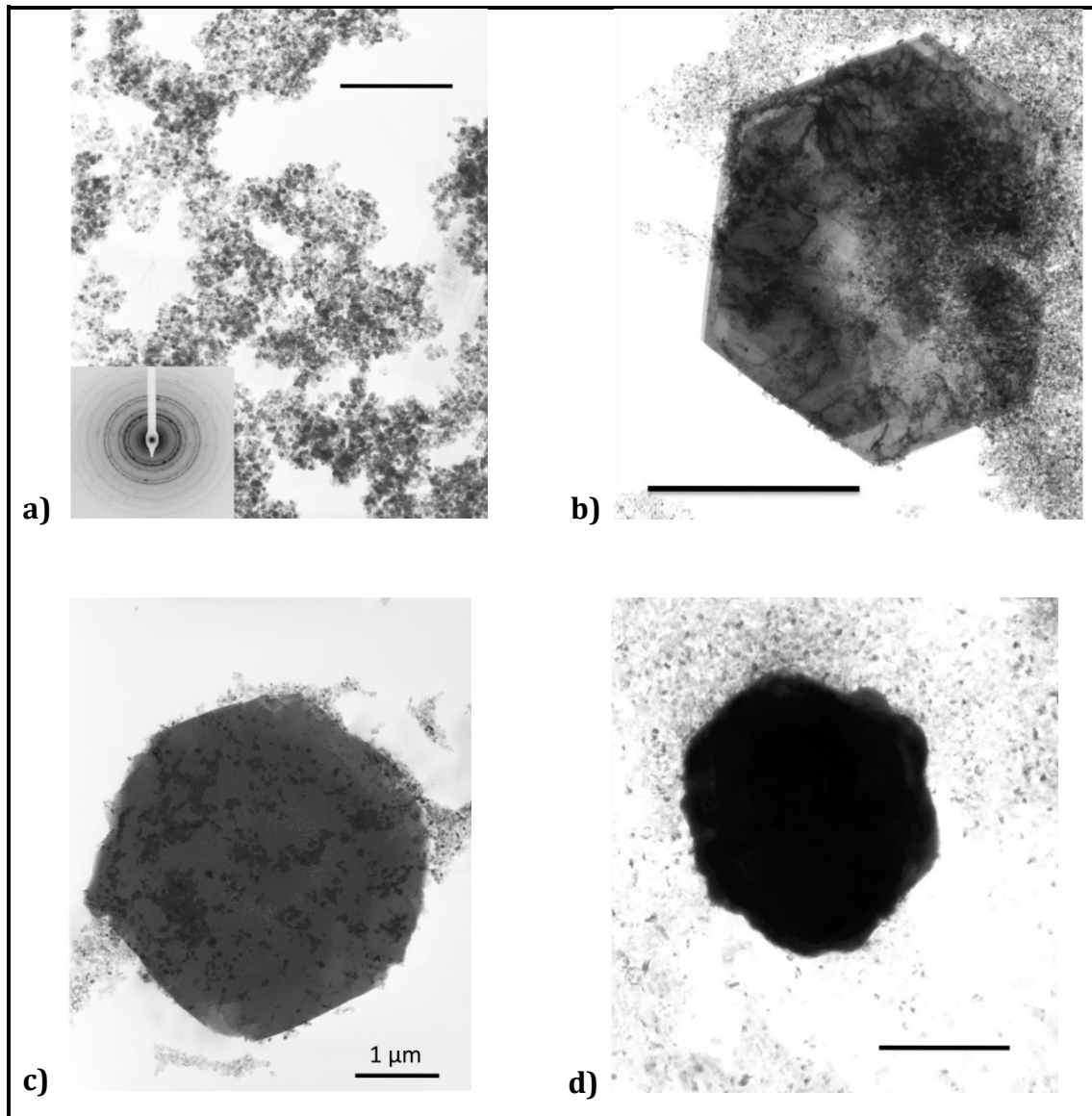


Figure 34 : TEM micrographs from experiment serial #1: a), nano magnetite particles from assay with 3 mg g⁻¹ Fe PAA, LC density, bar = 0.5 μm); b), green rust crystal from assay with 6 mg g⁻¹ Fe PAA, LC density, bar = 4 μm, the granular phase corresponds to γ-FeOOH; c), green rust crystal from assay with 30 mg g⁻¹ poly(ac), LC density, bar = 1 μm; d), green rust crystal from assay with 30 mg g⁻¹ Fe PAA, HC density, bar = 1 μm. All observations were made after at least 30 days of incubation time

Contribution de polymères neutres ou anioniques à la formation de rouille verte carbonatée issue de la bioréduction de l'épidocrocite par Shewanella putrefaciens

Interestingly, GR crystals were embedded within a material constituted by Fe, O and Na. The presence of C atoms was not investigated successfully by EDX since the grid bearing the sample was carbon coated. Therefore, we could not confirm that such material was constituted by the polymer (PAA, presently on the picture, **Figure 35**) but other studies have confirmed the recovering of the GR crystals by a bacterial polymeric matter (Zegeye, et al., to be submitted).

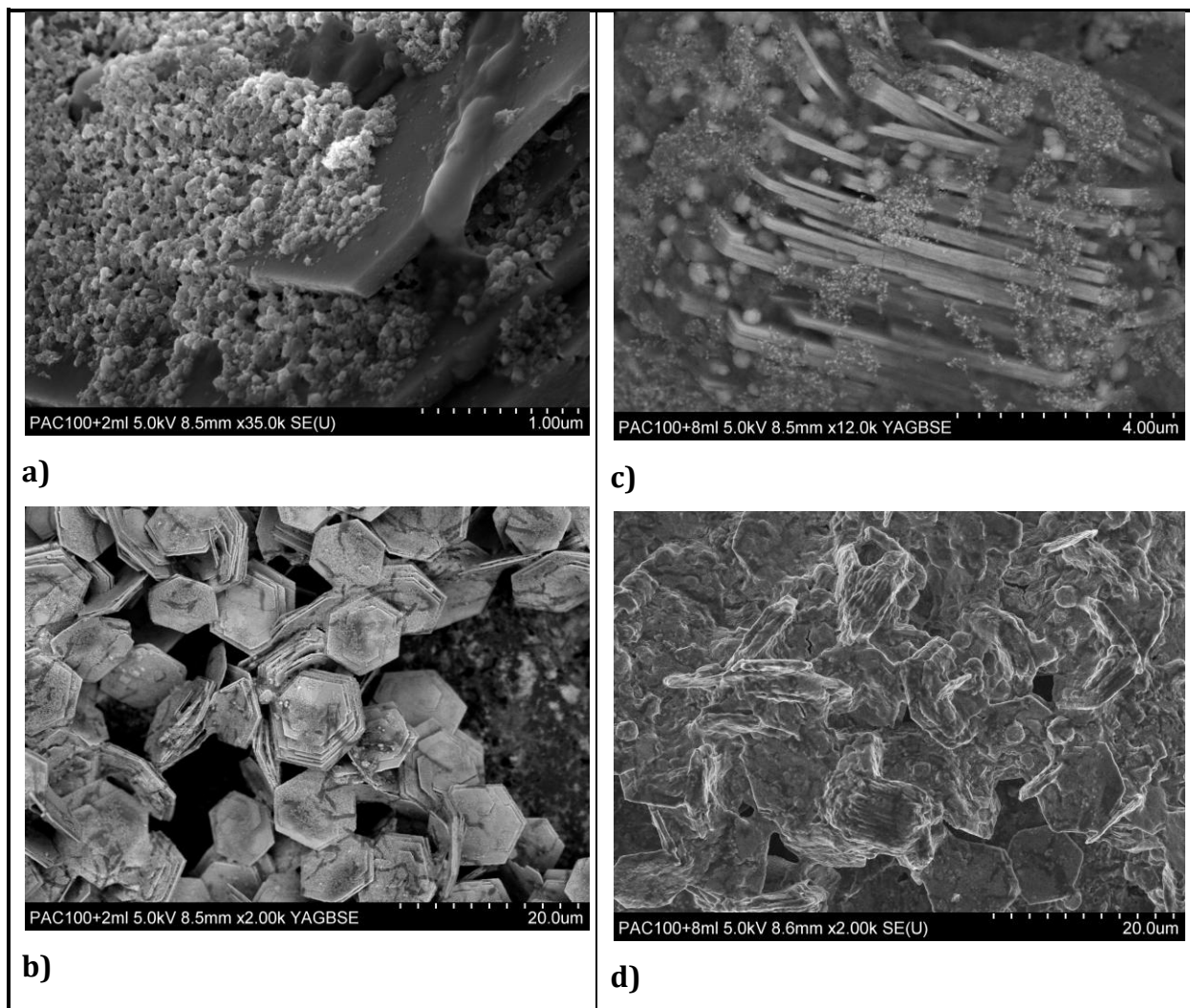


Figure 35 : SEM picture of GR crystals from assays with 6 mg g⁻¹ poly(ac) and LC density (a, b) and HC density (c, d). Oxygen atoms constituted the granular phase, Fe, and Na (~ 51, 42, 5.5 % atom), C atoms are also present.

4. INFLUENCE OF ADDITIVES IN ABIOTIC CONDITIONS

In order to examine whether the polymer could also influence the routes of the abiotic formation of GR and magnetite, the chemical synthesis of these compounds was performed in presence of various polymer doses (**Table 6**). GR1(CO₃²⁻) is obtained by co-precipitation of Fe^{II} and Fe^{III} salts when phosphate is present (25 mM), whereas magnetite is obtained in a non-supplemented medium (**Table 6**). A high density (HC) of heat-killed cells, or a high concentration of PAA (> 60 mg g⁻¹ Fe) exhibited the same effect and yielded GR1 (**Table 6**). A lower amount of either cells or PAA/PAM, were associated with a mix of magnetite and GR or magnetite as the main secondary iron minerals (**Table 6**). However, the lifetime of these GRs is significantly lower (a few days) than that of GR produced by biological activity probably because of the presence of additional polymers from the cells. These results substantiate the hypothesis that phosphate, polymers or cells bodies (or silicate and quartz particles, Sergent et al. 2011), act on the stability of GR crystals and that GRs should be a precursor of magnetite.

III. DISCUSSION

1. SURFACE INTERACTION OF PAA AND PAM WITH IRON OXIDE

The bacterial cells and PAA are negatively charged and they neutralize the positive surface of the iron oxide particles, thus triggering the flocculation of particles and biocolloids, whereas PAM essentially proceeds by bridging the particles together (Napper, 1983). In the first case (PAA), the polymers can increase the size of the heterogeneous aggregates of iron oxide and bacteria particles under non-turbulent regime by charge neutralization, but looks tenuous under turbulence as indicated for instance by laser particle sizing and settling volume measurements, respectively. In the second case (PAM) the aggregates looks larger by particle size analysis but no settlement was observed after 2 h. Therefore, the two polymers affect the colloidal stability of the iron oxide particles in two different ways.

Since iron reduction requires an access to the surface sites of the iron oxide, one could expect that sorption of negatively charged polymers or oxyanions will affect this process. At high dosage ($\geq 6 \text{ mg g}^{-1} \text{ Fe}$) the PAA seems to affect the extent of the iron reduction but it was not the case with the PAM. That suggests that the access of the oxide surface for the cells is partially prevented only by the PAA. Such observations are consistent with previous studies using quartz sand or dissolved silica to promote the formation of GR (Kukkadapu et al. 2004; Sergent et al., 2011).

Particle aggregation, such as induced by PAA, may change the fraction of the total area that is physically accessible to bacteria. Any electron shuttles, such as AQDS, would then diffuse and react with some or all of these surfaces not readily available to the bacteria. Indeed, the increase of AQDS concentration (from 100, 250 and up to 500 μM), led to the decrease of the relative intensity of lepidocrocite peaks (data not shown), thus suggesting that the Fe^{III} sites hidden by the PAA are partially accessed by the AQDS.

Regarding the GR biomineralization, the present data confirm that AQDS (100 μM) does not affect the formation of the secondary iron mineral with LC or HC densities (Ona-

Contribution de polymères neutres ou anioniques à la formation de rouille verte carbonatée issue de la bioréduction de lépidocrocite par Shewanella putrefaciens

Nguema et al., 2002a ; Zegeye et al., 2007; O'Loughlin et al., 2010). This was not the case at all in the presence of PAA with a LC density where AQDS was required for the formation of GR. This is consistent with the work of Fredrickson's group (Fredrickson et al. 1998; Kukkadapu et al. 2004) indicating that AQDS promotes GR biomineralization. Their experimental set up was different; they worked with a lower cell density ($\sim 10^8$ cells ml⁻¹) and in the presence of phosphate (at least 1 mM) zwitterionic organic buffer (1,4 piperazinediethansulfonic acid) and lactate as electron donor. Zwitterionic buffers were recently shown to interfere with the surface chemistry of iron oxides (Buchholz et al., 2011) and could then exhibit a complementary effect to that of phosphate. With a high cell density (HC), the AQDS does not show any apparent effect on GR formation. This would signify that the effects of AQDS, polymers, oxyanions, and cells on biomineralization are similar or additional. On the other hand, when lactate was used as electron donor, the resulting acetate (incomplete oxidation by *Shewanella* spp.), could interfere with the iron oxide surface by removing previously sorbed Fe^{II} (Roden and Zachara 1996). *A contrario*, formate is completely oxidized. All of these points may explain some of the discrepancies noted between the results of two different experimental designs, one using PIPES as a buffer, phosphate and lactate (e.g.: Fredrickson et al., 1998 and Kukkadapu et al., 2004), and the other using formate in an unbuffered medium, and a high cell density, with or without AQDS (Ona-Nguema et al. 2002a; Zegeye et al. 2007; O'Loughlin et al. 2010; Zegeye et al. 2010). Therefore, anionic polymers such as PAA, bacterial cell bodies (i.e. not here considered as iron reductants in this case), oxyanions and AQDS are favorable factors for GR formation.

During the bioreduction process, the resulting Fe^{II} is sorbed onto the residual Fe^{III} oxide (Roden and Zachara 1996) that can lead to the formation of magnetite through a solid-state transformation (Tronc *et al.* 1992). The competition of charged polymers (including cells), silica, phosphate and other oxyanions with Fe^{II} for the iron oxide surface sites would then impair magnetite formation and promote the formation of GR. But as for magnetite, the formation of GR is also assumed to occur via a solid-state transformation (e.g. : Kukkadapu *et al.* 2004) suggesting that in the two cases, a ferrous iron saturation of the oxide surface preceded the precipitation of GR or magnetite. The

process by which oxyanions and anionic polymers promote GR at the expense of magnetite remains an open question.

2. THE EFFECT OF AGGREGATION

It was suggested that the compactness of mixed aggregates constituted by cells and iron oxide particles contributes to an increase, within the vicinity of bacterial cells and iron oxide particles, of the concentrations of both carbonate and Fe^{2+} (because of anaerobic respiration). At a micro-scale level, the higher concentrations of those constituents could promote the formation of $\text{GR1}(\text{CO}_3^{2-})$ rather than of magnetite (Fe_3O_4) (Zegeye et al., 2010). It was not established to what extent the phosphate or the other oxyanions affect the aggregation of bacterial cells and iron oxides. But if we take into account the low concentration at which phosphate (from 1 mM) acts on the secondary mineral formation, we have to assume that phosphate and other oxyanions, probably proceed by another mechanism besides flocculation.

Comparing the two polymers, only PAA strongly affects the biomineralization routes. Since the effects of the two polymers used in this study are different, one could expect that the structure of the aggregates formed by negatively charged polymers and bacterial cells is more suitable than PAM for the formation of GR. The effect of PAM is less obvious than that of PAA, since it may promote the formation of GR in some assays, and not in others. This suggests that a subtle balance between polymers, and cell density would be needed to lead to aggregates with a favorable structure to promote GR. Additional research is still needed to assess the effect of oxyanions and polymers on the aggregate structure (3D organization) and its link with the formation pathways of secondary minerals.

3. EFFECT OF POLYMERS AND CELLS ON THE GR STABILITY

GRs are known to be metastable and several factors, other than air oxidation, could trigger their transformation to other phases. During the anaerobic bio-reduction of Fe^{III}_s , a non-stoichiometric electron donor concentration leads to the dissolution-

reprecipitation of GR into magnetite (Ona-Nguema *et al.*, 2002a) according to a solid-state reaction (Tronc *et al.* 1992). The sorption of $\text{Fe}^{2+}_{\text{aq}}$ onto $\text{Fe}^{\text{III}}_{\text{s}}$ leads both to a gradual GR dissolution and magnetite formation. In that case, GR can be considered as a precursor of magnetite (Sumoondour *et al.* 2008). However, it was not clearly established whether the formation of magnetite could also proceed directly without going through a GR “step”, or if a GR or GR-like species forms as a transitional phase, from which the system evolves to GR or magnetite (Kukkadapu *et al.*, 2004). Recently, it was shown that a simulated abiotic reaction between Fe^{II} and lepidocrocite promotes simultaneously the formation of GR and magnetite and a gradual transformation of GR to magnetite (Li *et al.*, 2011). In our study, during the lepidocrocite bioreduction, the color of the mixed suspension (cells and iron oxides) changed to green before ultimately turning black magnetotactic in experiments with LC supplemented by PAA or, to a lesser extent, with PAM. X-ray diffraction has confirmed that the green phase was associated with the presence of a GR1 phase. Our feeling is that the polymer would just induce the formation of GR (or GR-like phase, or “GR precursor”) because of a favorable aggregation, but if its amount is too low, or if the polymer does not interact with the GR crystals (to stabilize it), then the transformation of GR to magnetite occurs, with the polymers at best slowing down the phase transformation. This explains why in some of our samples, the GR produced with LC and PAA appears relatively less stable than those produced with HC only.

In other cases, with LC, the magnetite seems to be directly produced, without an intermediate green color. The formation of magnetite from lepidocrocite bioreduction has been recently monitored *in situ* by Mössbauer spectroscopy and GR was not observed after one day of incubation (Zegeye *et al.*, 2011). Nonetheless, the formation of GR and its subsequent transformation to magnetite can proceed in a shorter time scale (~ 10 h or less, Ona-Nguema *et al.* 2002b).

If we assume that GR is always a precursor of magnetite during iron oxide bioreduction, the factors promoting GR stability should rather be considered as factors suppressing the formation of magnetite. Thus, phosphate has been shown to form a physical barrier preventing the dissolution of the GR crystals (Bocher *et al.* 2004; Refait *et al.* 2006).

Silicate and cells have been suggested to play a similar role (Zegeye et al. 2010; Sergent et al. 2011). This hypothesis is strongly supported by the abiotic synthesis of GR and magnetite by co-precipitation. The effect of cells, PAA and phosphate was examined in those tests, and the results indicate that bacterial cells and the anionic polymer, but not the neutral one (PAM), can stabilize GR and impair the formation of magnetite. In the case of phosphate addition, all of the phosphate becomes incorporated in the ferrous phosphate vivianite (Kukkadapu et al. 2004), thus it was not available to “stabilize” the GR crystals. But the formation of vivianite during the Fe^{III} bioreduction does not occur as soon as the Fe^{II} is formed from the Fe^{III} bioreduction (Jorand et al., 2000). It can be hypothesized that the first mineral formed is GR, then vivianite. The GR would remain stable because Fe^{III}_s is not longer enough to sorb Fe²⁺_{aq} and then lead to the GR dissolution.

4. CONCEPTUAL MODEL FOR GR AND MAGNETITE FORMATION

From the literature data and this present work, a conceptual model can be developed, showing the various routes of magnetite and green rust formation from lepidocrocite respiration by dissimilatory iron reducing bacteria (**Figure 36**). This model should be applicable to most strains of the genus *Shewanella* since the corresponding bacteria are able to respire iron. Differences between strains could be due to their ability to produce EPS or to bear a more or less thick polymer layer (Korenevsky et al. 2002; Gaboriaud et al. 2006). Rapid iron reduction (up to 68 mmol L⁻¹ h⁻¹, Table 5) is, in general, associated with the direct transformation of γ -FeOOH to magnetite, no apparent greenish phase being noted (**Figure 36**, pathway 1). This occurs when no oxyanions are present in substantial amount or with a “low” cell density (LC) and an absence of polymers. The electron shuttle AQDS affects the reduction rate but not the nature of the secondary mineral. The aggregate structure does not allow diffusional constraints to induce relatively high concentrations of carbonate at the micro-scale. For that, a higher cell density or presence of flocculent would be required (**Figure 36**, pathways 2) and a GR precursor could be formed ([GR]). The presence of “stabilizers” of GR crystals, such as oxyanions (e.g.: phosphate or PAA) in too low concentration, would delay the GR1 crystal dissolution and recrystallization to magnetite and chukanovite

Contribution de polymères neutres ou anioniques à la formation de rouille verte carbonatée issue de la bioréduction de lépidocrocite par *Shewanella putrefaciens*

(Figure 36, pathway 3) or would impair its dissolution in presence of AQDS (Figure 36, pathway 4). In that case, such “stabilizers” are also “inhibitors” of magnetite formation. This route is believed to be promoted by AQDS by increasing the amount of Fe^{II} or the crystallinity of the GR in presence of phosphate or PAA. It is not known whether AQDS stabilizes GR or has another effect. Finally, with a high amount of bacterial cells (HC), believed to act both as flocculent and stabilizer, GR is directly formed as the main secondary mineral (Figure 36, pathway 8). In the latter case, AQDS is not required and GR is stable for several years in aqueous and anaerobic solutions.

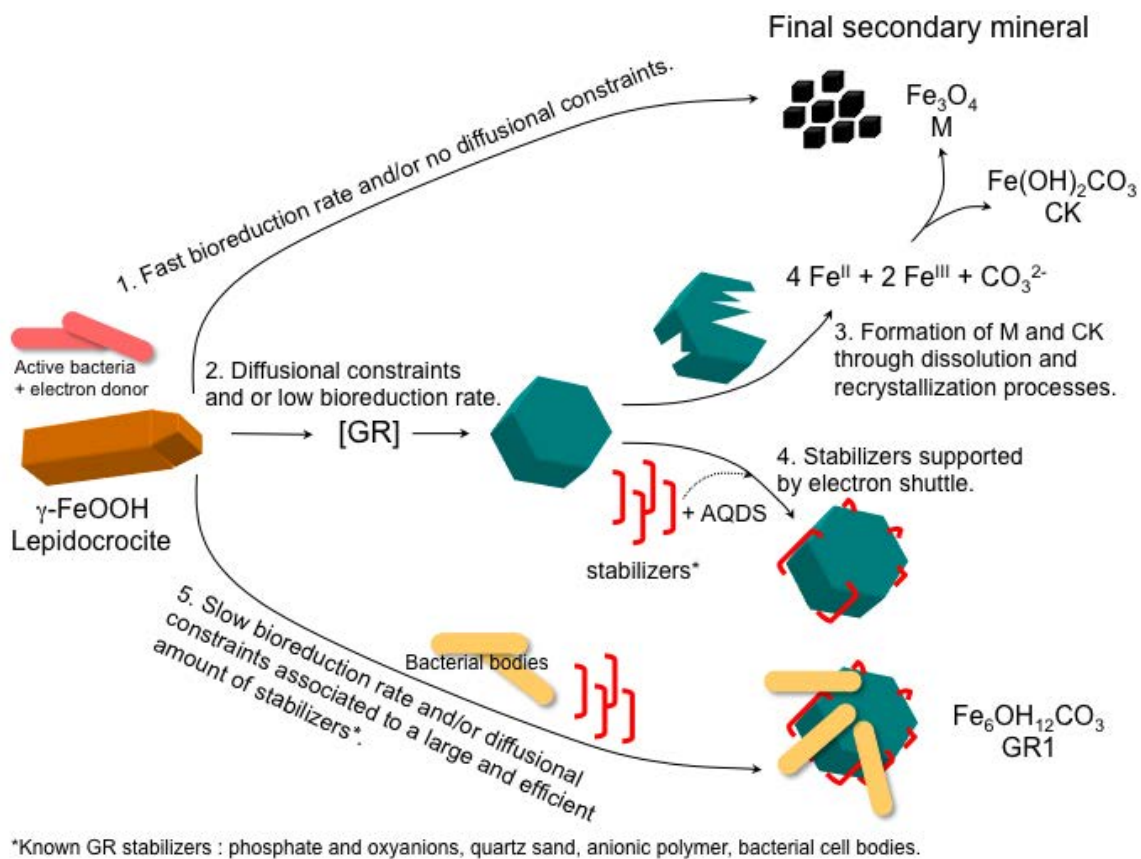


Figure 36 : Conceptual model of magnetite and green rust mineralization from bioreduction of lepidocrocite by dissimilatory iron reducing bacteria (*Shewanella* spp.).

1. Direct transformation in magnetite (M), generally associated to a fast bioreduction rate, and a relatively low cell density assumed to produce open aggregates with low or no diffusional constraints allowing fast diffusion of metabolic products (bicarbonate, Fe^{2+}) away from the aggregates and sorption of Fe^{II} onto iron oxide surfaces. 2. The

aggregate structure is favorable to carbonate green rust (GR) formation due to the cell surface properties (long polymeric fringe, flocculent polymers, etc.) and a GR precursor is formed ([GR]). 3. The “stabilizers” of the GR crystals are present in too low concentration, the GR crystal undergoes dissolution by their lateral faces and subsequent formation of magnetite, the excess of Fe^{II} and carbonate released lead to the formation of chukanovite (CK). 4. This route is believed to be promoted by anthraquinone disulfonate (AQDS) by increasing the amount of Fe^{II} or the crystallinity of the GR in presence of phosphate or polyacrylate. It is unknown if AQDS stabilize GR or if it has another effect. 5. This route is observed mainly with a relatively high amount of bacterial cells, shown to represent both a very efficient flocculent and stabilizer. In this case, the AQDS is not required and the GR is stable several years in anaerobic aqueous solution. The known stabilizers are phosphate and other oxyanions (H₄SiO₄, etc), quartz sand, anionic polymers, cells material (cell bodies and EPS).

IV. CONCLUSION AND ENVIRONMENTAL IMPLICATIONS

The role of bacteria in the formation of secondary Fe^{II}-bearing minerals is not just limited to the production of Fe(II) by anaerobic respiration. As regards to their capacity to form heterogeneous aggregates of cells and iron oxides, and/or to produce EPS with different properties, they could indirectly induce the formation of specific minerals such as GR or magnetite. Further work is needed to examine whether the effect of PAA on GR formation proceed by modifying the solution composition within the vicinity of bacterial cells and iron oxide, or only by stabilizing the GR crystal. The fact remains that cell densities, EPS, and other materials, [such as those found in natural biofilms (Jorand et al., 2011) and in soil (quartz sand)] promote the formation of GR at the expense of magnetite. This could explain the occurrence of fougérite in natural environments, a mineral related to GR, and believed to be a product of iron reducing bacteria (Berthelin *et al.*, 2006).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Sandrine Mathieu for help with SEM analyses, Guirec Olivier for XRD analyses, Angelina Razafitianamaharavo for BET analyses, Céline Caillet and Yves Waldvogel for particle size and electrophoretic mobility analyses, respectively. We are also grateful to Florian Landry and Fatima Boutaraa, two graduate students, for their technical help. Anne-Sophie Sergent benefited from a PhD grant by the French ministry of research.

Contribution de polymères neutres ou anioniques à la formation de rouille verte carbonatée issue de la bioréduction de lépidocrocite par Shewanella putrefaciens

Table 5 : Reduction rate and secondary minerals obtained from biomineralization experiments. LC = low cell density, HC = high cell density, PAA = polyacrylic acid, PAM = polyacrylamide, M = magnetite, GR = green rust, CK = chukanovite. (\pm M), means that magnetite was evidenced by the magnetic tip test but not by XRD; from relative intensity of the major peak, (+M), means that the mineral is considered to be a minor phase and “GR + M”, means that the minerals were considered in the same proportion. All assays were done with 100 μ M AQDS except when it was otherwise indicated. Control means experiments performed without addition of any polymers or autoclaved cells.

# seria l	Cell density $\times 10^9$ cells ml ⁻¹	Polymer dose (mg g ⁻¹ Fe ^{III})	Reduction Rate (mmol Fe ^{II} L ⁻¹ h ⁻¹)	Secondary minerals	Replicates
#1	0.55 \pm 0.01 (½LC)	+ PAA 6 mg g ⁻¹	ND	With transitory phase : M+CK	n=1
		Control	1.2 \pm 0.2	M	n=2
	1.1 \pm 0.3 (LC)	+ PAA 3 mg g ⁻¹	0.7 \pm 0.2	M	n=2
		+ PAA 6 mg g ⁻¹	0.7 \pm 0.1	GR	n=3
		+ PAA 30 mg g ⁻¹	0.3 \pm 0.3	GR	n=2
		+ autoclaved cells ^a	ND	GR	n=1
	4.5 \pm 0.1 (HC)	Control	0.6 \pm 0.1	GR	n=2
		+ PAA 3 mg g ⁻¹	0.5 \pm 0.1	GR	n=2
		+ PAA 6 mg g ⁻¹	0.5 \pm 0.3	GR	n=1
		+ PAA 30 mg g ⁻¹	0.3 \pm 0.4	GR	n=2
#2	2.2 \pm 0.3 (LC)	Control	5 \pm 2	M	n=2
		+ PAA 3 mg g ⁻¹	2.0 \pm 0.6	M	n=3
		+ PAA 6 mg g ⁻¹	0.5 \pm 0.1	GR	n=3
	8.7 \pm 0.1 (HC)	Control	0.6 \pm 0.5	GR	n=2
		+ PAA 3 mg g ⁻¹	0.7 \pm 0.2	GR	n=3
		+ PAA 6 mg g ⁻¹	0.5 \pm 0.1	GR	n=3
#3	0.54 \pm 0.01 (LC)	Control	42 \pm 15	M	n=2
		+ PAM 0.6 mg g ⁻¹	68 \pm 19	M	n=2
		+ PAM 3 mg g ⁻¹	39 \pm 3	M	n=2
		+ PAM 6 mg g ⁻¹	0.6 \pm 0.3	GR (+M)	n=1
		+ PAM 30 mg g ⁻¹	5.22 \pm 0.04	M (+GR+CK)	n=1
		+ autoclaved cells ^a	1.1 \pm 0.6	GR	n=1
	2.5 \pm 0.4 (HC)	Control	1.5 \pm 0.2	GR	n=2
		+ PAM 0.6 mg g ⁻¹	1.3 \pm 0.4	GR	n=2
		+ PAM 3 mg g ⁻¹	0.7 \pm 0.1	GR	n=2
		+ PAM 6 mg g ⁻¹	0.6 \pm 0.5	GR	n=1
		+ PAM 30 mg g ⁻¹	0.5 \pm 0.2	GR	n=1

Contribution de polymères neutres ou anioniques à la formation de rouille verte carbonatée issue de la bioréduction de lépidocrocite par Shewanella putrefaciens

#4	1.6 ± 0.1 (LC)	+ PAA 9 mg g ⁻¹	ND	GR	n=2
		+ PAA 9 mg g ⁻¹ no AQDS	ND	M	n=2
#5	0.95 ± 0.02 (LC)	Control	ND	M	n=1
		+ PAA 9 mg g ⁻¹	ND	GR then M ^b	n=2
		+ PAA 9 mg g ⁻¹ no AQDS	ND	M (+ GR)	n=1
		+ PAM 9 mg g ⁻¹	ND	M (+CK)	n=1
		+ PAM 9 mg g ⁻¹ no AQDS	ND	M	n=1
		Control	ND	GR	n=1
4.7 ± 0.1 (HC)	+ PAA 9 mg g ⁻¹	ND	GR	n=1	
	+ PAM 9 mg g ⁻¹	ND	GR	n=1	
	Control	2.23	M		
#6	0.8 ± 0.1 (LC) ^c	Control no AQDS	0.19	M	n=1
		+ PAA 3 mg g ⁻¹	1.23	M	n=1
		+ PAA 3 mg g ⁻¹ no AQDS	0.18	M	n=1
		+ PAA 30 mg g ⁻¹	0.38	GR then M like after 2 months	n=1
		+ PAA 30 mg g ⁻¹ no AQDS	0.85	M	n=1
		+ PAM 0.6 mg g ⁻¹	1.05	M+CK	n=1
		+PAM 0.6 mg g ⁻¹ no AQDS	0.13	M	n=1
		+ PAM 30 mg g ⁻¹	1.19	M (+CK)	n=1
		+ PAM 30 mg g ⁻¹ no AQDS	0.24	M (+GR?)	n=1
		4.4±0.4 (HC)	+ PAA 15 mg g ⁻¹	ND	GR
+ PAM 15 mg g ⁻¹	ND		M+GR	n=1	
#7	1.6 ± 0.2 (LC)	Control	ND	M	n=1
		+ PAA 3 mg g ⁻¹	ND	GR ^d	n=1
		+ PAA 9 mg g ⁻¹	ND	GR ^d	n=1
	7.8 ± 1.0 (HC)	Control	ND	GR	n=2

^aHC equivalent.

^bAfter 4 d the XRD indicated a dominance of GR1 as regards to peaks of magnetite.

^cData with "HC" (8×10⁹ cells mL⁻¹) are not presented here, the mineral produced was GR in all cases, with or without 100 μmol L⁻¹ AQDS.

^dEven after 7 months the XRD analysis still indicated GR1 as the sole secondary mineral (detectable according to the XRD).

(Table 5, continued)

Contribution de polymères neutres ou anioniques à la formation de rouille verte carbonatée issue de la bioréduction de lépidocrocite par Shewanella putrefaciens

Table 6 : Abiotic mineralization of M or GR at 30°C from co-precipitation of Fe^{II} and Fe^{III} salts, NaOH and Na₂CO₃ in presence of PO₄³⁻, polyacrylic acid (PAA), polyacrylamide (PAM) or a heat-killed cell suspension at “LC” or “HC” density. M = magnetite, GR = green rust. Each experiment was reproduced 3 to 10 times. The solids were characterized by XRD after 2 or 3 days.

Supplement to mineral mix	Amount	Minerals
Not supplemented	/	M
PO ₄ ³⁻	25 mmol l ⁻¹	GR
Killed cells	HC ^a	GR
Killed cells	LC ^b	GR + M
Killed cells + PO ₄ ³⁻	LC ^a + 25 mmol l ⁻¹	GR
PAA (mg g ⁻¹ Fe)	90 or 120	GR
PAA (mg g ⁻¹ Fe)	4.5, 15, 30 or 60	GR + M
PAM mg g ⁻¹ Fe	4.5, 15, 30, 60, 90 or 120	M (± GR traces)

^a7.75 ± 0.2 × 10⁹ cells mL⁻¹ ; ^b1.55 ± 0.2 × 10⁹ cells mL⁻¹

**CHAPITRE II : ETUDE DE LA REACTIVITE DE LA
ROUILLE VERTE CARBONATEE SYNTHETISEE PAR
VOIE MICROBIENNE ET PAR VOIE CHIMIQUE VIS-A-
VIS D'UN POLLUANT ORGANIQUE ET D'UN
POLLUANT METALLIQUE.**

CHAPITRE II : ETUDE DE LA REACTIVITE DE LA ROUILLE VERTE CARBONATEE SYNTHETISEE PAR VOIE MICROBIENNE ET PAR VOIE CHIMIQUE VIS-A-VIS D'UN POLLUANT ORGANIQUE ET D'UN POLLUANT METALLIQUE.

Cette étude a pour objectif d'évaluer et de comparer la capacité des rouilles vertes carbonatées biologiques et chimiques à réduire deux polluants modèles, l'un organique, le rouge de méthyle, le second inorganique, le mercure Hg (II). Ce travail a été réalisé avec Alice Hazotte et Paul-Philippe Rémy respectivement en stage de Master I Géosciences et de Master II Microbiologie.

La capacité réductrice des rouilles vertes synthétisées par voie chimique vis-à-vis de polluants organiques et inorganiques est déjà documentée (Erbs et al., 1999; O'Loughlin et al., 2003a; O'Loughlin et al., 2003b; Elsner et al., 2004; O'Loughlin et Burris, 2004), par contre la réactivité des rouilles vertes synthétisées par voie microbienne, et en présence de silicates ou de polymères est, à notre connaissance non renseignée. Nous avons choisi de travailler sur cette problématique. Nous avons vu dans le chapitre précédent que les silicates et les polymères favorisaient la formation de rouille verte comme minéral secondaire de la bioréduction de la lépidocrocite (γ -FeOOH). La présence de ces composés susceptibles de stabiliser la structure de la rouille verte (oxyanions et polymères) pourrait affecter la réactivité de cette rouille verte. C'est pourquoi, afin d'apprécier l'effet de ces composés, nous avons comparé la réactivité vis-à-vis du rouge de méthyle ou du mercure, des rouilles vertes chimiques et biologiques synthétisées ou non en présence de polymères et de silicates.

Nous avons conscience que ce travail reste exploratoire et que les hypothèses qu'il soulève devront être validées. Dans notre démarche expérimentale nous nous sommes intéressés principalement à la disparition du Hg de la phase eau et non à sa spéciation. Ainsi, il convenait de vérifier que la disparition de Hg²⁺ était bien due à sa réduction en Hg⁰ et non pas à d'autres mécanismes tels qu'une sorption sur le matériel (verrerie) ou encore qu'il ne restait pas de phase élémentaire piégée avec les oxydes de fer. De même,

Etude de la réactivité des rouilles vertes carbonatées vis-à-vis d'un polluant organique et d'un polluant métallique

pour le rouge de méthyle, il était nécessaire de s'assurer que la rupture de la liaison -N=N- était bien la cause de la chute d'absorbance à 430 nm. Ces aspects ont été depuis la fin de mon travail de thèse, vérifiés par P.-Ph. Remy qui poursuit cette étude au cours de son doctorat, et qui a confirmé les principaux points de ce travail, à savoir que la rouille verte biologique présentait une réactivité au moins équivalente à celle de la rouille verte "chimique".

Etude de la réactivité des rouilles vertes carbonatées vis-à-vis d'un polluant organique et d'un polluant métallique

I. INTRODUCTION

Rouge de méthyle. C'est un colorant présent sous forme de poudre cristalline rouge foncé dont la formule est $C_{15}H_{15}N_3O_2$ (acide diméthylamino-4 phénylazo-2 benzoïque) (**Figure 37**). C'est un indicateur de pH, il est rouge aux pH inférieurs à 4,4 ; jaune aux pH supérieurs à 6,2 et orange entre les deux avec un pKa de 5,1. Le rouge de méthyle appartient à la famille des « azo dyes » (colorants azotés). Les colorants azotés sont caractérisés par la présence d'un ou plusieurs groupes fonctionnels (-N=N-) et sont très largement utilisés dans les industries textiles, de papiers, de nourritures et de cosmétiques. Du fait de leur solubilité dans l'eau corporelle et surtout de leur risque cancérigène, les azo dyes doivent être dégradés. Ce sont des composés xénobiotiques, récalcitrants aux processus de biodégradation de par leur structure complexe (Stolz, 2001; Khalid et al., 2008). Ces colorants se retrouvent dans les eaux souterraines et les rivières qu'ils contaminent (Khalid et al., 2008).

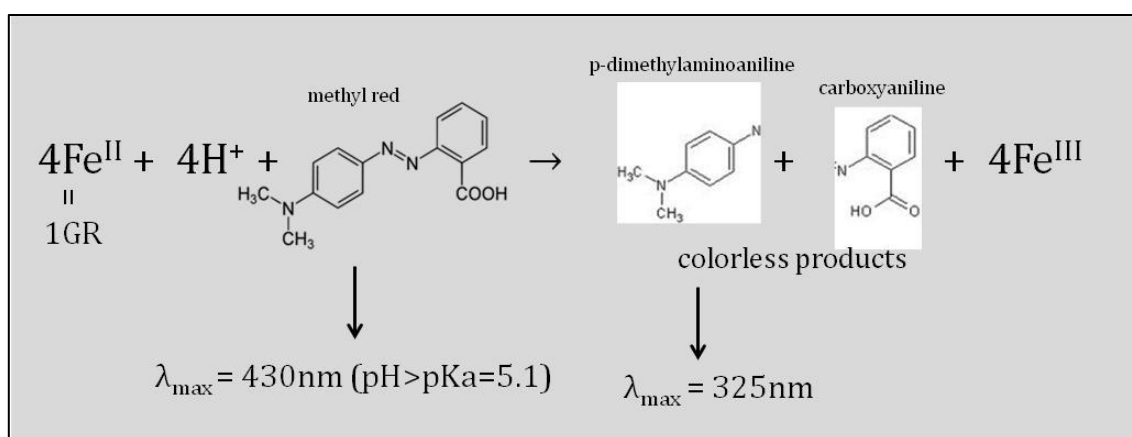


Figure 37 : Schéma de dégradation du rouge de méthyle (Remy et al., 2012)

Il a été démontré que les azo dyes peuvent aussi être dégradés par une enzyme peroxydase bactérienne en conditions anaérobies (Stolz, 2001). Des bactéries anaérobies ou encore anaérobies facultatives clivent le pont azoté des colorants. Des amines aromatiques incolores résultent du clivage des ponts azotés des colorants (Khalid et al., 2008) et sont assimilables par des bactéries aérobies. Le rouge de méthyle est facilement détecté à une longueur d'onde de 525 nm lorsque le pH est inférieur à 5,1 et à 430 nm à pH supérieur à 5,1. La réduction du rouge de méthyle par le Fe(0) ou le

Etude de la réactivité des rouilles vertes carbonatées vis-à-vis d'un polluant organique et d'un polluant métallique

Fe(II) conduit à la formation des métabolites (p-diméthylaminoaniline et carboxyaniline) absorbants uniquement dans l'UV et donc incolores (**Figure 37**) (Kone et al., 2009). Le rouge de méthyle est alors un polluant modèle intéressant dans notre cas tant d'un point de vue fondamental que pratique.

Mercure. De symbole Hg, le mercure est un métal argenté brillant qui a pour caractéristique d'être gazeux sous sa forme élémentaire dans les conditions normales de température et de pression. C'est un puissant neurotoxique sous ses formes organométalliques : monométhylmercure et diméthylmercure (Kritee et al., 2007). La toxicité du mercure dépend notamment de son degré d'oxydation. A l'état de valence 0, il est peu soluble et présentant un léger effet nocif pour la santé. Au degré d'oxydation +II, il est particulièrement toxique notamment sous forme de méthylmercure (CH_3Hg^+). Le mercure est un métal présent naturellement dans l'environnement sous forme élémentaire dans l'atmosphère, sous forme de sels ou complexé aux composés organiques ou sous forme de minéral (HgS, cinabre). Il est utilisé dans des produits ménagers, tels que les baromètres, les thermomètres et les ampoules des lampes fluorescentes. Il pénètre naturellement dans les cycles biogéochimiques lors d'éruptions volcaniques, de l'érosion naturelle, par le vent ou l'eau, de roches et du sol contenant du mercure et se retrouve dans les eaux de surfaces et l'atmosphère. Mais la plupart du mercure est rejeté par l'activité humaine dans l'air lors de la combustion de combustibles fossiles, de l'exploitation minière, de la fonderie ou de la combustion des déchets solides. Certaines applications rejettent du mercure directement dans le sol ou l'eau comme l'application de fertilisants agricoles ou les rejets d'eaux usées industrielles. L'ensemble du mercure rejeté dans l'environnement se retrouve finalement dans les sols et les eaux de surface par les interactions dynamiques entre les différents compartiments de l'environnement. Le devenir du Hg(II) dans le sol ou les eaux, est influencé par des réactions de complexation et d'oxydoréduction (Gabriel et Williamson, 2004).

Des travaux ont montré que la rouille verte sulfatée issue d'une synthèse chimique pouvait réduire le mercure Hg(II) en mercure élémentaire gazeux Hg(0) (O'Loughlin et al., 2003b) mais aucune donnée ne concerne la rouille verte carbonatée, la forme la plus

Etude de la réactivité des rouilles vertes carbonatées vis-à-vis d'un polluant organique et d'un polluant métallique

proche de la fougérite mais aussi celle qui est produite par l'activité bactérienne et susceptible d'être utilisée dans des applications industrielles de dépollution. Il est donc intéressant d'évaluer la réactivité de cette rouille verte biologique et de la comparer à celle de la même rouille verte chimique vis-à-vis du mercure Hg(II).

Etude de la réactivité des rouilles vertes carbonatées vis-à-vis d'un polluant organique et d'un polluant métallique

II. MATERIEL ET METHODES

1. SYNTHÈSE DES ROUILLES VERTES CARBONATÉES

Les rouilles vertes utilisées sont d'origine chimique et biologique, c'est-à-dire qu'elles ont été obtenues soit au cours de la bioréduction de la lépidocrocite γ -FeOOH par une concentration bactérienne « HC » (5×10^9 cellules mL^{-1}) ou plus basse dite « LC » (1×10^8 cellules mL^{-1}) de *Shewanella putrefaciens*, soit purement par voie chimique (coprécipitation de Fe(II) et de Fe(III)), en présence ou non d'un agent stabilisateur (polymères bactériens ou silicates). Les rouilles vertes ont ensuite été centrifugées puis séchées.

2. PRÉPARATION DE LA SOLUTION DE ROUGE DE METHYLE ET DOSAGE

Une solution de rouge de méthyle ($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$) est préparée en ajoutant 2 L d'eau à 30,5 mg de rouge de méthyle (Kuhlmann, Paris). La dissolution se fait sous agitation magnétique à température ambiante. Le pH est ajusté à 9 par l'ajout de NaOH ou d'HCl. Après 48 h, la solution est filtrée pour éliminer le rouge de méthyle non dissout et le pH est de nouveau ajusté à $6,9 \pm 0,1$ avant d'effectuer une mesure colorimétrique à 430 nm afin d'apprécier la concentration effective en rouge de méthyle. C'est à cette longueur d'onde ($\lambda = 430$ nm) que le pic du rouge méthyle est observé. La concentration est calculée d'après l'équation suivante issue de la loi de Beer-Lambert :

$$C = A_{430} \times 0,0315.$$

Où A_{430} est l'absorbance à 430 nm, C la concentration en rouge de méthyle (en mol L^{-1}), 0,0315 correspond à l/ϵ où ϵ est le coefficient d'extinction molaire du rouge de méthyle ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$), l la longueur du trajet optique (1 cm). Les concentrations de rouge de méthyle ainsi obtenues varient de 20 à 40 μM . Ensuite, une droite d'étalonnage a été effectuée sur une large gamme de concentrations.

Etude de la réactivité des rouilles vertes carbonatées vis-à-vis d'un polluant organique et d'un polluant métallique

3. INCUBATION DU ROUGE DE METHYLE AVEC LES ROUILLES VERTES

L'étude de la réduction du rouge de méthyle par les rouilles vertes est réalisée dans des flacons de 200 mL. Une solution aqueuse de rouge de méthyle (10 μM) est placée en condition anaérobie (chambre anaérobie Coy, $\text{N}_2:\text{H}_2$, 98:2) avec 100 mg \pm 1 mg de rouille verte. Les flacons sont constamment agités (table d'agitation magnétique, 500 rpm). Le pH est ajusté à $6,9 \pm 0,1$ dans chacun des flacons. La réaction est déclenchée par l'addition de la solution de rouge de méthyle dans les flacons contenant la rouille verte sous forme de poudre. L'analyse colorimétrique par spectrométrie (spectrophotomètre Helios E UNICAM) à $\lambda = 430$ nm permet de suivre l'évolution de la concentration en rouge de méthyle. La réaction est suivie pendant 10 h au cours desquelles sont réalisés des prélèvements réguliers. Chaque prélèvement de 2 mL est filtré au travers d'une membrane de 0,22 μm de porosité puis analysé au spectromètre.

Rouilles vertes testées. Les différentes rouilles vertes qui ont été testées sont : (1) RV a + Si, une rouille verte synthétisée par voie chimique avec 4 mM de silice sous forme d'acide silicique (H_4SiO_4); (2) RV a + HC; une rouille verte synthétisée par voie chimique avec une concentration « HC » de bactéries; (3) RV b HC, une rouille verte synthétisée par voie microbienne avec une concentration « HC » de bactéries; (4) RV b LC + Si, une rouille verte synthétisée par voie microbienne avec une concentration « LC » de bactéries complémentée de 4 mM de silicates.

Témoins. Plusieurs contrôles (« flacons témoins ») ont été réalisés : (1) un témoin noté « HC », a pour but d'appréhender l'effet des bactéries accompagnant la rouille verte biologique. Pour cela, la quantité de bactéries présentes dans 100 mg de rouille verte biotique a été estimée ($\sim 3,3 \times 10^9$ bactéries dans l'hypothèse où toutes les bactéries sont sorbées sur la rouille verte). Les bactéries ont été préalablement séchées dans les mêmes conditions que les essais avec la rouille verte biologique. (2) Un témoin « LC » où la quantité de bactéries est de l'ordre de 10^8 cellules mL^{-1} . Les bactéries ont également été séchées dans les mêmes conditions que la rouille verte biologique. (3) Un témoin Fe(II) 0,2 mM afin de déterminer si le Fe(II) soluble est capable de réduire le rouge de méthyle. (4) Un témoin « blanc » est réalisé pour s'assurer que la disparition du rouge de

Etude de la réactivité des rouilles vertes carbonatées vis-à-vis d'un polluant organique et d'un polluant métallique

méthyle dans les conditions de l'expérience n'est pas due à d'autres phénomènes (photolyse, hydrolyse, etc.). La solution de rouge de méthyle seule est suivie sans ajout de rouille verte ni de fer ni de cellules bactériennes, toutes choses étant égales par ailleurs.

4. PREPARATION DE LA SOLUTION DE MERCURE ET DOSAGE

Une solution de 10 mM de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ est préparée dans 100 mL de HNO_3 (65%). À partir de cette solution, une gamme étalon est réalisée. L'élément à doser étant présent en solution avec du Fe(II) soluble (le fer désorbé de la rouille verte), chaque étalon est ensuite complété avec une solution de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à 200 μM . Cette gamme étalon est analysée par ICP-AES (ULTIMA de JOBIN YVON Emission Hariba Group). Afin de calibrer l'appareil, 25 mL de chaque étalon sont prélevés automatiquement et une courbe étalon est directement obtenue indiquant l'intensité des pics spectrométriques en fonction de la concentration en mercure.

5. INCUBATION DU MERCURE AVEC LES ROUILLES VERTES

Six flacons de bioréduction sont préparés en atmosphère anaérobie et fermés hermétiquement avant d'être placés sous une hotte. (1) Un essai avec de la rouille verte chimique à une concentration de 0,8 mM stabilisée par une concentration « HC » de bactéries « RV a 0,8 mM » ; (2) un essai avec de la rouille verte chimique à une concentration de 0,4 mM stabilisée par une concentration « HC » de bactéries « RV a 0,4 mM » ; (3) un essai avec 0,8 mM de rouille verte biologique synthétisée avec une concentration « HC » de bactéries « RV b 0,8 mM » ; (4) un essai 0,4 mM de rouille verte biologique synthétisée avec une concentration « HC » de bactéries « RV b 0,4 mM ». Les deux derniers sont des témoins, (5) Fe (II) soluble 0,2 mM à pH acide (2-3) pour éviter la formation de précipité du Fe et (6) « blanc » avec seulement du rouge de méthyle dans de l'eau pure.

Un millilitre d'une solution d' $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (10 mM) est introduit dans un flacon contenant 99 mL d'une suspension de rouille verte ou d'une solution de FeSO_4 ou d' H_2O

Etude de la réactivité des rouilles vertes carbonatées vis-à-vis d'un polluant organique et d'un polluant métallique

et fermé par un bouchon butyle sous atmosphère anaérobie. La solution est aussitôt agitée et dégazée continuellement par de l'azote gazeux (99,99%) pour aider le mercure élémentaire gazeux à s'évaporer (Estrade et al., 2011). Un jeu d'aiguilles, l'une plongeant dans la solution et l'autre affleurant le liquide, traverse le bouchon, ce qui permet d'une part d'effectuer des prélèvements et, d'autre part, de faire barboter en continu l'azote gazeux tout en respectant l'anaérobie. Après 2 minutes, 5 mL de la solution sont prélevés, filtrés (0,22 μm) et ajoutés à 5 mL d' HNO_3 (65%) pour stopper la réaction. Cette étape est répétée après 4, 6, 8 et 10 minutes d'inoculation. Après avoir répété ces étapes pour les six flacons de 100 mL, la quantité de mercure est mesurée pour les 30 prélèvements par ICP-AES.

III. RESULTATS

1. SUIVI DE LA REDUCTION DU ROUGE DE METHYLE

Notons que la contribution de l'adsorption à l'élimination de rouge de méthyle en présence de rouille verte a été évaluée grâce à des analyses chimiques et spectroscopiques dans une étude antérieure (Kone et al., 2009). Toutes ces analyses ont confirmé le rôle mineur de l'adsorption, et ont révélé que les rouilles vertes ne sont pas des bons adsorbants pour les composés azotés.

Témoins. La concentration en rouge de méthyle au cours du temps (10 h) ne varie pas de manière significative pour les essais « blanc », « HC » et « LC » (**Figure 38**). Les conditions dans lesquelles nous travaillons (lumière, température, atmosphère, etc.) n'induisent pas indirectement une réduction du rouge de méthyle. D'autre part, les bactéries dans les conditions où nous les avons cultivées puis préparées ne sont pas capables de réduire le rouge de méthyle et ne participent donc pas à sa disparition. Cependant, en présence de 0,2 mM de Fe, la concentration en rouge de méthyle diminue de 20 % en 7 h (**Figure 38**). Le Fe (II) soluble réduit le rouge de méthyle mais reste relativement peu efficace.

Rouilles vertes. Rappelons que la rouille verte carbonatée formée chimiquement nécessite d'être stabilisée par des silicates, des phosphates, une forte concentration bactérienne « HC » ou un polymère anionique, sinon celle-ci se transforme en magnétite. Par conséquent, une suspension de rouille verte chimique n'est jamais « pure ». C'est pourquoi des essais ont été réalisés afin de voir si ces agents stabilisants diminuent la réactivité de la rouille verte. Au bout de 3 h, le rouge de méthyle a complètement disparu en présence de rouille verte chimique stabilisée par 4 mM de silicates, celle-ci a réduit intégralement le polluant. Par contre, la rouille verte chimique stabilisée par des polymères bactériens ne réduit que très peu le rouge de méthyle (20 % en 8 h). La rouille verte biologique synthétisée à partir d'une faible concentration en bactéries « LC » supplémentée de silicates (4 mM) comme agents stabilisants réduit efficacement le rouge de méthyle (de 100 % en 5 h). Si nous comparons la rouille verte biologique

**Etude de la réactivité des rouilles vertes carbonatées vis-à-vis d'un polluant
organique et d'un polluant métallique**

avec « LC + Si » et la rouille verte biologique avec « HC », il n'y a pas de différence significative sur la disparition du rouge de méthyle qu'elles réduisent toutes deux à 100 % au bout de 5 h. Les polymères et les silicates dans le cas de la rouille verte biologique n'interfèrent pas sur la réactivité de celle-ci vis-à-vis du polluant organique.

Tableau 7 : Valeurs de k_{obs} (équations de premier ordre) obtenues à partir des cinétiques de réduction du rouge méthyle dans différentes conditions.

Essais	k_{obs} (min^{-1})	R^2
RV b LC + Si	0,0153	0,990
RV a + Si	0,0125	0,957
HC	0,0006	0,981
Fe 0,2 mM	0,0056	0,951
LC	0,0005	0,858
Blanc	/	/
RV a + HC	0,0006	0,966
RV b HC	0,006 \pm 0,004 (n = 3)	0,925

La vitesse de disparition du rouge de méthyle est légèrement supérieure en présence de rouille verte biologique « LC + Si » ($k_{obs} = 0,0153 \text{ min}^{-1}$) qu'en présence de rouille verte chimique + Si ($k_{obs} = 0,0125 \text{ min}^{-1}$) (**Tableau 7**).

La rouille verte chimique peut être stabilisée à l'aide d'une forte concentration en bactérie « HC ». Sa réactivité est comparée à la réactivité de la rouille verte biologique « HC ». La vitesse de réduction du rouge de méthyle est plus élevée avec la rouille verte biologique « HC » ($k_{obs} = 0,006 \text{ min}^{-1}$) qu'avec la rouille verte chimique stabilisée par « HC » ($k_{obs} = 0,0006 \text{ min}^{-1}$) (**Tableau 7**). Une autre expérience a été réalisée en présence d'une rouille verte biologique stabilisée par une forte concentration en bactéries « HC » ($8 \times 10^9 \text{ cellules mL}^{-1}$). Cette rouille verte est moins efficace que celle stabilisée par des silicates. Les silicates seraient alors de meilleurs agents stabilisants dans le sens où ils n'affecteraient pas, ou peu, la réactivité de la rouille verte.

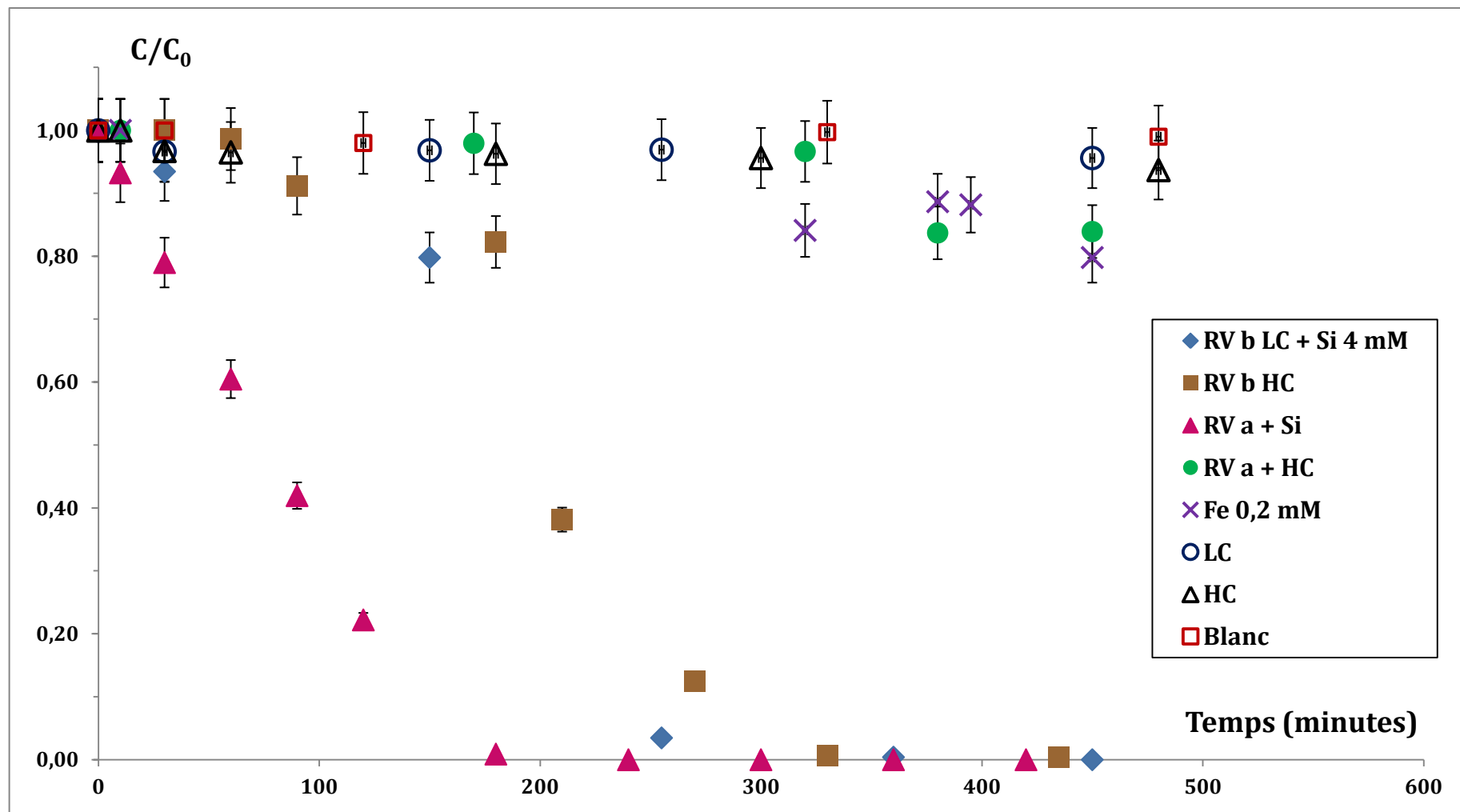


Figure 38 : Concentration relative en rouge de méthyle en fonction du temps en présence de RV b + Si 4 mM, RV b HC, RV a + Si, RV a + HC, Fe 0,2 mM, LC, HC et blanc : pH = 6,9 ± 0,1. T = 30 °C. [MR] ~ 10 μM

2. SUIVI DE LA BIOREDUCTION DU MERCURE

La réduction du mercure Hg(II) conduit à la formation de mercure élémentaire Hg(0) volatil. Sous cette forme et grâce à l'agitation mécanique et au barbotage d'azote, il s'évapore et n'est en principe plus présent dans l'échantillon. Dans cette condition, la quantité de mercure analysée par l'ICP-AES correspond donc à la concentration en mercure non réduit.

Le témoin « blanc » (**Figure 39**) ne présente aucune réduction significative du mercure Hg(II). Les conditions dans lesquelles nous travaillons n'induisent pas de réduction indirecte du mercure Hg(II). Les résultats (**Figure 39**) montrent une diminution générale de la concentration en mercure Hg(II) au cours du temps lorsque celui-ci est en présence de rouille verte. Quelque soit le type de rouille verte et sa concentration, en 10 min, la concentration mesurée sur la concentration initiale (C/C_0) en mercure Hg(II) passe de 1 à 0. Ceci montre la capacité de la rouille verte à réduire le mercure. Cette réduction est possible aussi bien par la rouille verte synthétisée par voie biotique que par celle synthétisée par voie chimique.

En présence de Fe(II) soluble, il n'y a pas de diminution significative de la concentration en Hg(II). La concentration en mercure en présence de Fe(II) reste constante au cours du temps (**Figure 39**). La concentration en Fe(II), qui est équivalente à celle en équilibre avec la rouille verte, ne permet pas la réduction du mercure. Donc toute diminution est bien due à la rouille verte ou au fer total de la rouille verte sachant qu'une concentration de 0,2 mM ne suffit pas à réduire ce polluant.

Si nous nous intéressons aux cinétiques de réduction (**Tableau 8**), il n'y a pas de différence significative entre le k_{obs} de la rouille verte chimique à 0,8 mM ($k_{obs} = 0,572$) et celui à 0,4 mM ($k_{obs} = 0,582$). La vitesse de disparition du mercure semble plus rapide ($1,125 \text{ min}^{-1}$) en présence de 0,8 mM de rouille verte biologique ($k_{obs} = 1,125$) qu'en présence de 0,4 mM de rouille verte biologique ($k_{obs}=0,696$). Plus la concentration en rouille verte biologique est importante, plus la réduction du mercure est rapide. Ce qui n'est pas le cas pour la réduction du mercure Hg (II) par les rouilles vertes chimiques.

Etude de la réactivité des rouilles vertes carbonatées vis-à-vis d'un polluant organique et d'un polluant métallique

Tableau 8 : Cinétique de réduction du mercure par la rouille verte ou les agents stabilisants

Essai	K_{obs} (min^{-1})	R^2
RV chim 0,8mM	0,572	0,8840
RV chim 0,4mM	0,582	0,9799
RV b 0,8mM	1,125	0,9970
RV b 0,4mM	0,696	0,9854
Blanc	0,038	0,4636
Fe(II)	0,031	0,2668

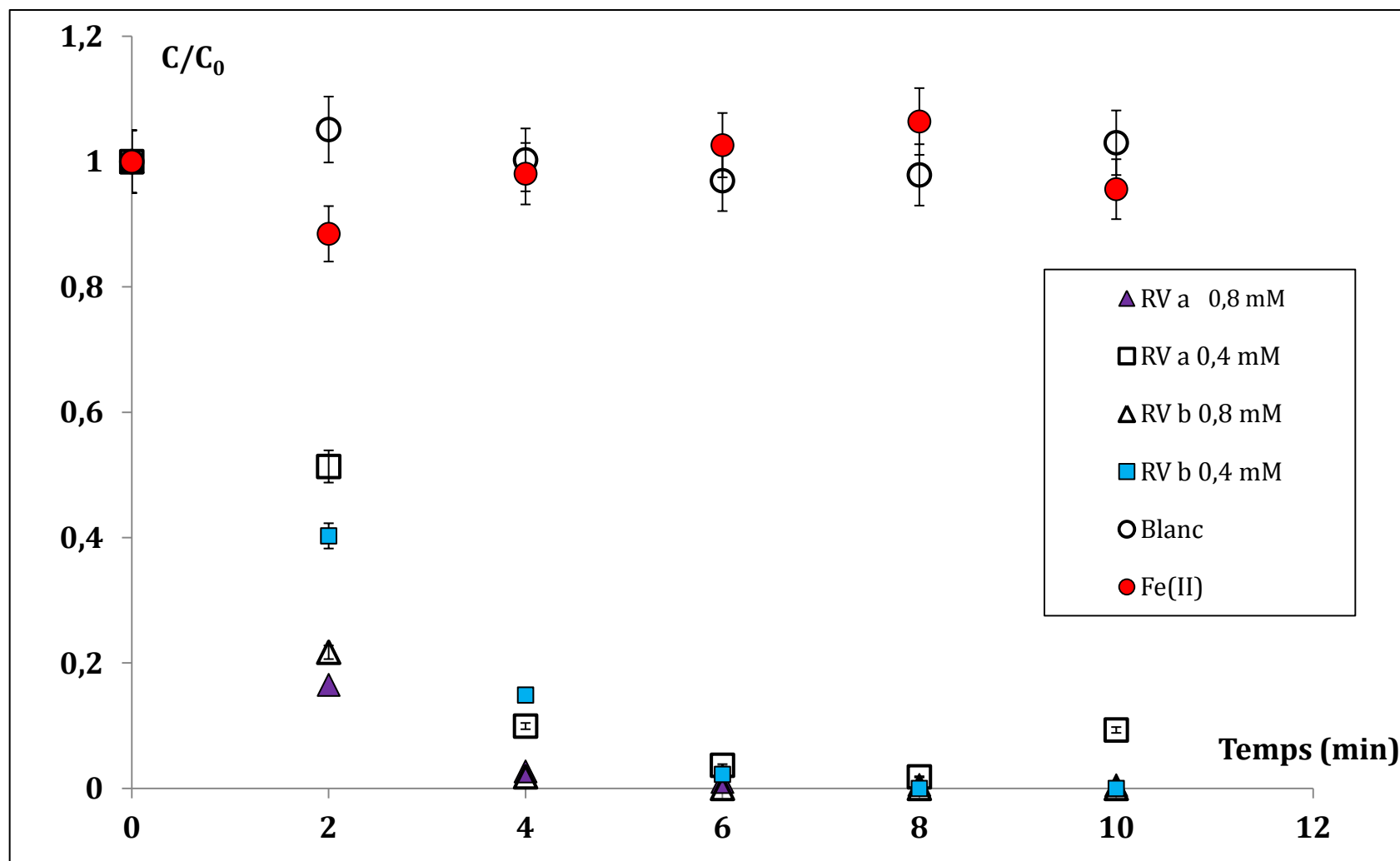


Figure 39 : Représentation de la concentration en Hg(II) en fonction du temps en présence de rouille verte chimique ou biotique et d'eau ou de Fe. [Hg]= 100 μ M, T = 22 °C, pH = 7

IV. DISCUSSION

1. INFLUENCE DE L'ORIGINE DES ROUILLES VERTES SUR LA REACTIVITE

Rouge de méthyle. Une différence de réactivité vis-à-vis du rouge de méthyle est observée entre la rouille verte chimique stabilisée par une densité « HC » de cellules et la rouille verte biologique obtenue à partir d'une densité « HC » de bactéries. La rouille verte biologique dégrade plus rapidement le rouge de méthyle ($k_{\text{obs}} = 0,006 \text{ min}^{-1}$) que la rouille verte chimique ($k_{\text{obs}} = 0,0006 \text{ min}^{-1}$) alors qu'elles sont en présence de la même concentration en bactéries. Cette différence de réactivité entre les deux rouilles vertes peut provenir des propriétés intrinsèques des deux types de minéraux ou des produits accompagnant la rouille verte (bactéries, polymères, etc.). Les deux rouilles vertes ont des propriétés physicochimiques différentes et la rouille verte biologique pourrait contenir plus ou moins de Fe(II) que la rouille verte chimique ($\text{Fe(II)}/\text{Fe(III)} = 2$). Pour rappel, la quantité de Fe(II) totale est fixée dès le départ dans le cas de la synthèse de rouille verte chimique, alors qu'elle dépend de l'activité bactérienne dans le cas de rouille verte biologique (Ona-Nguema et al., 2002a). Par ailleurs, la présence d'impuretés dans la préparation de la rouille verte chimique telles que la magnétite (moins réactive que la RV) pourrait diminuer la réactivité apparente de la rouille verte chimique.

Si nous comparons nos résultats avec ceux de la littérature, Kone et al., (2009) ont travaillé sur la réduction du rouge de méthyle par une rouille verte sulfatée synthétisée par voie chimique. La réduction du rouge du méthyle est complète au bout d'une heure ($k_{\text{obs}} = 0,0082 \text{ min}^{-1}$). Il semble que la réduction du rouge de méthyle soit plus significative en présence de rouille verte chimique sulfatée qu'en présence de rouille verte chimique carbonatée. Cependant, nous pouvons nous demander si cela est dû à la présence de silicates et de polymères ou simplement dû au type de rouille verte (carbonatée vs sulfatée). Rappelons que la synthèse de rouille verte sulfatée par voie chimique ne nécessite aucun ajout d'agent stabilisant (Gehin et al., 2002). Chun et al. (2007) ont travaillé sur la réduction de polluants organiques (ex : trichloronitrométhane) par une rouille verte carbonatée synthétisée par voie chimique.

**Etude de la réactivité des rouilles vertes carbonatées vis-à-vis d'un polluant
organique et d'un polluant métallique**

Elle est capable de réduire des contaminants organiques mais le problème reste que la rouille verte carbonatée en fonction de la composition du milieu peut être dégradée. Ils ont observé que la rouille verte carbonatée était progressivement transformée en magnétite au bout de 48 h, ce qui est un problème majeur pour l'étude de la réduction de polluants nécessitant un temps d'expérience plus long.

Mercure. Les rouilles vertes chimiques ont été stabilisées par une concentration « HC » de bactéries et les rouilles vertes biologiques contiennent aussi une forte concentration en bactéries. En absence de témoin avec des bactéries seules, nous pouvons nous demander si elles participent ou non à la réduction du mercure Hg(II). Les bactéries comme *S. putrefaciens* sont susceptibles de réduire le mercure (Wiatrowski et al., 2006). Néanmoins, les essais avec la rouille verte chimique ont été réalisés avec des rouilles vertes synthétisées en présence de bactéries autoclavées (tuées par la chaleur) et les essais ne montrent pas de différence significative avec la rouille verte biologique. La contribution des bactéries à la réduction du mercure, dans les conditions de l'expérience sans ajout de donneur d'électrons est donc moins important ; cela a ensuite été confirmé avec des suspensions fraîches de *Shewanella putrefaciens* (Remy et al., 2012).

Les propriétés intrinsèques des rouilles vertes jouent un rôle très important sur la vitesse de réduction d'un contaminant. Si nous effectuons un parallèle avec la réactivité d'autres minéraux tels que la magnétite,, Wiatrowski et al. (2009) ont travaillé sur la réduction du mercure Hg(II) par la magnétite et ont observé que l'augmentation de la surface spécifique de la magnétite augmentait le taux de réduction du mercure Hg(II) en mercure Hg(0). De plus, si nous comparons la réactivité de la rouille verte et de la magnétite vis-à-vis du mercure, pour une concentration de 0,1 μM de Hg(II) en présence de 0,2 g L⁻¹ (0,8 mM) de magnétite, la concentration en mercure diminue de 80 % en 2 h ($k_{\text{obs}} = 0,096 \text{ s}^{-1}$). Il semble donc que la magnétite soit moins efficace, sûrement dû à la quantité de Fe(II) présent dans sa structure plus faible que dans celle de la rouille verte (Elsner et al., 2004).

Pour ce qui est de l'influence de l'origine (biologique ou chimique) et du type (ex. sulfatée ou carbonatée) des rouilles vertes sur la réactivité vis-à-vis du mercure,

Etude de la réactivité des rouilles vertes carbonatées vis-à-vis d'un polluant organique et d'un polluant métallique

O'Loughlin et al. (2003b) ont travaillé sur la réduction du mercure Hg(II) par des rouilles vertes sulfatées synthétisées par voie chimique. Ils ont montré que la rouille verte sulfatée réduisait significativement le mercure Hg(II) en mercure élémentaire Hg(0), cependant aucune comparaison de leur travail avec le nôtre n'est possible car aucune vitesse de réduction n'est spécifiée.

2. INFLUENCE DES POLYMERES ET DES SILICATES SUR LA REACTIVITE DE LA ROUILLE VERTE

En comparant la réactivité des rouilles vertes synthétisées en présence ou en absence de silicates et de polymères, nous avons observé dans le cas du rouge de méthyle que la présence de polymère diminuait la réactivité de la rouille verte chimique. Dans le cas de la rouille verte chimique, il semble que les silicates soient plus intéressants en tant qu'agents stabilisants car ils n'ont pas d'effet limitant sur la réduction du rouge de méthyle. Par contre, les polymères et les silicates, dans le cas de la rouille verte biologique, n'interfèrent pas sur la réactivité de celle-ci vis-à-vis du polluant organique.

3. INFLUENCE DE LA FORME DE FE SUR LA REDUCTION

Dans l'implication du fer dans la réduction du polluant inorganique, seul un témoin contenant une concentration de Fe(II) de 0,2 mM (correspondant à la quantité de fer soluble en présence de rouille verte) a été réalisée. Ces résultats montrent que le fer soluble ne réduit pas le mercure comme cela a été confirmé par Rémy et al., (2012). Estrade et al. (2012) ont montré qu'une solution de 3 mM de FeSO₄ n'entraîne aucune réduction significative d'Hg (II). La réduction du mercure est donc bien due à la rouille verte et à son Fe(II) structural. Cette interprétation s'applique également dans le cas du rouge de méthyle. Le Fe(II) soluble 0,2 mM ne réduit pas significativement le rouge de méthyle.

V. CONCLUSION

La capacité réductrice des rouilles vertes carbonatées chimiques et biologiques vis-à-vis du rouge de méthyle et du mercure a été mise en évidence. La rouille verte carbonatée est capable de réduire des polluants organiques et métalliques. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'effet de la présence de silicates et de polymères bactériens sur cette réactivité. La présence de silicates n'interfère pas sur la capacité réductrice de la rouille verte chimique et biologique, par contre les polymères bactériens diminuent la vitesse de réduction de la rouille verte chimique. Il apparaît donc que les silicates sont de meilleurs agents stabilisants car ils n'altèrent pas la réactivité des rouilles vertes. La différence de réactivité de la rouille verte entre le mercure et le rouge de méthyle pourrait être due à une accessibilité différente du polluant à la rouille verte, du fait d'une charge ou d'un encombrement stérique différent.

Ce chapitre sur la réactivité de la rouille verte carbonatée synthétisée par voie chimique ou biologique en présence de silicates et de polymères est un travail préliminaire et a été depuis poursuivi par P-Ph Remy. Cela a permis de montrer que la présence de silicates et de polymères était compatible avec la capacité réductrice de la rouille verte carbonatée et a permis d'entrevoir des perspectives dans l'utilisation de ces rouilles vertes dans la mise en place d'un système de bioremédiation. D'un point de vue plus fondamental, cela pourrait expliquer l'atténuation naturelle de certains polluants, à condition évidemment de poursuivre les investigations et les expérimentations en verrouillant davantage de paramètres et en allant plus loin dans le questionnement scientifique

**CHAPITRE III : BIOREDUCTION DE LA
LEPIDOCROCITE PAR *SHEWANELLA PUTREFACIENS*
DANS UN SYSTEME SOUMIS A UN REGIME
HYDRODYNAMIQUE**

CHAPITRE III : BIOREDUCTION DE LA LEPIDOCROCITE PAR *SHEWANELLA PUTREFACIENS* DANS UN SYSTEME EN FLUX CONTINU

Ce travail a été réalisé avec l'assistance de Jean-Sébastien Mondy (assistant ingénieur CDD), Paul-Philippe Rémy (étudiant M2) et Hadrien Depernet (stagiaire BTS). Dans ce chapitre, le but était d'étudier la bioréduction, par *Shewanella putrefaciens*, d'une phase Fe(III) (lépidocrocite) sorbée/déposée sur du sable de Fontainebleau (LCS) dans un système en flux continu (colonne) et de déterminer les conditions optimales pour la génération de rouille verte (présence des agents stabilisants, etc.). La mise en place des colonnes a nécessité une longue mise au point pour caler tous les paramètres, la conduite d'une telle colonne n'ayant encore jamais été mise en place au laboratoire. De fait, ce travail représente une étape préliminaire à la synthèse de rouilles vertes sous flux continu et il reste encore de nombreuses étapes à franchir. Néanmoins, ce travail permet de montrer que la formation des rouilles vertes « biogéniques » sous flux continu est tout à fait envisageable et particulièrement difficile à contrôler. Cette étude a permis de « dégrossir » et de mettre en évidence les limites et les avantages d'un tel système.

I. INTRODUCTION

Les minéraux du fer constituent seulement une petite fraction de la phase totale solide dans les sols, les sédiments et les environnements aquifères. Cependant ces minéraux contribuent au cycle des éléments traces, influencent le cycle du soufre, du carbone et du phosphore et peuvent avoir un impact sur l'équilibre du pH et du E_h de l'eau contenue dans les pores. Le cycle du fer dans ces environnements est contrôlé par l'interaction entre la phase aqueuse et ses constituants, et la phase solide et est souvent couplé à des processus bactériens.

Les oxydes de fer sont associés dans les sols, les sédiments et les environnements aquifères à des bactéries, de la matière organique, du sable et de l'argile sous la forme de complexes organo-minéraux (Duchaufour, 1998). Afin de se rapprocher des conditions

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

environnementales, il convient d'étudier la biominéralisation de la rouille verte dans un système poreux hétérogène constitué de sable, bactéries et oxydes de fer, soumis à un régime hydraulique. Pour modéliser ce système hydrodynamique, nous avons simplifié et transposé ces conditions dans un réacteur en colonne constitué de sable, de bactéries et d'oxydes de fer.

Le but de ce chapitre est donc double. Dans un premier temps, nous souhaitons étudier la bioformation de minéraux secondaires en colonne à partir de lépidocrocite $\gamma\text{-FeOOH}$ déposée sur du sable de Fontainebleau à 10 % wt (LCS) en présence d'une forte densité « HC » de *Shewanella putrefaciens*. Notons que la génération ou bio-génération de rouille verte comme le minéral secondaire prédominant et en quantité importante dans un tel système n'avait encore jamais été observée. Dans un second temps, nous voulons étudier l'impact des silicates comme agent stabilisant sur la bioréduction de la lépidocrocite en colonne. Dans ces conditions, l'acide silicique a-t-il le même effet promoteur de formation de rouille verte en colonne que celui que nous avons observé en batch (Chapitre I partie A) ?

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

II. MATERIEL ET METHODES

1. MILIEU POREUX CONTENU DANS LA COLONNE

La bioréduction de la lépidocrocite (LCS) est étudiée dans un système en colonne soumis à régime en flux continu. Le mélange lépidocrocite déposée sur du sable de Fontainebleau à 10 % wt (LCS) + bactéries est compacté dans une colonne de chromatographie en verre avec un diamètre interne de 2,6 cm (XK 26/40, GE Healthcare). Le sable de Fontainebleau de type quartz a une surface spécifique très faible de $0,06 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. Il a été lavé plusieurs fois à l'acide chlorhydrique, l'eau oxygénée et enfin à l'eau déminéralisée pour éliminer tous les impuretés. Le choix s'est porté sur le sable de Fontainebleau car la taille de ses grains ($150\text{-}300 \mu\text{m}$) d'une part permet la formation d'un système poreux hydrauliquement conducteur évitant les problèmes de perte de charge et de colmatage, et d'autre part il est très peu soluble, chimiquement et structurellement stable.

2. TRAÇAGE ET DETERMINATION DU REGIME HYDRODYNAMIQUE

Cette étape préliminaire est une étape incontournable. Lorsque nous travaillons en colonne, il est important et nécessaire de caractériser le régime hydrodynamique. Cela passe généralement par le traçage non réactif, c'est-à-dire injecter dans la colonne un traceur (soluté non réactif) qui ne réagit pas avec la surface du solide. Le traçage se fait après la saturation de la colonne et immédiatement avant l'étude centrale et le suivi de la bioréduction. Etant donné que notre système complexe nécessite une préparation qui dure trente jours le traçage n'a pas été effectué sur la colonne de l'expérimentation centrale au sens strict mais sur une colonne LCS 10 % wt sans bactéries. Bien que la présence de bactéries pourraient perturber légèrement l'écoulement dans ce milieu poreux nous avons réalisé cette expérience avec seulement du LCS.

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

a. Dispositif expérimental et colonne de LCS

La colonne est un tube de verre entouré d'une seconde enveloppe en plastique conçue pour faire circuler de l'eau thermostatée. Elle a un diamètre intérieur de 26 mm, la hauteur de son contenu est ajustable entre 7,5 et 40 cm au moyen de deux pistons amovibles. L'appareil qui l'accompagne (Äktaprimé Plus, GE Healthcare) est presque entièrement automatisé et connecté à un ordinateur.

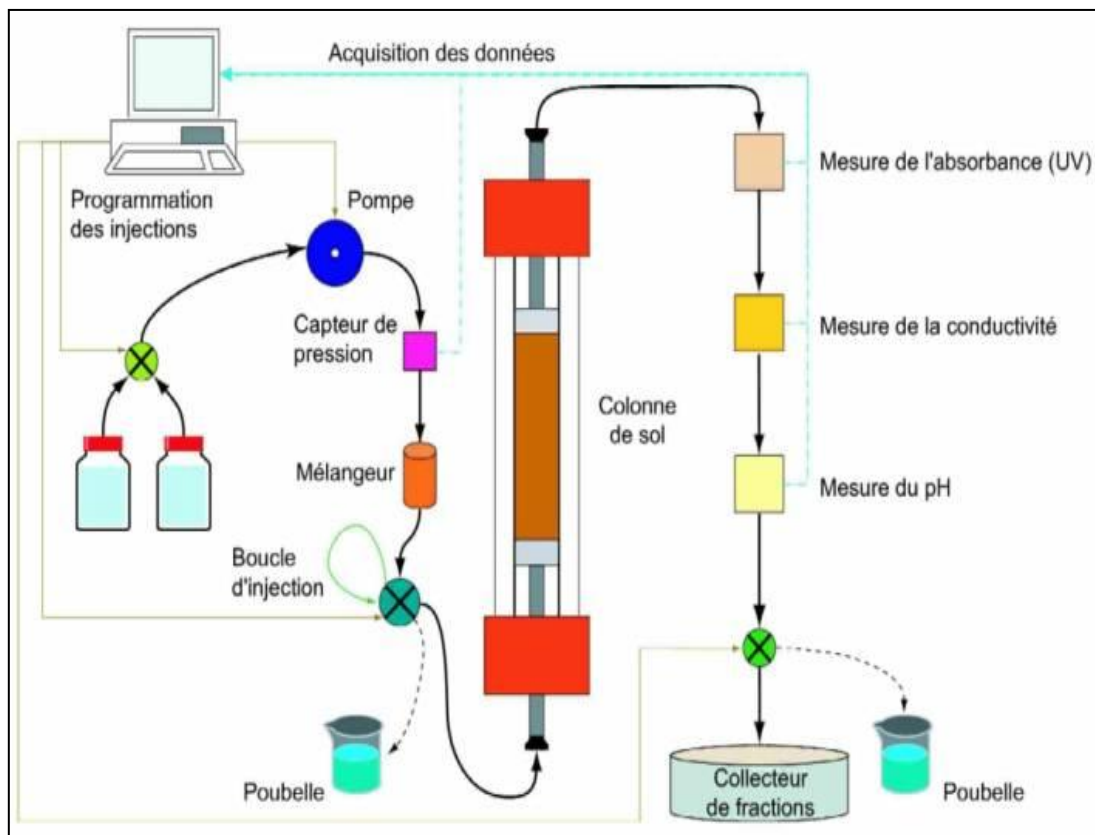


Figure 40 : Photo du montage de la colonne et du système Aktaprimé

La **Figure 40** présente le schéma d'ensemble du dispositif qui montre le trajet du fluide. Le débit étant programmé au début de l'injection entre 0,1 et 50 mL par min directement sur l'Äktaprimé, la vanne d'entrée permet de réaliser un mélange de plusieurs solutions en proportions variables au cours du temps, donc par exemple un gradient de concentration. Le liquide traverse ensuite la pompe, le capteur de pression et une chambre d'homogénéisation puis entre dans la colonne. Le lit fixe de la colonne est maintenu en place au moyen de grilles et filtres en nylon (10 μm) qui équipent les

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

pistons à l'entrée et à la sortie. Le flux d'eau ascendant garantit un régime hydrique saturé dans la colonne (absence de bulles d'air). En sortie, des capteurs en ligne acquièrent les mesures de l'absorbance dans l'ultraviolet (à 254 ou 280 nm), la conductivité, la température et le pH. L'ordinateur équipé du logiciel spécifique PrimeView centralise les mesures qui s'affichent en temps réel sous forme de graphes. Un collecteur de fractions sert à conserver le flux sortant dans des tubes à essai (95 tubes de 20 mL) en vue de caractérisations physiques ou chimiques complémentaires.

Une manipulation complète en colonne comporte les étapes suivantes : le conditionnement, le traçage et l'expérience de bioréduction proprement dite. Pour faciliter les interprétations, nous cherchons à travailler dans un système où l'écoulement est principalement convectif et peu dispersif et où l'ensemble du milieu poreux est occupé par de l'eau mobile.

Le conditionnement de la colonne comporte son remplissage, sa mise en eau et son équilibrage. Le conditionnement est terminé quand tous les capteurs donnent des signaux stables en sortie, en général après une nuit. Le **Tableau 9** donne les caractéristiques de l'expérience en colonne remplie de solide LCS :

Tableau 9 : Caractéristiques du conditionnement d'une colonne de LCS

Masse solide sec LCS (g)	100
Hauteur du lit (cm)	13
Diamètre colonne (mm)	26
Volume colonne (cm³)	69
Masse volumique (g cm³)	1,45
Volume poreux (mL)	25

A l'issue du conditionnement, la teneur volumique en eau de la colonne qui s'identifie à sa porosité, s'obtient par pesée en calculant la différence entre la masse de la colonne remplie avant mouillage et à la saturation, cette donnée sert à déduire la vitesse de pore.

***Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système
soumis à un régime hydrodynamique***

b. Le traçage et caractérisation du régime hydrodynamique

Le traçage a pour objectif de recueillir les caractéristiques hydrodynamiques de l'écoulement dans un milieu poreux tel qu'une colonne de sol, sans le perturber. L'opération consiste à injecter dans le milieu poreux à $t = t_0$, une quantité de traceur en solution (dans notre cas, 5 mL d'une solution de KBr) et à suivre son devenir au cours du temps en sortie de colonne. Cela revient à dire que nous étudions la variation de C , concentration du traceur, au cours du temps grâce à sa courbe d'éluion (ou courbe de restitution). La fraction de volume de fluide qui sort entre t et $t + dt$ contient les molécules de traceur qui ont séjourné un temps t dans le milieu. La courbe $C(t)$ constitue une représentation de la distribution des temps de séjour dans la colonne. La méthode que nous avons employée pour traiter les traçages s'appuie sur l'équation d'advection-dispersion (CDE):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - \frac{q}{\theta} \frac{\partial C}{\partial x}$$

C : concentration en solution ($M L^{-3}$)

D : coefficient de dispersion hydrodynamique ($L^2 T^{-1}$)

q : vitesse de Darcy ($L T^{-1}$)

v : vitesse de pore ou vélocité ($L T^{-1}$)

θ : teneur en eau volumique

ρ : masse volumique du solide sec ou masse volumique apparente ou masse de solide par unité de volume de milieu poreux ($M L^{-3}$)

Cette équation découle de la conservation de la matière. Pour mémoire, les hypothèses sont les suivantes : fluide incompressible, écoulement stationnaire, dispersivités longitudinale et transversale identiques, absence de source ou puits dans le milieu poreux qui implique que le soluté n'est pas réactif.

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

Un programme sous MATHCAD résout l'équation CDE. Ce programme établit les moments d'ordre 0, 1 et 2 de la distribution des temps de séjour, vérifie le bilan de masse et le facteur de retard, en principe égal à 1. Les données d'entrée sont la longueur, la vitesse de Darcy, la teneur en eau volumique, et la durée d'injection du créneau de concentration. La concentration en sortie est finalement calculée à l'aide d'une solution analytique de l'équation unidimensionnelle CDE. La résolution revient alors à trouver les valeurs de D et θ qui optimisent l'adéquation entre valeurs expérimentales et courbe calculée.

Sachant qu'un régime d'écoulement dominé par l'advection est nécessaire pour l'interprétation du transport réactif, le nombre de Péclet Pe (sans dimension) donne une indication sur l'importance relative du transport par advection par rapport à la dispersion hydrodynamique dans la colonne :

$$Pe = \frac{Lv}{D}$$

où L (L) représente la longueur du lit fixe dans la colonne, v ($L T^{-1}$) la vitesse de pore et D ($L^2 T^{-1}$) le coefficient de dispersion hydrodynamique calculé à partir du traçage.

Pour une colonne remplie d'un matériau donné et un débit fixé qui impose une certaine vitesse de pore, le nombre de Péclet est directement proportionnel à la longueur de la colonne : c'est pourquoi l'appellation colonne, qui sous-entend nombre de Péclet élevé (par exemple, supérieur à 50), est réservée à des carottes de sol dont le rapport longueur / largeur est supérieur à 3 ou 4. Ce qui est le cas dans notre présente étude.

La courbe d'élution du traceur Br a été tracée en fonction du volume. Dans ce cas, l'axe des abscisses mentionne plutôt le volume relatif V/V_p (sans dimension), c'est-à-dire le nombre de volumes poreux V_p , que le volume absolu V qui dépend de la taille de la colonne.

**Bioréduction de la lépidocrocite par *Shewanella putrefaciens* dans un système
soumis à un régime hydrodynamique**

Comme expliqué précédemment, l'expérience de traçage a été effectuée sur une colonne remplie de LCS 10% wt sans bactéries. L'exploitation quantitative de la courbe obtenue (**Figure 41**) consiste à en déduire les paramètres hydrodynamiques de la colonne qui sont le coefficient de dispersion hydrodynamique, la dispersivité et le nombre de Péclet.

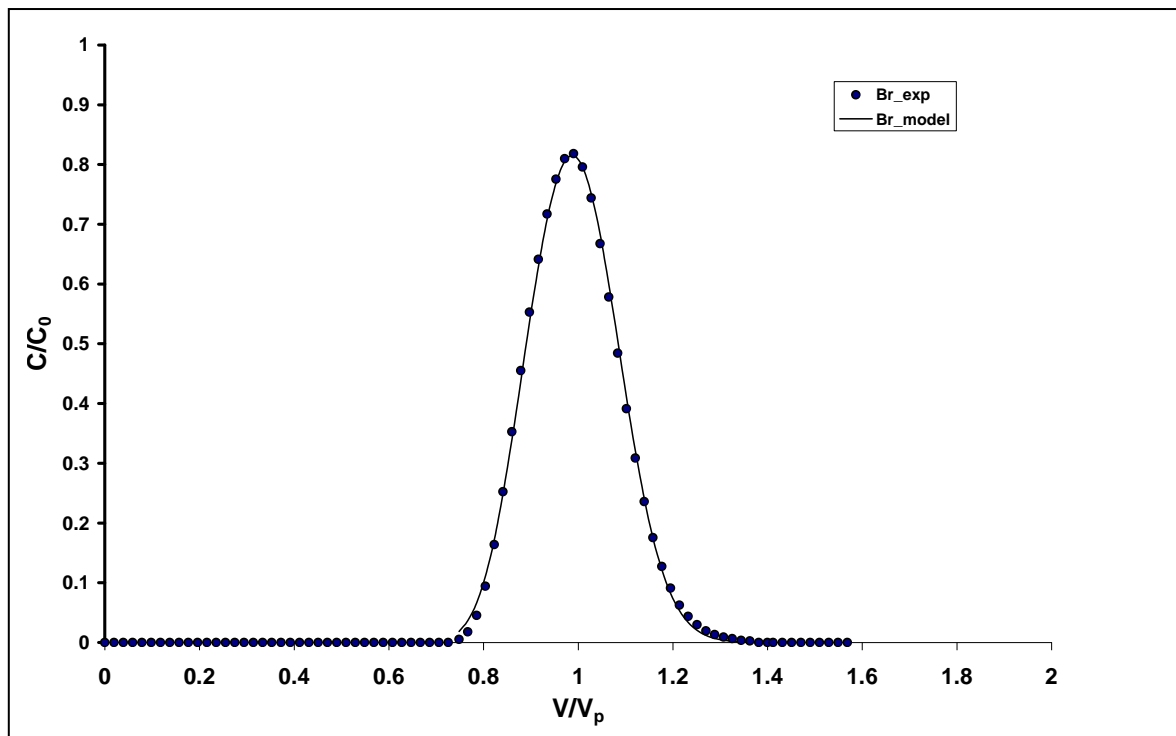


Figure 41 : Courbe obtenue lors d'un traçage à travers une colonne de LCS. 5 mL de solution de KBr à 10 mM ; $V_p = 25$ mL.

L'équation CDE sous sa forme simple dans le cas d'un flux unidimensionnel s'applique au cas du traceur. Elle relie la variation locale de la concentration C à la dispersion hydrodynamique et l'advection. MATHCAD recherche les valeurs des inconnues D et θ qui reproduisent au mieux la courbe expérimentale en sortie de colonne, confirmant la valeur du volume poreux trouvé par pesée. Le **Tableau 13** donne les résultats d'un traçage à travers la colonne de LCS :

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

Tableau 10 : Caractéristiques hydrodynamiques d'une colonne de LCS.

Vitesse de Darcy	$q = 0,018 \text{ cm min}^{-1}$
Vélocité	$v = 0,05 \text{ cm min}^{-1}$
Porosité	$\theta = 0,36$
Coefficient de dispersion	$D = 0,0085 \text{ cm}^2 \text{ min}^{-1}$
Nombre de Péclet	$Pe = 77$
Dispersivité	$\lambda = 170 \text{ }\mu\text{m}$

La dispersivité calculée grâce au traitement des courbes de traçage est de même ordre de grandeur que la taille des grains de sable (150-300 μm), ce qui est en accord avec des résultats déjà publiés (Rusch et al., 2010 ; Hanna et al., 2010 ; Hanna et Boily, 2010).

3. SUIVI DE LA BIOREDUCTION EN COLONNE

Cent grammes de LCS + bactéries sont ainsi introduits dans la colonne par compactages successifs sous boîte à gants afin de respecter les conditions anoxiques ($\text{N}_2:\text{H}_2$, 98:2) (Coy Laboratory Product Inc., Grass Lake, MI, USA). La quantité de bactéries ajoutées est de $1,4 \times 10^{11} \pm 1,1 \times 10^{10}$ bactéries mL^{-1} (en tenant compte du volume poreux de la colonne). La concentration en bactéries est calculée selon Zegeye et al. (2007) afin d'avoir un ratio *cellules / gramme d'oxydes de fer* équivalent et favorable à la formation de rouille verte. La hauteur de la colonne de sable est de 13 cm.

La colonne est ensuite installée sur un système Äktaprime (**Figure 42**) permettant les analyses en sortie telles que la conductivité, la température, la DO et le pH, et qui contrôle le débit via une pompe péristaltique. Le collecteur de fractions n'a pas été utilisé car les mesures de Fe^{2+} en sortie de la colonne nécessitent une acidification rapide de l'effluent pour éviter toute oxydation, ce qui nous a obligé à collecter manuellement les fractions. Afin de respecter les conditions anoxiques et stériles, le milieu de base a été autoclavé et dégazé à l'azote N_2 par barbotage pendant 2 heures. De plus, afin de compenser la perte de liquide injecté dans la colonne, une poche souple remplie de N_2 est connectée au ballon d'alimentation pour maintenir des conditions anaérobies.

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

La colonne est saturée avec seulement un volume poreux constitué du milieu de base (la composition du milieu de base est la même que celle utilisée en batch) à un débit constant de $0,1 \text{ mL min}^{-1}$. Le volume poreux de chaque colonne est de 23 mL environ. Ce choix de saturation avec seulement un V_p et une circulation continue d'une nuit par exemple (comme cela se fait habituellement) a été motivé par la crainte de voir les bactéries sortir par lessivage avant le début de l'expérience de bioréduction.



Figure 42 : Photo du montage de la colonne et du système Aktaprime

Après saturation, le milieu nutritif anoxique (formiate, 70 mM et AQDS, 47,75 mM) est envoyé par un flux ascendant toujours à un débit de $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ pendant 18 jours. Le plus faible débit de l'appareil (i.e. 0.1 mL min^{-1}) a été choisi pour assurer un grand temps de résidence favorable pour l'établissement des réactions en colonne.

Des prélèvements réguliers sont effectués en sortie afin de dénombrer les bactéries, la concentration en formiate par chromatographie ionique, en fer soluble et en silice par ICP-AES. Les prélèvements sont acidifiés excepté ceux destinés aux dénombrements bactériens qui sont fixés au glutaraldéhyde (2 % v/v).

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

Cinq colonnes ont été successivement suivies avec 0 mM de Si (colonnes I et I'), avec 0,2 mM de Si (colonne II), avec 1 mM de Si (colonne III) et avec 2 mM de Si (colonne IV). Les silicates ont été introduits sous forme d'acide silicique H_4SiO_4 dans le milieu de base.

Après 18 jours, chaque colonne est découpée en 5 sections dans la boîte à gant sous atmosphère anoxique, notées de A à E comme présenté sur la **Figure 43**, chaque section est caractérisée par analyse en DRX. Des analyses MET sont également effectuées, ainsi que des comptages en bactérie. Le fer (II) et le fer total sont également dosés par la méthode colorimétrique de phénanthroline dans le solide après extraction avec HCl concentré.

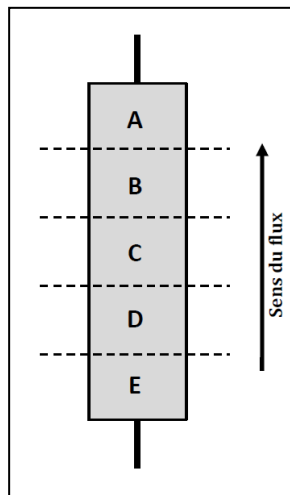


Figure 43 : Représentation schématique de la colonne montrant le découpage effectué après démontage de la colonne suivant le sens de flux

4. ANALYSE DES SOLIDES DE LA COLONNE

c. Microscopie électronique à transmission

Les solides issus de la colonne sont analysés en microscopie électronique à transmission. Quelques grammes de solide de chaque section de la colonne sont placés dans de l'eau en anoxie puis agités vigoureusement. Après sédimentation (quelques secondes), une goutte de surnageant est prélevée et déposée sur le porte échantillon immédiatement inséré dans la chambre d'analyse sous vide.

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

d. Diffraction aux rayons X

Les solides issus de chaque colonne sont directement déposés sur les portes échantillons immédiatement après le découpage de la colonne dans la boîte à gant afin de prévenir de toute oxydation et sont aussitôt analysés en DRX.

e. Mössbauer

Un échantillon de fragment issu de la première colonne avec 0 mM de silicates a été analysé par spectrométrie Mössbauer. Aucun autre échantillon n'a pu être analysé en raison de l'indisponibilité de l'appareil.

f. Dosage du fer dans le solide à la phénanthroline

Le but de cette analyse est de connaître la proportion de Fe (II) et de Fe (III) contenue dans la partie solide de chaque fragment des colonnes. Pour cela, quelques grammes de chaque fragment sont mis à sécher dans la boîte à gant. Ensuite 1 g de solide est pesé, 3 mL d'HCl à 1M sont ajoutés afin de dissoudre le Fe (II) et d'éviter son oxydation. Après 24h, le Fe (II) et le Fe (III) sont dosés par phénanthroline et le Fe (II) est exprimé en % du Fe total.

5. ANALYSES DE LA SOLUTION EN SORTIE

Les concentrations en Fe soluble et en Si sont dosées par ICP-AES. Les échantillons collectés en sortie de colonne sont préalablement acidifiés, et filtrés puis dilués dans l'acide nitrique 0,1 % en fonction de la gamme étalon avant passage dans l'appareil (*Inductive Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry*) (Jobin Yvon-ULTIMA). Les échantillons étant acidifiés directement au moment de leur sortie des colonnes, il n'y a pas de distinction entre le Fe(II) et le Fe(III). Une gamme étalon est préalablement établie en fonction des concentrations en fer suspectées dans les échantillons. Les échantillons collectés sont également filtrés pour être analysés en chromatographie ionique afin de doser le formiate.

Bioréduction de la lépidocrocite par *Shewanella putrefaciens* dans un système soumis à un régime hydrodynamique

III. RESULTATS

1. SUIVI DE LA COLORATION DE LA COLONNE AU COURS DE LA REACTION

La **Figure 44** présente l'aspect macroscopique des 5 colonnes après 18 jours d'injection et circulation, juste avant d'être analysées. Les colonnes sont présentées dans l'ordre de la concentration en Si et non dans l'ordre où elles ont été réalisées.

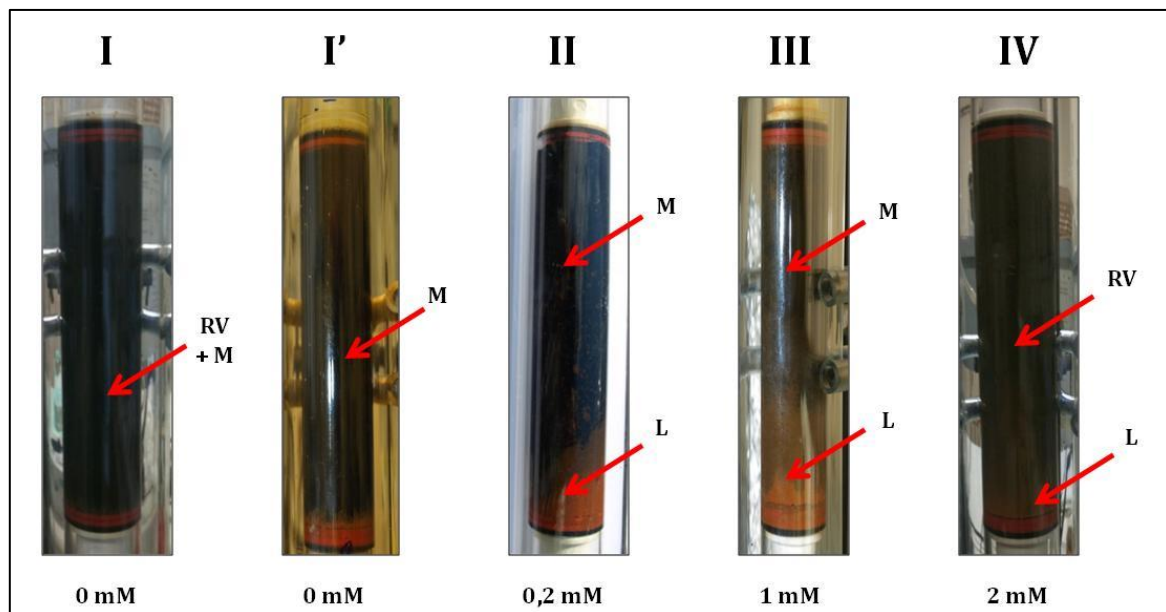


Figure 44 : Photos des colonnes à 18 jours I et I' (sans Si), II (0,2 mM de Si), III (1 mM de Si), IV (2 mM de Si). « RV » pour rouille verte, « M » pour magnétite et « L » pour lépidocrocite.

Macroscopiquement, les colonnes I et I' (0 mM de Si) sont les plus homogènes et de couleur noire, la colonne I semble davantage verdâtre. Les colonnes II (0,2 mM de Si), III (1 mM de Si) et IV (2mM de Si) présentent un dégradé de l'orange au noir en passant par le vert.

Dans les colonnes ayant reçu de l'acide silicique, la base de la colonne est restée orange, au point d'entrée de la solution injectée (**Figure 44**). La colonne II est plus foncée.

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

2. SUIVI DU PH

Le système Aktaprime permet de mesurer le pH de la solution de sortie avant que celle-ci soit éjectée du système. Les résultats des 5 colonnes sont présentés ci-dessous.

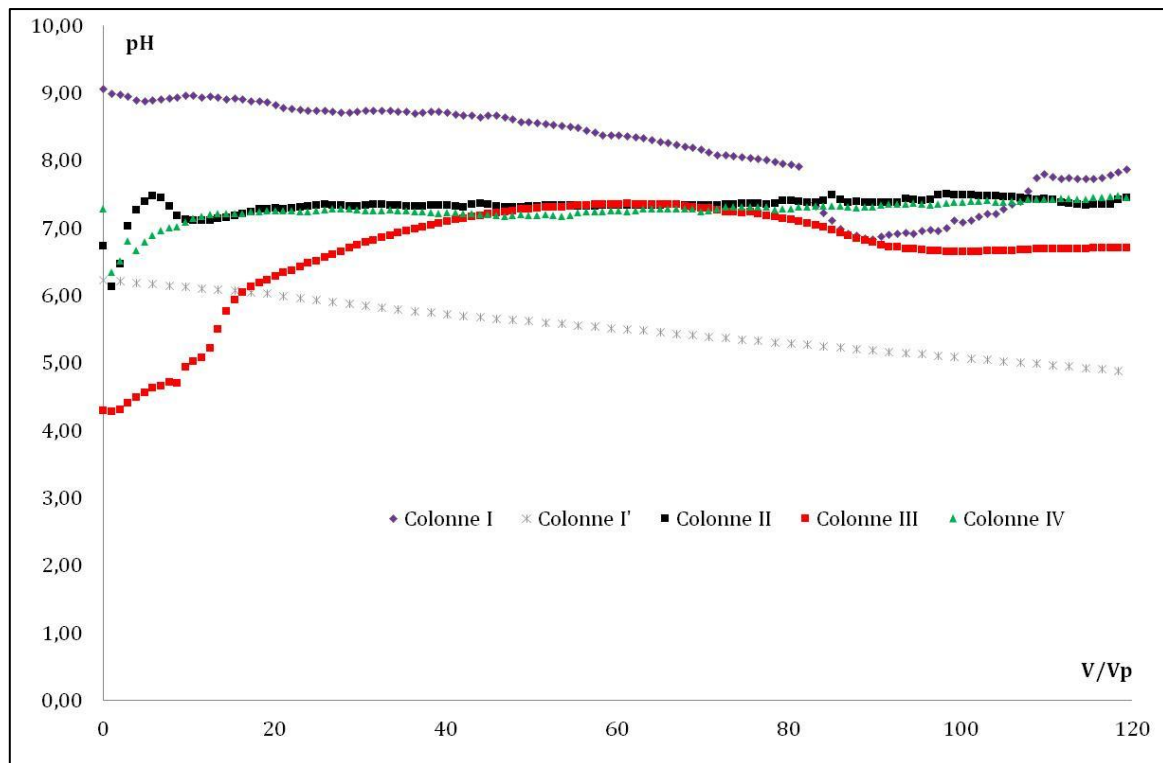


Figure 45 : Suivi du pH des colonnes I et I' (0 mM de silicates), II (0,2 mM de silicates), III (1 mM de silicates) et IV (2 mM de silicates)

Le pH du milieu de base est autour de 6,5-7 en début d'expérience. Quelque soit le pH de départ toutes les colonnes tendent vers $7,5 \pm 0,5$ en fin d'expérience, sauf la colonne I'.

3. CARACTERISATION DES MINERAUX SECONDAIRES OBTENUS

Après avoir observé les colonnes dans leur ensemble, elles sont transférées dans la boîte à gants afin d'y être découpées en 5 sections de hauteur équivalente. Chaque fragment issu du découpage des colonnes est analysé par diffraction des rayons X (DRX) et en microscopie électronique à transmission (MET).

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

D'après l'analyse DRX, la diversité des cristaux présents est homogène sur toute la hauteur de la colonne I (0 mM de Si) (**Figure 46**) et indiquent la formation de la rouille verte et la magnétite en plus du quartz déjà présent. Nous pouvons noter l'absence de lépidocrocite résiduelle.

L'analyse DRX de la colonne II (0,2 mM de Si) montre que le minéral secondaire formé est exclusivement de la magnétite et que la lépidocrocite, minéral initial, est encore présente dans les deux sections de la base de la colonne (E et D). D'après la hauteur relative des pics la proportion en magnétite augmenterait avec la hauteur de la colonne (**Figure 46**).

Les résultats des DRX de la colonne IV (2 mM de silice) montrent que le seul minéral secondaire est exclusivement la rouille verte. La lépidocrocite est encore présente sur toute la hauteur de la colonne alors que la rouille verte n'est pas détectée à la base de celle-ci (section E) (**Figure 46**).

Les résultats DRX montrent que la nature des minéraux secondaires varie selon la section et selon la concentration en Si du milieu alimentant la colonne. Ces résultats sont confirmés par analyse en microscopie électronique à transmission (MET) (**Figure 47**) où l'analyse a été limitée aux sections E, C, et A.

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

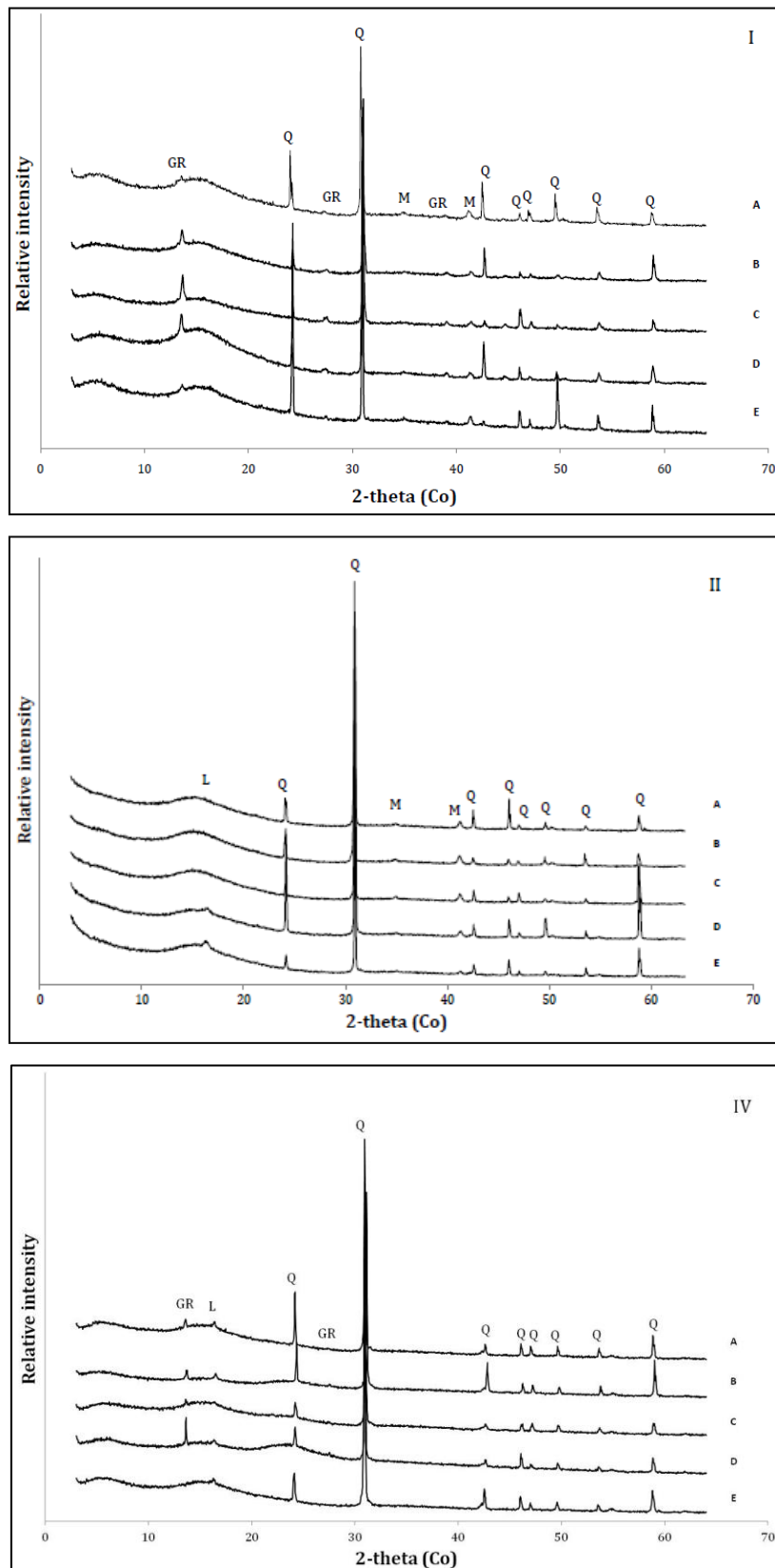


Figure 46 : Diffractogramme aux rayons X des solides présents dans les sections de la colonne I (0 mM de silicates, II (0,2 mM de silicates et IV (2 mM de silicates). Sens du flux : E vers A. « GR » pour rouille verte, « M » pour magnétite, « L » pour lépidocrocite et « Q » pour quartz.

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

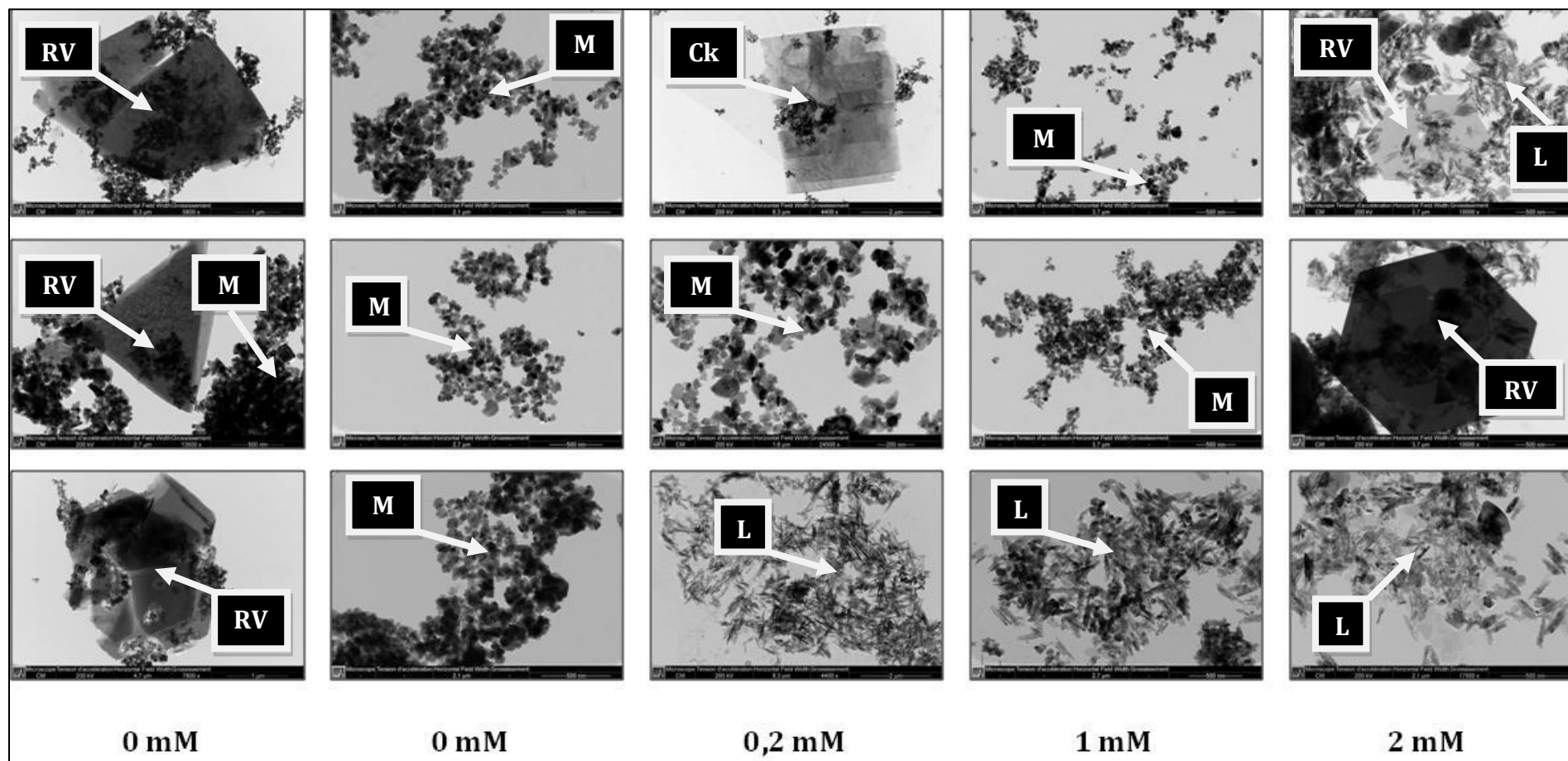


Figure 47 : Images en microscopie électronique à transmission des minéraux secondaires issus de la biominéralisation de la lépidocrocite par *Shewanella putrefaciens* en absence de Si (colonnes I et I'), en présence de 0,2 et 1 mM de Si (colonnes II et III), 2 mM de Si (colonne IV). « RV » pour rouille verte, « M » pour magnétite, « L » pour lépidocrocite et « Ck » pour chukanovite.

Bioréduction de la lépidocrocite par *Shewanella putrefaciens* dans un système soumis à un régime hydrodynamique

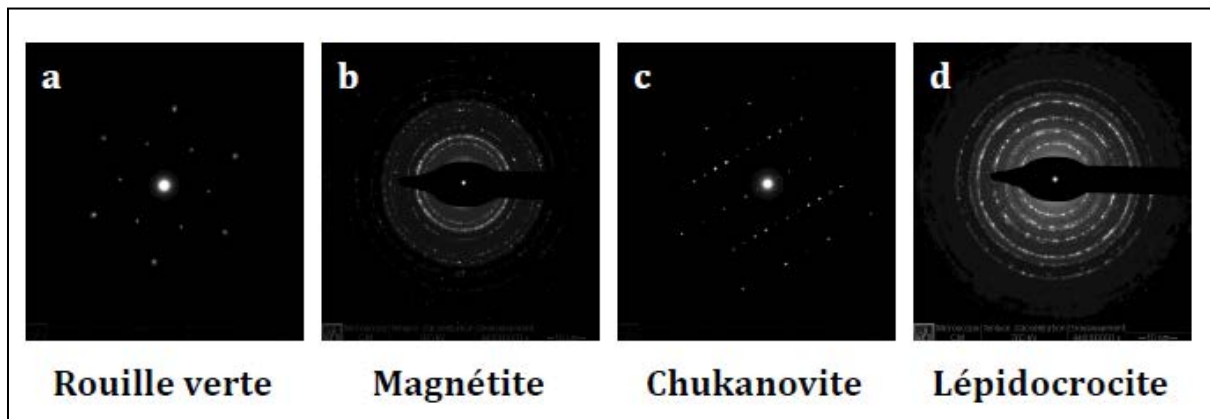


Figure 48 : Clichés de diffraction électronique à transmission des minéraux secondaires issus de la biominéralisation de la lépidocrocite par *Shewanella putrefaciens* en absence de Si (Colonne I et I'), en présence de 0,2, 1 et 2 mM de Si (colonnes II, III et IV).

Les résultats MET (**Figure 47**) montrent la morphologie des différents cristaux, la diffraction des électrons a permis d'identifier ces cristaux (**Figure 48**).

Ainsi pour la colonne I (0 mM de Si) un mélange rouille verte et magnétite est obtenu dans les 3 sections de colonne. Les cristaux de rouille verte ne sont pas intacts, ils apparaissent comme altérés, ou fragmentés. La colonne I' est constituée de magnétite sur toute sa hauteur.

La colonne II (0,2 mM de Si) présente la plus grande variété de minéraux, les analyses par MET ont montré la présence de cristaux de chukanovite de forme rectangulaire, non détectés par DRX. La magnétite est associée à la chukanovite dans le fragment A. Pour les deux autres fragments, il y a de la lépidocrocite et de la magnétite avec une proportion en lépidocrocite beaucoup plus importante dans le dernier fragment qui était de couleur orange en observation macroscopique (**Figure 44**).

Dans la colonne III, seules sont présentes la magnétite dans le haut de la colonne et la lépidocrocite restant à la base de celle-ci (**Figure 44 et Figure 47**).

Dans la colonne IV (2 mM de Si), prédominent la rouille verte et la lépidocrocite, les cristaux de rouilles vertes sont relativement gros (1-2 μm) et parfaitement hexagonaux.

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

4. CONCENTRATION EN FER DANS LES COLONNES

Une analyse Mössbauer a été réalisée, à température ambiante, dans le fragment A de la colonne I (0 mM de Si)(**Figure 49**).

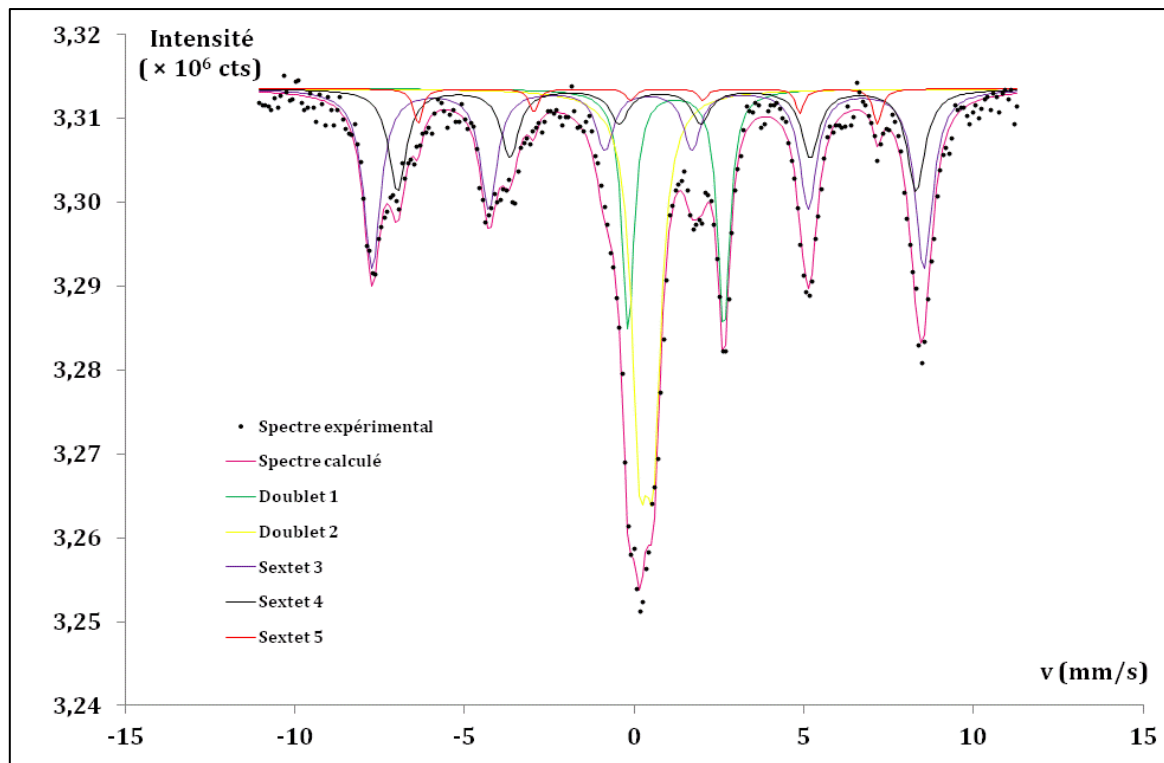


Figure 49 : Spectre Mössbauer des produits de biominéralisation de la colonne I (0 mM de silicates) obtenus à température ambiante

COMPILED SITE PROPERTIES

	Site populations
Doublet 1	16,331
Doublet 2	26,7875
Sextet 1	33,7
Sextet 2	19,8
Sextet 3	3,3

Bioréduction de la lépidocrocite par *Shewanella putrefaciens* dans un système soumis à un régime hydrodynamique

Les analyses en spectrométrie Mössbauer montrent que dans la colonne I sans Si, il y a environ 42 % de rouille verte, 55 % de magnétite et 3 % d'une phase de Fe(III) non définie.

D'autre part la quantité de Fe dans la partie solide est dosée pour chaque section des colonnes I et IV où la rouille verte a été formée (**Figure 50 et Figure 51**). Dans la colonne I (0 mM de Si), la quantité de Fe dans un gramme de solide est environ 5 fois supérieure à celle de la colonne IV (2 mM de Si). Une partie du Fe de la colonne IV semble avoir été lessivée.

La concentration en Fe a également été mesurée dans les échantillons de collecte de la fraction de sortie des colonnes I, II et IV (**Figure 52**). Les échantillons sont acidifiés en sortie de colonne, donc tout le Fe (soluble + particulaire) présent dans les échantillons est dissous. Nous admettrons donc qu'il s'agit de Fe(II) soluble majoritairement.

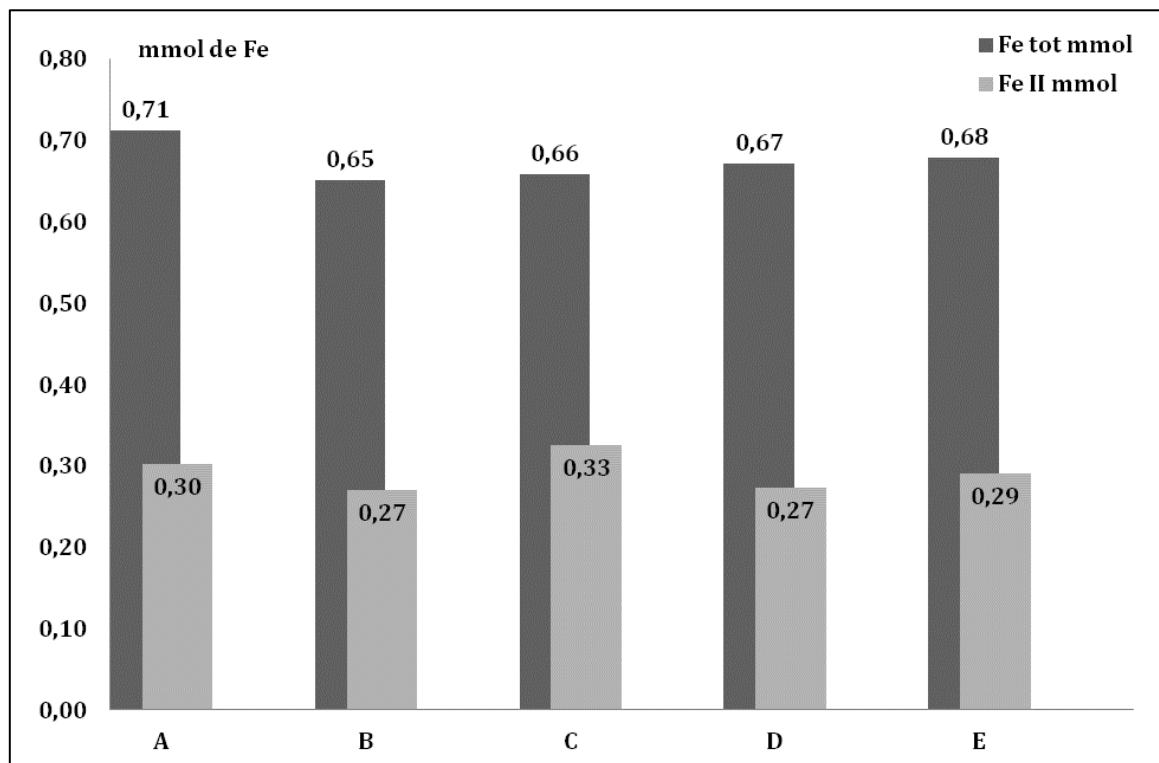


Figure 50 : Quantité de Fe(II) et de Fe total pour 1 g de solide de la colonne I (0 mM de Si) en fonction des fragments considérés A, B, C, D et E.

Bioréduction de la lépidocrocite par *Shewanella putrefaciens* dans un système soumis à un régime hydrodynamique

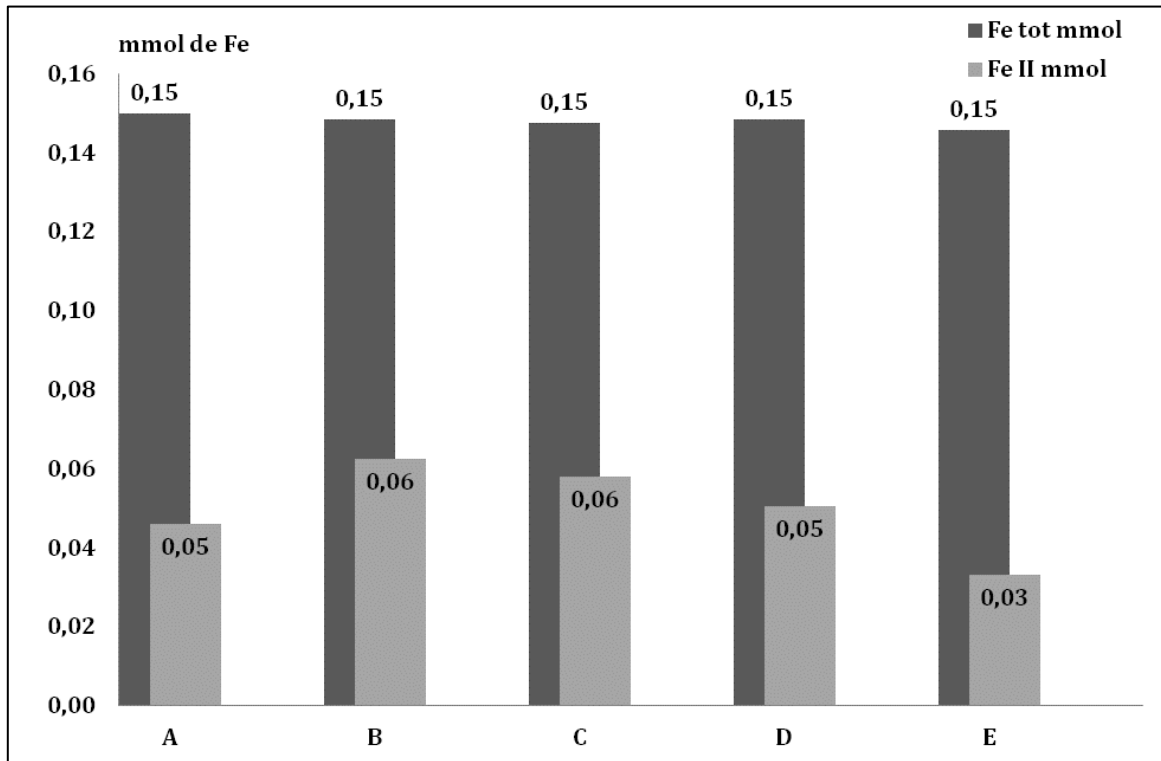


Figure 51 : Quantité de Fe(II) et de Fe total pour 1 g de solide de la colonne IV (2 mM de Si) en fonction des fragments considérés A, B, C, D et E.

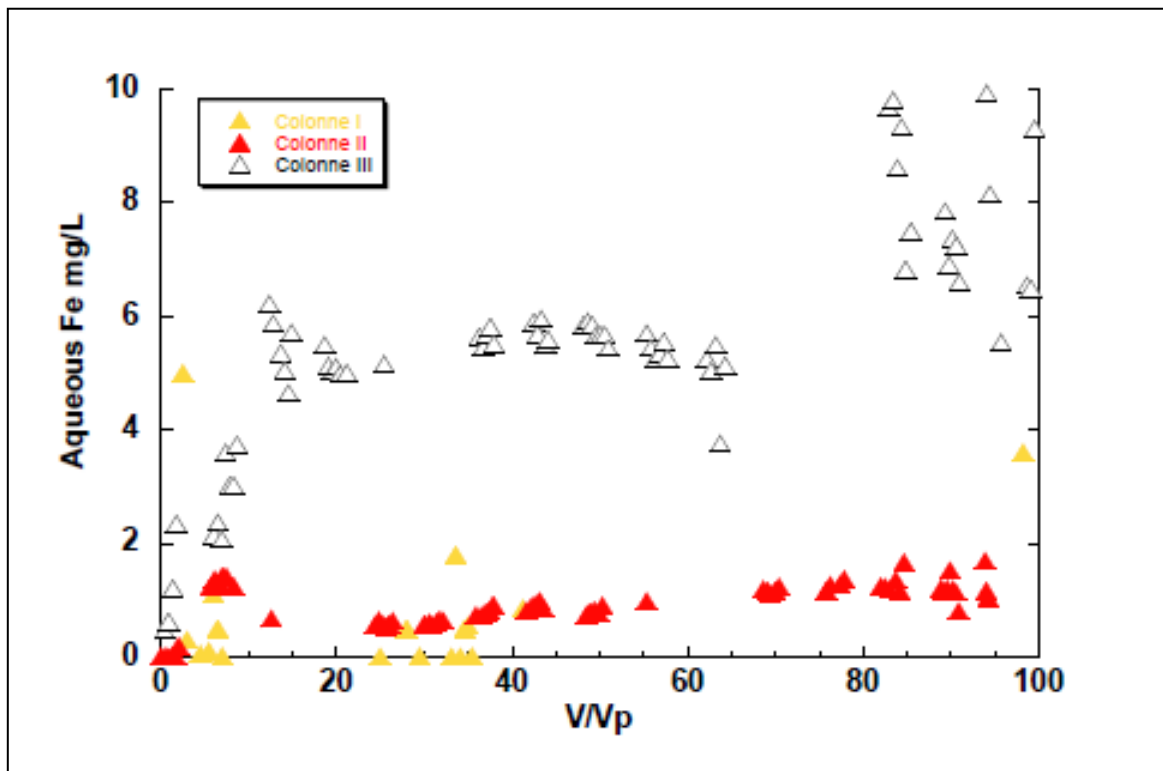


Figure 52 : Concentrations de Fe(II)_{aq} en sortie des colonnes I, II et IV dosés par ICP-AES.

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

La concentration en Fe(II) dissous en sortie de la colonne augmente au cours de l'expérience pour les 3 colonnes, ce qui suggère que le Fe(III) présent sous forme solide (lépidocrocite) est réduit par les bactéries ferriréductrices et passe dans la phase aqueuse. Il est possible que la réduction du Fe(III) augmente dans toute la colonne, ce qui augmente la quantité de Fe(II) dans l'effluent ou bien la production de Fe(II) est constante mais le Fe²⁺ est réadsorbé ce qui se traduit par un pseudo-plateau. Il y a davantage de Fe(II) en sortie de la colonne IV (2 mM de silice) où la rouille verte a été observée comme le principal minéral secondaire. Dans la colonne I, la concentration en Fe(II) augmente autour de 60 volumes poreux alors qu'elle était à peu près constante. Cela pourrait suggérer une dissolution de la rouille verte et une partie du Fe(II) de celle-ci rejoint la phase aqueuse. Pour la colonne II (0,2 mM de Si), il y a une sortie plus ou moins continue de Fe(II) aqueux. Dans tous les cas, nous avons au maximum 1 mM de Fe(II) qui est sorti de la colonne ce qui ne représente pas plus de 2 % de Fe (II) total en colonne supposé si toute la lépidocrocite a été transformée en rouille verte.

5. SUIVI DE LA CONSOMMATION EN FORMIATE ET DE SILICE

Le formiate et la silice sont dosés dans la solution de sortie de colonne. Les échantillons récoltés au cours de l'expérience sont analysés par chromatographie ionique afin de mesurer l'ion formiate HCOO⁻ et par ICP-AES afin de déterminer la concentration en Si dans la solution sortante de la colonne. La **Figure 53** présente la concentration relative en formiate C/C₀ en fonction du nombre de volumes poreux injectés (V/V_p).

La consommation en formiate traduit l'activité bactérienne qui couple son oxydation à la réduction de Fe(III). Des bactéries actives vont donc être responsables de la plus grande partie du formiate consommé pour répondre à leurs besoins. Toutefois, une partie du formiate peut aussi être sorbée par la lépidocrocite. En réacteur batch, Ona-Nguema et al. (2002a) montrent que 10-15 % du formiate sont éliminés de la phase aqueuse par adsorption sur la lépidocrocite. En début d'expérience (environ deux volumes poreux (V_p)) la concentration sortante de formiate est proche de zéro, ce qui est probablement dû à la fois à l'activité bactérienne et à l'adsorption.

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

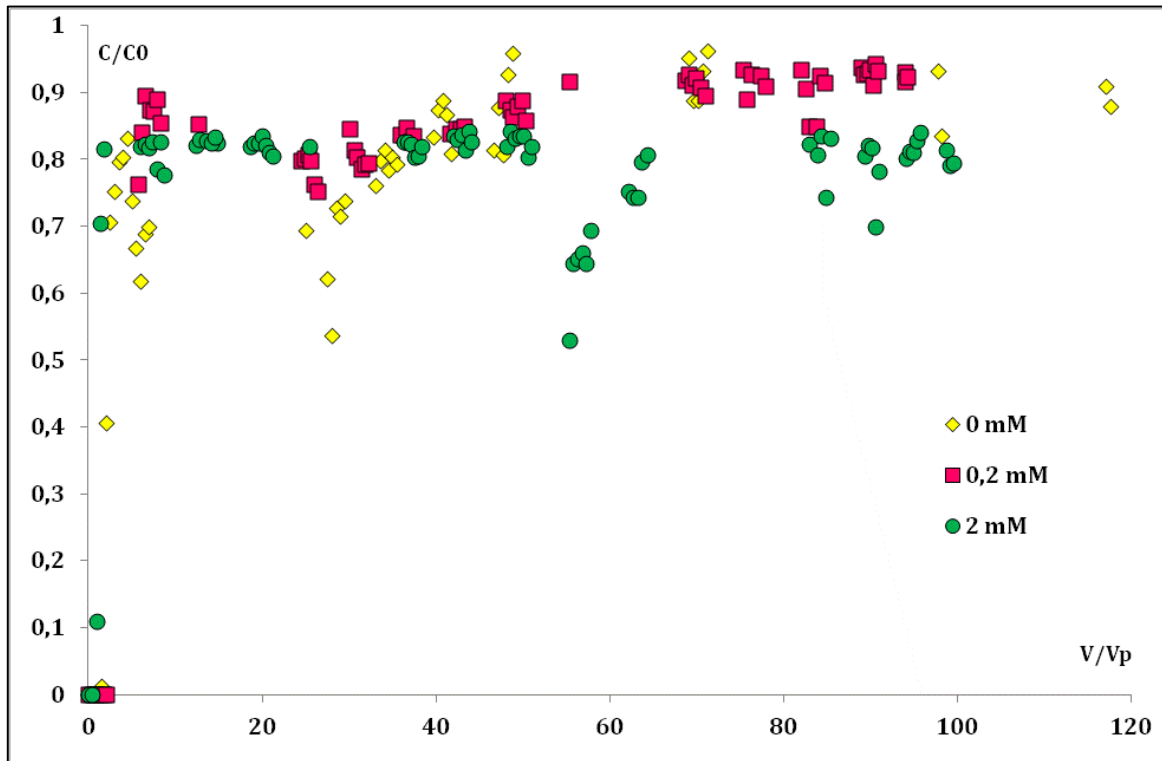


Figure 53 : Suivi de la concentration du formate dosé par chromatographie ionique en sortie de colonne I (0 mM de Si), II (0,2 mM de Si) et IV (2 mM de Si).

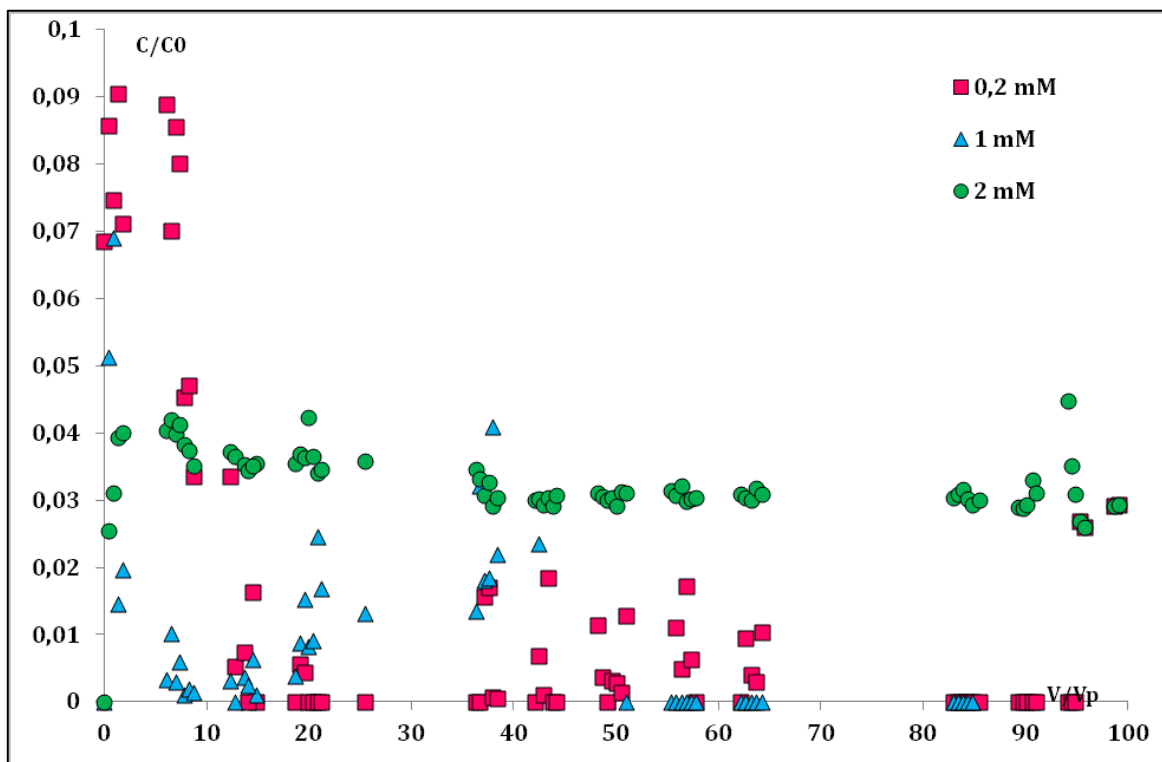


Figure 54 : Suivi de la concentration en silice dosé par ICP-AES en sortie des colonnes II (0,2 mM de Si), III (1 mM) et IV (2 mM de Si).

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

Après cette première étape (2 Vp), la concentration relative de formiate augmente dans l'effluent et oscille entre 80 et 90 % pour la colonne I. Pour la colonne II (0,2 mM de Si), le même comportement a été observé, à savoir une concentration sortante variant entre 75 et 95 %. Pour la colonne IV, seulement 70 à 80 % du formiate injecté ressort avec la même allure que les autres courbes de percée mais avec une consommation légèrement plus importante en formiate. Pour toutes les colonnes, aucun plateau n'a pu être observé avec parfois des variations importantes en C/C_0 .

L'élément Si est dosé par ICP-AES et les courbes de percée de Si sont présentées dans la **Figure 54**. Le sable de Fontainebleau étant très peu soluble, l'élément Si mesuré provient de l'acide silicique injecté dans la colonne via le milieu de base. Les concentrations initiales en silice sont de 0,2 mM, 1 mM et 2 mM dans le milieu de base injecté à 0,1 mL min⁻¹. Pour les colonnes II, III et IV toute au long de l'expérience, la concentration en Si dans l'effluent de la colonne est faible (maximum 0,1 %), ce qui suggère qu'une grande partie de celle-ci est sorbée sur les minéraux. En fonction de la concentration en silice injectée dans la colonne, seul paramètre variable entre les colonnes, les minéraux secondaires diffèrent selon les sections des colonnes (**Figure 44 et Figure 47**).

Lorsque nous regardons le suivi de la concentration en silice en sortie des colonnes II, III et IV, nous pouvons voir que les représentations graphiques sont différentes. Pour la colonne II, la silice est présente dans la solution de sortie avant même que 1 volume poreux du milieu de base contenant la silice sous forme d'acide silicique soit passé dans la colonne, puis la concentration en silice diminue après une dizaine de volumes poreux pour être proche de 0 à la fin du temps d'expérimentation. Ceci est inattendu puisque la solubilité de sable quartz de Fontainebleau est très faible voire négligeable (Rusch et al., 2010). La faible quantité détectée suggère qu'il s'agit d'une contamination en silice des matériaux utilisés.

La concentration en silice de la colonne III (1 mM de Si) varie peu mais reste très faible et elle est quasiment nulle en fin d'expérience. Pour la colonne IV (2 mM de Si), la concentration relative en silice présente un plateau autour de 0,03-0,04, une quantité

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

faible malgré la forte concentration injectée (i.e. 2mM). Dans les trois colonnes, on peut enfin constater que la majorité de la silice injectée via le milieu de base est retenue/adsorbée dans la colonne puisque la concentration mesurée en sortie est faible à nulle.

6. CARACTERISATION MICROBIENNE

Nous avons fait plusieurs tentatives de caractérisation microbienne, c'est-à-dire que nous avons essayé de dénombrer les bactéries dans la solution de sortie et dans le solide de la colonne, et de qualifier l'état des bactéries c'est-à-dire leur viabilité. Les graphiques présentés ci-dessous sont les quelques données exploitables que nous avons réussi à obtenir sur l'ensemble des colonnes. La mesure du nombre de bactéries a été effectuée sur une douzaine d'échantillons de collecte de la solution en sortie de la colonne IV afin d'apprécier le nombre de bactéries lessivées. Pour cela nous avons marqué les cellules directement au SYBR green après la collecte (**Figure 55**).

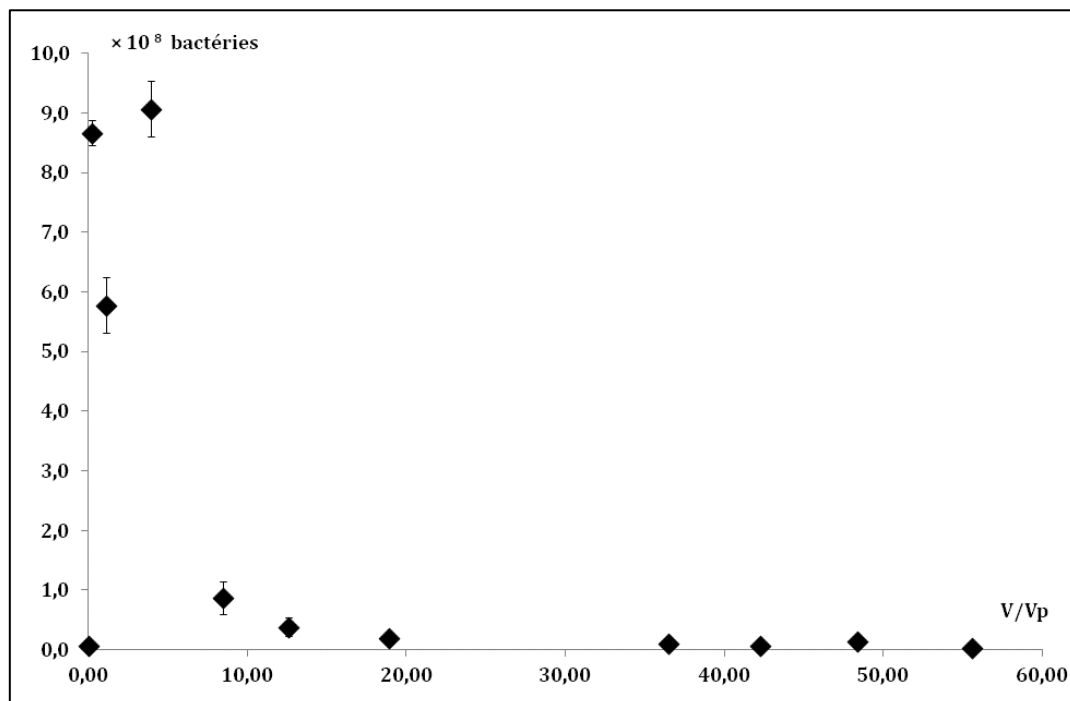


Figure 55 : Nombre de bactéries dans quelques échantillons en sortie de la colonne IV (2 mM de Si).

Bioréduction de la lépidocrocite par *Shewanella putrefaciens* dans un système soumis à un régime hydrodynamique

Le nombre de bactéries dans la solution de sortie est de l'ordre de ~ 6 à 9×10^9 cellules jusqu'à 4 volumes poreux puis diminue jusqu'à atteindre un nombre pratiquement nul à 56 volumes poreux. Il semble que la mobilisation des bactéries dans la phase aqueuse est importante en début d'expérience (entre 0 et 2 jours) (**Figure 55**). Les différentes caractérisations microbiennes ont été effectuées sur des colonnes différentes car ce sont des expérimentations très chargées et d'un point de vue logistique toutes les caractérisations ne pouvaient être effectuées sur un même échantillon.

Le nombre de bactéries a été mesuré dans le solide de la colonne I. Pour cela, 1 g de solide (Fe + sable) issu de la colonne a été séché puis resuspendu dans du pyrophosphate de sodium, traité au bain à ultrasons et marqué au SYBR green après dilution (**Figure 56**).

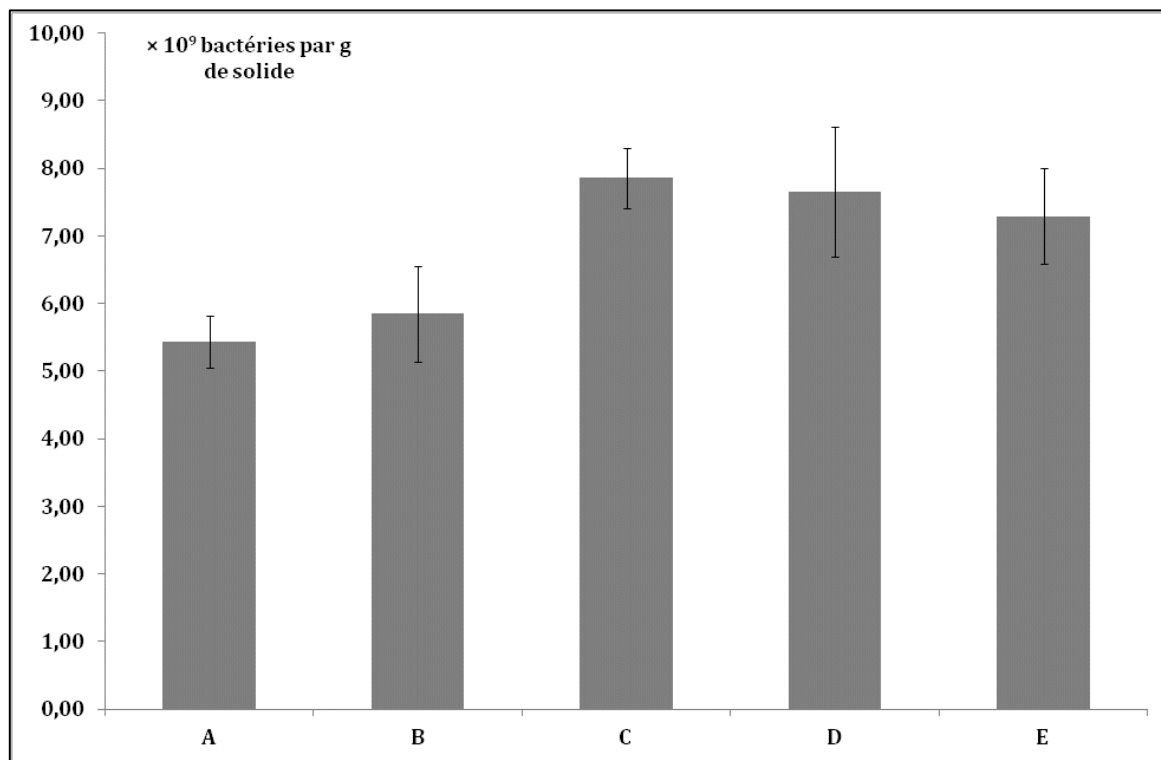


Figure 56 : Nombre de bactéries par gramme de solide (Fe + sable) dans chaque fraction de la colonne I (0 mM de silicates).

Le nombre de bactéries par gramme de solide est de l'ordre de ~ 5 à 8×10^9 cellules dans l'ensemble des fragments de la colonne I avec 0 mM de silicates. Le nombre de

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

bactéries au départ est de $\sim 1,1 \times 10^{11}$ cellules mL⁻¹ sachant que le volume poreux est de 23 mL ce qui représente $\sim 2,5 \times 10^{12}$ bactéries au total dans la colonne pour 100g de solide. Ce qui est cohérent avec les résultats obtenus (**Figure 56**). La différence observée entre les différents fragments de la colonne ne semble pas être significative. L'instauration d'un flux ne semble pas créer de différence significative de la concentration en bactéries en fonction de la hauteur dans la colonne.

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

IV. DISCUSSION

1. METABOLISME MICROBIEN

L'introduction de *Shewanella putrefaciens* CN32 avec de la lépidocrocite sorbée sur du sable (LCS 10 % wt) sous des conditions de flux hydrodynamique provoque la réduction du formiate en bicarbonate couplée à la réduction du Fe(III) de la lépidocrocite. L'activité bactérienne peut être suivie en regardant la concentration de formiate (HCOONa) en sortie, plus précisément, l'ion formiate (HCOO⁻) qui est dosé par chromatographie ionique. Nous pouvons définir trois périodes d'activité microbienne : (1) la consommation en formiate est importante puis (2) la consommation en formiate diminue et (3) la consommation en formiate se stabilise. Les bactéries utilisent très peu du formiate qui est mis à leur disposition dans le milieu de base (de 0 à 20 % maximum), cela se traduit par une forte concentration en formiate présente en sortie de colonne. Il faut également noter que le formiate est mis en excès dans le milieu de base.

Nous avons essayé de quantifier le nombre de bactéries dans la colonne au cours de l'expérience en marquant les cellules au SYBR green dans les fractions de sortie et de définir leur viabilité par CYTO 9. Cependant, nous avons été confrontés à plusieurs difficultés qui ont rendu les résultats ininterprétables. De ce que nous avons observé, il semblerait que le lessivage des bactéries est significatif au début de l'expérience. Notons que l'absence de phosphate dans le milieu empêche toute croissance des bactéries. D'autre part, nous supposons que l'état des bactéries est semblable dans l'ensemble des colonnes, mais nous n'avons pas été en mesure de le vérifier.

2. FORMATION DES MINÉRAUX SECONDAIRES EN COLONNE

Colonne I : Les phases solides formées au cours de la réduction dissimilatrice de la lépidocrocite par *Shewanella putrefaciens* sont la rouille verte carbonatée et la magnétite. Les minéraux secondaires formés ont été identifiés par diffraction aux rayons X et par microscopie électronique à transmission. Après 18 jours d'expérience en colonne, la rouille verte et la magnétite sont présentes (**Figure 49**). La quantification

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

des deux phases a été déterminée par analyse Mössbauer et a montré que la rouille verte et la magnétite étaient présentes respectivement à 42 et 55 %. La colonne I est homogène et la répartition des minéraux secondaires semblent être également homogène sur toute la hauteur de la colonne. Cependant, lorsqu'on regarde la morphologie des cristaux en microscopie électronique à transmission (**Figure 47**), les cristaux de rouilles vertes semblent être altérés et n'ont pas une forme parfaitement hexagonale. Les cristaux de rouilles vertes sont en partie dissous au niveau de leurs faces latérales. Nous pourrions alors poser l'hypothèse qu'une partie de la rouille verte est en train de se transformer et de se recristalliser en magnétite.

Colonne I' : cette colonne est le duplicata de la colonne I (0 mM de Si). Les résultats montrent que le minéral secondaire obtenu est exclusivement de la magnétite contrairement à la colonne I où il y avait un mélange rouille verte et magnétite. Les résultats obtenus dans les mêmes conditions ne sont pas tout à fait équivalents. La rouille verte peut ne pas avoir été détectée en diffraction en rayons x ou en microscopie électronique si la concentration de celle-ci n'était pas suffisante dans la colonne. Contrairement à la colonne I, le solide issu de cette colonne n'a pas pu être analysé par Mössbauer, et nous ne disposons donc pas des données quantitatives sur les minéraux secondaires formés. Cependant, la magnétite reste tout de même le minéral majoritaire dans ces deux colonnes. Probablement parce que la rouille verte est métastable par rapport à la magnétite. Cette observation corrobore notre hypothèse émise auparavant, à savoir que la rouille verte peut représenter une phase éphémère et intermédiaire dans la formation de la phase secondaire la plus stable thermodynamiquement (i.e. magnétite). Il a déjà été suggéré que la rouille verte serait un précurseur de la magnétite (Sumoondur et al., 2008). L'apparition de la couleur verdâtre en colonne qui est progressivement devenue noire conforte cette hypothèse.

Colonne II : Dans la colonne II, les principaux minéraux obtenus sont de la magnétite et de la chukanovite avec un résidu de lépidocrocite présent dans le bas de la colonne au point d'entrée du milieu de base contenant de la silice à 0,2 mM. Il n'y a pas de trace de rouille verte dans la colonne par diffraction aux rayons X et par microscopie électronique à transmission (**Figure 47**) même au niveau du fragment verdâtre observé

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

macroscopiquement. De plus, au cours de l'expérience, la colonne initialement de couleur orange est passée par une phase de couleur verdâtre qui s'est progressivement transformée en noire. Deux hypothèses sont possibles : (1) soit la rouille verte s'est transformée en une autre phase, soit (2) la quantité restante de rouille verte n'est pas détectable par les méthodes employées. La présence de chukanovite, un carbonate ferreux, suggère que la rouille verte carbonatée préalablement formée, s'est transformée en magnétite, et le Fe(II) résiduel s'est associé avec les carbonates formant la chukanovite (Rémazeilles et Refait, 2009). D'autre part, la présence de lépidocrocite résiduelle en bas de la colonne peut s'expliquer par la sorption de silice sur les cristaux de lépidocrocite au point d'entrée du flux empêchant ainsi l'accès des bactéries aux sites ferriques et donc sa réduction. Cette hypothèse a d'ores et déjà été formulé par Kukkadapu et al. (2004), Borch et al. (2007) et O'Loughlin et al. (2010) qui suggèrent que la sorption d'oxyanions tels que les phosphates et les silicates, bloquent l'accès des bactéries et/ou des navettes à électrons aux sites de surface des oxydes de fer, limitant ainsi la vitesse de bioréduction du Fe(III). La silice qui est injectée via le milieu de base arrive au point d'entrée de la colonne et se fixe directement sur la lépidocrocite. L'arrivée de silice étant continue, les oxydes de Fe(III) en bas de la colonne sont fortement saturés et les bactéries n'ont plus accès aux sites de surfaces. Il s'installe alors dans la colonne un gradient de silicates sorbés qui décroît avec la hauteur de la colonne. Cette observation est valable dans tous les essais où le milieu de base contient de la silice.

Colonne III : la colonne III est réalisée avec 1 mM de silice dans le milieu de base injectée dans la colonne. Les résultats montrent la présence à la base de la colonne d'une fraction qui est restée de couleur orange similaire aux essais précédents avec de la silice. Des analyses plus approfondies en microscopie électronique ont montré qu'il s'agissait effectivement de lépidocrocite résiduelle non réduite. Comme supposé précédemment, la présence de silice dans le milieu de base, se fixerait à l'entrée de la colonne, sur la lépidocrocite empêchant ainsi l'accès des bactéries aux sites de surface et donc sa réduction. D'autre part, l'autre minéral caractérisé est la magnétite. Il n'y a pas de trace de rouille verte, ni même de chukanovite qui pourrait témoigner de sa présence comme phase transitoire. La détermination du profil de concentration de silicates sorbés dans la

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

colonne par des méthodes spectroscopiques (e.g. Raman ou IR) est rendue difficile par des interférences dues à la présence de sable quartz (SiO_2).

Colonne IV : En présence de 2 mM de silice, le principal minéral secondaire caractérisé par diffraction aux rayons X est la rouille verte avec des résidus de lépidocrocite (**Figure 47**). Cela a été confirmé par microscopie électronique à transmission (**Figure 57**). La taille des cristaux de rouille verte parfaitement hexagonaux est entre 2 μm et 3 μm . Les cristaux de rouille verte sont recouverts de silice.

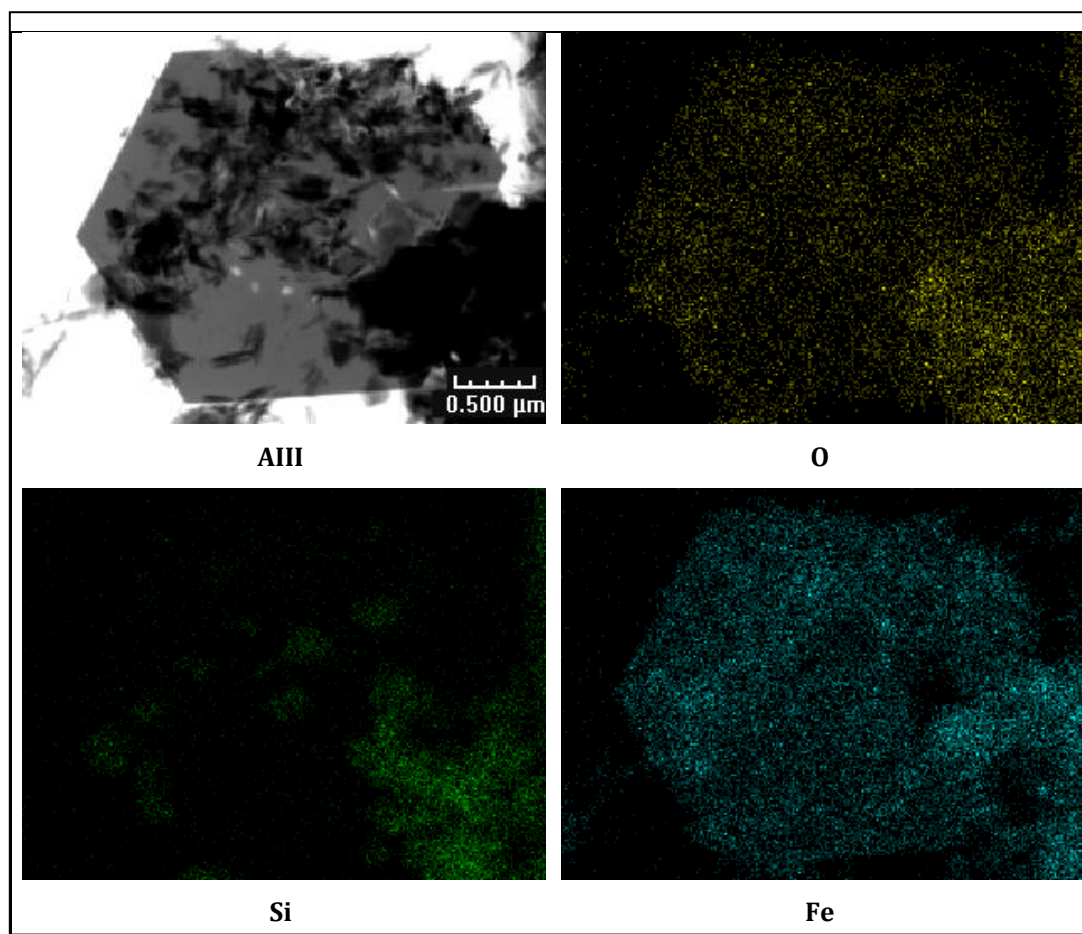


Figure 57 : Image STEM (*scanning transmission electronic microscopy*) de la composition chimique d'un cristal de rouille verte associé à de la silice pour le fragment A de la colonne IV (2 mM de Si)

Il semble dans le cas de cet essai avec 2 mM de silice que celle-ci joue un rôle favorable dans la formation de la rouille verte puisque c'est le principal minéral secondaire formé par la bioréduction de la lépidocrocite. De plus, il n'y a pas de magnétite détectée dans la colonne. Cependant en comparant les quantités de Fe par g de solide celles-ci sont 5 fois

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

inférieures à celles de la colonne I avec 0 mM de silicates. Cela suggère qu'une partie du Fe est sortie de la colonne. Ceci est également cohérent avec la concentration de Fe(II) aqueux en sortie de la colonne. La solubilité relative de la rouille verte par rapport à celle de la magnétite, et la production supposée forte de Fe(II) pourraient expliquer la percée de Fe(II) dissous.

En considérant les courbes de percée de Si, nous pouvons affirmer que la majeure partie de la silice est adsorbée sur les phases solides en colonne. Un gradient de silice adsorbée avec une concentration plus élevée au point d'entrée de colonne pourrait avoir lieu. Il est important de noter que l'adsorption des silicates sur les oxydes de fer est forte et n'atteint pas facilement un plateau de saturation (Rusch et al., 2010a; Sergent et al., 2011). Le silicate se fixe sur l'oxyde de fer via une réaction de complexation de sphère interne, et une polymérisation de Si se produit à forte concentration de silicate. Ceci explique pourquoi la limite de saturation n'est pas atteinte et pourquoi il est impossible de déterminer la capacité maximale d'adsorption. Dans notre cas ici, la quasi-totalité de Si est fixée sur la lépidocrocite en colonne quelle que soit la concentration injectée.

Par ailleurs, notre étude (chapitre I partie A) a montré que les silicates peuvent stabiliser la rouille verte et éviter sa transformation en magnétite. Ceci a été observé en batch dans des conditions plutôt favorables à la formation de magnétite (« LC »).

Nous pouvons également imaginer que l'adsorption des silicates pourrait inhiber la transformation de la lépidocrocite par le Fe(II) biogénéré par les bactéries, empêchant ainsi la formation des oxydes de fer plus cristallisés, donc moins réactifs (Pedersen et al., 2005; Yee et al., 2006; Sergent et al., 2011).

Bioréduction de la lépidocrocite par *Shewanella putrefaciens* dans un système soumis à un régime hydrodynamique

La **Figure 58** résume alors nos expériences en colonnes:

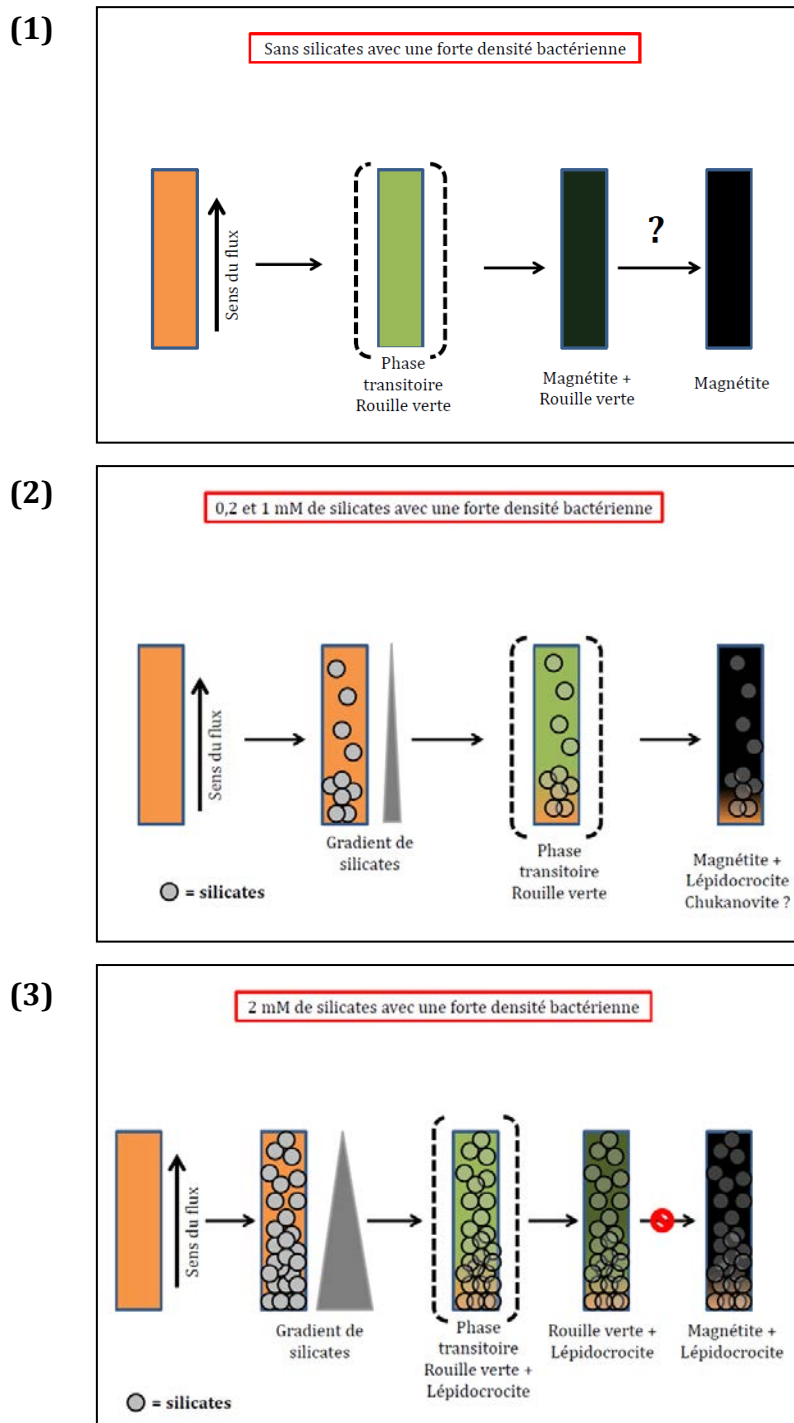


Figure 58 : Schéma conceptuel de l'effet des silicates en système de flux sur la bioréduction de la lépidocrocite par *Shewanella putrefaciens*

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

- (1) En absence de silice, la bioréduction de la lépidocrocite en présence d'une forte concentration en bactéries conduit à la formation de rouille verte (Zegeye et al., 2007). Cependant, le flux de la colonne mobilise le Fe(II) qui est en partie élué. Ceci pourrait créer un déficit en Fe(II) aqueux et conduire à la dissolution de la rouille verte et sa recristallisation en magnétite. De plus, le flux hydrodynamique semble avoir aussi lessivé une partie des bactéries.

- (2) Avec 0,2 et 1 mM de silice, la silice arrive au point d'entrée de la colonne. Une grande partie se fixe directement sur la lépidocrocite à la base de la colonne empêchant ou limitant sa réduction. D'autre part dans le reste de la colonne, la réduction de la lépidocrocite conduit (i) soit à la formation d'une phase intermédiaire de rouille verte mais celle-ci n'étant pas stabilisée, elle se transforme en chukanovite et magnétite, (ii) soit directement à la formation de magnétite. Les mécanismes qui conduisent à l'un ou à l'autre restent encore à élucider.

- (3) Avec une concentration de 2 mM de silice, la silice qui arrive au bas de la colonne se fixe sur la lépidocrocite empêchant sa réduction. Mais la concentration étant plus élevée, une partie de la silice arrive dans le haut de la colonne. La rouille verte qui a alors été formée par la bioréduction de la lépidocrocite par *Shewanella putrefaciens* est alors stabilisée empêchant sa dissolution et sa recristallisation en magnétite (**Figure 57**).

Il reste à comprendre pourquoi avec une concentration en silice de 0,2 et 1 mM, nous avons dans un cas et non dans l'autre de la chukanovite. La chukanovite serait un produit accompagnant la transformation de la rouille verte. Cependant, si le Fe(II) est lessivé par la colonne, la chukanovite ne peut se former. Zachara et al. (2002), ont travaillé sur la biominéralisation d'oxydes de Fe(III) tels que la ferrihydrite par des bactéries ferriréductrices afin de mettre en évidence les facteurs contrôlant la nature du minéral secondaire. Ils ont suggéré que la nature du minéral secondaire formé lors de la biominéralisation d'oxydes de Fe(III) dépendait de la concentration en Fe(II). Le minéral spécifique issu de la réduction microbienne du Fe(III) dépend de la l'état de

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

cristallisation de la phase initiale de l'hydroxyde, de la présence d'ions sorbés ou coprécipités, de la composition chimique de la solution en particulier de la concentration en Fe(II) (Zachara et al., 2002). Le processus de biominéralisation apparaît comme un processus indirecte où le Fe(II) biogénique catalyse la transformation à travers un processus de réaction de surface (complexation de surface, transfert d'électrons) avec la ferrihydrite résiduelle et des ions sorbés comme les phosphates PO_4^{3-} et carbonates HCO_3^- . Les produits issus de la biominéralisation sont sensibles à la concentration totale et au taux de production de Fe(II), au pH et sont influencés par la dissolution de l'oxyde de Fe(III). Nous pouvons donc facilement concevoir que l'instauration d'un flux dans la colonne, mobilisant le Fe(II) joue sur la formation du minéral secondaire.

Bioréduction de la lépidocrocite par Shewanella putrefaciens dans un système soumis à un régime hydrodynamique

V. CONCLUSION

Nous avons synthétisé et caractérisé la rouille verte carbonatée comme une phase minérale secondaire et finale dans un système en flux continu. Ainsi malgré son instabilité, la formation de cette rouille verte carbonatée à partir de lépidocrocite γ -FeOOH réduite par une forte densité cellulaire de *Shewanella putrefaciens* est donc possible dans un système en colonne soumis à un régime hydrodynamique.

Cette formation est avantagée par la présence d'une concentration importante (> 2 mM) d'acide silicique dans le milieu de base. En effet, nous avons montré l'impact positif que pouvait avoir la silice sur la formation et la stabilisation de la rouille verte. Cependant, la quantité de rouille verte produite reste encore faible dans le système en colonne, l'optimisation du système tient donc dans l'augmentation du taux de réduction du Fe(II) afin d'augmenter la quantité de rouille verte produites et de favoriser sa stabilisation. Le problème est, que si nous augmentons la quantité de silicates pour favoriser sa stabilisation, nous risquons de diminuer la quantité de rouille verte produites due à la sorbtion de silicates sur les oxydes de Fe(III).

Cette étude apporte donc des précisions pour la compréhension de la formation de la fougérite dans l'environnement où elle est associée à de la silice, des bactéries, le tout soumis à un régime hydrodynamique, mais aussi pour l'utilisation des rouilles vertes dans un processus industriel de dépollution des sols et des eaux à partir d'une colonne de sable.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

Ce travail visait d'une part à identifier les paramètres influençant la formation de la rouille verte plutôt que d'autres minéraux secondaires tels que la magnétite, en s'attachant aux paramètres tels que ceux que l'on peut rencontrer dans l'environnement naturel ou dans une colonne de sable. La finalité étant, à terme, d'une part de définir les conditions expérimentales à mettre en œuvre pour pouvoir produire une rouille verte par voie biologique dans les conditions les plus drastiques (sous flux, où on s'attend à ce que la rouille verte ne se maintienne pas) afin de pouvoir utiliser la rouille verte dans des systèmes de traitement d'effluents pollués tels que des réacteurs en colonnes de sable. D'autre part, il convenait d'évaluer la réactivité des rouilles vertes produites vis-à-vis de polluants organiques (rouge de méthyle) et métalliques (le mercure). En particulier, il s'agissait de s'assurer que la présence de certains facteurs comme la silice ou les polymères organiques, bactériens ou modèles, ne risquaient pas de bloquer ou « d'affaiblir » la capacité réactive des rouilles vertes vis-à-vis de contaminants.

Dans la première partie de ce manuscrit, nous avons travaillé sur la bioréduction de la lépidocrocite dans un système contenant de la silice (quartz ou silicates). Cette expérience avait pour but de se rapprocher des conditions environnementales (sols, sédiments) où les espèces silicatées (sable, argile, silice dissoute, etc....) sont prédominantes ou au moins largement présentes. De plus, le mélange oxyde de fer/sable peut constituer un milieu poreux idéal pour les expériences en colonne puisqu'il offre un système hydrauliquement conducteur, et chimiquement et structurellement stable. La formation de rouille verte dans un système de flux en colonne est donc intéressante à la fois d'un point de vue géochimique, mais aussi d'ingénierie environnementale.

Nous avons traité de l'influence de la silice sur la nature du minéral secondaire formé au cours de la bioréduction de la lépidocrocite par *Shewanella putrefaciens* dans un système fermé de type batch. Nous avons mis en évidence, l'impact « positif » que pouvait avoir la silice sous forme solide, le sable (quartz) SiO_2 et sous forme soluble, l'acide silicique H_4SiO_4 . Trois types de sable quartz ont été testés à différentes proportions (5 à 70 % wt). Les résultats ont montré que la nature des minéraux secondaires formés à l'issue de la

bioréduction de la lépidocrocite (γ -FeOOH) dépendait de la charge en quartz et de la taille des particules. Les essais montrent qu'une trop faible concentration d'acide silicique ($< 2 \text{ mM H}_4\text{SiO}_4$) conduit à la formation de magnétite, alors que des concentrations plus fortes sont associées à la formation de la rouille verte. Les fines particules de quartz favorisent la formation de rouille verte au dépend de la magnétite. Cet impact favorable de la silice pourrait s'expliquer par la sorption de silicates, issues de la dissolution du quartz, sur la surface de la lépidocrocite, ce qui limiterait l'accès des Fe(II) aux sites Fe(III) de la lépidocrocite favorisant ainsi la formation de rouille verte au dépend de la magnétite. D'autre part, l'interaction de la silice colloïdale (s'associant au Fe(II) pour former des polymères Fe-Si (Sergent et al., 2011) ou dissoute avec les faces latérales des cristaux de rouille verte néosynthétisés) pourrait stabiliser la rouille verte et empêcher sa dissolution et sa transformation en d'autres phases. Cette hypothèse est appuyée par les essais abiotiques montrant que la silice tout comme les cellules bactériennes ou le polymère anionique (PAA) limitent la transformation de la rouille verte carbonatée en magnétite. Enfin, les complexes physiques et la distribution chimique à la surface et dans les agrégats de phases minérales mixtes pourrait affecter les processus de diffusion des espèces et donc les processus de biominéralisation tel que cela a été suggéré par les travaux de Zegeye *et al.* (2010). La formation de microenvironnements où les concentrations en espèces chimiques (CO_3^{2-} , Fe^{2+} ,...) seraient plus importantes favoriseraient la formation de rouille verte au dépend de la magnétite.

Nous avons vu que les silicates et les polymères favoriseraient la formation de rouille verte carbonatée en la stabilisant et empêchant ainsi sa dissolution et sa recristallisation en de nouvelles espèces minérales. Cependant, la présence de ces oxyanions et de ces polymères diminue-t-elle la capacité réductrice de la rouille verte vis-à-vis des polluants organiques et métalliques ? Pour répondre à cette question nous avons testé l'effet des polymères et des silicates sur la réactivité vis-à-vis de deux polluants : le rouge de méthyle et le mercure Hg(II) (HgCl_2).

Nous avons comparé cette réactivité à celle du Fe(II) soluble et de la rouille verte synthétisée par voie chimique. Les résultats ont montré que le Fe(II) structural de la

rouille verte était plus réactif que le Fe(II) soluble confirmant la réactivité de la rouille verte vis-à-vis d'espèces oxydées. Concernant les deux types de rouille verte, chimique vs biologique, l'une stabilisée par des phosphates et l'autre par des silicates ou des polymères (synthétique ou bactériens), aucune différence significative sur la réduction de Hg(II) n'a pu être mise en évidence, indiquant que les composés « stabilisateurs » n'influencent pas la réactivité avec Hg(II). Par contre, il est apparu que la rouille verte biologique stabilisée par les bactéries ou les polymères était nettement moins réactive vis-à-vis du rouge de méthyle que la rouille verte « chimique ». Ces résultats ont été confirmés par la suite au cours des travaux de thèse en cours de Paul-Philippe Remy mais des investigations plus poussées sont nécessaires pour comprendre cette différence de réactivité. L'accès du polluant aux sites réactifs de la rouille verte pourrait être plus ou moins limité à cause des polymères et selon les propriétés du polluant (taille, charge,...). En extrapolant ces observations au milieu naturel, on peut s'attendre à ce que la réactivité de la fougérite, le minéral équivalent aux rouilles vertes, diffère selon la nature des polluants présents et selon la nature des espèces « stabilisantes » présentes dans son environnement.

Pour finir, nous avons transposé notre système étudié en première partie (en batch) dans un système en colonne. Le but de ce dernier chapitre était de tester la formation par *Shewanella putrefaciens* de la rouille verte carbonatée dans un système en colonne soumis à un régime hydraulique. Dans la littérature, la formation en flux par voie microbienne de la rouille verte comme minéral secondaire issue de la réduction d'un oxyde de Fe(III) n'a jamais été observée de manière significative (Roden et al., 2000; Hansel et al., 2003). Toute la difficulté ici était de mettre en place un système où coexistent des paramètres physico-chimiques et biologiques difficilement maîtrisables. Ces essais ont permis « d'affiner » et de détailler les paramètres et les difficultés rencontrées dans la mise en place d'un tel système. C'est la première fois que de la rouille verte carbonatée est observée et parfaitement caractérisée comme minéral secondaire issu de la bioréduction de la lépidocrocite dans un système soumis à un flux. Nous avons également testé l'impact des silicates sur la formation du minéral secondaire en colonne à partir de la réduction de lépidocrocite par *Shewanella putrefaciens*. Les silicates semblent jouer un rôle positif sur la formation de rouille verte dans la colonne.

Discussion générale

Ils ont le rôle de stabilisateur s'ils sont présents à des concentrations suffisantes (2 mM). Les silicates limitent également, même à faible concentration (0,2 mM), la réduction de la lépidocrocite probablement en bloquant l'accès des bactéries aux sites ferriques. La lépidocrocite, qui reste présente au point d'entrée de la colonne en fin d'expérience pour les essais avec des silicates renforce cette hypothèse.

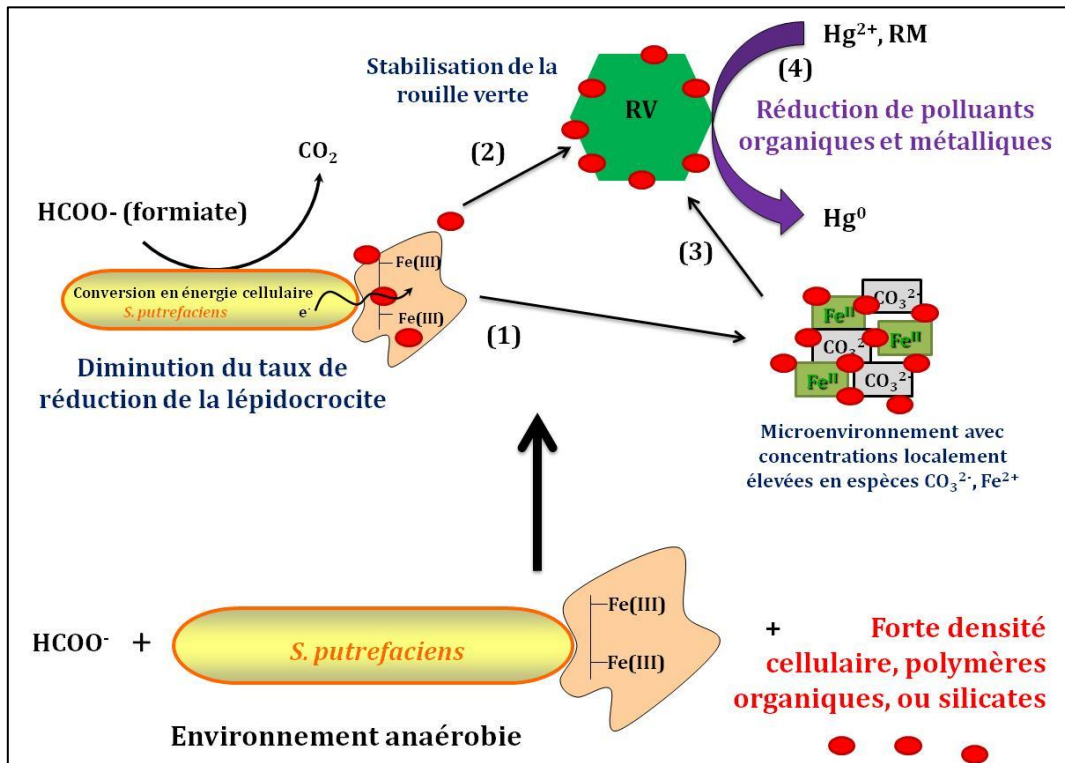


Figure 59 : Schéma récapitulatif des hypothèses de l'effet de la présence de silicates ou de polymères bactériens sur la bioréduction de la lépidocrocite par *Shewanella putrefaciens* et sur sa réactivité. Les ovales foncés représentent les silicates ou les polymères.

(1) Les polymères et les silicates peuvent se sorber à la surface de la lépidocrocite, limitant ainsi l'accès des bactéries aux sites ferriques limitant la vitesse de bioréduction favorable à la formation de rouille verte.

(2) Les silicates et les polymères peuvent, en se sorbant sur les faces latérales des cristaux de rouille verte, empêcher sa dissolution et sa recristallisation en d'autres minéraux tels que la magnétite.

(3) Les silicates et les polymères participent à la formation de microenvironnements où se concentrent des ions carbonates CO_3^{2-} et des ions Fe^{2+} , favorables à la formation de rouille verte.

(4) Réactivité de la rouille verte biologique avec des contaminants

Ces observations peuvent nous aider à mieux comprendre l'occurrence de la rouille verte (fougérite) dans les sols hydromorphes où coexistent espèces silicatées, matière organique et bactéries et expliquer les possibles voies de formation comme cela est illustré par la **Figure 59**. Elles apportent des éléments nouveaux dans la compréhension de la formation de rouille verte carbonatée par les microorganismes dans des sols anoxiques riches en silice. D'autre part, cela ouvre des perspectives nouvelles dans le traitement des sols et eaux pollués par la mise en place d'un système en colonne utilisant la réactivité de la rouille verte néoformée.

Il semblerait intéressant de poursuivre les études en colonnes en testant l'impact que pourraient avoir l'ajout de polymères synthétiques organiques tels que le PAA et le PAM (même si son effet est moindre) sur la biominéralisation de la lépidocrocite γ -FeOOH par *Shewanella putrefaciens*. De plus, il semble indispensable de qualifier et de quantifier précisément les bactéries et leur viabilité dans ce type de système au cours du temps d'expérience et d'effectuer des essais en présence de phosphate, qui permet le développement bactérien mais aussi la stabilisation de la rouille verte.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelmoula, M., Refait, P., Drissi, S.H., Mihe, J.P. and Genin, J.M.R. (1996). *Conversion electron mössbauer spectroscopy and x-ray diffraction studies of the formation of carbonate-containing green rust one by corrosion of metallic iron in NaHCO₃ and (NaHCO₃ + NaCl) solutions.* Corrosion Science, 38(4): 623-633.
- Abdelmoula, M., Trolard, F., Bourrie, G. and Genin, J.M.R. (1998). *Evidence for the Fe(II)-Fe(III) Green Rust "Fougerite" mineral occurrence in a hydromorphic soil and its transformation with depth.* Hyperfine Interactions, 112(1-4): 235-238.
- Abdul-Tehrani, H., Hudson, A.J., Chang, Y.S., Timms, A.R., Hawkins, C., Williams, J.M., Harrison, P.M., Guest, J.R. and Andrews, S.C. (1999). *Ferritin mutants of Escherichia coli are iron deficient and growth impaired, and fur mutants are iron deficient.* Journal of Bacteriology, 181(5): 1415-1428.
- Andrews, J.E., 2004. *An Introduction to Environmental Chemistry.* Blackwell Science.
- Bazylinski, D.A., Frankel, R.B. and Konhauser, K.O. (2007). *Modes of biomineralization of magnetite by microbes.* Geomicrobiology Journal, 24(6): 465-475.
- Beliaev, A.S., Saffarini, D.A., McLaughlin, J.L. and Hunnicutt, D. (2001). *MtrC, an outer membrane decahaem c cytochrome required for metal reduction in Shewanella putrefaciens MR-1.* Molecular Microbiology, 39(3): 722-730.
- Belleville, P., Jolivet, J.P., Tronc, E. and Livage, J. (1992). *Crystallization of ferric hydroxide into spinel by adsorption on colloidal magnetite.* Journal of Colloid And Interface Science, 150(2): 453-460.
- Benali, O., Abdelmoula, M., Refait, P. and Génin, J.-M.R. (2001). *Effect of orthophosphate on the oxidation products of Fe(II)-Fe(III) hydroxycarbonate: the transformation of green rust to ferrihydrite.* Geochimica et Cosmochimica Acta, 65(11): 1715-1726.
- Benner, S.G., Hansel, C.M., Wielinga, B.W., Barber, T.M. and Fendorf, S. (2002). *Reductive dissolution and biomineralization of iron hydroxide under dynamic flow conditions.* Environmental Science and Technology, 36(8): 1705-1711.
- Bergel, A. (2009). *Biofilms électro-actifs et production d'énergie.* Ecole thématique récurrente du CNRS : Microbiologie et physico-chimie des biofilms, LCPME.
- Bernal, J., Dasgupta, D. and Mackay, A. (1959). *The oxides and hydroxides of iron and their structural interrelationships.* Clay Miner. Bull., 4: 15-30.

Références bibliographiques

- Bernal, J.D., Dasgupta, D.R. and MacKay, A.L. **(1957)**. *Oriented transformations in iron oxides and hydroxides*. *Nature*, 180(4587): 645-647.
- Berthelin, J., Ona-Nguema, G., Stemmler, S., Quantin, C., Abdelmoula, M. and Jorand, F. **(2006)**. *Bioreduction of ferric species and biogenesis of green rusts in soils*. *Comptes Rendus - Geoscience*, 338(6-7): 447-455.
- Bocher, F., Géhin, A., Ruby, C., Ghanbaja, J., Abdelmoula, M. and Génin, J.M.R. **(2004)**. *Coprecipitation of Fe(II-III) hydroxycarbonate green rust stabilised by phosphate adsorption*. *Solid State Sciences*, 6(1): 117-124.
- Bond, D.L. and Fendorf, S. **(2003)**. *Kinetics and structural constraints of chromate reduction by green rusts*. *Environmental Science and Technology*, 37(12): 2750-2757.
- Borch, T., Kretzschmar, R., Kappler, A., Van Cappellen, P., Ginder-Vogel, M., Voegelin, A. and Campbell, K. **(2010)**. *Biogeochemical Redox Processes and their Impact on Contaminant Dynamics*. *Environmental Science & Technology*, 60: 3182-3191.
- Borch, T., Masue, Y., Kukkadapu, R.K. and Fendorf, S. **(2007)**. *Phosphate imposed limitations on biological reduction and alteration of ferrihydrite*. *Environmental Science and Technology*, 41(1): 166-172.
- Bourrié, G., Trolard, F., Jaffrezic, J.M.R.G., Maître, V. and Abdelmoula, M. **(1999)**. *Iron control by equilibria between hydroxy-Green Rusts and solutions in hydromorphic soils*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63(19-20): 3417-3427.
- Buchholz, A., Laskov, C. and Haderlein, S.B. **(2011)**. *Effects of Zwitterionic Buffers on Sorption of Ferrous Iron at Goethite and Its Oxidation by CCl₄*. *Environmental Science & Technology*, 45: 3355-3360.
- Caccavo, F., Lonergan, D.J., Lovley, D.R., Davis, M., Stolz, J.F. and McInerney, M.J. **(1994)**. *Geobacter Sulfurreducens Sp-Nov, a Hydrogen-Oxidizing and Acetate-Oxidizing Dissimilatory Metal-Reducing Microorganism*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(10): 3752-3759.
- Caccavo Jr, F., Schamberger, P.C., Keiding, K. and Nielsen, P.H. **(1997)**. *Role of hydrophobicity in adhesion of the dissimilatory FE(III)-reducing bacterium Shewanella alga to amorphous FE(III) oxide*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10): 3837-3843.
- Charlet, L., Scheinost, A.C., Tournassat, C., Greneche, J.M., Géhin, A., Fernández-Martínez, A., Coudert, S., Tisserand, D. and Brendle, J. **(2007)**. *Electron transfer at the mineral/water interface: Selenium reduction by ferrous iron sorbed on clay*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71(23): 5731-5749.

Références bibliographiques

- Christiansen, B.C., Balic-Zunic, T., Dideriksen, K. and Stipp, S.L.S. **(2009)**. *Identification of green rust in groundwater*. Environmental Science and Technology, 43(10): 3436-3441.
- Chun, C.L., Hozalski, R.M. and Arnold, W.A. **(2007)**. *Degradation of disinfection byproducts by carbonate green rust*. Environmental Science and Technology, 41(5): 1615-1621.
- Cornell, R.M. and Schwertmann, U., 2003. *The Iron Oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses*. Weinheim: Wiley-VCH.
- DiChristina, T.J., Moore, C.M. and Haller, C.A. **(2002)**. *Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction by Shewanella putrefaciens requires ferE, a homolog of the pulE (gspE) type II protein secretion gene*. Journal of Bacteriology, 184(1): 142-151.
- Doelsch, E., Rose, J., Masion, A., Bottero, J.Y., Nahon, D. and Bertsch, P.M. **(2000)**. *Speciation and crystal chemistry of iron(III) chloride hydrolyzed in the presence of SiO₄ ligands. 1. An Fe K-edge EXAFS study*. Langmuir, 16(10): 4726-4731.
- Dong, H., Fredrickson, J.K., Kennedy, D.W., Zachara, J.M., Kukkadapu, R.K. and Onstott, T.C. **(2000)**. *Mineral transformations associated with the microbial reduction of magnetite*. Chemical Geology, 169(3-4): 299-318.
- Drissi, S.H., Refait, P., Abdelmoula, M. and Génin, J.M.R. **(1995)**. *The preparation and thermodynamic properties of Fe(II)Fe(III) hydroxide-carbonate (green rust 1); Pourbaix diagram of iron in carbonate-containing aqueous media*. Corrosion Science, 37(12): 2025-2041.
- Duchaufour, P., 1998. *Handbook of pedology*. Handbook of pedology.
- Elsner, M., Schwarzenbach, R.P. and Haderlein, S.B. **(2004)**. *Reactivity of Fe(II)-bearing minerals toward reductive transformation of organic contaminants*. Environmental Science & Technology, 38(3): 799-807.
- Erbs, M., Hansen, H.C.B. and Olsen, C.E. **(1999)**. *Reductive dechlorination of carbon tetrachloride using iron(II) iron(III) hydroxide sulfate (green rust)*. Environmental Science and Technology, 33(2): 307-311.
- Erdoes, E. and Altorfer, H. **(1976)**. *Basic Ferrous Carbonate Resembling Malachite as a Product of Corrosion of Steel*. EIN DEM MALACHIT AEHNLICHES BASISCHES EISENKARBONAT ALS KORROSIONSPRODUKT VON STAHL., 27(5): 304-312.
- Estrade, N., Carignan, J. and Donard, O.F.X. **(2011)**. *Tracing and Quantifying Anthropogenic Mercury Sources in Soils of Northern France Using Isotopic Signatures*. Environmental Science & Technology, 45(4): 1235-1242.

Références bibliographiques

- Fadrus, H. and Maly, J. **(1975)**. *Suppression of iron(III) interference in the determination of iron(II) in water by the 1,10-phenanthroline method*. *The Analyst*, 100(1193): 549-554.
- Findlay, A.D., Thompson, D.W. and Tipping, E. **(1996)**. *The aggregation of silica and haematite particles dispersed in natural water samples*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 118(1-2): 97-105.
- Flemming, H.-C. and Wingender, J. **(2010)**. *The biofilm matrix*. *Nature Rev Microbiol*, 8: 623-633.
- Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Kennedy, D.W., Dong, H., Onstott, T.C., Hinman, N.W. and Li, S.-m. **(1998)**. *Biogenic iron mineralization accompanying the dissimilatory reduction of hydrous ferric oxide by a groundwater bacterium*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 62(19-20): 3239-3257.
- Gaber, H.M., Comfort, S.D., Shea, P.J. and Machecek, T.A. **(2002)**. *Metolachlor dechlorination by zerovalent iron during unsaturated transport*. *Journal of Environmental Quality*, 31(3): 962-969.
- Gaboriaud, F., Dague, E., Bailet, S., Jorand, F., Duval, J. and Thomas, F. **(2006)**. *Multiscale dynamics of the cell envelope of *Shewanella putrefaciens* as a response to pH change*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 52(2): 108-116.
- Gaboriaud, F. and Ehrhardt, J.J. **(2003)**. *Effects of different crystal faces on the surface charge of colloidal goethite (α -FeOOH) particles: An experimental and modeling study*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67(5): 967-983.
- Gabriel, M.C. and Williamson, D.G. **(2004)**. *Principal biogeochemical factors affecting the speciation and transport of mercury through the terrestrial environment*. *Environmental Geochemistry and Health*, 26(4): 421-434.
- Gehin, A., Ruby, C., Abdelmoula, M., Benali, O., Ghanbaja, J., Refait, P. and Genin, J.M.R. **(2002)**. *Synthesis of Fe(II-III) hydroxysulphate green rust by coprecipitation*. *Solid State Sciences*, 4(1): 61-66.
- Génin, J.-M.R., Aïssa, R., Géhin, A., Abdelmoula, M., Benali, O., Ernstsén, V., Ona-Nguema, G., Upadhyay, C. and Ruby, C. **(2005)**. *Fougerite and FeII-III hydroxycarbonate green rust; ordering, deprotonation and/or cation substitution; structure of hydrotalcite-like compounds and mythic ferrosic hydroxide $Fe(OH)(2+x)$* . *Solid State Sciences*, 7(5): 545-572.
- Génin, J.-M.R., Bourrié, G., Trolard, F., Abdelmoula, M., Jaffrezic, A., Refait, P., Maitre, V., Humbert, B. and Herbillon, A. **(1998)**. *Thermodynamic Equilibria in Aqueous Suspensions of Synthetic and Natural Fe(II)-Fe(III) Green Rusts: Occurrences of the*

Références bibliographiques

- Mineral in Hydromorphic Soils*. Environmental Science & Technology, 32(8): 1058-1068.
- Génin, J.M.R., Olowe, A.A., Refait, P. and Simon, L. **(1996)**. *On the stoichiometry and pourbaix diagram of Fe(II)-Fe(III) hydroxy-sulphate or sulphate-containing green rust 2: An electrochemical and Mössbauer spectroscopy study*. Corrosion Science, 38(10): 1751-1762.
- Gorby, Y.A., Yanina, S., McLean, J.S., Rosso, K.M., Moyles, D., Dohnalkova, A., Beveridge, T.J., Chang, I.S., Kim, B.H., Kim, K.S., Culley, D.E., Reed, S.B., Romine, M.F., Saffarini, D.A., Hill, E.A., Shi, L., Elias, D.A., Kennedy, D.W., Pinchuk, G., Watanabe, K., Ishii, S., Logan, B., Nealson, K.H. and Fredrickson, J.K. **(2006)**. *Electrically conductive bacterial nanowires produced by Shewanella oneidensis strain MR-1 and other microorganisms*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(30): 11358-11363.
- Gralnick, J.A. and Newman, D.K. **(2007)**. *Extracellular respiration*. Molecular Microbiology, 65(1): 1-11.
- Gram, L. **(1994)**. *Siderophore-mediated iron sequestering by Shewanella putrefaciens*. Applied and Environmental Microbiology, 60(6): 2132-2136.
- Hanna, K. **(2007)**. *Sorption of two aromatic acids onto iron oxides: Experimental study and modeling*. Journal of Colloid and Interface Science, 309(2): 419-428.
- Hanna, K., Kone, T. and Ruby, C. **(2009)**. *Fenton-like oxidation and mineralization of phenol using synthetic Fe(II)-Fe(III) green rusts*. Environmental Science and Pollution Research: 1-11.
- Hansel, C.M., Benner, S.G., Neiss, J., Dohnalkova, A., Kukkadapu, R.K. and Fendorf, S. **(2003)**. *Secondary mineralization pathways induced by dissimilatory iron reduction of ferrihydrite under advective flow*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 67(16): 2977-2992.
- Hansel, C.M., Benner, S.G., Nico, P. and Fendorf, S. **(2004)**. *Structural constraints of ferric (hydr)oxides on dissimilatory iron reduction and the fate of Fe(II)*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 68(15): 3217-3229.
- Hansen, H.C.B. **(1989)**. *Composition, stabilization, and light absorption of Fe(II)Fe(III) hydroxy-carbonate ('green rust')*. Clay Minerals, 24(4): 663-669.
- Hansen, H.C.B., Borggaard, O.K. and Sørensen, J. **(1994)**. *Evaluation of the free energy of formation of Fe(II)-Fe(III) hydroxide-sulphate (green rust) and its reduction of nitrite*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 58(12): 2599-2608.

Références bibliographiques

- Hansen, H.C.B., Guldborg, S., Erbs, M. and Bender Koch, C. **(2001)**. *Kinetics of nitrate reduction by green rusts-effects of interlayer anion and Fe(II) :Fe(III) ratio*. Applied Clay Science, 18(1-2): 81-91.
- Hansen, H.C.B. and Koch, C.B. **(1998)**. *Reduction of nitrate to ammonium by sulphate green rust: Activation energy and reaction mechanism*. Clay Minerals, 33(1): 87-101.
- Herbillon, A.J. **(2006)**. *Les hydroxydes ferrosiques, les rouilles vertes et la fougérite dans le cycle biogéochimique du fer*. Ferrosic hydroxides, green rusts and fougérite in the biogeochemical cycle of iron, 338(6-7): 393-401.
- Holt, H.M., Gahrn-Hansen, B. and Bruun, B. **(2005)**. *Shewanella algae and Shewanella putrefaciens: Clinical and microbiological characteristics*. Clinical Microbiology and Infection, 11(5): 347-352.
- Jambor, J. and Dutrizac, J. **(1998)**. *Occurrence and constitution of natural and synthetic ferrihydrite, a widespread iron oxyhydroxide*. Chemical reviews, 98(7): 2549-2585.
- Johnson, C.M., Beard, B.L., Klein, C., Beukes, N.J. and Roden, E.E. **(2008)**. *Iron isotopes constrain biologic and abiologic processes in banded iron formation genesis*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 72(1): 151-169.
- Jones, A.M., Collins, R.N., Rose, J. and Waite, T.D. **(2009)**. *The effect of silica and natural organic matter on the Fe(II)-catalysed transformation and reactivity of Fe(III) minerals*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 73(15): 4409-4422.
- Jorand, F., Appenzeller, B.M.R., Abdelmoula, M., Refait, P., Block, J.C. and Gá©nin, J.M.R. **(2000)**. *Assessment of vivianite formation in Shewanella putrefaciens culture*. Environmental Technology, 21(9): 1001-1005.
- Jorand, F., Zegeye, A., Ghanbaja, J. and Abdelmoula, M. **(2011)**. *The formation of green rust induced by tropical river biofilm components*. Science of the Total Environment, 409(13): 2586-2596.
- Jorand, F., Zegeye, A., Landry, F. and Ruby, C. **(2007)**. *Reduction of ferric green rust by Shewanella putrefaciens*. Letters in Applied Microbiology, 45(5): 515-521.
- Jorand, F., Zegeye, A. and Lartiges, B. **(2009)**. *Influence of bacterial cell bodies and organic polymers on the secondary mineral formation (green-rust vs magnetite) from gamma-FeOOH bioreduction*. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 73(13): A605-A605.

Références bibliographiques

- Khalid, A., Arshad, M. and Crowley, D.E. **(2008)**. *Accelerated decolorization of structurally different azo dyes by newly isolated bacterial strains*. Applied Microbiology and Biotechnology, 78(2): 361-369.
- Kim, S.B., Park, S.J., Lee, C.G., Choi, N.C. and Kim, D.J. **(2008a)**. *Bacteria transport through goethite-coated sand: Effects of solution pH and coated sand content*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 63(2): 236-242.
- Kim, S.B., Park, S.J., Lee, C.G. and Kim, H.C. **(2008b)**. *Transport and retention of Escherichia coli in a mixture of quartz, Al-coated and Fe-coated sands*. Hydrological Processes, 22(18): 3856-3863.
- Kobayashi, M., Juillerat, F., Galletto, P., Bowen, P. and Borkovec, M. **(2005)**. *Aggregation and charging of colloidal silica particles: Effect of particle size*. Langmuir, 21(13): 5761-5769.
- Koch, C.B. and Morup, S. **(1991)**. *Identification of Green Rust in an Ochre Sludge*. Clay Minerals, 26(4): 577-582.
- Kone, T., Hanna, K., Abdelmoula, M., Ruby, C. and Carteret, C. **(2009)**. *Reductive transformation and mineralization of an azo dye by hydroxysulphate green rust preceding oxidation using H₂O₂ at neutral pH*. Chemosphere, 75(2): 212-219.
- Konhauser, K., 2009. Introduction to Geomicrobiology. John Wiley & Sons.
- Konhauser, K., Schultze-Lam, S., Ferris, F., Fyfe, W., Longstaffe, F. and Beveridge, T. **(1994)**. *Mineral Precipitation by Epilithic Biofilms in the Speed River, Ontario, Canada*. Appl. Environ. Microbiol., 60: 549-553.
- Korenevsky, A.A., Vinogradov, E., Gorby, Y. and Beveridge, T.J. **(2002)**. *Characterization of the lipopolysaccharides and capsules of Shewanella spp.* Applied and Environmental Microbiology, 68(9): 4653-4657.
- Krack, S., Fortin, D., Chatellier, X. and Daughney, C. **(2007)**. *Effect of growth phase and metabolic activity on the adhesion of Escherichia coli K-12 AB264 to quartz and lepidocrocite*. Geomicrobiology Journal, 24(3-4): 179-187.
- Kritee, K., Blum, J.D., Johnson, M.W., Bergquist, B.A. and Barkay, T. **(2007)**. *Mercury stable isotope fractionation during reduction of Hg(II) to Hg(0) by mercury resistant microorganisms*. Environmental Science & Technology, 41(6): 1889-1895.
- Kukkadapu, R.K., Zachara, J.M., Fredrickson, J.K. and Kennedy, D.W. **(2004)**. *Biotransformation of two-line silica-ferrihydrite by a dissimilatory Fe(III)-reducing*
-

Références bibliographiques

- bacterium: Formation of carbonate green rust in the presence of phosphate. Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68(13): 2799-2814.
- Kukkadapu, R.K., Zachara, J.M., Fredrickson, J.K., Kennedy, D.W., Dohnalkova, A.C. and McCready, D.E. **(2005)**. *Ferrous hydroxy carbonate is a stable transformation product of biogenic magnetite. American Mineralogist*, 90(2-3): 510-515.
- Kukkadapu, R.K., Zachara, J.M., Fredrickson, J.K., Smith, S.C., Dohnalkova, A.C. and Russell, C.K. **(2003)**. *Transformation of 2-line ferrihydrite to 6-line ferrihydrite under oxic and anoxic conditions. American Mineralogist*, 88(11-12 PART 2): 1903-1914.
- Kwon, S.K., Kimijima, K., Kanie, K., Suzuki, S., Muramatsu, A., Saito, M., Shinoda, K. and Waseda, Y. **(2007)**. *Influence of silicate ions on the formation of goethite from green rust in aqueous solution. Corrosion Science*, 49(7): 2946-2961.
- Larese-Casanova, P., Haderlein, S.B. and Kappler, A. **(2010)**. *Bio-mineralization of lepidocrocite and goethite by nitrate-reducing Fe(II)-oxidizing bacteria: Effect of pH, bicarbonate, phosphate, and humic acids. Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 74(13): 3721-3734.
- Legrand, L., Abdelmoula, M., Géhin, A., Chaussé, A. and Génin, J.M.R. **(2001a)**. *Electrochemical formation of a new Fe(II)-Fe(III) hydroxy-carbonate green rust: Characterization and morphology. Electrochimica Acta*, 46(12): 1815-1822.
- Legrand, L., Mazerolles, L. and Chausse, A. **(2004)**. *The oxidation of carbonate green rust into ferric phases: Solid-state reaction or transformation via solution. Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68(17): 3497-3507.
- Legrand, L., Sagon, G., Lecomte, S., Chausse, A. and Messina, R. **(2001b)**. *A Raman and infrared study of a new carbonate green rust obtained by electrochemical way. Corrosion Science*, 43(9): 1739-1749.
- Legrand, L., Savoye, S., Chausse, A. and Messina, R. **(2000)**. *Study of oxidation products formed on iron in solutions containing bicarbonate/carbonate. Electrochimica Acta*, 46(1): 111-117.
- Li, Y., Zhu, S. and Deng, K. **(2011)**. *Mössbauer hyperfine parameters of iron species in the course of Geobacter-mediated magnetite mineralization Phys. Chem. Minerals*, 38: 701-708.
- Liang, X. and Butler, E.C. **(2010)**. *Effects of natural organic matter model compounds on the transformation of carbon tetrachloride by chloride green rust. Water Research*, 44(7): 2125-2132.

Références bibliographiques

- Little, B., Wagner, P., Hart, K., Ray, R., Lavoie, D., Nealson, K. and Aguilar, C. **(1998)**. *The role of biomineralization in microbiologically influenced corrosion*. Biodegradation, 9(1): 1-10.
- Liu, C., Kota, S., Zachara, J.M., Fredrickson, J.K. and Brinkman, C.K. **(2001)**. *Kinetic analysis of the bacterial reduction of goethite*. Environmental Science and Technology, 35(12): 2482-2490.
- Lovley, D.R. **(1997)**. *Microbial Fe(III) reduction in subsurface environments*. FEMS Microbiology Reviews, 20(3-4): 305-313.
- Lovley, D.R. and Phillips, E.J.P. **(1987)**. *Rapid Assay for Microbially Reducible Ferric Iron in Aquatic Sediments*. Applied and Environmental Microbiology, 53.
- Loyaux-Lawniczak, S., Refait, P., Ehrhardt, J.J., Lecomte, P. and GÃ©nin, J.M.R. **(2000)**. *Trapping of Cr by formation of ferrihydrite during the reduction of chromate ions by Fe(II)-Fe(III) hydroxysalt green rusts*. Environmental Science and Technology, 34(3): 438-443.
- Mayer, T.D. and Jarrell, W.M. **(1996)**. *Formation and stability of iron(II) oxidation products under natural concentrations of dissolved silica*. Water Research, 30(5): 1208-1214.
- Misawa, T., Hashimoto, K. and Shimodaira, S. **(1974)**. *The mechanism of formation of iron oxide and oxyhydroxides in aqueous solutions at room temperature*. Corrosion Science, 14(2): 131-149.
- Myers, C.R. and Myers, J.M. **(1992a)**. *Fumarate reductase is a soluble enzyme in anaerobically grown Shewanella putrefaciens MR-1*. FEMS Microbiology Letters, 98(1-3): 13-19.
- Myers, C.R. and Myers, J.M. **(1992b)**. *Localization of cytochromes to the outer membrane of anaerobically grown Shewanella putrefaciens MR-1*. Journal of Bacteriology, 174(11): 3429-3438.
- Myers, C.R. and Myers, J.M. **(1997)**. *Outer membrane cytochromes of Shewanella putrefaciens MR-1: Spectral analysis, and purification of the 83-KDa c-type cytochrome*. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, 1326(2): 307-318.
- Myers, C.R. and Nealson, K.H. **(1988)**. *Microbial reduction of manganese oxides: Interactions with iron and sulfur*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 52(11): 2727-2732.

Références bibliographiques

- Myneni, S.C.B., Tokunaga, T.K. and Brown Jr, G.E. **(1997)**. *Abiotic selenium redox transformations in the presence of Fe(II,III) oxides*. Science, 278(5340): 1106-1109.
- Napper, D. **(1983)**. *Polymeric Stabilization of Colloidal Dispersions*. Academic Press London, UK.
- Nealson, K.H. and Saffarini, D. **(1994)**. *Iron and manganese in anaerobic respiration: Environmental significance, physiology, and regulation*. Annual Review of Microbiology, 48: 311-343.
- Nriagu, J.O. **(1972)**. *Stability of vivianite and ion-pair formation in the system $Fe_3(PO_4)_2 \cdot H_3PO_4 \cdot H_2O$* . Geochimica et Cosmochimica Acta, 34: 459-470.
- O'Loughlin, E.J. and Burris, D.R. **(2004)**. *Reduction of halogenated ethanes by green rust*. Environmental Toxicology and Chemistry, 23(1): 41-48.
- O'Loughlin, E.J., Gorski, C.A., Scherer, M.M., Boyanov, M.I. and Kemner, K.M. **(2010)**. *Effects of Oxyanions, Natural Organic Matter, and Bacterial Cell Numbers on the Bioreduction of Lepidocrocite (γ -FeOOH) and the Formation of Secondary Mineralization Products*. Environmental Science & Technology, 44(12): 4570-4576.
- O'Loughlin, E.J., Kelly, S.D., Cook, R.E., Csencsits, R. and Kemner, K.M. **(2003a)**. *Reduction of uranium(VI) by mixed iron(II)/iron(III) hydroxide (green rust): Formation of UO₂ nanoparticles*. Environmental Science and Technology, 37(4): 721-727.
- O'Loughlin, E.J., Kelly, S.D., Kemner, K.M., Csencsits, R. and Cook, R.E. **(2003b)**. *Reduction of AgI, AuIII, CuII, and Hg II by FeII/FeIII hydroxysulfate green rust*. Chemosphere, 53(5): 437-446.
- O'Loughlin, E.J., Larese-Casanova, P., Scherer, M. and Cook, R. **(2007)**. *Green rust formation from the bioreduction of γ -FeOOH (Lepidocrocite): Comparison of several Shewanella species*. Geomicrobiology Journal, 24(3-4): 211-230.
- Olowe, A.A., Bauer, P., Genin, J.M.R. and Guezennec, J. **(1989)**. *Moessbauer effect evidence of the existence of Green Rust 2 transient compound from bacterial corrosion in marine sediments*. Corrosion, 45(3): 229-235.
- Olowe, A.A., Benbouzid-Rollet, N.D., Genin, J.M.R., Prieur, D., Confente, M. and Resiak, B. **(1992)**. *The simultaneous presence of green rust 2 and sulphate-reducing bacteria in the drilling corrosion of steel piles in a harbour. Le presence simultanée de rouille verte 2 et de bactéries sulfato-réductrices en corrosion perforante de palplanches en zone portuaire*, 314(11): 1157-1163.

- Olowe, A.A. and Génin, J.M.R. **(1991)**. *The mechanism of oxidation of ferrous hydroxide in sulphated aqueous media: Importance of the initial ratio of the reactants*. Corrosion Science, 32(9): 965-984.
- Ona-Nguema, G., 2003. Biogenèse d'hydroxysels mixtes Fe(II-III) de type rouille verte en culture de *Shewanella putrefaciens*. Thèse de doctorat Thesis, Université Henri Poincaré, Nancy I, France.
- Ona-Nguema, G., Abdelmoula, M., Jorand, F., Benali, O., GÃ©hin, A., Block, J.C. and GÃ©nin, J.M.R. **(2002a)**. *Iron(II,III) hydroxycarbonate green rust formation and stabilization from lepidocrocite bioreduction*. Environmental Science and Technology, 36(1): 16-20.
- Ona-Nguema, G., Benali, O., Jorand, F., Abdelmoula, M. and Génin, J. **(2002b)**. *Key role of the kinetic of γ -FeOOH on the formation of Fe(II)-Fe(III) minerals*. Proc. of the International Conference on the Application of the Mossbauer Effect. Hyperfine Interact (C), 5: 415-418.
- Pantke, C., Obst, M., Benzerara, K., Morin, G., Ona-Nguema, G., Dippon, U. and Kappler, A. **(2012)**. *Green Rust Formation during Fe(II) Oxidation by the Nitrate-Reducing Acidovorax sp Strain BoFeN1*. Environmental Science & Technology, 46(3): 1439-1446.
- Park, S.-J., Lee, C.-G. and Kim, S.-B. **(2009)**. *The role of phosphate in bacterial interaction with iron-coated surfaces*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 68(1): 79-82.
- Pedersen, H.D., Postma, D., Jakobsen, R. and Larsen, O. **(2005)**. *Fast transformation of iron oxyhydroxides by the catalytic action of aqueous Fe(II)*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 69(16): 3967-3977.
- Pekov, I.V., Perchiazzi, N., Merlino, S., Kalavchev, V.N., Merlini, M. and Zadov, A.E. **(2007)**. *Chukanovite, Fe₂(CO₃)(OH)₂, a new mineral from the weathered iron meteorite Dronino*. European Journal of Mineralogy, 19(6): 891-898.
- Phillips, D.H., Watson, D.B., Roh, Y. and Gu, B. **(2003)**. *Mineralogical characteristics and transformations during long-term operation of a zerovalent iron reactive barrier*. Journal of Environmental Quality, 32(6): 2033-2045.
- Pineau, S., Sabot, R., Quillet, L., Jeannin, M., Caplat, C., Dupont-Morrall, I. and Refait, P. **(2008)**. *Formation of the Fe(II-III) hydroxysulphate green rust during marine corrosion of steel associated to molecular detection of dissimilatory sulphite-reductase*. Corrosion Science, 50(4): 1099-1111.

Références bibliographiques

- Refait, P., Abdelmoula, M. and Genin, J.M.R. **(1998)**. *Mechanisms of formation and structure of green rust one in aqueous corrosion of iron in the presence of chloride ions*. Corrosion Science, 40(9): 1547-1560.
- Refait, P., Memet, J.B., Bon, C., Sabot, R. and Genin, J.M.R. **(2003)**. *Formation of the Fe(II)-Fe(III) hydroxysulphate green rust during marine corrosion of steel*. Corrosion Science, 45(4): 833-845.
- Refait, P., Reffass, M., Landoulsi, J., Sabot, R. and Jeannin, M. **(2007)**. *Role of phosphate species during the formation and transformation of the Fe(II-III) hydroxycarbonate green rust*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 299(1-3): 29-37.
- Refait, P., Simon, L. and Genin, J.M.R. **(2000)**. *Reduction of SeO_4^{2-} anions and anoxic formation of iron(II) - Iron(III) hydroxy-selenate green rust*. Environmental Science and Technology, 34(5): 819-825.
- Rémazeilles, C. and Refait, P. **(2009)**. *Fe(II) hydroxycarbonate $Fe_2(OH)_2CO_3$ (chukanovite) as iron corrosion product: Synthesis and study by Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. Polyhedron, 28(4): 749-756.
- Remy, P., Sergent, A.S., Jorand, F. and Hanna, K., 2012. Comparative reduction kinetics of both organic and inorganic pollutants (methyl red and Hg(II)) by chemically synthesized and biomineralized Fe(II)-Fe(III) green rusts. 7th International Conference Interfaces Against Pollution, Prague.
- Roberts, J.A., Fowle, D.A., Hughes, B.T. and Kulczycki, E. **(2006)**. *Attachment behavior of *Shewanella putrefaciens* onto magnetite under aerobic and anaerobic conditions*. Geomicrobiology Journal, 23(8): 631-640.
- Roden, E.E. and Urrutia, M.M. **(1999)**. *Ferrous iron removal promotes microbial reduction of crystalline iron(III) oxides*. Environmental Science and Technology, 33(11): 1847-1853.
- Roden, E.E., Urrutia, M.M. and Mann, C.J. **(2000)**. *Bacterial Reductive Dissolution of Crystalline Fe(III) Oxide in Continuous-Flow Column Reactors*. Appl. Environ. Microbiol., 66(3): 1062-1065.
- Roden, E.E. and Zachara, J.M. **(1996)**. *Microbial reduction of crystalline iron(III) oxides: Influence of oxide surface area and potential for cell growth*. Environmental Science and Technology, 30(5): 1618-1628.
- Roh, Y., Zhang, C.L., Vali, H., Lauf, R.J., Zhou, J. and Phelps, T.J. **(2003)**. *Biogeochemical and environmental factors in Fe biomineralization: Magnetite and siderite formation*. Clays and Clay Minerals, 51(1): 83-95.

Références bibliographiques

- Ruby, C., Aïssa, R., Géhin, A., Cortot, J., Abdelmoula, M. and Génin, J.-M. **(2006a)**. *Green rusts synthesis by coprecipitation of FeII-FeIII ions and mass-balance diagram*. Comptes Rendus Geosciences, 338(6-7): 420-432.
- Ruby, C., Géhin, A., Aïssa, R., Ghanbaja, J., Abdelmoula, M. and Génin, J.M.R. **(2006b)**. *Chemical stability of hydroxysulphate green rust synthesised in the presence of foreign anions: Carbonate, phosphate and silicate*. Hyperfine Interactions, 167(1-3): 803-807.
- Rusch, B., Hanna, K. and Humbert, B. **(2010a)**. *Coating of quartz silica with iron oxides: Characterization and surface reactivity of iron coating phases*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 353(2-3): 172-180.
- Rusch, B., Hanna, K. and Humbert, B. **(2010b)**. *Sorption and transport of salicylate in a porous heterogeneous medium of silica quartz and goethite*. Environmental Science and Technology, 44(7): 2447-2453.
- Ryan, J.N. and Gschwend, P.M. **(1994)**. *Effect of solution chemistry on clay colloid release from an iron oxide-coated aquifer sand*. Environmental Science and Technology, 28(9): 1717-1726.
- Salas, E.C., Berelson, W.M., Hammond, D.E., Kampf, A.R. and Nealson, K.H. **(2009)**. *The influence of carbon source on the products of dissimilatory iron reduction*. Geomicrobiology Journal, 26(7): 451-462.
- Salas, E.C., Berelson, W.M., Hammond, D.E., Kampf, A.R. and Nealson, K.H. **(2010)**. *The impact of bacterial strain on the products of dissimilatory iron reduction*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 74(2): 574-583.
- Scheidegger, A., Borkovec, M. and Sticher, H. **(1993)**. *Coating of silica sand with goethite: preparation and analytical identification*. Geoderma, 58(1-2): 43-65.
- Schwertmann, U. and Fechter, H. **(1994)**. *The formation of green rust and its transformation to lepidocrocite*. Clay Minerals, 29(1): 87-92.
- Schwertmann, U. and Taylor, R.M. **(1989)**. *Iron oxides*.
- Scott, J.H. and Nealson, K.H. **(1994)**. *A biochemical study of the intermediary carbon metabolism of Shewanella putrefaciens*. Journal of Bacteriology, 176(11): 3408-3411.
- Sergent, A.S., Jorand, F. and Hanna, K. **(2011)**. *Effects of Si-bearing minerals on the nature of secondary iron mineral products from lepidocrocite bioreduction*. Chemical Geology, 289(1-2): 86-97.

Références bibliographiques

- Simon, L., François, M., Refait, P., Renaudin, G., Lelaurain, M. and Gélénin, J.M.R. **(2003)**. *Structure of the Fe(II-III) layered double hydroxysulphate green rust two from Rietveld analysis*. Solid State Sciences, 5(2): 327-334.
- Stampfl, P.P. **(1969)**. *Ein basisches eisen-II-III-karbonat in rost*. Corrosion Science, 9(3): 185-187.
- Stolz, A. **(2001)**. *Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes*. Applied Microbiology and Biotechnology, 56(1-2): 69-80.
- Stumm, W. and Sulzberger, B. **(1992)**. *The cycling of iron in natural environments: Considerations based on laboratory studies of heterogeneous redox processes*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 56(8): 3233-3257.
- Su, C. and Wilkin, R.T., 2006. Arsenate and arsenite sorption on and arsenite oxidation by iron(II, III) hydroxycarbonate green rust, ACS Symposium Series, pp. 25-40.
- Sumoondur, A., Shaw, S., Ahmed, I. and Benning, L.G. **(2008)**. *Green rust as a precursor for magnetite: An in situ synchrotron based study*. Mineralogical Magazine, 72(1): 201-204.
- Swietlik, J., Raczyk-Stanislawiak, U., Piszora, P. and Nawrocki, J. **(2012)**. *Corrosion in drinking water pipes: The importance of green rusts*. Water Research, 46(1): 1-10.
- Taillefert, M., Beckler, J.S., Carey, E., Burns, J.L., Fennessey, C.M. and DiChristina, T.J. **(2007)**. *Shewanella putrefaciens produces an Fe(III)-solubilizing organic ligand during anaerobic respiration on insoluble Fe(III) oxides*. Journal of Inorganic Biochemistry, 101(11-12): 1760-1767.
- Tamura, Y. **(1985)**. *Ferrite formation from the intermediate, green rust II, in the transformation reaction of \hat{I}^3 -FeO(OH) in aqueous suspension*. Inorganic Chemistry, 24(25): 4363-4366.
- Tamura, Y., Ito, K. and Katsura, T. **(1983)**. *Transformation of γ -FeO(OH) to Fe_3O_4 by adsorption of iron(II) ion on γ -FeO(OH)*. Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions(2): 189-194.
- Trolard, F., Abdelmoula, M., Bourrié, G., Humbert, B. and Gélénin, J.M.R. **(1996)**. *Evidence of the occurrence of a "Green Rusts" component in hydromorphic soils. Proposition of the existence of a new mineral: "fougerite"*. Mise en Évidence d'un constituant de type rouilles vertes dans les sols hydromorphes, Proposition de l'existence d'un nouveau minéral: La fougerite, 323(12): 1015-1022.

Références bibliographiques

- Trolard, F., Bourrie, G., Abdelmoula, M., Refait, P. and Feder, F. **(2007)**. *Fougerite, a new mineral of the pyroaurite-iowaite group: Description and crystal structure*. Clays and Clay Minerals, 55(3): 323-334.
- Trolard, F., Génin, J.M.R., Abdelmoula, M., Bourrié, G., Humbert, B. and Herbillon, A. **(1997)**. *Identification of a green rust mineral in a reductomorphic soil by Mossbauer and Raman spectroscopies*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 61(5): 1107-1111.
- Tronc, E., Belleville, P., Jolivet, J. P., Livage and J, 1992. Transformation of ferric hydroxide into spinel by Fe[II] adsorption, 8. American Chemical Society, Washington, DC, ETATS-UNIS.
- Turick, C.E., Tisa, L.S. and Caccavo, F. **(2002)**. *Melanin production and use as a soluble electron shuttle for Fe(III) oxide reduction and as a terminal electron acceptor by Shewanella algae BrY*. Applied and Environmental Microbiology, 68(5): 2436-2444.
- Urrutia, M.M., Roden, E.E., Fredrickson, J.K. and Zachara, J.M. **(1998)**. *Microbial and surface chemistry controls on reduction of synthetic Fe(III) oxide minerals by the dissimilatory iron-reducing bacterium*. Geomicrobiology Journal, 15(4): 269-291.
- van der Zee, C., Roberts, D.R., Rancourt, D.G. and Slomp, C.P. **(2003)**. *Nanogoethite is the dominant reactive oxyhydroxide phase in lake and marine sediments*. Geology, 31(11): 993-996.
- Venkateswaran, K., Moser, D.P., Dollhopf, M.E., Lies, D.P., Saffarini, D.A., MacGregor, B.J., Ringelberg, D.B., White, D.C., Nishijima, M., Sano, H., Burghardt, J., Stackebrandt, E. and Nealson, K.H. **(1999)**. *Polyphasic taxonomy of the genus Shewanella and description of Shewanella oneidensis sp. nov.* International Journal of Systematic Bacteriology, 49(2): 705-724.
- Wang, H.D., White, G.N., Turner, F.T. and Dixon, J.B. **(1993)**. *Ferrihydrite, lepidocrocite, and goethite in coatings from east Texas vertic soils*. Soil Science Society of America Journal, 57(5): 1381-1386.
- Weber, K.A., Achenbach, L.A. and Coates, J.D. **(2006)**. *Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction*. Nature Reviews Microbiology, 4(10): 752-764.
- Wiatrowski, H.A., Das, S., Kukkadapu, R., Ilton, E.S., Barkay, T. and Yee, N. **(2009)**. *Reduction of Hg(II) to Hg(0) by Magnetite*. Environmental Science & Technology, 43(14): 5307-5313.

Références bibliographiques

- Wiatrowski, H.A., Ward, P.M. and Barkay, T. **(2006)**. *Novel reduction of mercury(II) by mercury-sensitive dissimilatory metal reducing bacteria*. Environmental Science and Technology, 40(21): 6690-6696.
- Woese, C.R., Weisburg, W.G. and Hahn, C.M. **(1985)**. *The phylogeny of purple bacteria: The gamma subdivision*. Systematic and Applied Microbiology, 6(1): 25-33.
- Yee, N., Shaw, S., Benning, L.G. and Nguyen, T.H. **(2006)**. *The rate of ferrihydrite transformation to goethite via the Fe(II) pathway*. American Mineralogist, 91(1): 92-96.
- Zachara, J.M., Kukkadapu, R.K., Fredrickson, J.K., Gorby, Y.A. and Smith, S.C. **(2002)**. *Bio-mineralization of poorly crystalline Fe(III) oxides by dissimilatory metal reducing bacteria (DMRB)*. Geomicrobiology Journal, 19(2): 179-207.
- Zachara, J.M., Kukkadapu, R.K., Peretyazhko, T., Bowden, M., Wang, C.M., Kennedy, D.W., Moore, D. and Arey, B. **(2011)**. *The mineralogic transformation of ferrihydrite induced by heterogeneous reaction with bio-reduced anthraquinone disulfonate (AQDS) and the role of phosphate*. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 75(21): 6330-6349.
- Zegeye, A., Abdelmoula, M., Usman, M., Hanna, K. and Ruby, C. **(2011)**. *In situ monitoring of lepidocrocite bio-reduction and magnetite formation by reflection Mossbauer spectroscopy*. American Mineralogist, 96(8-9): 1410-1413.
- Zegeye, A., Mustin, C. and Jorand, F. **(2010)**. *Bacterial and iron oxide aggregates mediate secondary iron mineral formation: Green rust versus magnetite*. Geobiology, 8(3): 209-222.
- Zegeye, A., Ona-Nguema, G., Carteret, C., Huguet, L., Abdelmoula, M. and Jorand, F. **(2005)**. *Formation of hydroxysulphate green rust 2 as a single iron(II-III) mineral in microbial culture*. Geomicrobiology Journal, 22(7-8): 389-399.
- Zegeye, A., Ruby, C. and Jorand, F. **(2007)**. *Kinetic and thermodynamic analysis during dissimilatory γ -FeOOH reduction: Formation of green rust 1 and magnetite*. Geomicrobiology Journal, 24(1): 51-64.

ANNEXES

ANNEXE I: « SUPPLEMENTARY INFORMATION » CHAPITRE I PARTIE B

Supplementary information

Contribution of anionic vs neutral polymers to the formation of green rust 1 from γ -FeOOH bioreduction

Jorand FPA^{1*}, Sergent A-S¹, Remy P-Ph¹, Bihannic I², Ghanbaja J³, Lartiges B⁴, Hanna K⁵, Zegeye A¹

¹*Université de Lorraine, LCPME, UMR 7564 CNRS-University of Lorraine (UHP), 405 rue de Vandœuvre, F-54600 Villers-lès-Nancy, France*

²*CNRS, LEM, UMR 7569 CNRS-University of Lorraine (INPL), 15 avenue du Charmois, F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France*

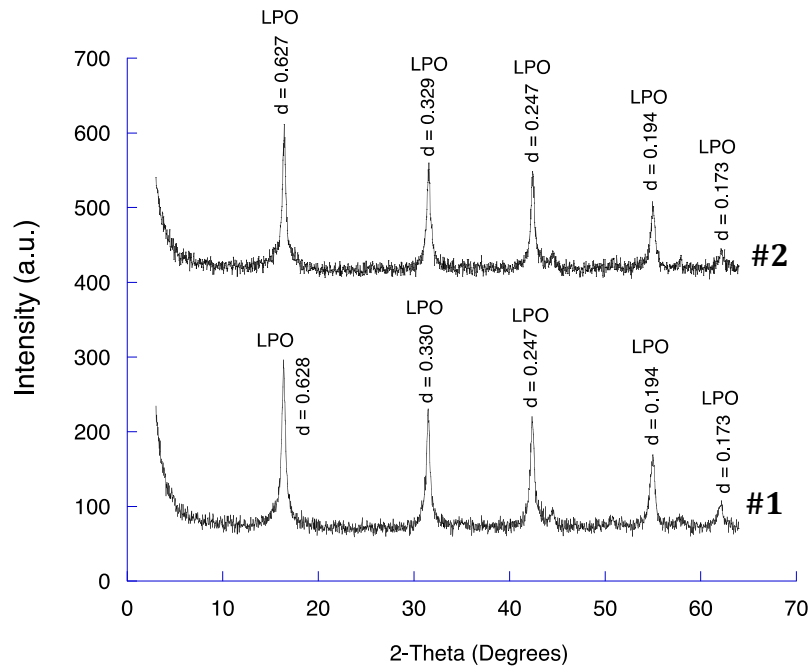
³*Université de Lorraine, Service Commun de Microscopies Electroniques et Microanalyses X (SCMEM), Bvd des Aiguillettes, BP 239, 54506, Vandoeuvre-lès-Nancy, France*

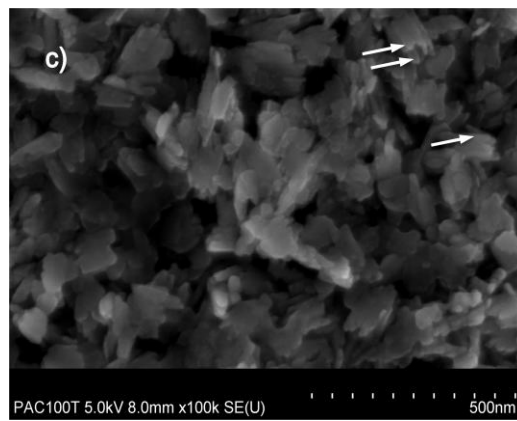
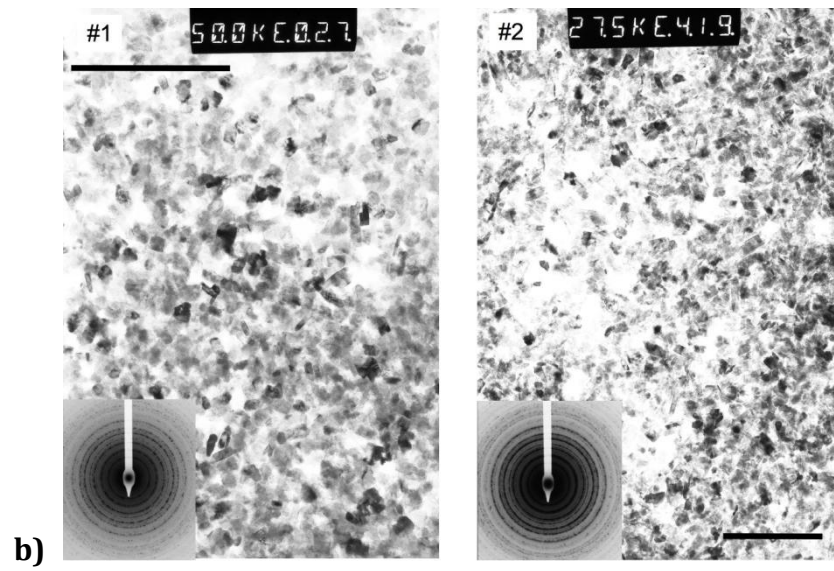
⁴*GET (UPS/CNRS/IRD), University of Toulouse (Paul Sabatier) – 14 Avenue E. Belin – 31400 Toulouse, France*

⁵*Sciences Chimiques de Rennes UMR CNRS 6226 (ENSR), Equipe CIP, Avenue du G^{al} Leclerc, CS 50837, F-35708 RENNES Cedex 7, France*

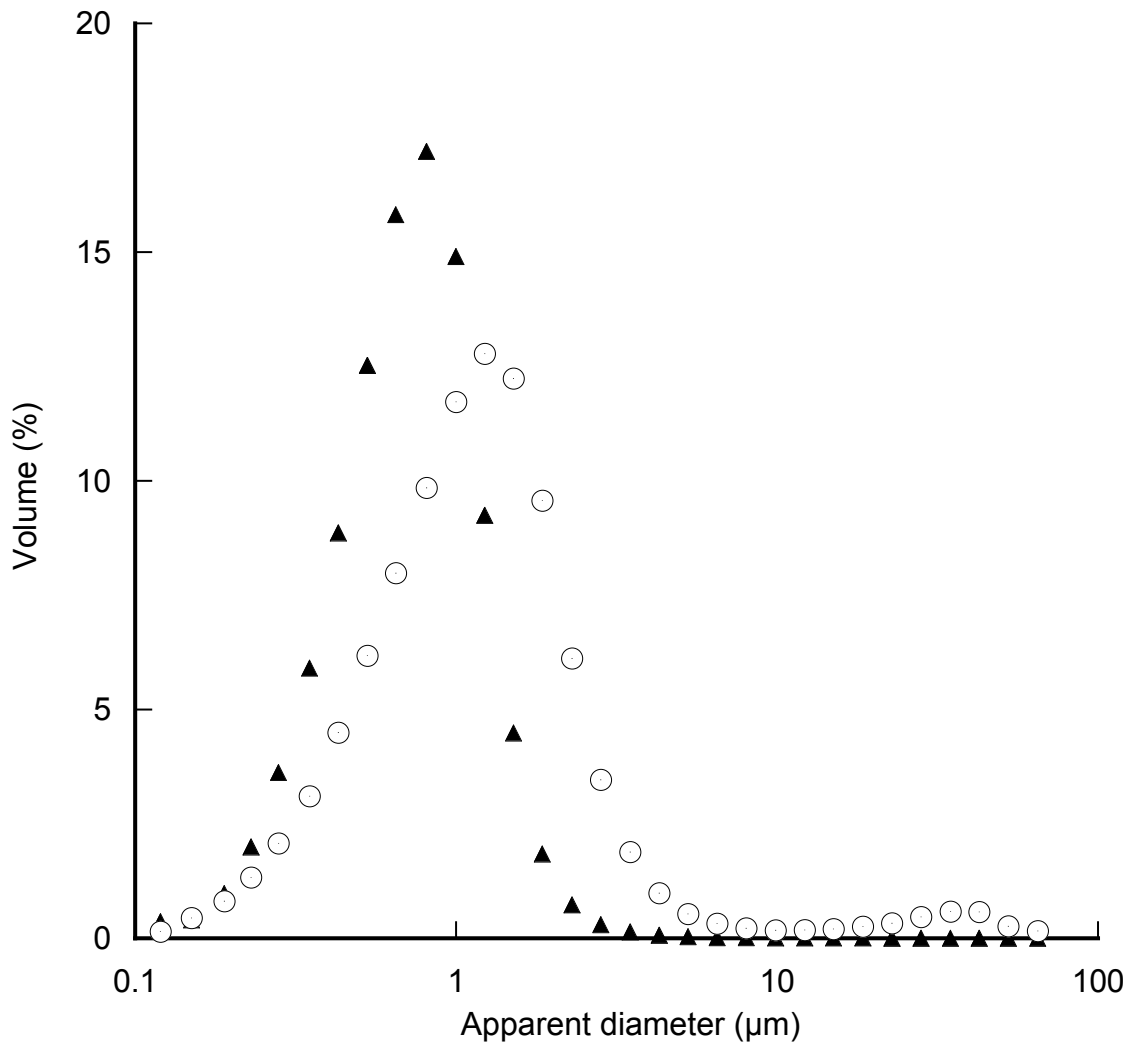
Annexes

SI-1. Lepidocrocite characterization. XRD (a), TEM (bar = 0.5 μm) with electrodiffractograms (b) and SEM (c) of the lepidocrocite (series #1 and #2). L denote lepidocrocite. Arrows (c) show crystals arranged in aggregates. "LPO" denotes lepidocrocite.





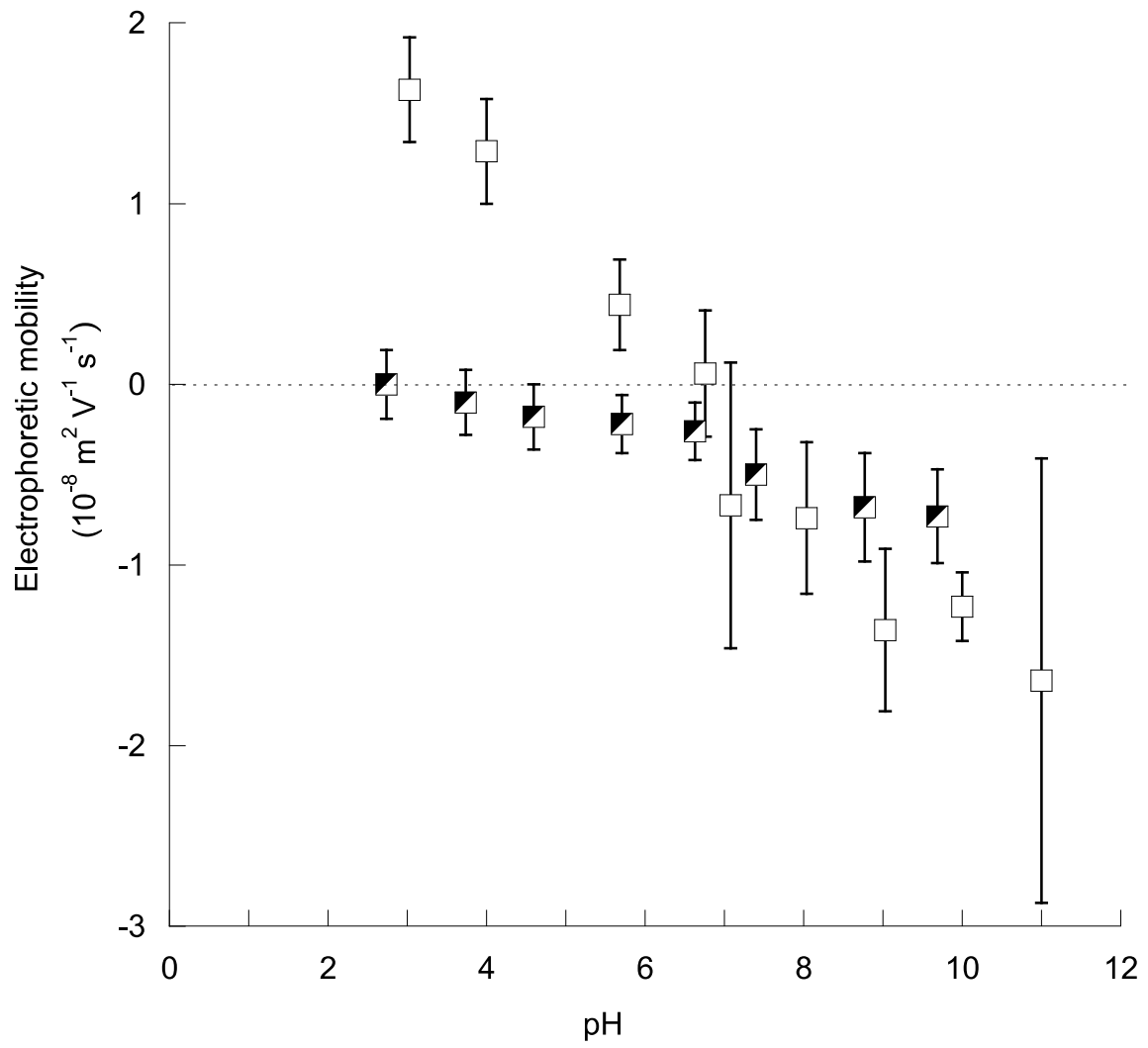
SI-2. Granulometric distribution of the lepidocrocite suspension (serie #1) in pure water (closed triangle) or in the bioreduction medium with the 0.16 mol L⁻¹ formate (open circle).



SI-3. Effects of NaCl and formate on iron oxide particle size

The particle size distribution of the γ -FeOOH mineral suspension in pure water was monomodal with a median diameter (d_{50}) equal to $0.8 \pm 0.2 \mu\text{m}$ (SI- 2) suggesting that the crystals of lepidocrocite are associated to form aggregates. In presence of sodium formate 0.16 mol L^{-1} the electrophoretic mobility of the lepidocrocite particles was strongly affected for pHs below the neutrality. The pH of zero mobility (isoelectric point) shifted from ~ 6.9 to ~ 2.7 in presence of formate (**Figure 28**) indicating a specific affinity of the surface sites for HCOO^- . That is also consistent with the increase of the d_{50} (from 0.8 to $1.3 \mu\text{m}$) in presence of the bioreduction medium (containing the 0.16 mol L^{-1} of sodium formate) (SI-2), the decrease of the repulsion charges improving the formation of aggregates.

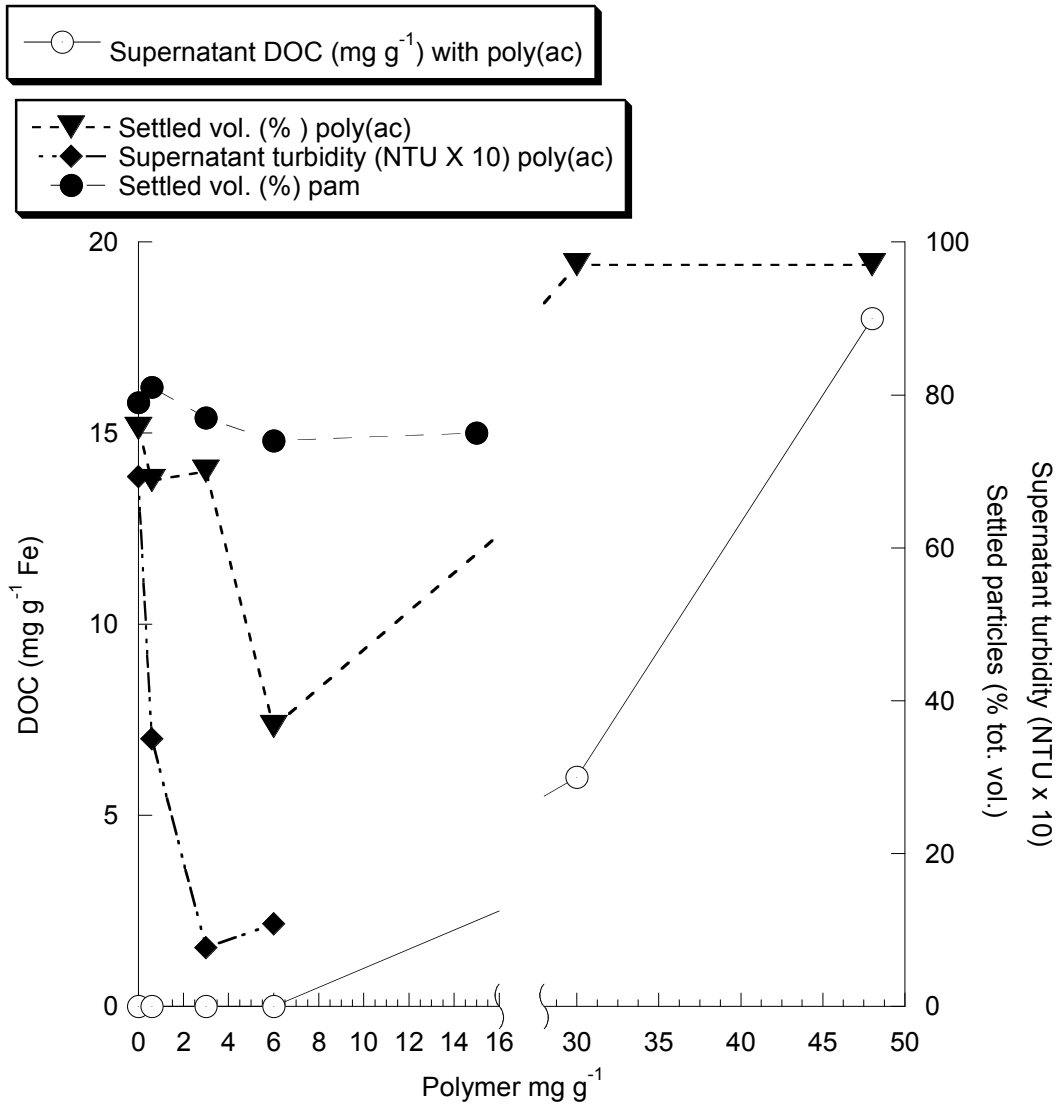
The figure below represents the electrophoretic mobility as a function of pH for a lepidocrocite suspension in $\text{NaCl } 0.10 \text{ mol L}^{-1}$ supplemented (semi-open square) or not (open square) by 0.15 mol L^{-1} sodium formate. Vertical bars represent standard deviation calculated on 50 to 400 particle trajectories.



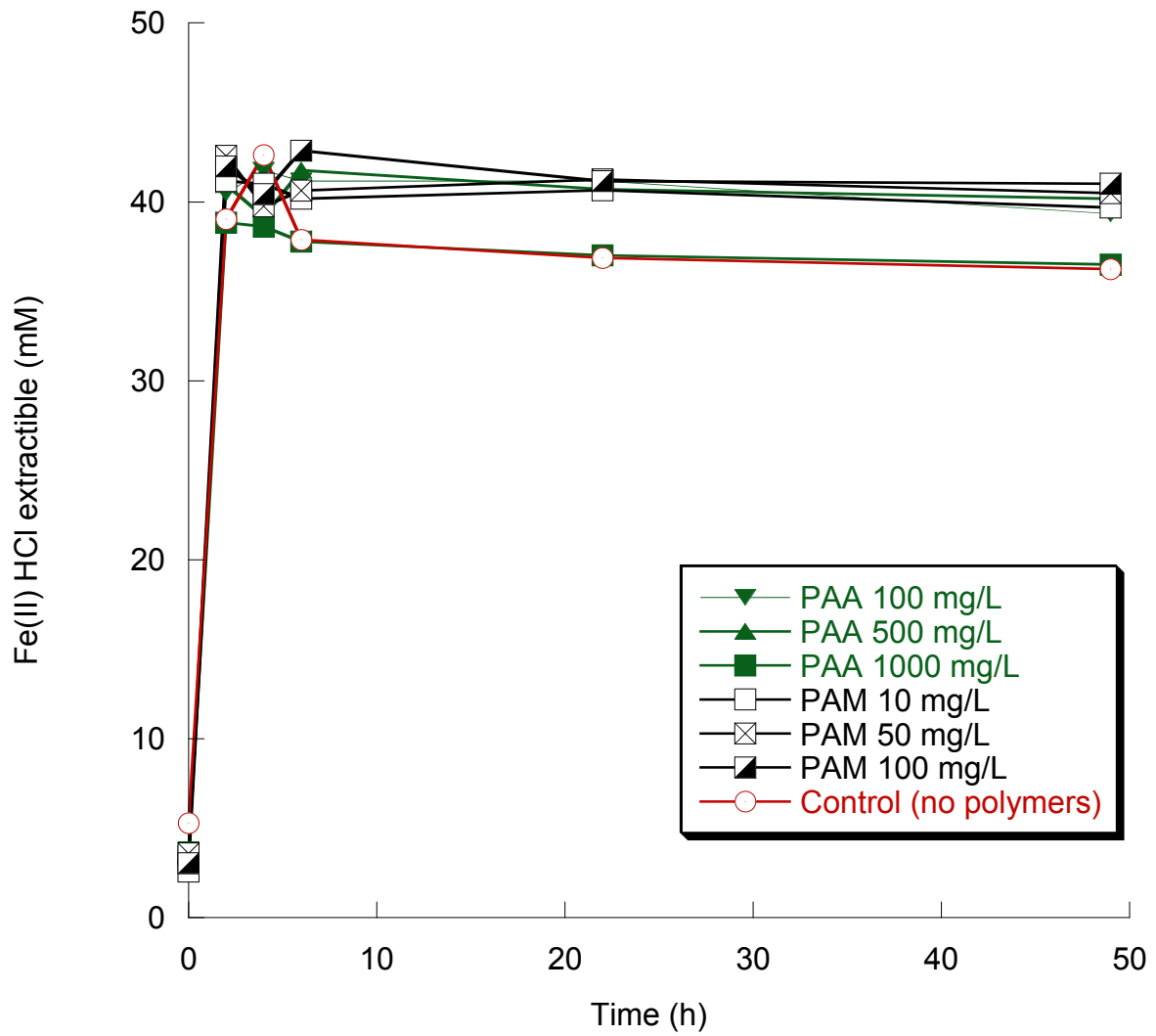
SI-4. Flocculation test of γ -FeOOH with polyacrylic acid (PAA)).

The suspension of lepidocrocite was mixed with poly(ac) in the 0.1 to 1000 mg L⁻¹ concentration range. After 2 h of settling in a conical test tube, the volume occupied by the settled lepidocrocite was measured, as well as the turbidity of the supernatant and the dissolved organic carbon content (DOC). DOC and turbidity were measured by TOC analyzer and by nephelometer (NTU = nephelometric turbidity unit), respectively. The turbidity measurements for concentration of 500 and 800 mg L⁻¹ were not possible because the volume of the conical tube was entirely occupied by the iron oxide particles. This method was not appropriate for PAM flocculation test, since it doesn't proceed by charge neutralization, the settled volume did not changed significantly.

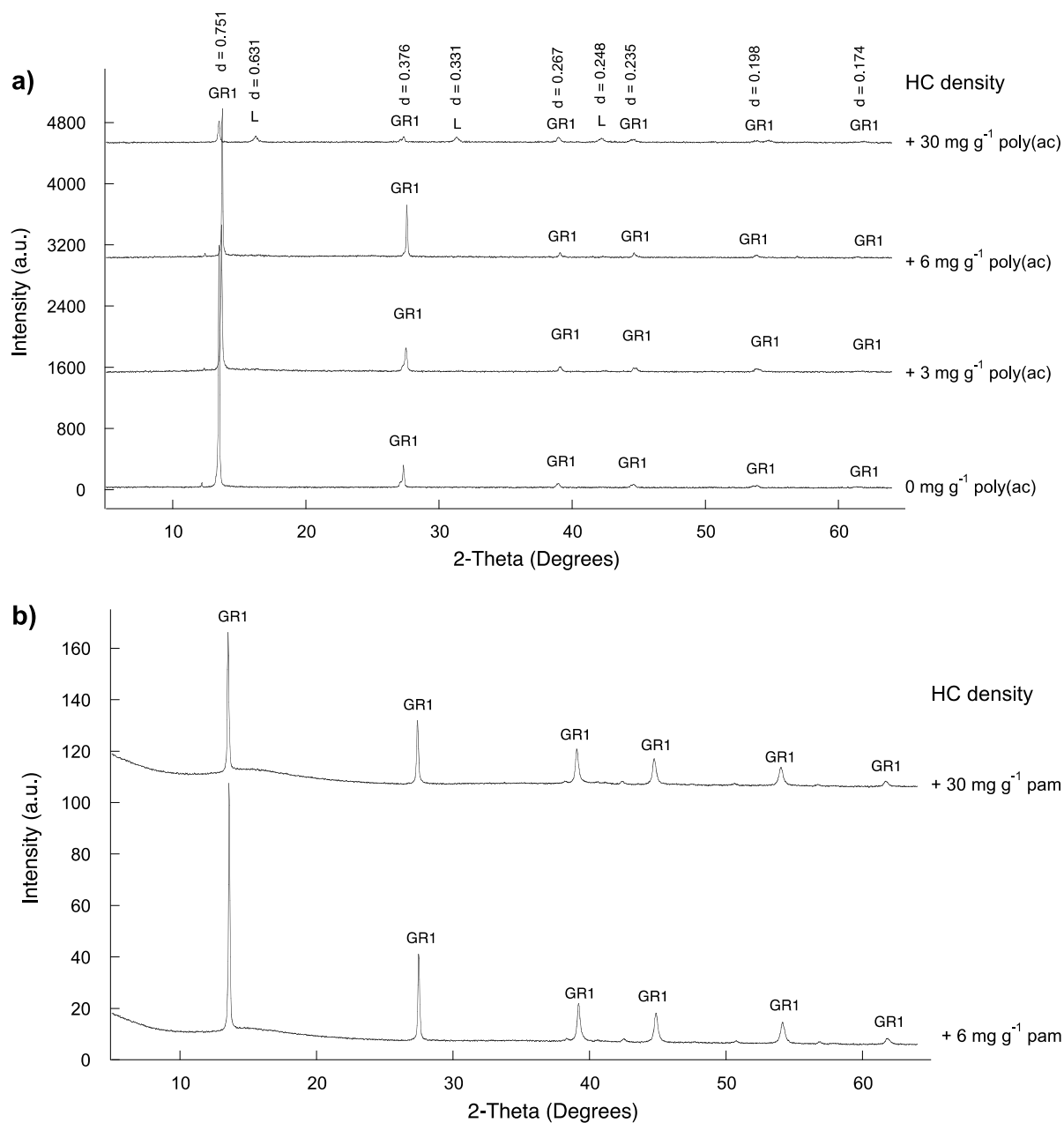
PAA is expressed in mg g⁻¹ Fe (from γ -FeOOH): white circle = poly(ac) remained in the supernatant (mg DOC g⁻¹ Fe); triangle = volume occupied by the γ -FeOOH (% total vol.) after settling with PAA; diamond = turbidity of the supernatant after 2 h of settling.



SI-5. Reduction course of Fe^{III} citrate by *Shewanella putrefaciens* in presence or absence of 100 – 1000 mg L⁻¹ polyacrylate (PAA) or 10- 100 mg L⁻¹ of polyacrylamide (PAM).



SI-6. XRD of solids obtained from incubation with HC densities and several ratio of a) polyacrylate (PAA) or b) polyacrylamide (PAM). Control means incubation free of synthetic polymers.



ANNEXE II : PUBLICATIONS PARUES./IN.PRESS

Chemical Geology 289 (2011) 86–97



Contents lists available at ScienceDirect

Chemical Geology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemgeo



Effects of Si-bearing minerals on the nature of secondary iron mineral products from lepidocrocite bioreduction

A.-S. Sergent, F. Jorand, K. Hanna ^{*,1}

Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, LCPME, UMR 7564 CNRS-Nancy Université, 405 rue de Vandoeuvre, 54600 Villers-les-Nancy, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 May 2011

Received in revised form 19 July 2011

Accepted 21 July 2011

Available online 29 July 2011

Editor: J. Fein

Keywords:

Green rust

Magnetite

Quartz sand

Silicate

Bioreduction

Dissolution

ABSTRACT

Lepidocrocite (γ -FeOOH) bioreduction by *Shewanella putrefaciens* was examined in systems containing three kinds of quartz silica sand with solid contents ranging from 5 to 70 wt.%. The results notably demonstrated that the formation routes of secondary iron minerals from microbial reduction of γ -FeOOH in silica mineral assemblages are dependent on quartz sand loading and particle size distribution. Biomineralization experiments with a concentration range of aqueous silica showed that a lower Si concentration (less than 2 mM) led to magnetite or magnetite/chukanovite, while higher concentrations resulted in the formation of green rust (GR). Dissolution of very fine quartz particles may have promoted the formation of biogenic GR instead of magnetite. This behavior could be explained by the sorption of dissolved silicate on the lepidocrocite surface, which might limit the bioreduction rate and promote GR formation. As observed with the chemically synthesized GR, the interactions of dissolved or colloidal Si with the lateral faces of the GR crystals could stabilize the GR structure, thus preventing its transformation into other products. Furthermore, complex physical and chemical distribution at the surfaces and within heteroaggregates of mixed mineral phases may affect the diffusion processes of species and therefore the biomineralization mechanism.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Green rusts (GRs) are mixed ferrous–ferric hydroxides that have layered structures consisting of alternating positively charged hydroxide layers and hydrated anion layers (Schwertmann and Fechter, 1994; Génin et al., 1998; Hansen et al., 2001). Because of their structural Fe(II), GRs are very reactive compounds and play a central role in the redox cycling of iron in the aquatic and terrestrial environments where they are present (Génin et al., 1998; Hansen et al., 2001). They are found as corrosion products of Fe metal (Refait et al., 2003), in ochre sludge (Koch and Mørup, 1991), as minerals in hydromorphic soils (Trolard et al., 1997; Génin et al., 1998) or ground water (Christiansen et al., 2009). They can be synthesized in the laboratory by partial oxidation of Fe(II) or by co-precipitation of Fe(II) and Fe(III) salts in aqueous solutions (Schwertmann and Fechter, 1994; Génin et al., 1998; Hansen et al., 2001), by electrochemical way (Legrand et al., 2001) and also by biological processes (Fredrickson et al., 1998; Ona-Nguema et al., 2002; O'Loughlin et al., 2007).

Under anoxic conditions, the bioreduction of Fe(III) to Fe(II) by iron reducing bacteria is possible depending on the nature of the Fe-oxide.

The formation of "biogenic" GR from bioreduction of lepidocrocite or ferrihydrite has been observed using organic acids or H₂ as electron donors for Fe(III) respiration by *Shewanella* spp. (Fredrickson et al., 1998; Ona-Nguema et al., 2002; Zegeye et al., 2005; O'Loughlin et al., 2007). The factors controlling secondary iron mineralization in incubation experiments are cell amount, electron donor concentration, solution chemistry, presence of polymers or organic and inorganic ligands, etc. (Lovley et al., 1987; Ona-Nguema et al., 2003; Kukkadapu et al., 2005; O'Loughlin et al., 2007; Zegeye et al., 2007, 2010).

In general, the main solid-phase end products of microbial reduction of Fe(III) oxides were Fe(II)-bearing products including magnetite, siderite, vivianite, green rust and chukanovite (Lovley et al., 1987; Fredrickson et al., 1998; Ona-Nguema et al., 2002; Kukkadapu et al., 2005; Zegeye et al., 2010; Jorand et al., 2011). Although the microbial-promoted generation of GR is widely demonstrated, the mechanisms and factors governing the GR formation as the major secondary iron mineral at the expense of other products in lab-scale investigations or environmental systems are largely unknown (O'Loughlin et al., 2010; Zegeye et al., 2010).

In subsurface soils and sediments, iron oxides generally do not occur as homogeneous assemblages. Frequently, the iron oxides are present as coatings on less soluble or less reactive soil particles such as silica sand (Ryan and Gschwend, 1994). In some soils and aquifer sediments, iron hydroxide coatings on the sand surface were characterized as ferrihydrite, goethite and lepidocrocite (Wang et al., 1993). The attachment of these coatings to the silicate surface is generally strong because Si—O—Fe bonds can form between the

* Corresponding author at: LCPME, CNRS-Nancy Université, 405 rue de Vandoeuvre, 54600 Villers-les-Nancy, France. Tel.: +33 3 83 68 52 42; fax: +33 3 83 27 54 44.

E-mail address: khallil.hanna@lcpme.cnrs-nancy.fr (K. Hanna).

¹ Present address: Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, UMR CNRS 6226 "Sciences Chimiques de Rennes", Chimie et Ingénierie des Procédés, Avenue du Général Leclerc, 35708 Rennes Cedex, France. Tel.: +33 3 83 68 52 42; fax: +33 3 83 27 54 44.

This article was downloaded by: [Frederic PA Jorand]

On: 13 December 2012, At: 06:14

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Geomicrobiology Journal

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/ugmb20>

Contribution of anionic vs neutral polymers to the formation of green rust 1 from γ -FeOOH bioreduction

F PA Jorand^a, A-S Sergent^a, P-Ph Remy^a, I Bihannic^b, J Ghanbaja^c, B Lartiges^d, K Hanna^e & A Zegeye^a

^a Université de Lorraine, LCPME, UMR 7564 CNRS-Université de Lorraine (UHP), 405 rue de Vandœuvre, F-54600, Villers-lès-Nancy, France

^b CNRS, LEM, UMR 7569 CNRS-Université de Lorraine (INPL), 15 avenue du Charmois, F-54500, Vandœuvre-lès-Nancy, France

^c Université de Lorraine, Service Commun de Microscopies Electroniques et Microanalyses X (SCMEM-UHP), Bvd des Aiguillettes, BP 239, 54506, Vandœuvre-lès-Nancy, France

^d University of Toulouse (Paul Sabatier) GET (UPS/CNRS/IRD)—14 Avenue E. Belin, 31400, Toulouse, France

^e ENSCR, Institut des Sciences Chimiques de Rennes UMR CNRS 6226 Avenue du G^{al} Leclerc, CS 50837, F-35708 Rennes Cedex 7, France

Accepted author version posted online: 12 Dec 2012.

To cite this article: F PA Jorand, A-S Sergent, P-Ph Remy, I Bihannic, J Ghanbaja, B Lartiges, K Hanna & A Zegeye (2012): Contribution of anionic vs neutral polymers to the formation of green rust 1 from γ -FeOOH bioreduction, Geomicrobiology Journal, DOI:10.1080/01490451.2012.746403

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/01490451.2012.746403>



Disclaimer: This is a version of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to authors and researchers we are providing this version of the accepted manuscript (AM). Copyediting, typesetting, and review of the resulting proof will be undertaken on this manuscript before final publication of the Version of Record (VoR). During production and pre-press, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal relate to this version also.

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae, and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand, or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.



RESUME

Les rouilles vertes sont des hydroxysels mixtes Fe(II)-Fe(III) présents dans les sols hydromorphes sous forme de fougérite. Elles sont connues pour être capable de réduire des polluants organiques et métalliques. Les rouilles vertes peuvent être produites à partir de la bioréduction de lépidocrocite γ -FeOOH par *Shewanella putrefaciens*, une bactérie ferriréductrice. En vue de comprendre leur formation dans l'environnement et d'utiliser leur réactivité dans la mise en place, à terme, d'un système de dépollution des sols et des eaux (colonne de sable), nous avons étudié leur formation dans un système en batch en présence d'une phase siliceuse (sable et acide silicique) et en présence de polymères organiques synthétiques (polyacrylate PAA et polyacrylamide PAM) afin de mimer la présence des corps bactériens. La silice est les polymères apparaissent comme de bons agents stabilisateurs, favorables à la formation des rouilles vertes. Les rouilles vertes formées en présence de ces agents stabilisateurs conservent leur capacité réductrice vis-à-vis d'un polluant organique, le rouge de méthyle et d'un polluant métallique, le mercure Hg^{2+} . Nous avons ensuite transposé notre système en batch dans une colonne de sable + lépidocrocite γ -FeOOH, soumise à un régime hydrodynamique. Nous avons réussi à former et à caractériser une rouille verte comme minéral secondaire de la bioréduction de la lépidocrocite par *Shewanella putrefaciens*.

Mots clés : rouille verte, silice, polymères, bioréduction, réactivité, colonne.

SUMMARY

Green rusts are mixed species Fe(II)-Fe(III) present in hydromorphic soils as fougérite. They are capable to reduce organic and metallic pollutants. Green rusts may be produced from the bioreduction of lepidocrocite γ -FeOOH by *Shewanella putrefaciens*, a dissimilatory iron reducing bacteria. In order to understand their formation routes in the environment and eventually, use their reactivity in a system for soil and water remediation (sand column), we studied their formation in a batch system with silica phase (quartz sand and silicic acid) and with two organic polymers (PAA polyacrylate and polyacrylamide PAM). The silica polymers appear to be good stabilizers, favorable to the formation of green rusts. Green rusts formed in the presence of the stabilizing agents retain their reductive capacity toward an organic pollutant, methyl red and a metallic pollutant, mercury Hg^{2+} . Then, we have transposed our system in a flow through column of sand + lepidocrocite γ -FeOOH. The carbonate green rust was formed and identified as secondary mineral of lepidocrocite bioreduction by *Shewanella putrefaciens*.

Keywords: green rust, silica, polymers, bioreduction, flow through column.
