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

École Doctorale Science et Ingénierie, Ressources Procédés Produits Environnement

Collégium Sciences et Technologies

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

En Géosciences

Par **Djihad OULKADI**

Gels de silice hybrides dopés en particules colloïdales de smectites pour l'étude des interactions bactérie/silicate

Soutenance publique le 3 juillet 2013

Directrice de thèse : Sylvie Desobry-Banon

Co-directeur de thèse : Christian Mustin

Membres du jury

Mme Marie Libert, Chargée de recherche HDR, CEA-LMTE Cadarache, rapporteur

M. Pierre Renault, Directeur de recherche HDR, INRA-UAPV Avignon, rapporteur

M. Laurent Michot, Directeur de recherche HDR, LIEC UMR 7360 CNRS-UL Nancy, examinateur

Mme Sylvie Desobry-Banon, Maitre de conférence HDR, LIEC UMR 7360 CNRS-UL Nancy, examinateur.

M. Mathieu Etienne, Chargé de recherche, CNRS-LCPME Nancy, invité

M. Christian Mustin, Directeur de recherche HDR, LIEC UMR 7360 CNRS-UL Nancy, invité

Laboratoire Interdisciplinaire des Ecosystèmes Continentaux
UMR 7360 CNRS Université de Lorraine
Site Aiguillettes
Faculté des Sciences et Technologies
BP 70239- 54506 Vandœuvre-Lès-Nancy

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier comme il se doit mon laboratoire d'accueil, le LIEC (Ex LIMOS) dans lequel j'ai effectué mon stage de Master 2 dans le cadre de la thèse de *Brice Louvel* et sous la direction de *Corinne Leyval* que je remercie beaucoup de m'avoir accepté puis encadré en Master.

Ma reconnaissance et mes remerciements vont à mes encadrants de thèse *Sylvie Desobry-Banon* (directrice de thèse) et *Christian Mustin* (Co-directeur). D'abord Sylvie qui m'a permis de faire cette thèse et surtout qui a cru en moi depuis mon stage de master 2, pour sa présence, ses conseils, son aide et sa bonne humeur chaque jour et surtout sa patience. Christian, merci pour les conseils et les idées en géomicrobiologie qui sont toujours là où il faut pour mieux comprendre tel ou tel processus. Merci à vous deux pour votre confiance et pour les expériences partagées.

Mes remerciements s'adressent à *M. Pierre Renault*, *Mme. Marie Libert, M. Laurent Michot*, *M. Mathieu Etienne,* qui, ont accepté de juger et d'examiner ce travail de thèse. Soyez assurés de ma profonde reconnaissance.

Ma pensée va vers tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin dans cette thèse, dans la mise en place ou la préparation de mes expériences, durant les expérimentations et dans l'interprétation des résultats: *JoJo, Christine, Géraldine, David, Hervé, Mehdi Yemloul, Stéphane Desobry, Mathieu Etienne, Marie José Stébé, Mélanie Emo, Isabelle Bihannic, Daniel Canet, Emmanuelle Montargès-Pelletier, Laurent Michot*.

Je salue également tous mes collègues du laboratoire : *Thierry, Aurélie, Marie, Amélia, Jean-Pierre, Asfaw, Dimitri, Cécile*, mes collègues de bureau : *Aurélie, Léa et Anne, Damien*, *Romain, Alexis, Jessica, Fabrice, Patrick, Colette, Sylvie Dousset, Jacques Berthelin* et mes remerciements aussi à *Clarisse, Cécile T., Fabien et Goshia*. Nouvellement arrivés au LIEC, je remercie aussi *Laurence, Damien Blaudez, Pierre Faure* et ses collègues de bureau.

Un merci particulier au personnel administratif du laboratoire : *Chantal* (en retraite), *Cécile Lorentz* sans oublier *Laetitia Despouy*

Un grand merci à tous mes amis (es) qui m'ont soutenu durant ma thèse.

Je ne peux oublier de remercier ma famille en Algérie, mes chers parents qui ont toujours cru en moi et soutenu, mes frères et ma sœur, mes grands parents, mes oncles et tantes et leurs fils et filles.
Enfin je veux dire un grand merci à ma femme qui m'a soutenu depuis toujours et, surtout cette dernière année de thèse, et à ma petite fille *Lahna*; spéciale dédicace à vous.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION GÉNÉRALE 1

CHAPITRE I: ETAT DE L'ART ET OBJECTIFS DE LA THÈSE 4

I.1. Altération des minéraux dans la rhizosphère 5

I.2. La fraction argileuse des sols 8

I.3. Les principaux processus d'altération biogéochimiques liés à l'activité des microorganismes 10

I.3.1. Acidolyse ou influence du pH sur la dissolution des phylosilicates 12

I.3.2. Complexolyse ou influence des ligands sur la dissolution minérale 13

I.3.3. Des ligands spécifiques excrétés par les microorganismes : les sidérophores 14

I.3.4. Des réactions rédox impliquées dans la dissolution du fer 16

I.3.5. Biosorption et biominéralisation du fer par les bactéries 21

I.4. Les bactéries du sol et le métabolisme carboné 23

I.5. Contexte de l'étude 26

CHAPITRE II: MATÉRIELS ET MÉTHODES 27

II.1. Gels de silice hybrides 28

II.1.1. Principe du procédé sol-gel 28

II.1.2. Synthèse des gels de silice hybrides 30

II.1.2.1. Protocole 30

II.1.2.2. Particules minérales 32

II.2. Les souches bactériennes 33

II.2.1. Identification des bactéries sauvages 33

II.2.2. Banque de mutants de *Rahnella aquatilis* RA1 34

II.2.2.1. Obtention de la banque de mutants 34

II.2.2.2. Caractérisation des clones de mutants après criblage sur le critère de production de sidérophores 35

II.2.3. Préparation des suspensions bactériennes 35

II.2.3.1. Milieux de cultures 35

II.2.3.2. Suspensions bactériennes 36

II.3. Etude de l'altération minérale: systèmes « GSH – bactéries » 37

II.3.1. Biotests 37

II.3.1.1. Mesure du pH 37

II.3.1.2. Dosage du glucose 37

II.3.1.3. Dosage du fer total dissocié des particules minérales 38

II.3.2. Dosages spécifiques aux métabolites bactériens 38

II.3.2.1. Les sidérophores 38

II.3.2.2. Les acides organiques 39

II.4. Techniques utilisées 40

II.4.1. Structure et propriétés physico-chimiques des GSH 40

II.4.1.1. La spectrométrie optique sur GSH 40

II.4.1.2. Caractérisation de la structure des gels par Small-Angle X-ray Scattering, SAXS 41

II.4.1.3. Caractérisation des interactions eau – GSH 46

II.4.2. Microscopie électrochimique SECM et système « GSH-bactéries » 54

II.4.2.1. Principe de la SECM 55

II.4.2.2. Équipement de base de la SECM 56

II.4.2.3. Préparation des ultramicroélectrodes de travail et de référence 57

II.4.2.4. Mesure du gradient de pH à l'interface des bactéries immergées dans du BHm. 57

CHAPITRE III: RÉSULTATS ET DISCUSSIONS 61

III.1. Caractérisation physico-chimique des gels de silice hybrides 62

III.1.1. Etude de la variation de structure des GSH par SAXS 62

III.1.1.1. Vieillissement des gels 62

III.1.1.2. Traitement par autoclave des gels 68

III.1.2. Etude des interactions eau-GSH 70

III.1.2.1. Caractérisation de la sorption et désorption d'eau dans les gels de silice hybride contenant des particules colloïdales de nontronite (publication n°1) 71

III.1.2.2. Le Comportement de l'eau dans les gels de silice hybrides étudiés par relaxométrie en résonance magnétique nucléaire du proton (^{1}H). Mise en évidence de deux couches d'hydratation (publication n°2) 80

III.2. Etude de l'altération minérale sur gels de silice hybrides 85

III.2.1. Des gels de silice hybrides pour l'étude de la dissolution bactérienne de particules colloïdales de phyllosilicates (publication n°3, soumise) 87

III.2.2. Altération des particules colloïdales de nontronite dans les gels hybrides de silice : Implications concernant la mobilisation du fer par les bactéries (publication n°4 soumise). 105
III.2.3. Rôle des sidérophores de *Rahnella aquatilis* RA1 dans l'altération minérale..... 125
III.2.3.1. Analyse génétique 125
III.2.3.2. Production de sidérophores et altération minérale par les mutants de *Rahnella aquatilis RA1* 127
III.2.4. Influence de la composition de la matrice siliceuse sur l'altération des particules minérales dans les GSH..... 131
III.2.5. Evaluation de l'altération des particules minérales dans les µGSH par spectrophotométrie UV-Visible..... 133
III.2.6. Vers une mesure local du pH à l'interface bactérie du sol/minéral (publication n°5 en préparation) 137

CHAPITRE IV: DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES 148

IV.1. Discussion générale.....149

IV.2. Conclusion générale 153

IV.3. Perspectives d'étude.....155

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 157

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....173

Liste des abréviations

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

ATP : Adénosine-5'-Triphosphate

BHm : Bushnell-Haas modifié

DVS : Sorption dynamique de vapeur d'eau (Dynamic Vapour Sorption)

GDH : Glutamate Déshydrogénase

GSH : Gel de silice Hybride

LB : milieu de culture de Luria-Bertani

MET : Microscope Électronique à Transmission

MM9 : Milieu M9 modifié

MTMS : Méthyltriméthoxysilane

NAD^+ : Nicotinamide adénine dinucléotide

NAu-2 : Nontronite

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

PQQ : Pyrroloquinoline quinone

RMN : Résonance magnétique nucléaire

SAXS : Diffusion des rayons X aux petits angles (Small-Angle X-ray Scattering)

SECM : Microscopie électrochimique (Scanning Electrochemical Microscopy)

STXM : Scanning Transmission X-ray Microscopy

SWy-2 : Montmorillonite de Wyoming

TEOS : Tétraéthoxysilane

UME : Ultramicroélectrodes en SECM

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'un des défis majeurs de la prochaine décennie est d'identifier clairement et de comprendre la réponse des systèmes microbiens complexes interagissant avec leur environnement immédiat, afin de proposer des modèles réalistes de fonctionnement des sols et d'envisager des solutions efficaces à certains problèmes environnementaux (pollution, baisse de fertilité, lessivage…). Il est ainsi important d'obtenir une connaissance plus précise des réactions chimiques qui s'établissent entre bactéries et minéraux et de la dynamique de ces réactions en termes d'étapes intermédiaires et limitantes.

Les microorganismes sont des acteurs majeurs des cycles biogéochimiques des éléments majeurs et en traces. Ils participent à l'altération des minéraux, un processus clé dans la formation des sols et des sédiments ainsi qu'à l'évolution de la composition chimique des différents compartiments environnementaux. L'altération des silicates est particulièrement étudiée car elle implique une large gamme d'interactions microorganismes-minéraux affectant la mobilisation de nutriments essentiels (Mg, K, Fe,…) ou d'éléments métalliques toxiques. La colonisation des surfaces et/ou la production par les microorganismes de protons, d'acides organiques et autres métabolites complexant sont reconnues comme les principaux mécanismes responsables de la dissolution des silicates. Pour autant, les liens entre les phénomènes d'altération, la colonisation des surfaces minérales et la nutrition microbienne restent encore aujourd'hui mal compris.

C'est dans ce contexte que de nouveaux matériaux, i.e. gels de silice hybrides, ont été mis au point par Malgorzata Grybos (Post-doc CNRS 2008-2009) dans le cadre d'un partenariat LIMOS-LEM (FR-EST). Il s'agit de gels de silice préparés par transition sol-gel dans lesquels une suspension colloïdale de particules d'argile naturelles est dispersée. Les premières études d'altération ont montré que les particules minérales dans les GSH sont bien disponibles et altérables par voie chimique ou biologique (Grybos et al., 2010 ; 2011). Ce programme de recherche à l'interface de l'approche matériau et biologie a ainsi été poursuivi dans le cadre du présent travail de thèse.

L'un des objectifs de la thèse était, dans un premier temps, de mieux connaître le matériau GSH par la caractérisation de sa structure et de ses propriétés physico-chimiques. Dans un second temps, les travaux ont porté sur l'étude des interactions entre bactéries et particules

minérales dans ces systèmes modèles (GSH) en testant les potentialités du matériau sur les aspects cinétiques de production de métabolites, évaluation in situ de l'altération minérale par variation des propriétés optiques des minéraux utilisés, mise en évidence de gradients de protons locaux produits par les bactéries aux interfaces…

Ce travail de thèse se subdivise en quatre chapitres correspondant aux objectifs définis.
Le premier chapitre intitulé « Etat de l'art et objectifs de la thèse » consiste en une synthèse de la littérature sur l'altération des minéraux dans le sol. Il aborde les principaux thèmes qui seront développés dans la suite du manuscrit. Ce chapitre traite de l'altération minérale dans la rhizosphère, puis il présente la fraction argileuse qui nous intéresse plus particulièrement. Les principaux processus biogéochimiques liés à l'activité des microorganismes et les éléments clés du métabolisme bactérien achèvent cette synthèse bibliographique. A la suite, les principaux objectifs de la thèse sont présentés.

Le deuxième chapitre décrit les dispositifs expérimentaux et le matériel utilisé dans ce travail de thèse. Il montre la transdisciplinarité du travail expérimental qui a bénéficié de nombreuses collaborations avec les laboratoires de l'Université de Lorraine (LCPME, LIBIO, CRM2, SRMSC). La synthèse des gels de silice hybrides (GSH) et le principe de la technique sol-gel sont détaillés. Les souches bactériennes utilisées, la sélection des mutants sidérophores (-) de *Rahnella aquatilis*, les expérimentations biotiques et abiotiques de l'altération minérale des GSH sont présentées. Enfin, les différentes techniques consacrées à la caractérisation de la structure et des propriétés physico-chimiques des GSH (SAXS, DVS, RMN) sont présentées étayées de rappels théoriques utilisés dans le cadre du travail de thèse.

Dans le troisième chapitre « résultats et discussions » sont discutés les principaux résultats sous forme de publications et de résultats complémentaires. Le premier volet de ce chapitre est consacré à la caractérisation structurale et physico-chimique des GSH. Le second volet présente les travaux sur l'altération minérale en voie biotique et abiotique. *Rahnella aquatilis* RA1 a été privilégiée pour son aptitude à l'altération minérale via la production d'acides organiques variés et de sidérophores. De plus, un millier de clones mutants de *Rahnella aquatilis* étaient disponibles pour des études plus spécifiques. Nous avons choisi de cribler le phénotype sidérophore (-).

Le quatrième et dernier chapitre « discussion générale, conclusion et perspectives » permet de dresser un bilan de l'ensemble du travail et d'extraire les points forts et les limites de

l'utilisation des GSH dans l'étude de l'altération minérale. Une représentation multi-échelle des gels est proposée afin de redonner quelques ordres de grandeur de ce système modèle en interaction avec les microorganismes. Quelques pistes de poursuite du travail de thèse sont finalement proposées en perspectives.

CHAPITRE I

ETAT DE L'ART ET OBJECTIFS DE LA THÈSE

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux interactions entre bactéries et minéraux. Trois souches de bactéries hétérotrophes Gram (-) isolées du sol et précédemment utilisées au LIMOS dans le cadre d'études sur l'altération minérale ont été choisies. Il s'agit de *Rahnella aquatilis* RA1 et *Pantaoe agglomerans* PA1, isolées de la rhizosphère de blé et de hêtres et de *Burkholderia sp*. G5, provenant d'un sol acide vosgien de type podzol (Balland, 2010; Grybos et al., 2011). Le substrat minéral utilisé pour les expériences d'altération consiste en un « micro-sol » constitué de particules colloïdales d'argile dispersées de façon homogène dans un gel de silice. Ce nouveau matériau et support de culture pour les bactéries du sol a été mis au point au LIMOS par Grybos et al. (2010).
Ainsi, après un point bibliographique sur l'altération des minéraux dans la rhizosphère, la fraction argileuse du sol sera présentée suivie des principaux processus biogéochimiques liés à l'activité des microorganismes dans les sols. Enfin, un dernier paragraphe sera consacré aux bactéries du sol et à leur métabolisme.

I.1. Altération des minéraux dans la rhizosphère

Le sol et plus particulièrement le sol rhizosphérique (rhizosphère) qui entoure les racines des plantes, joue un rôle important dans l'altération des minéraux. En effet, il a été montré que l'altération des minéraux est plus rapide dans la rhizosphère des plantes que dans un sol sans racines (Calvaruso et al., 2009). Cette zone du sol diffère du reste du sol par son pH, le potentiel redox Eh, l'abondance de la matière organique et sa forte activité microbienne. Toutes ces caractéristiques, affectent donc les conditions physico-chimiques et biologiques du sol et, par la suite, la biodisponibilité de nombreux éléments minéraux nutritifs ou oligo-éléments (Jones et al., 2003). L'intensification de l'altération des minéraux dans la rhizosphère est attribuée, en partie, aux communautés fongiques et bactériennes associées aux racines (Figure I.1) qui peuvent affecter le cycle biogéochimique des éléments ainsi que la nutrition des plantes (Leyval et Berthelin, 1991; Toro et al., 1997 ; Calvaruso et al., 2006).

Ainsi, des valeurs de pH généralement acides sont observées au niveau de la rhizosphère par rapport au sol non rhizosphérique ce qui facilite et renforce l'efficacité des processus d'altération des minéraux (Haynes, 1990). De plus, la fragmentation des particules minérales par les systèmes racinaires des plantes renforce l'altération chimique en favorisant l'exposition de nouvelles surfaces minérales aux exsudats racinaires et métabolites

microbiens, e.g. acides organiques, sidérophores (chélateurs de fer) et protons, dont l'influence directe sur les cinétiques d'altération des minéraux a été démontrée (Barker et al., 1997). Cependant, l'impact réel des acides organiques sur les particules minérales du sol demeure incertain en raison de la sous-estimation de leurs concentrations dans la solution du sol (Jones, 1998; Jones et al., 2003).

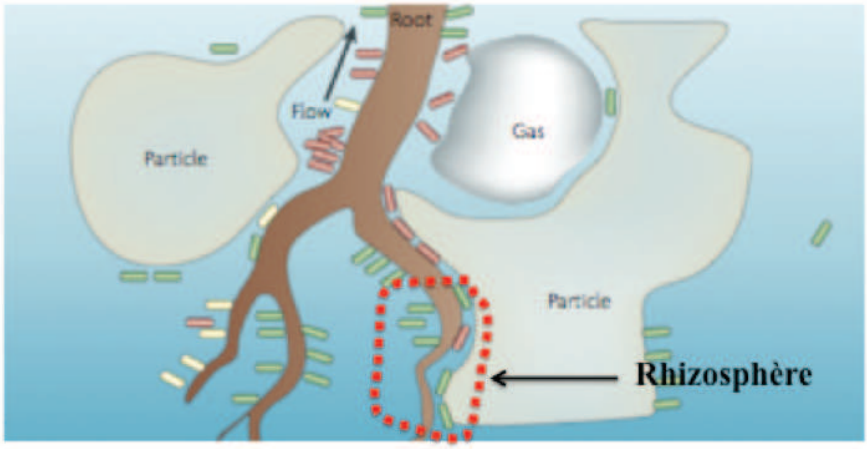


Figure I.1 : Interactions rhizosphériques entre les microorganismes du sol, les racines des plantes et les minéraux associés aux racines (d'après Hense et al., 2007).

L'association symbiotique entre champignons et racines de plantes, ou encore l'association symbiotique entre champignons, racines et bactéries produit des complexes endomycorhiziens et ectomycorhiziens plus résistants aux conditions physico-chimiques (résistance au stress hydrique, au froid) ou aux conditions de carence nutritionnelle comme cela a été rapporté dans les environnements forestiers tempérés (Leyval et Berthelin, 1991; Illmer etSchinner, 1995; Toro et al., 1997; Uroz et al., 2007), dans les mangroves (Vazquez et al., 2000), et les zones désertiques (Goldstein et al., 1999; Puente et al., 2004). L'environnement rhizosphérique sélectionne les communautés bactériennes et fongiques qui, à leur tour, améliorent la nutrition des plantes en conditions de carence en éléments nutritifs. De plus, sa propagation améliore la nutrition des plantes via l'exploration d'un volume de sol plus important, la production de métabolites variés ou la fixation d'azote (Frey-Klett et al., 2005 ; Uroz et al., 2009). Le prélèvement des nutriments (Fe, P) par la plante est plus marqué dans la rhizosphère que dans les zones non colonisées par les racines (Darrah, 1993). En retour, la libération de composés organiques métabolisables par exsudation racinaire vers la rhizosphère favorise le développement des communautés microbiennes (Nguyen, 2003) et, par

conséquent, l'altération des minéraux et l'extraction d'éléments essentiels tels que le phosphore et le fer (Leyval et Berthelin, 1991; Breemen et al., 2000 ; Calvaruso et al., 2006; Hider and Kong, 2010; Uroz et al., 2011; Coker et al., 2012;). Ce processus a une importance écologique, car une grande partie du carbone assimilé par photosynthèse est rhizo-déposée sous forme de sucres simples, polysaccharides, acides aliphatiques, acides aminés et organiques, peptides, protéines et coenzymes (Dakora et Phillips, 2002; Nguyen, 2003; Jones et al., 2004). Ces composés exudés interviennent alors de manière directe ou indirecte dans les processus d'acquisition des nutriments dans les environnement pauvres (Dakora and Phillips, 2002) (figure I.2). Ainsi selon Marschner (1995), la rhizodéposition est stimulée en réponse à des carences en éléments nutritifs. Par exemple, certaines espèces de plantes exsudent, par voie racinaire, des acides organiques en réponse à une déficience en fer et en phosphates ou bien des phytosidérophores suite à une déficience en fer et en zinc (Haynes, 1990; Jones et Darrah, 1994). Gardner et al. (1983) ont observé une augmentation du taux d'exsudation racinaire en présence de microorganismes au niveau de la rhizosphère.

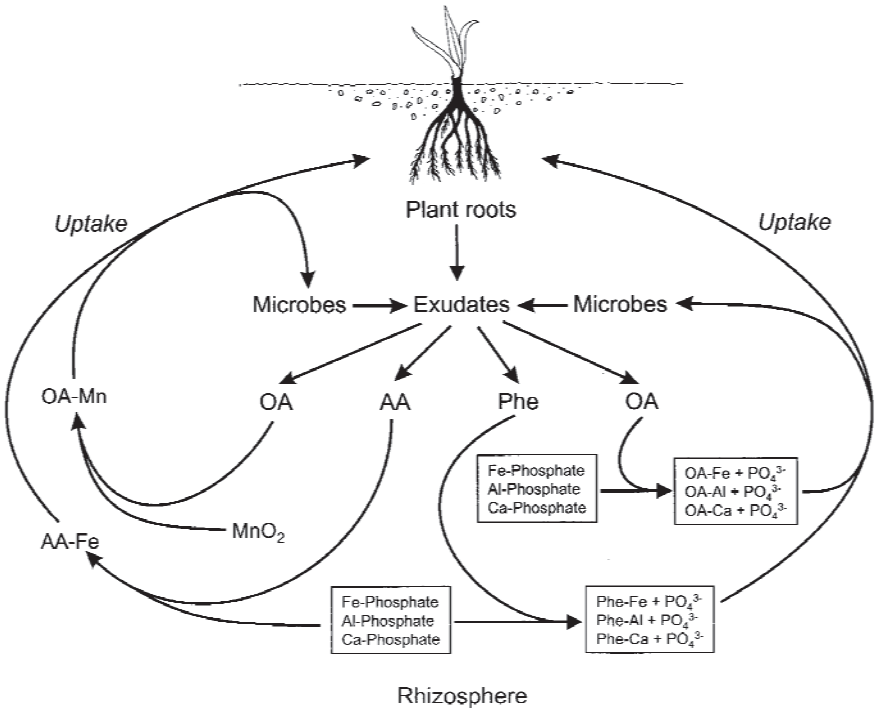


Figure I.2 : Effets des exsudats racinaires sur la disponibilité des nutriments pour les plantes et les microorganismes de la rhizosphère : OA, acides organiques, AA, acides aminés et sidérophores, Phe ; composés phénoliques (Dakora et Philipps, 2002).

En résumé, il existe des interactions physico-chimiques intenses et des relations trophiques étroites entre cette petite fraction du sol, qu'est la rhizosphère, les microorganismes, la plante et les minéraux.

I.2. La fraction argileuse des sols

La fraction minérale des sols provient de la transformation des roches mères qui subissent deux types d'altération: (i) la désagrégation physique caractérisée par une fragmentation grossière de la roche mère sans apport ou modification chimique des minéraux et (ii) l'altération (bio)-chimique caractérisée par la transformation des particules grossières (sable et limons) ou minéraux dits primaires, en nouveaux minéraux dits minéraux secondaires (notamment les argiles et les oxydes libres). Cette fraction secondaire représentant les complexes d'altération constitue la fraction fine du sol ($d < 2\mu m$), communément appelée « argiles ». Elle joue un rôle prépondérant dans le sol en influençant sa structure, sa porosité et sa capacité d'échange (Duchaufour, 1970, 1997). Dans sa dénomination pédologique, le terme argile recouvre des minéraux variés produits principalement à partir de l'altération de minéraux silicatés ou par le processus de recristallisation. En général, ces argiles sont constituées d'agrégats minéraux formés à partir du mélange de particules d'alumino-silicates micrométriques, elles-mêmes constituées par l'empilement de feuillets élémentaires plus au moins hydratés. Sous climat tempéré et dans les sols tempérés mal drainés, les argiles sont généralement composées d'assemblages en proportions variables de plusieurs phases minérales : illites, smectites, vermiculites, interstratifiés (illite-smectite)…. Sous climat chaud et bien drainé, la formation d'illite et de kaolinite est favorisée. En raison de ces assemblages hétérogènes, les argiles peuvent avoir des compositions chimiques très variées à différentes échelles (Petit et al., 1995). Il peut s'agir de variations minéralogiques au sein des agrégats, d'hétérogénéité chimique dans les feuillets constitutifs d'une même particule et de substitutions métalliques ou d'organisation des cations à l'intérieur d'un même feuillet. A l'échelle macroscopique, la nature chimique et physique de cet assemblage ainsi que sa teneur en eau détermine le comportement rhéologique de l'argile (i.e. indice de plasticité). Les argiles peuvent être ainsi classées à partir des propriétés de plasticité des matériaux, quelle que soit la taille et l'assemblage des minéraux qui les composent. Ainsi, pour les industriels, le mot « argile » recouvre l'ensemble des matériaux de consistance plastique.
Les minéraux argileux sont des alumino-silicates, constitués essentiellement de particules de phyllosilicates en feuillets plus au moins hydratés dont la taille est de l'ordre du micromètre.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement aux minéraux argileux du groupe des smectites de type 2:1 ou TOT et plus spécifiquement aux nontronites et montmorillonites dont les feuillets sont dioctaédriques. Ces argiles riches en silice, de type

montmorillonite-smectite, sont les plus réactives et les plus répandues dans les sols tempérés. Leur surface spécifique et leur capacité d'échange cationique élevées ainsi que leur grande variabilité cristallochimique en font des minéraux très importants dans les processus de pédogenèse et le fonctionnement biogéochimique des sols.

Leur classification, présentée dans le Tableau I.1 repose principalement sur la valeur de la charge interfoliaire (équivalente au taux de substitutions hétérovalentes), la localisation du déficit de charges (tétraédrique ou octaédrique) et du taux d'occupation de la couche octaédrique (di- ou trioctaédrique). Ces propriétés spécifiques sont détaillées dans ce qui suit.

Les smectites sont des phyllosilicates d'aluminium de type 2:1 dont les feuillets sont constitués d'une couche octaédrique (O) entourée de deux couches tétraédriques (T) et séparés par un espace interfoliaire (I) (Figure I.3).

La couche tétraédrique est formée de tétraèdres du type SiO_4 constitués de quatre oxygènes et du cation métallique situé dans la cavité tétraédrique (Si^{4+}, Al^{3+}, Fe^{3+}…). Les tétraèdres sont liés entre eux par la mise en commun de trois oxygènes (les oxygènes basaux). Le quatrième oxygène (oxygène apical) est partagé avec la couche octaédrique.

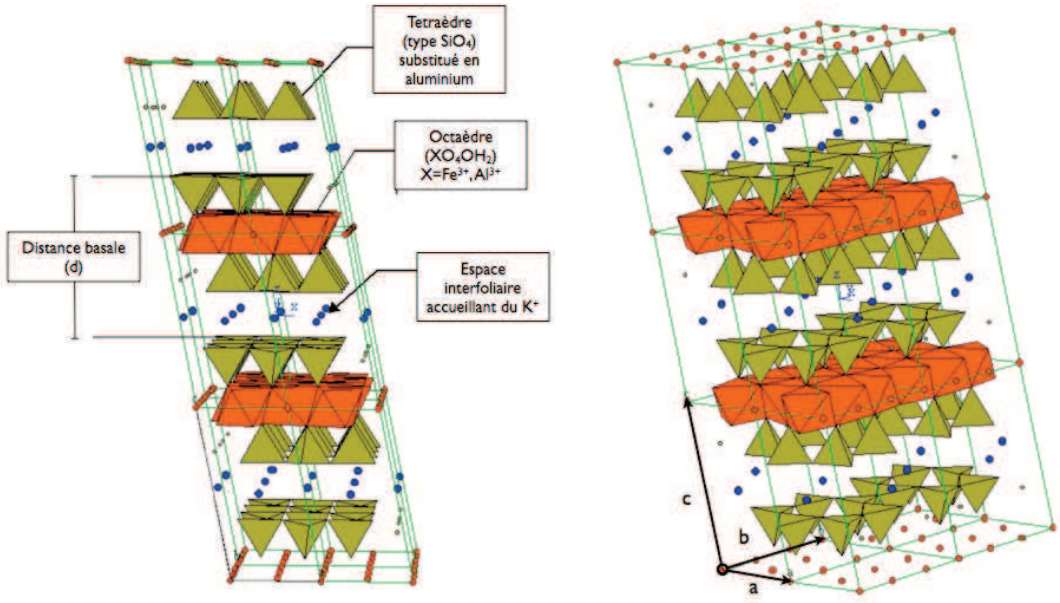


Figure I.3 : Structure tridimensionnelle d'une smectite potassique (TOT) possédant une distance basale de 10 Å (d'après Peronnet, 2004).

La couche octaédrique XO_4OH_2 peut être décrite comme la succession d'octaèdres couchés sur une face triangulaire et composés de quatre oxygènes et deux hydroxyles (OH^-). Chaque cavité octaédrique peut être occupée par des cations (X = Al^{3+}, Fe^{3+}, $Mg^{2+,}$, $Ti^{4+,}$,…) qui composent le motif de base. Si le taux d'occupation octaédrique est voisin de 3, le feuillet est dit trioctaédrique. Si deux sites octaédriques sur trois sont occupés, la couche est dite dioctaédrique. Il est alors possible de distinguer deux types de configurations des sites octaédriques (*cis*-vacant et *trans*-vacant) selon les positions relatives des groupements hydroxyles par rapport aux sites vacants. Dans les smectites ferrifères dioctaédriques, comme les nontronites, l'agencement *cis-trans* des lacunes autour des cations trivalents Fe^{3+} détermine la réactivité des particules vis à vis d'agents chimiques réducteurs ou oxydants (Stucki, 2011, cf §I.3.4)

Les substitutions hétérovalentes (Si^{4+}/Al^{3+} ; Mg^{2+}/Fe^{3+}…) dans les sites tétraédriques ou octaédriques affectent l'électro-neutralité de l'édifice cristallin. Par exemple, au niveau de la couche tétraédrique, une substitution du silicium par un atome d'aluminium (Al^{3+}) et plus rarement par du fer (Fe^{3+}) crée un déficit de charges permanent. Pour les smectites, ce déficit, porté à la fois par les sites octaédriques et tétraédriques, est compris entre 0,4 à 1,2 charges par maille (Tableau I.1). La présence de cations compensateurs, monovalents ($Na^{+,}$ K^+) ou divalents (Ca^{2+}, Mg^{2+}), entre les feuillets permet d'équilibrer le déficit général de charges de la structure TOT (Stumm, 1992).
Cet espace interfoliaire accueille aussi des molécules polaires (eau, éthylène-glycol, glycérol, molécules organiques...). En fonction de son contenu (polarité du solvant, degré d'hydratation des cations compensateurs…etc.) et des conditions de température et de pression, la couche interfoliaire est de taille variable. La distance basale varie ainsi de 10 à 15 Å, lorsque l'hydratation du cation est nulle ou constituée de deux couches d'eau, comme avec le calcium Ca^{2+} (Suquet, 1981, Lantenois, 2003; Perronnet, 2004). Cette distance basale atteint des valeurs supérieures à 17 Å lorsque l'espace interfoliaire est saturé avec des composés organiques comme les acides organiques ou les sidérophores (Haack et al., 2008).

I.3. Les principaux processus d'altération biogéochimiques liés à l'activité des microorganismes

Les principaux processus biogéochimiques d'altération des minéraux sont liés aux activités métaboliques et énergétiques des microorganismes. Celles-ci s'accompagnent de

l'excrétionde protons, de molécules et ligands organiques aux propriétés complexantes ou oxydo-réductrices.

Tableau I.1 : Classification des phyllosilicates en fonction du type de feuillet, du déficit de charges du feuillet (X) par unité formulaire (demi-maille) et de sa localisation (Tétraédrique ou Octaédrique) ainsi que du taux d'occupation des sites octaédriques (d'après Perronnet, 2004).

Feuillet	Groupe	Charge		Couche octaédrique	Minéraux types
		par unité formulaire	Localisation		
TO	Kaolins	~ 0	-	Dioct.	*Dickite, Kaolinite, Nacrite*
	Serpentines			Trioct.	*Antigorite, Lizardite, Amesite, Chrysotile*
TOT	Talc-pyrophyllite	~ 0	-	Dioct.	*Pyrophyllite,*
				Trioct.	*Talc, Willemseite*
	Smectites	0,2 à 0,6	T	Dioct.	*Beidellite, Nontronite*
			O		*Montmorillonite*
			T	Trioct.	*Saponite*
			O		*Hectorite, Stévensite*
	Hydro-micas (vermiculites)	0,6 à 0,9	T	Dioct.	*Illite*
				Trioct.	*Vermiculite*
	Micas	0,5 à 1,0	T/O	Dioct.	*Muscovite, Celadonite*
			T	Trioct.	*Biotite, Phlogopite*
	Micas durs	~ 2	T	Dioct.	*Margarite*
				Trioct.	*Anandite*
TOT O'	Chlorite	variable	T	Tri-Dioct.	*Dombassite Sudoite Clinochlore, chamosite*

Tous ces métabolites participent directement à l'altération biogéochimique des minéraux et à la libération d'oligo-éléments essentiels à la survie des organismes du sol et des plantes comme le fer ou le phosphore. Ces éléments minéraux ainsi que les éléments traces qui les accompagnent sont alors internalisés pour satisfaire les besoins nutritionnels des bactéries. Le fer notamment est un élément clé qui intervient dans des processus biologiques variés : synthèse des acides aminés, transport d'oxygène, respiration, fixation d'azote et dans la photosynthèse (Gorbushina, 2007; Gobat et al., 2010). Quant au phosphore, il est notamment indispensable au métabolisme énergétique cellulaire (synthèse d'ATP, AMP…).

I.3.1. Acidolyse ou influence du pH sur la dissolution des phylosilicates

De nombreux travaux de recherche montrent l'effet du pH sur l'hydrolyse des minéraux silicatés (Kalinowski et al., 2000; Brandt et al., 2003; Golubev et al., 2006; Balland et al., 2010; Grybos et al., 2010). Les phyllosilicates sont altérés par voie acide (H^+) ou basique (OH^-) par interaction au niveau des liaisons métal-ligand des couches tétraédrique (T) ou octaédrique (O). Les liaisons Fe-O et Al-O sont concernées en milieu acide et les liaisons Si-O en milieu basique. La vitesse de dissolution augmente de façon exponentielle avec le pH de part et d'autre d'une zone de dissolution minimale comprise entre pH5 et pH8, i.e. pH commun des sols. La respiration microbienne et la dégradation complète des composés carbonés dissous dans la solution du sol, peut élever la concentration en acide carbonique à la surface des minéraux dans les sols (Barker and Banfield, 1998). Kalinowski et Schweda (1996) ont comparé la dissolution acide des muscovites, phlogopite et biotite pour des **pH allant de 1 à 4** et à température ambiante. Ils ont remarqué que les micas dioctaédriques (e.g. muscovite) présentent une surface très résistante aux attaques de protons, contrairement aux micas trioctaédriques (biotite, phlogopite) qui sont plus facilement altérés. Pour ces auteurs, l'action des protons serait liée à la position et au nombre de sites réactifs disponibles sur la surface minérale. Brandt et al. (2003) ont observé que la dissolution des chlorites à **pH acide (pH 2)**, peut être contrôlée par deux mécanismes à savoir (*i*) des défauts sur les surfaces du minéral qui favorisent la dissolution des surfaces basales ; (*ii*) la rupture de la structure foliaire, comme par exemple la transformation d'une partie des chlorites (TOTO') en des structures stratifiées de vermiculite/smectite (TOT). Cette dissolution est plus importante sur les feuillets octaédriques que sur les tétraèdres avec des libérations majeures de Mg, Al, Fe comparativement au silicium. Les principaux agents d'altération, i.e. protons, réagissent avec les groupements hydroxyles à la surface du minéral (Sokolova, 2011). Grybos et al (2010) ont mis en évidence, pour des nontronites (NAu-2) de tailles colloïdales et exfoliées, une dissolution préférentielle du fer tétraédrique. Il faut aussi noter que dans les mécanismes de dissolution des alumino-silicates, l'aluminium joue un rôle très important. La sortie de l'aluminium des feuillets structuraux est une étape limitante, qui contrôle les vitesses globales de dissolution. Cette réaction dépend fortement de la spéciation de cet élément en solution et de l'activité de Al^{3+}(aq), spéciation sur laquelle des chélatants organiques ont sans doute un rôle déterminant.

D'autres travaux montrent l'effet du pH associé à d'autres facteurs tels que la température, les molécules complexantes, le temps de contact minéral/solution, sur la dissolution des minéraux

(Stillings et al., 1996; Welch and Ullman, 1999). Récemment, dans leurs travaux sur la stabilité des barrières argileuses géosynthétiques, Gates and Bouazza (2010) ont trouvé que des solutions lixiviées à partir de la surface des sols **à pH alcalin (pH>13)** peuvent provoquer la dissolution de la bentonite (smectite) et la précipitation de phases hydratées d'hydroxydes d'aluminosilicates et de carbonates. Ces phases précipitées formées à partir de réactions entre les bentonites et les solutions alcalines lixiviées sont directement responsables du colmatage des pores dans les barrières argileuses. On observe ainsi un affaiblissement de la conductivité hydraulique de certain type de bentonite dans les milieux très alcalins. Toutefois, la concentration des agents de dissolution basiques et acides (i.e. OH^- et H^+) à la surface minérale peut être significativement perturbée par l'adhésion de bactéries ou par la formation d'un biofilm, ce qui entraîne une dissolution plus au moins rapide du minéral.

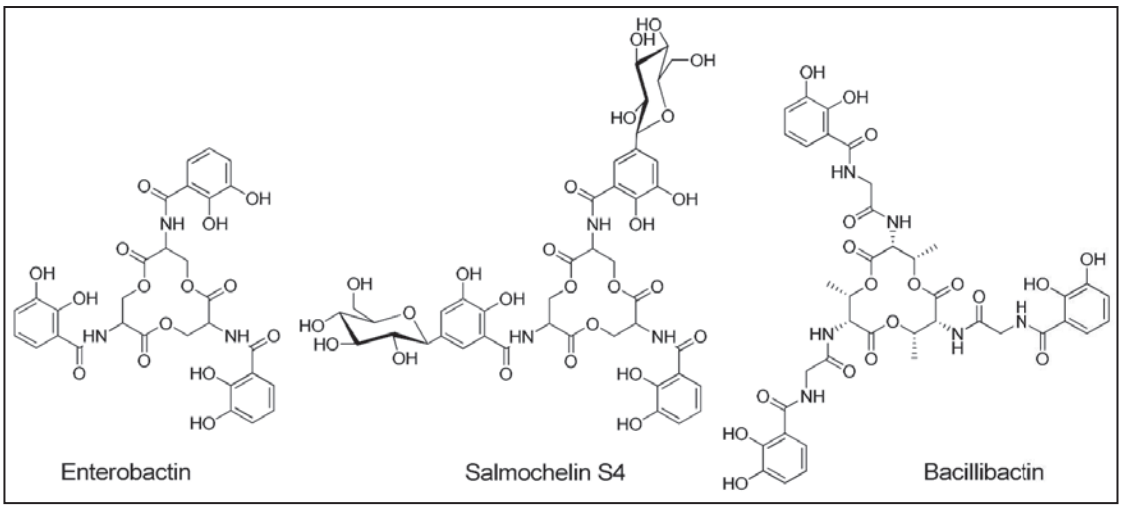
I.3.2. Complexolyse ou influence des ligands sur la dissolution minérale

En plus de l'acide carbonique et des protons produits, les microorganismes peuvent excréter des acides organiques par diverses voies métaboliques de fermentation et de dégradation de molécules organiques (glucides, autres source de carbone), ou des molécules spécifiques comme les sidérophores en réponse à un stress nutritif (déficience du milieu en fer) (Neijssel and Tempest, 1975; Gottschalk, 1986; Tempest and Neijssel, 1992 ; Paris et al., 1996). La production d'acides organiques tels des citrates, oxalates et sidérophores peut augmenter directement le taux d'altération des minéraux par complexolyse en entraînant la formation à la surface du minéral d'un complexe organo-métallique stable qui entraîne l'affaiblissement des liaisons entre métal et oxygène (Fe-O par exemple) et favorise la réaction de dissolution (Ehrlich, 1981 ; Robert et Berthelin, 1986 ;Amrhein and Suarez, 1988;Wieland et al., 1988; Schleissner et al., 1997 ; Latour et Lemanceau, 1998 ; Chen et al., 2009). Ces ligands organiques peuvent également maintenir en solution les ions minéraux en formant un complexe organo-métallique stable et soluble, ce qui augmente la disponibilité de ces éléments pour les organismes (Bennett et al., 1988). Drever and Stillings (1997) ont estimé que les acides organiques peuvent affecter le taux d'altération ou de dissolution des minéraux par au moins trois mécanismes principaux *(i)* une baisse du pH de la solution du sol qui va amener un changement du taux de dissolution, *(ii)* la formation au niveau des cations de liaisons ou complexes à la surface des minéraux , *(iii)* la modification de l'état de saturation et de spéciation des métaux dans la solution du sol. Cependant, ces mêmes auteurs précisent que

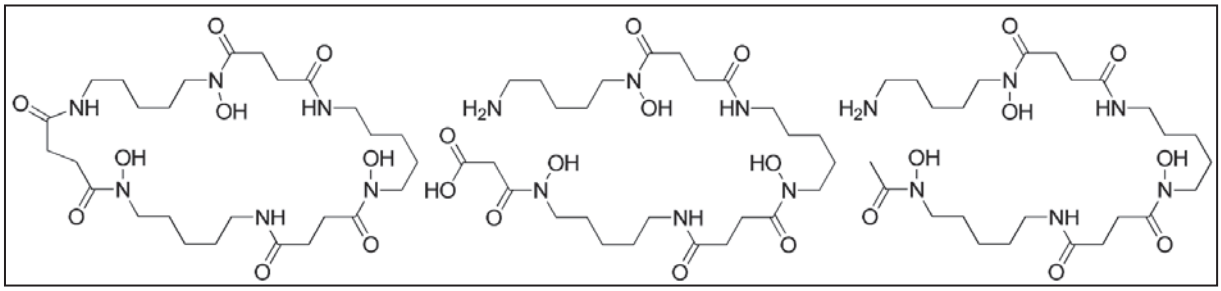
l'effet des acides organiques sur l'altération des minéraux silicatés est relativement faible dans les conditions naturelles et aux concentrations usuelles (quelques mM). Selon Golubev et al., (2006), la dissolution des smectites entre pH 1 et pH 12 est significativement augmentée en présence des neuf ligands organiques les plus représentatifs des milieux naturels (acétate, oxalate, citrate, EDTA, alginate, acide glucuronique, acide 3,4-dihydroxybenzoique, gluconate et glucosamine) si leur concentration est accrue de 10 à 100 mM. En plus des composés de faible poids moléculaire, les microorganismes produisent également des composés de haut poids moléculaire, tels que les polysaccharides extracellulaires. Ces macromolécules peuvent agir sur la dissolution des minéraux en favorisant la complexation des ions métalliques en solution, ou en inhibant de manière irréversible les sites réactifs sur la surface du minéral (Welch and Vandevivere, 1994; Barker et al., 1998; Welch and Ullman, 2000). Ces polysaccharides extracellulaires peuvent également servir de sites de nucléation pour les phases minérales secondaires (Ferris et al., 1988, 1989; Konhauser et al., 1994; Barker et Banfield, 1996, 1998).

I.3.3. Des ligands spécifiques excrétés par les microorganismes : les sidérophores

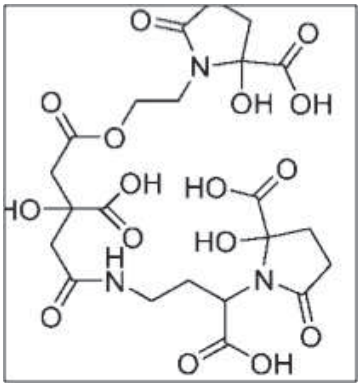
La faible disponiblité du fer (III) dans les sols à pH 7 (<1μM), en condition aérobie, contraint les microorganismes à produire des composés organiques complexant, i.e. les sidérophores. Leur forte affinité pour le fer permet de solubiliser certains minéraux ferrifères et de transporter le fer à l'intérieur des cellules bactériennes (Silverman and Ehrlich, 1964). Même si leur présence dans l'environnement est régulée par de nombreux facteurs physico-chimiques et trophiques (nature des sources de carbone, degré d'oxygénation, température, pH,…), ils peuvent être présents dans des concentrations non négligeables dans les sols : entre 10^{-8}M dans la rhizosphère jusqu'à 10^{-3}M dans les solutions du sol (Powell et al., 1980 ; Hersman et al., 1995). Plusieurs centaines de sidérophores de structures différentes synthétisés par des micro-organismes ont été identifiés et décrits à ce jour. Ils possèdent tous une très forte affinité pour le Fe (III) ($K_f > 10^{32}$) (Hider and Kong, 2010). Pour la pyoverdine et la pyochéline, deux sidérophores produits par des bactéries du genre *Pseudomonas*, les constantes d'association avec le fer sont respectivement de 10^{32} et 10^{18} (Albrecht et al., 1994). Selon les fonctions chimiques impliquées dans la complexation du fer, les sidérophores se répartissent en trois classes principales : les catécholates (Figure I.4a), les hydroxamates (Figure I.4b) et les α-hydroxycarboxylates (Figure I.4c).



(a)



(b)



(c)

Figures I.4 : Structure de sidérophores de type (a) tris-catécholates, (b) tris-hydroxamates : desferrioxamines E, G, and B (de gauche à droite) (c) tris-α-hydroxycarboxylate : achromobactin (Sandy et Butler, 2009)

Les bactéries produisent des sidérophores pour mobiliser et transférer le fer (III) au travers de leur paroi cellulaire. Chez les bactéries Gram-, les précurseurs cytoplasmiques des sidérophores sont transportés successivement au travers de la membrane interne vers le

périplasme puis vers le milieu extracellulaire via un transporteur ABC et des pompes d'efflux ATP dépendantes (Visca et al, 2007, Yeterian et al, 2009). Dans le périplasme, un ensemble de réactions enzymatiques transforme ces précurseurs en sidérophores actifs avant leur excrétion dans le milieu extérieur.

Une fois le Fer (III) chélaté, le complexe sidérophore/Fe est reconnu par des récepteurs membranaires spécifiques puis transporté à travers la paroi vers le cytoplasme de la cellule via des protéines périplasmiques (type FpvA ou FtpA), des perméases et des complexes membranaires (Sandy et Butler, 2009; Hider et Kong, 2010). Une réduction dans l'espace périplasmique du Fer (III) en Fer (II) facilite la dissociation du complexe (Schalk et al, 2002).

En plus de ces sidérophores endogènes, les bactéries peuvent utiliser des molécules synthétisées par d'autres organismes (champignons, plantes…). Dans la rhizosphère, les molécules d'acide humique résultant de la décomposition incomplète de matières organiques telles que la lignine, peuvent également complexer une grande variété de métaux, tel que Fe(III).

I.3.4. Des réactions rédox impliquées dans la dissolution du fer

Dans les solutions de sols, les valeurs limites de pε sont comprises entre -10 et +17 pour un domaine de pH de pH 4 à 10 (Calvet, 2003). On distingue alors les sols oxiques (pε >7) des sols suboxiques (2 < pε < 7) et des sols anoxiques (pε < 2). Dans ces conditions redox et proche de la neutralité, le fer (III) et les phases minérales ferrifères peuvent servir de puits à électrons et soutenir les activités microbiennes. Même si ces activités réductrices des bactéries dépendent fortement des phases minérales et des conditions géochimiques du milieu, trois processus sont proposés pour expliquer la réduction du Fe (III) par voie microbienne : *(i)* la respiration anaérobie où le Fe (III) est accepteur d'électrons et les molécules carbonées sont donneurs d'électrons, *(ii)* les cycles fermentaires impliquant des hydrogénases interagissant avec le fer (III), *(iii)* la production de navettes extracellulaires transporteurs d'électrons de type quinones (Lovley et al., 2000 ; Newman et Kolter 2000 ; Hernandez et al., 2001).

Le diagramme suivant (Figure I.5), donne les principales réactions d'oxydo-réduction catalysées par les microorganismes du sol en fonction de pε (d'après Stumm et Morgan, 1981).

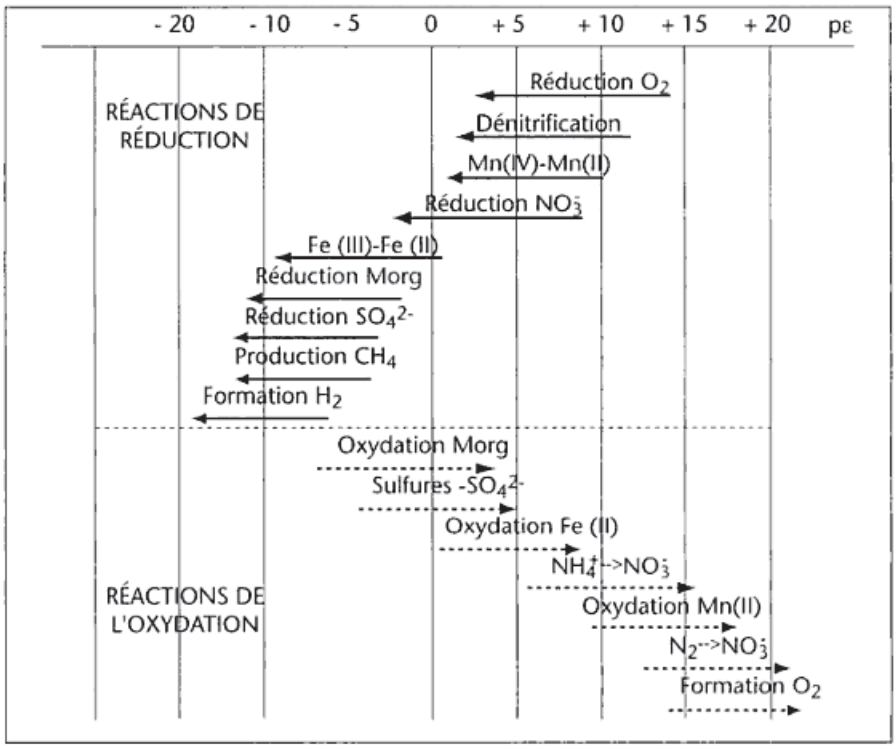


Figure I.5 : Principales réactions d'oxydo-réduction catalysées par les microorganismes du sol (d'après Stumm et Morgan, 1981).

La figure I.6 représente les domaines d'existence des différentes formes du fer en fonction du pH et du potentiel rédox *Eh* de la solution. Le fer présente trois états d'oxydation : le fer réduit Fe (II), le fer oxydé Fe (III) et le fer métallique à l'état de valence Fe (0). Dans les phases solides et liquides du sol, il est présent sous forme Fe (II) ou Fe (III).

Alors qu'il est stable en conditions anaérobies acides, le Fe(II) est facilement oxydé chimiquement en Fe (III) à des pH supérieurs à 5 (Schröder et al., 2003) et pour des valeurs de $p\varepsilon$ variant de +1,7 à +5,0 (Stumm et Morgan, 1981). En milieu acide, la position du système Fe (III)/ Fe (II) dans l'échelle des potentiels d'oxydo-réduction a pour conséquence un grand nombre de réactions d'oxydation par les sels ferriques et de réduction par les sels ferreux (Charlot, 1983).

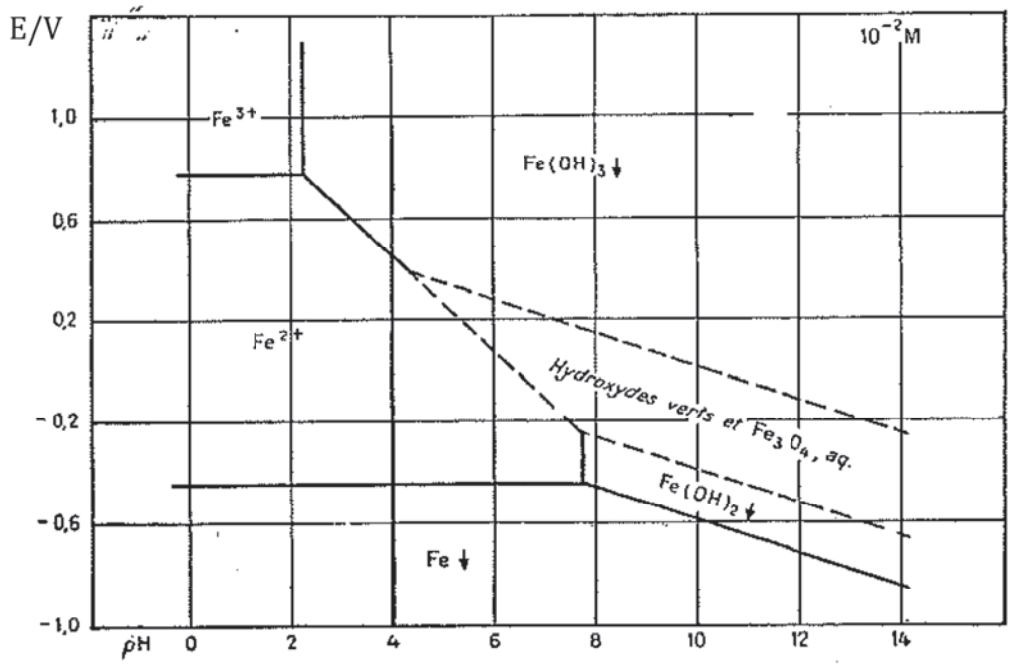


Figure I.6 : Diagramme de Pourbaix (*Eh*/pH) du Fer (Charlot, 1983)

L'étude de la réduction bactérienne du fer (III) dans les phyllosilicates a intéressé de nombreux auteurs comme Jaisi et al. (2005) sur la réduction de la nontronite (NAu-2) par *Shewanella putrefaciens* CN32. Des études récentes sur des smectites ferrifères ont également montré que la libération de métabolites bactériens réducteurs ou chélatants peut induire des modifications structurales des minéraux argileux (Kostka et al., 1999; Dong et al., 2003, Esnault 2010). En général, la réduction du fer (III) structural provoque un déséquilibre supplémentaire du déficit de charges qui déstabilise la structure du feuillet 2:1 de la smectite. La production d'acides organiques ou de chélateurs puissants du fer (i.e. sidérophores) permettrait d'accroître la disponibilité du fer (III) avant sa réduction (O'Reilly et al., 2006). Dans ce dernier cas, le Fe (III) serait libéré en solution avant la réduction microbienne.

Récemment, Stucki (2011) traite des conséquences des cycles d'oxydo-réduction du fer sur les propriétés physico-chimiques des smectites riches en fer. La variation de couleur est présentée comme étant l'une des plus sensibles et des plus simples à observer. Au cours de la réduction, la couleur d'une suspension de smectites riches en fer (nontronite NG-1) passe du jaune au vert puis au bleu-vert et enfin au bleu-gris pour des taux de réduction de 0 à 96% (Figure 1.7).



Figure I.7 : Illustration du changement de couleur de jaune à bleu-vert par réduction, dans une smectite riche en fer (échantillon de nontronite NG-1 (Hohen Hagen, Allemagne) en provenance de la collection de référence des argiles de la *Clay Minerals Society*) (Stucki, 2011).

La variation de couleur est la conséquence de transitions électroniques impliquant les orbitales 3d du Fe (II), Fe (III) et des transferts de charges de O → Fe (III) dans le champ cristallin de la nontronite (Sherman and Vergo, 1988). Le spectre UV-Vis d'une smectite riche en fer (beidellite) dans les états non altéré, réduit puis réoxydé (Figure I.8) montre les évènements spectroscopiques correspondant aux observations visuelles. La variation de l'absorbance à 730 nm au cours d'un cycle de réduction chimique ou biologique suivie d'une réoxydation par O_2 est particulièrement mise en évidence pour une smectite riche en fer (Stucki, 2011).

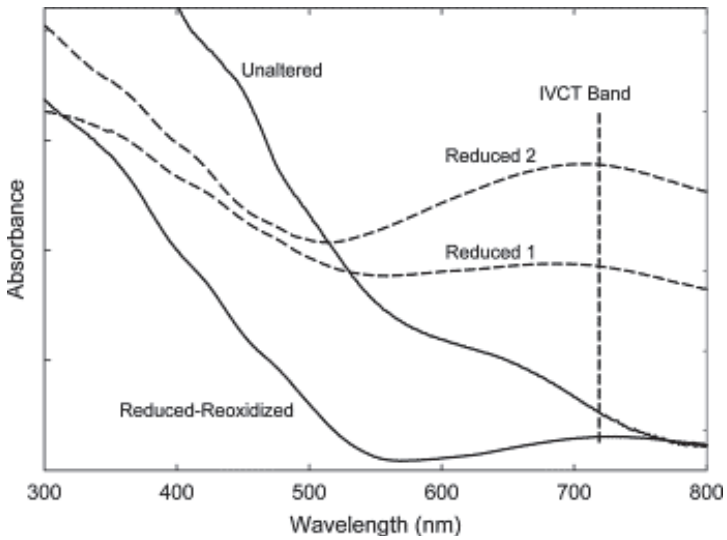


Figure I.8 : Spectres de réflectance diffuse (convertie en absorbance) d'une smectite riche en fer, inaltérée, réduite et réduite-réoxydée (échantillon SWa-1 en provenance de la collection de référence des argiles de la *Clay Minerals Society*), avec utilisation de dithionite comme agent réducteur (résultats de Jankovič, non publiés) (Stucki, 2011).

Une représentation graphique des modifications structurales induites par la réduction chimique et biologique est présentée en Figure I.9 (Stucki, 2011). Au cours de la réduction par le dithionite, Fe (III) migre massivement des sites *cis* à *trans* laissant des lacunes où les sites *cis* étaient présents (de A à B à D en Figure I.9). La réduction bactérienne est plus limitée et réversible (de A à C en Figure I.9).

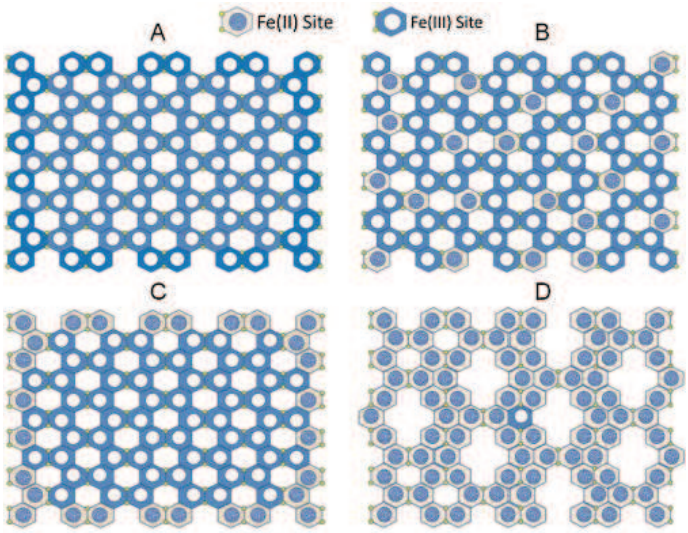


Figure I.9 : Illustration des changements de structure et de distribution du Fe dans le feuillet octaédrique d'une nontronite de Garfield : (A) non altérée (oxydée), (B) partiellement réduite par dithionite, (C) partiellement réduite par des bactéries, (D) complètement réduite par dithionite (adapté d'après Ribeiro et al., 2009) (Stucki, 2011).

Schaefer et al. (2011) explicitent les mécanismes de transfert d'électrons entre Fe (II) et Fe (III) en surface de nontronite (NAu-2) d'après des résultats en spectroscopie Mössbauer. La figure I.10, représente un spectre Mössbauer de Nau-2 à 13K avant et après réaction avec une solution de ^{56}Fe(II) à 1,44 mM pendant 71h. Le spectre Mössbauer de NAu-2 (Figure I.10 haut) indique la présence de Fe (III) dans NAu-2 avec majoritairement du Fe (III) octaédrique en coordination *Cis* (Oct 1) et peu de sites en coordination *trans* et *cis* (Oct 2) Fe (III). Après réaction avec ^{56}Fe (II), non détectable en spectroscopie Mössbauer, un nouveau pic à 2,6 mm/sec apparaît qui est attribué à une réduction de Fe (III) structural en Fe (II) (Figure I.10 bas). Macroscopiquement, une modification de la couleur de la suspension de NAu-2 de brun à bleu-vert est observée, indiquant la présence de paires Fe (II)-Fe (III). La disparition de l'épaulement à 1,1 mm/sec (Figure I.10 haut) après réaction implique que le Fe (III) octahédrique (Oct 2) a réagit préférentiellement. ^{56}Fe (II) en solution est donc sorbé à la surface du minéral et induit un maximum de 15% de réduction du Fe (III) structural de NAu-2 par transfert d'électrons à la surface du minéral (Schaefer et al., 2011).

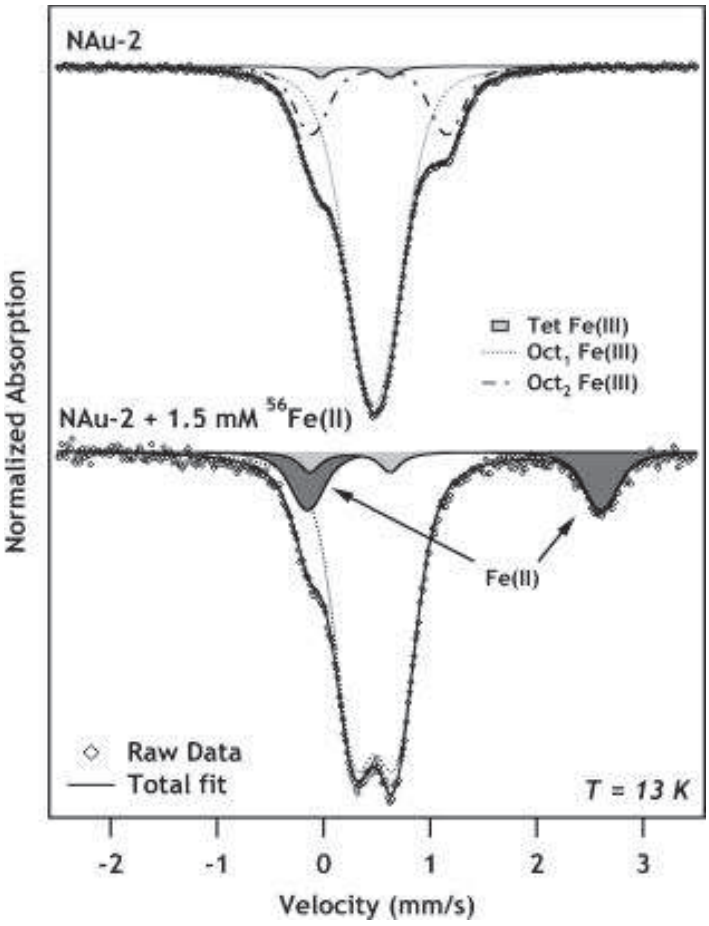


Figure I.10 : Spectres Mössbauer de Nau-2 à 13K avant (haut) et après (bas) réaction avec une solution de ^{56}Fe(II) à 1,44 mM pendant 71h (1,42 mM ^{56}Fe(II) adsorbés) (Schaefer et al., 2011).

I.3.5. Biosorption et biominéralisation du fer par les bactéries

Les microorganismes jouent un rôle important dans la mobilisation et l'immobilisation des éléments minéraux. Ils peuvent en absorber ou adsorber afin d'acquérir de nombreux éléments minéraux indispensables à leur survie (Si, Fe, Mn, Mg, Ca, K, P, Na). Par exemple : l'absorption du potassium par les champignons qui peut conduire à la transformation de biotite en vermiculite ou encore des immobilisations bactériennes de phosphore qui appauvrissent les sols (Bonneau and Souchier, 1979). Diverses études ont montré aussi la possibilité de mobiliser par voie microbienne, selon les conditions de milieu, le fer des oxydes, des oxyhydroxydes mais aussi des silicates, sulfures, et phosphates (Ullman et al., 1996; Barker et al., 1997; Rogers et Bennett, 2004; Li et al., 2006; Buss et al., 2007; Jaisi, et al., 2007).

Les bactéries qui oxydent le fer jouent un rôle non négligeable dans la formation des oxydes et hydroxydes de fer dans les sols. Ainsi, le fer colloïdal, en suspension stable, est absorbé par des bactéries hétérotrophes pour former des granules intracellulaires dans le cytoplasme (Komeili et al., 2007) ou se présenter sous forme d'incrustations dans la membrane cellulaire (Benzerara et al., 2008). Dans une étude récente, Miot et al. (2011) montrent les premières étapes de biominéralisation intracellulaire en combinant STXM (Scanning Transmission X-ray Microscopy), STEM (Scanning Transmission Electron Microscopy) et cryo-TEM (cryo-Transmission Electron Microscopy) (Figure I.11). La présence de sites de chélation et d'oxydation du fer, mis en évidence sur la face externe de la membrane plasmique, induit un processus de nucléation-croissance d'oxydes de fer dans le périplasme de la cellule. Ce phénomène peut conduire à une totale « encapsulation » de la cellule tout en préservant les structures globulaires protéiques et le peptidoglycan. Cette biominéralisation peut également être extracellulaire par formation d'une capsule ferrique produite au contact des lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries Gram négatives (Miot et al., 2009). La production extracellulaire de polysaccharides ou de lipo-polysaccharides par les bactéries génère également la synthèse d'assemblages de nature organo-minérale dont la structure et la composition dépendent de l'espèce bactérienne, de la nature des polysaccharides et des conditions physico-chimiques de formation.

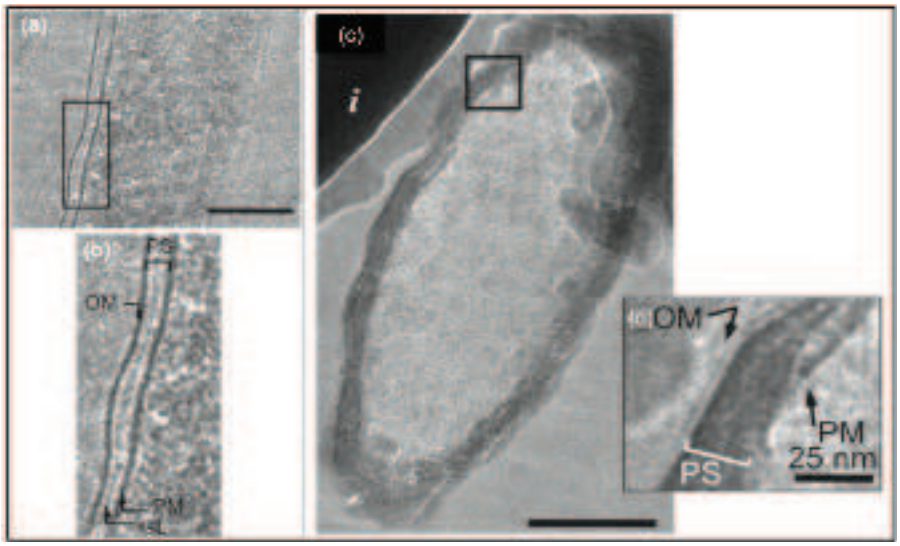


Figure I.11 : Images en cryo-electron microscopie de sections vitreuses (CEMOVIS) de cellules bactériennes BoFeN1 (souches nitrate-dépendantes et Fe (II)-oxydante) à différents stades de minéralisation. (a) cellule non minéralisée de contrôle et détail de l'encadré (b) avec OM ou membrane externe, PS ou espace périplasmique dans lequel une couche granuleuse GL est observée, PM la membrane plasmique; (c) cellule totalement minéralisée après 3 jours de culture avec un encadré sur la paroi bactérienne dense aux électrons (d). L'échelle de chaque image correspond à 100 nm si elle n'est pas spécifiée (d'après Miot et al., 2011).

I.4. Les bactéries du sol et le métabolisme carboné

Un grand nombre de bactéries et tous les champignons ont un métabolisme de type chimio-organotrophe et peuvent croître sur différents substrats carbonés organiques. Leur métabolisme énergétique est un facteur déterminant de leur caractère ubiquitaire et qui conditionne leur action altérante sur l'environnement minéral immédiat.

Le métabolisme énergétique regroupe l'ensemble des réactions d'oxydo-réduction au cours desquelles une source d'énergie (substance prélevée dans l'environnement) est oxydée. Ces oxydations cataboliques permettent la production d'ATP, source d'énergie indispensable à toutes les cellules vivantes, et la réduction d'un composé accepteur d'électrons. En conditions aérobies, c'est le dioxygène. En conditions anaérobies et en l'absence d'autres accepteurs comme le fer (III), des accepteurs organiques provisoires comme le NAD^+ (qui devra être ré-oxydé pour assurer la pérennité du système) ou définitifs comme l'acide lactique seront produits. Ainsi, plutôt qu'une oxydation complète en CO_2 et H_2O, la fermentation peut être vue comme un moyen pour la cellule de fournir de l'énergie en régénérant ses accepteurs d'électrons via la production d'acides organiques intermédiaires. Les métabolismes fermentaires et respiratoires peuvent être interdépendants, en particulier pour les bactéries anaérobies facultatives ou les micro-organismes micro-aérophiles. Ainsi, dans les sols et les sédiments où les conditions d'anaérobiose alternent avec les conditions d'aérobiose en fonction notamment de la saturation en eau de la porosité du sol, le métabolisme bactérien contribue aux cycles du fer dans les sols et à l'alternance des processus acidifiants et oxydo-réducteurs affectant le statut des minéraux argileux (Figure I.12).

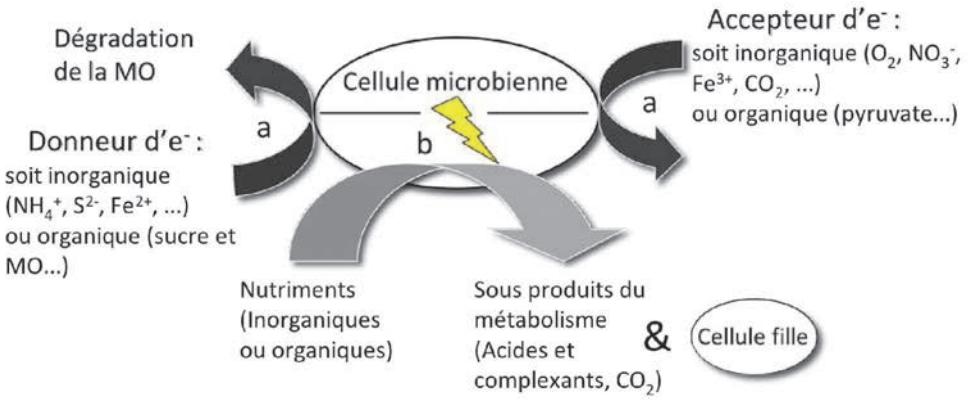


Figure I.12: Schéma de l'activité microbienne (a) respiration de la bactérie, (b) production d'énergie grâce aux nutriments pour former une cellule fille (d'après Balland, 2010).

La sécrétion des acides organiques est liée à la dégradation incomplète de composés carbonés riches en énergie (glucose). Si le produit final de l'oxydation de ces composés organiques est en principe le dioxyde de carbone, certaines bactéries sont incapables d'aller jusqu'à ce terme soit parce qu'elles ne disposent pas des enzymes nécessaires, soit parce que des facteurs environnementaux comme le pH, la température, la force ionique ou la présence de molécules inhibitrices diminuent l'activité enzymatique ou altèrent les capacités catalytiques des enzymes. Différents acides organiques intermédiaires s'accumulent dans le cytoplasme puis sont excrétés dans le milieu environnant (Overflow). On retrouve ainsi des acides fumarique, citrique, oxalique ou acétique qui peuvent réagir avec un cation métallique à la surface des minéraux, et former un complexe métal-chélate. Les acides polyfonctionnels comme l'acide citrique et oxalique augmentent la dissolution des silicates de plusieurs degrés.

Selon la source de carbone disponible dans le milieu et les microorganismes présents, diverses voies d'assimilations existent. Le glucose est une source carbonée quantitativement importante dans la biosphère grâce à la cellulose ou à l'amidon. Dans le cadre de cette thèse, le glucose ayant été principalement utilisé comme source de carbone, les voies métaboliques associées seront présentées, *i.e.* la glycolyse, la voie des pentoses phosphates et la voie des Glutamates Déshydrogénases (GDH).

La **glycolyse** ou la voie d'Embden-Meyerhof, produit deux molécules de pyruvate à partir d'une molécule de glucose. Elle se déroule dans le cytoplasme (ou cytosol) des bactéries en aérobie ou anaérobie pour les bactéries chimio-organotrophes. Le pyruvate produit peut ainsi entrer dans le cycle de Krebs où il sera complètement oxydé en CO_2 avec production d'acides organiques intermédiaires (e.g. le citrate, le succinate, le fumarate, le malate, l'oxaloacétate). Le pyruvate pourra également être métabolisé partiellement par fermentation en condition anaérobie en lactate et en éthanol.

La voie des pentoses phosphates se déroule dans le cytoplasme en aérobie ou en anaérobie chez la majorité des bactéries. Parmi les produits de cette voie on trouve : *(i)* le NADPH, H^+ , coenzyme d'oxydoréduction utilisé comme source principale d'électrons lors des réactions biosynthétiques dans la cellule *(ii)* le ribose-5-phosphate utilisé dans la synthèse des nucléotides et *(iii)* l'érythrose-4-phosphate précurseur d'acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine et tryptophane). Cette voie est une alternative à la glycolyse et permet à la bactérie d'utiliser des pentoses comme le xylose, le ribose ou l'arabinose. Les acides organiques produits sont principalement l'acétate et le lactate.

La voie des GDH (ou glucose déshydrogénases) est une voie privilégiée pour l'oxydation du glucose en gluconate. Pour les bactéries Gram(-) de type Enterobacter et Pseudomonas, elle se déroule dans l'espace périplasmique par l'intermédiaire de GDH et de cofacteurs de type pyrroloquinoléine quinone (PQQ). Lors de l'oxydation du glucose en gluconate, les PQQ réduites sont réoxydées au niveau des quinones membranaires par la mise en jeu de la chaîne respiratoire (Pelmont, 1993). Cette voie est particulièrement importante dans les sols rhizosphériques pour la solubilisation du phosphate minéral indispensable à la croissance et au développement des plantes (Sharma et al., 2005). De nombreuses bactéries dont *Rahnella, Pseudomonas, Erwinia, Enterobacter, Bacillus* et *Rhizobium* sont particulièrement efficaces dans la solubilisation du phosphate grâce à la production d'acides organiques variés comme l'acide gluconique (Rodriguez et Fraga, 1999). Cependant, la voie des GDH peut être réprimée par d'autres acides organiques faibles présents dans le milieu tels le malate et le succinate (Patel et al., 2011).

Ainsi dans la rhizosphère, les substrats carbonés comme les sucres ou les acides organiques produits par les microorganismes ou exsudés au niveau des racines des plantes, peuvent être utilisés selon de nombreuses voies métaboliques pour la survie, le développement et la croissance des microorganismes. Ces acides organiques peuvent également jouer le rôle de répresseur enzymatique sur des enzymes clés comme les GDH, et moduler la réponse métabolique des microorganismes présents.

I.5. Contexte de l'étude

L'altération des minéraux silicatés a largement été étudiée en conditions biotique et abiotique. Les mécanismes de dissolution proposés résultent de la combinaison de différents processus biologiques et/ou chimiques impliquant : *(i)* les acides organiques et inorganiques présents dans les sols (acidolyse et complexolyse), *(ii) la* production de molécules spécifiques produites par les microorganismes ou les exsudats racinaires de plantes comme les sidérophores *(iii)* des variations des conditions physico-chimiques du milieu en termes de pH et de potentiel redox ou *(iv)* la colonisation microbienne des surfaces et le développement de biofilm. Dans tous les cas, les microorganismes jouent un rôle prépondérant dans l'altération des minéraux en interagissant au niveau des interfaces solide-air-eau afin de prélever les nutriments nécessaires à leur survie et à leur développement. Les matrices usuelles utilisées dans les dispositifs expérimentaux sont particulièrement complexes lorsqu'il s'agit de sols et structuralement instables dans le cas de suspensions de particules minérales. La création de matériaux hybrides présentant une matrice siliceuse poreuse dans laquelle sont dispersées les particules minérales offre des perspectives d'étude des interactions plus spécifiques et mieux contrôlées.

Ce travail poursuit les travaux de Grybos et al. (2010, 2011) réalisés au LIMOS sur les gels de silice hybride. Il s'inspire également des travaux antérieurs de Balland (2010), notamment pour le choix des microorganismes étudiés. Les deux principaux objectifs de la thèse sont de *(i)* caractériser la structure des matériaux hybrides et d'accéder à une meilleure connaissance de leurs propriétés physico-chimiques et *(ii)* d'explorer les potentialités de ces matériaux dans l'objectif de mieux comprendre les interactions bactéries/minéral.

Les questions scientifiques posées vers lesquelles nos travaux se sont orientés sont les suivantes : l'altération des minéraux est-elle une stratégie adaptative spécifique offrant aux populations microbiennes altérantes un avantage compétitif ou s'agit-il simplement d'une conséquence fortuite du métabolisme microbien ? Quelle est l'importance des propriétés de surface (composition et charge de surface, hydrophobicité) et du contact bactérie-minéraux dans le déclenchement de l'altération ? En retour, quelles sont les réponses adaptatives au plan métabolique (production de métabolites) des bactéries en présence de surfaces minérales différentes ? De nombreuses questions se posent notamment sur la capacité des populations microbiennes à cibler des silicates spécifiques et sur l'utilisation des nutriments libérés lors de l'altération.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

II.1. Gels de silice hybrides

Les gels de silice hybrides (ou GSH) utilisés dans ce travail de thèse permettent d'immobiliser des particules minérales colloïdales dans une matrice siliceuse. Ils sont synthétisés d'après le procédé sol-gel élaboré par Grybos et al. (2010). La dénomination « gels de silice hybrides » provient de la nature mixte organique et inorganique produite. La structure siliceuse et les particules minérales constituent la fraction inorganique. Les groupements méthyls ainsi que l'agar noble constituent la fraction organique.

II.1.1. Principe du procédé sol-gel

Le procédé sol-gel permet d'obtenir des matériaux vitreux par des réactions chimiques simples et à des températures modérées de 20 à 150°C. La synthèse est effectuée à partir d'un précurseur de type alkoxysilane de formule $Si(OR)_4$ où R est un groupement organique alkyle de type C_nH_{2n+1} (Brinker and Scherer, 1990). Le contact entre les précurseurs et l'eau produit des réactions chimiques simples à la base du procédé sol-gel. L'hydrolyse des groupements alkoxy des précurseurs en groupements silanols (Si-OH) intervient dans une première étape (éq. 2.1 et 2.2) et entraîne la libération de l'alcool correspondant (R-OH). Les réactions d'hydrolyse sont décrites ci-dessous pour les deux précurseurs utilisés dans ce travail, le tétraéthoxysilane ou TEOS de formule $Si\text{-}(OC_2H_5)_4$ et le méthyltriméthoxysilane ou MTMS de formule $Si\text{-}(OCH_3)_3\ CH_3$:

TEOS : $Si(OC_2H_5)_4 + x\ H_2O \rightarrow Si(OC_2H_5)_{4-x}\ (OH)_x + x\ C_2H_5OH$ (2.1)

MTMS : $Si\text{-}(OCH_3)_3\ CH_3 + yH_2O \rightarrow Si\text{-}(OCH_3)_{3-y}\ CH_3\ (OH)_y + yCH_3OH$ (2.2)

Les réactions de condensation débutent généralement avant la fin de l'hydrolyse complète des précurseurs. Un pont siloxane (≡Si-O-Si≡) est produit à partir de la condensation de deux groupements silanols avec libération d'une molécule d'eau selon l'équation (2.3) pour une solution à 100% TEOS ou selon les équations 2.3, 2.4 et 2.5 pour un mélange TEOS-MTMS :

$2\ Si(OC_2H_5)_{4-x}(OH)_x \rightarrow (Si(OC_2H_5)_{4-x}(OH)_{x-1})_2O + H_2O$ (2.3)

$2\ Si\text{-}(OCH_3)_{3-y}\ CH_3(OH)_y \rightarrow (Si(OCH_3)_{3-y}\ CH_3(OH)_{y-1})_2O + H_2O$ (2.4)

$Si(OC_2H_5)_{4-x}(OH)_x + Si\text{-}(OCH_3)_{3-y}CH_3(OH)_y \rightarrow$

$$(OC_2H_5)_{4-x}(OH)_{x-1}Si\text{-}O\text{-}Si(OCH_3)_{3-y}\ CH_3(OH)_{y-1} + H_2O \qquad (2.5)$$

De la même façon, un groupement alkoxy peut interagir avec un groupement siloxane et libérer une molécule d'éthanol pour le TEOS ou de méthanol pour le MTMS.

Les ponts siloxanes sont les unités de base du polymère inorganique. La polymérisation des précurseurs de départ conduit à la formation d'un « sol » c'est-à-dire d'une solution colloïdale constituée de petites particules de silice (Brinker and Scherer, 1990). La généralisation des ponts siloxanes entraîne l'agrégation de ces particules dans tout le volume disponible pour former un gel particulaire de silice. Les réactions d'hydrolyse et de condensation peuvent être très longues, un catalyseur acide ou basique est donc le plus souvent utilisé durant la synthèse sol-gel. L'hydrolyse est accélérée en milieu acide et sa vitesse est minimale à pH 7(Cihlar, 1993). La réaction de condensation du TEOS présente une vitesse minimale pour une valeur de pH de 2. Ce pH correspond au point isoélectrique de la silice. A partir de pH 3, la vitesse de condensation augmente pour atteindre un maximum à pH 6 (Figure II.1). A pH basique, la réversibilité de la réaction peut devenir importante et la gélification ne survient plus. Dans le cas d'un précurseur $R'Si(OR)_3$ où R' est un groupement organique non-hydrolysable (cas du MTMS), la vitesse minimale de condensation est déplacée vers pH 4. La vitesse de condensation augmente avec le nombre de liaisons siloxanes formées. Plus la vitesse de condensation est élevée et plus le temps de gélification est rapide. Les vitesses d'hydrolyse et de condensation déterminent la structure du sol et donc la structure du matériau final (Brinker and Scherer, 1990).

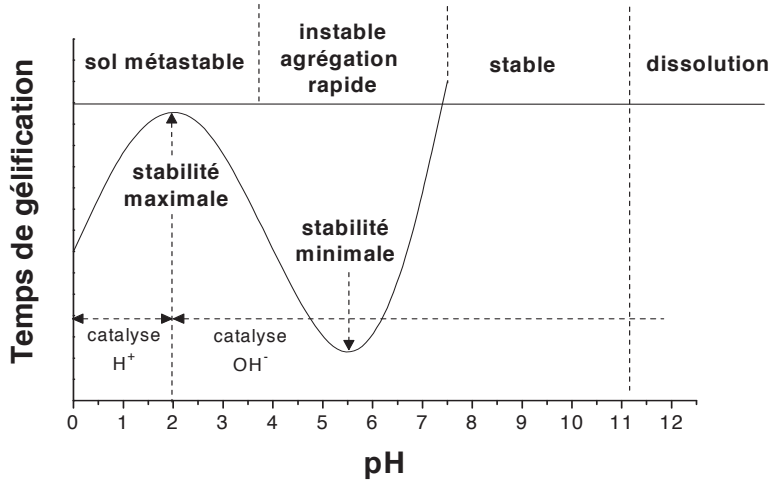
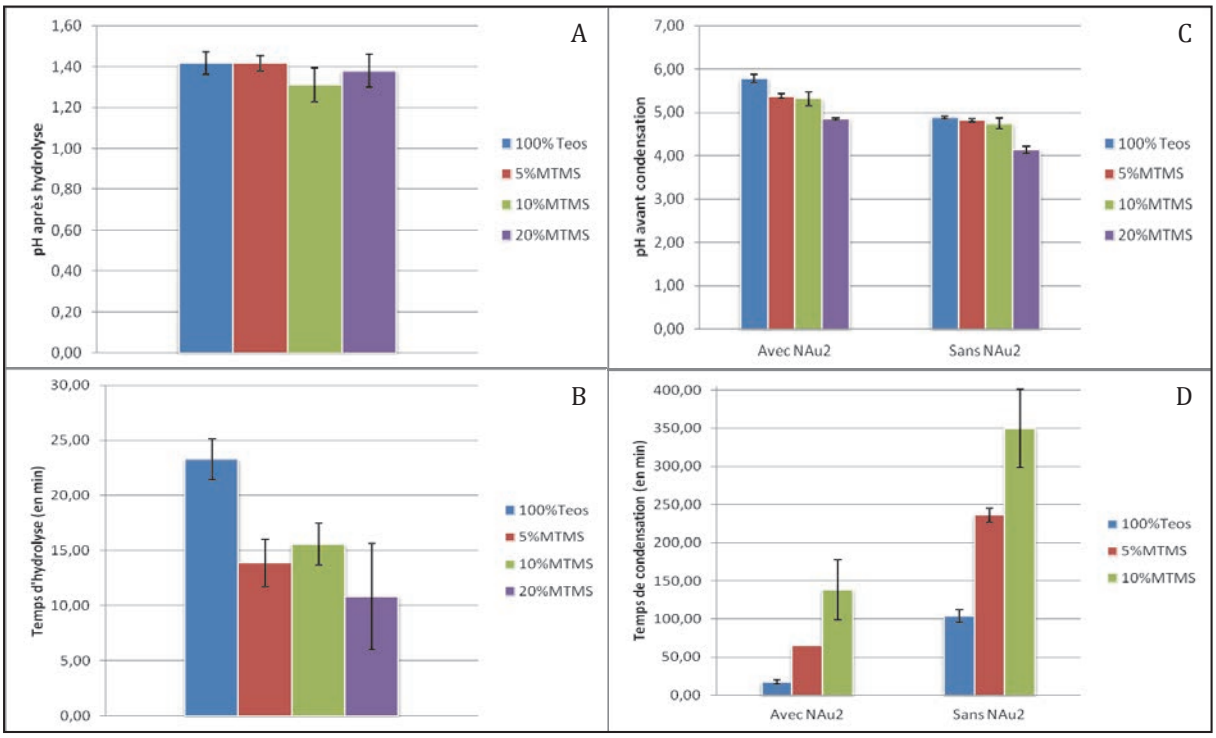


Figure II.1 : Variation du temps de gélification et de stabilité des sols (Michaux, 2010).

II.1.2. Synthèse des gels de silice hybrides

II.1.2.1. Protocole

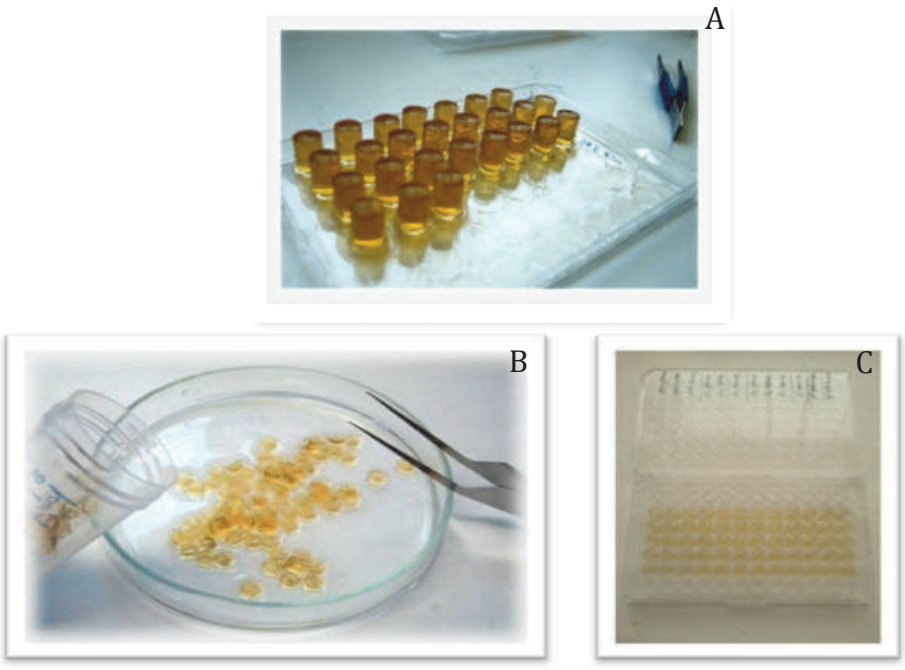
Les précurseurs silicatés utilisés sont le tétraéthoxysilane (TEOS, 99,99%, Fluka) et le méthyltriméthoxysilane (MTMS, 99,99%, Fluka). Une solution limpide (ou sol) est préparée par hydrolyse acide (pH < 1,5 ; Figure II.2 A) d'un mélange de précurseurs silicatés, d'eau ultrapure, et d'acide chlorydrique (HCl à 0,1 M) selon un volume ratio de 1: 0,2: 0,12 (vol/vol) (ou ratio molaire de 1:2,45:0,1) dans un bain à sonication (Branson 2410 DTH) à 55 kHz et à température ambiante. Les temps d'hydrolyse moyens varient de 10 min pour les sols à 20% MTMS à 22 min pour les sols à 100% TEOS (Figure II.2 B). Une solution d'agar noble à 0,15 g L^{-1} est systématiquement ajoutée au système afin d'améliorer les propriétés texturales des gels obtenus en augmentant leur résistance à la fracture. Le pH du sol est augmenté de pH < 1,5 à pH 4,0 environ par addition de NaOH (0,1 M) avant ajout des particules minérales. La concentration finale des gels de silice en particules minérales dans le gel est ajustée à 2,0 g. L^{-1} (sauf indications dans les publications). Afin d'accélérer la condensation et la transition sol-gel, le pH est ensuite ajusté à pH 5,0 environ (Figure II.2 C) avec NaOH (0,1M).



Figures II.2 : Valeurs de pH (A) et de temps (B) pour la phase d'hydrolyse ; valeurs de pH (C) et de temps (D) pour la phase de condensation des sols en gels.

Le sol, amené à pH 5,0 environ, est rapidement distribué en puits de microplaques (96, 48, ou 24 puits selon l'utilisation) et laissé à température ambiante pour condensation. Les temps de condensation varient de quelques minutes à plusieurs heures selon les précurseurs silicatés choisis (Figure II.2 D). Selon l'usage, les GSH ont des volumes variables. Les expérimentations « classiques » en altération minérale sont réalisées avec des GSH de 250 µl (Figure II.3 A). Les utilisations plus spécifiques pour des mesures de transmittance sur de faibles épaisseurs de gel ou des mesures électrochimiques en SECM requièrent respectivement des « µGSH » de 60µL et des GSH de 1,5 mL (Figures II.3 B et C). Les GSH sont stockés dans de l'eau Milli-Q à température ambiante jusqu'à utilisation. Tous les produits utilisés pour la préparation des GSH sont de qualité ultrapure. Le tableau II.1 récapitule les volumes utilisés dans la préparation des gels de silice hybrides.

Les GSH ainsi obtenus sont autoclavés deux fois à 110°C pendant 30 minutes dans de l'eau Milli-Q. Ce traitement a pour objectifs de *(i)* stabiliser la structure des gels, *(ii)* éliminer l'éthanol et le méthanol produit par hydrolyse des précurseurs TEOS et MTMS respectivement et *(iii)* stériliser les gels avant leur utilisation en milieux de culture avec les suspensions bactériennes.



Figures II.3 : Préparation de GSH dopés en NAu-2 de 250 µL (A) et de µGSH de 60 µL dopés en NAu-2 (B) puis déposés en fond de microplaques (C).

Tableau II.1: Récapitulatif des volumes (en mL) de chaque solution et suspension minérale utilisées pour la préparation des GSH.

Type de gels (% MTMS)*	MTMS (ml)	TEOS ml)	HCl 0,1M (ml)	Eau milli-Q (ml)	Agar noble (ml)	NaOH 0,1 M (ml)	Suspensions de particules minérales (ml)	NaOH 0,1 M (ml)	Volume total (ml)
0	0	5	0,6	1	1,5	0,3	3,75	0,35	12,5
5	0,25	4,75	0,6	1	1,5	0,3	3,75	0,35	12,5
10	0,5	4,5	0,6	1	1,5	0,3	3,75	0,35	12,5
20	1	4	0,6	1	1,5	0,3	3,75	0,35	12,5

*Pourcentage exprimé en vol/vol des précurseurs silicatés TEOS et MTMS

II.1.2.2. Particules minérales

Les particules minérales utilisées sont des argiles de la famille des phyllosillicates et du groupe des smectites dioctaédriques, constituées de deux feuillets tétraédriques pour un feuillet octaédrique (TOT). La nontronite (NAu-2) provient du sud de l'Australie (Purdue University) et la montmorillonite (SWy-2), du Wyoming. Les formules structurales sont respectivement pour NAu-2 et SWy-2 les suivantes : $(Si_{7.55}\ Al_{0.16}Fe_{0.29})\ (Al_{0.34}Fe_{3.54}Mg_{0.05})\ O_{20}\ (OH)_4\ Na_{0.72}$ (Gates et al., 2002; Keeling et al., 2000) et $(Si_{7.74}\ Al_{0.26})\ (Al_{3.06}\ Mg_{0.48}\ FeII_{0.03}\ FeIII_{0.42})\ Na_{0.77}$ (Vantelon et al., 2003). Ces minéraux diffèrent par leur teneur en fer (III), élevée pour NAu-2 et basse pour SWy-2.

Le protocole de purification et de fractionnement des particules selon la taille a été mis au point au Laboratoire Environnement et Minéralurgie (LEM, UMR CNRS 7569, Université de Lorraine). Il consiste en une première phase d'échanges d'ions interfoliaires avec le sodium suivie de rinçages puis d'une seconde phase de centrifugations successives permettant le fractionnement selon la taille (Michot et al., 2008; Vantelon et al., 2003). Brièvement, l'argile, réduite en poudre, est dispersée à $40 g.L^{-1}$ dans une solution à 1M de chlorure de sodium (Normapur, VWR) pendant 24h puis centrifugée à 7700*g* pendant 20 min. Le culot de centrifugation est récupéré puis redispersé dans de l'eau distillée. Trois échanges successifs sont ainsi effectués permettant le remplacement total des cations interfoliaires par le cation sodique. Après le troisième échange, l'excès de chlorure de sodium est éliminé par

centrifugation de la suspension à 7700*g* pendant 20 min et redispersion du sédiment dans de l'eau distillée. Cette suspension est ensuite lavée par dialyse en introduisant l'argile dans des tubes à dialyse en cellulose régénérée (membranes Visking, 76mm, Roth) fermés par des pinces lestées. Le seuil de coupure de ces membranes est de 14000 Da permettant uniquement le transfert de l'eau. L'eau osmosée est renouvelée quotidiennement jusqu'à ce que sa conductivité soit inférieure à 5µS, typiquement après une à deux semaines. Finalement la suspension d'argile est placée dans des cônes d'Imhoff. Après 24h de sédimentation, les minéraux indésirables sont séparés et éliminés de la suspension. La suspension purifiée ainsi obtenue est centrifugée pendant 90 min à 7000, 17000 puis 35000 *g*. Les culots récupérés à chaque étape sont redispersés dans de l'eau osmosée et constituent respectivement les tailles 1, 2 et 3. Après la dernière centrifugation, le surnageant restant est concentré par roto-évaporation, le résultat correspond à la taille 4.

La pureté minéralogique a été déterminée par diffraction aux rayons X (XRD, D8 Bruker, Co Ka radiation) et par spectroscopie infra-rouge (Bruker IFS-55). Les tailles des particules minérales ont été mesurées par microscopie électronique à transmission (MET) et sont récapitulées dans le tableau suivant pour NAu-2 (Tableau II.2) (Michot et al., 2008) . Ces valeurs sont également appliquées aux particules minérales SWy-2 fractionnées dans les mêmes conditions opératoires que NAu-2.

Tableau II.2. Paramètres morphométriques des fractions minérales NAu-2 analysées par MET (Michot et al., 2008)

size	minimal length (nm)	maximal length (nm)	av length (nm)	polydispersity length (%)[a]	minimal width (nm)	maximal width (nm)	average width (nm)	polydispersity width (%)[a]	av anisotropy in the plane
1	239	2200	705	52	45	351	138	46	5.5
2	112	986	368	41	45	245	93	39	4.2
3	53	345	147	39	20	120	52	37	3.1
4	47	250	120	35	21	106	44	35	2.9

[a] Polydispersity $P = \sqrt{\langle D^2\rangle - \langle D\rangle^2}/\langle D\rangle$.

II.2. Les souches bactériennes

II.2.1. Identification des bactéries sauvages

Les trois souches de bactéries hétérotrophes Gram (-) utilisées dans le cadre de cette thèse ont été sélectionnées pour leur aptitude à altérer les minéraux d'après des travaux antérieurs

réalisés au LIMOS (Balland et al., 2010; Grybos et al., 2011).

Rahnella aquatilis (RA1) et *Pantoae agglomerans* PA1 ont été isolées respectivement de la rhizosphère de blé et de hêtres (Vosges, France) (Balland et al., 2010). *Burkholderia sp*. G5 a été isolée d'un horizon de sol acide de type podzol (Vosges, France) (Grybos et al., 2011). Les caractéristiques d'identification de ces souches sont détaillées dans le tableau II.3 (Balland et al., 2010; Grybos et al., 2011). Les cultures mères de chaque souche bactérienne sont conservées à -80°C.

Tableau II.3. Caractéristiques d'identification des 3 souches bactériennes utilisées dans les expérimentations biotiques de la thèse (taille du produit PCR = 433 pb) et code d'accès dans la banque de données GenBank (http://www.nbci.mlm.nih.gov.blast)

Souches bactériennes	Références des auteurs	Reconnaissance d'après la séquence d'ARNr 16S	% Similitude	Accès
RA1	(Balland et al., 2010)	*Rahnella aquatilis*	99	DQ862542.1
PA1	(Balland et al., 2010)	*Pantoae agglomerans*	98	GQ862542.1
G5	(Grybos et al., 2011)	*Burkholderia sp*.	99	EU184087.1

II.2.2. Banque de mutants de *Rahnella aquatilis* RA1

II.2.2.1. Obtention de la banque de mutants

Une banque de mutants de *Rahnella aquatilis* RA1 a été produite par insertion du transposon Tn5-gfp porté par le plasmide pAG408 (Suarez et al., 1997) par conjugaison avec *E. coli* S17-1/pAG408. Des aliquots (50 µl) de cultures en phase stationnaire de la souche donneuse S17-1 pAG408 et de la réceptrice *R. aquatilis* RA1 ont été mélangés, déposés sur une gélose de milieu LB puis incubés 6h à 28°C. Les cellules ont ensuite été suspendues dans 2 ml de LB et des dilutions de cette suspension ont été étalées sur gélose LB additionnée de rifampicine (100 µg/ml) et de kanamycine (20 µg/ml) pour sélectionner les transconjugants de *R. aquatilis* RA1 (résistante à la rifampicine) ayant intégré le transposon Tn5-gfp (conférant la résistance à la kanamycine) dans leur génome. L'observation de colonies de différents niveaux de fluorescence après deux jours d'incubation à 28°C indique que l'intégration de Tn5-gfp dans

le génome de *RA1* a bien eu lieu de façon aléatoire, comme attendu. Un millier de colonies ont été inoculées dans 200 µl de LB additionné de kanamycine dans des microplaques 96 puits puis cultivées une nuit à 28°C. Ces cultures ont été additionnées de glycérol (15%) avant d'être stockées à - 80°C.

II.2.2.2. Caractérisation des clones de mutants après criblage sur le critère de production de sidérophores

Les techniques générales de biologie moléculaire utilisées ont été décrites par Sambrook et Russell(2000). Pour identifier le site d'insertion chromosomique du transposon Tn5-gfp dans les mutants de *R. aquatilis* RA1 affectés dans la production de sidérophore, l'ADN génomique de chaque mutant a été extrait à partir de cultures de 2 ml de LB additionné de kanamycine à l'aide du kit FastDNA spin kit (MP Biomedicals), digéré par l'enzyme de restriction KpnI (cette enzyme coupe Tn5-gfp mais laisse intact le gène de résistance à la gentamycine situé à une extrémité du transposon) puis cloné dans le plasmid pBluescript KS- (Stratagène) préalablement digéré par la même enzyme. Le mélange de ligation a ensuite été utilisé pour transformer la souche *E. coli* TOP10 (Invitrogen), les transformants ont été sélectionnés sur milieu LB additionné de gentamycine (10 µg/ml) et d'ampicilline (100 µg/ml). Des mini-préparations d'ADN plasmidique ont été effectuées à partir des transformants obtenus pour chaque mutant et les plasmides recombinants ont été séquencés (MWG opéron) en utilisant l'oligonucléotide pGm3 (5'-GGGAAGAAGTGATGCACTTTGATATCG) complémentaire de l'extrémité 3' du gène de résistance à la gentamycine. Les séquences obtenues ont enfin été comparées aux bases de données de séquence de GenBank à l'aide du program BlastN (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/).

II.2.3. Préparation des suspensions bactériennes

II.2.3.1. Milieux de cultures

Trois milieux de culture ont principalement été réalisés, i.e. milieu LB, milieu BHM et le milieu MM9, à partir de produits chimiques de qualité ultrapure. Les milieux sont stérilisés

par traitement thermique en autoclave à 110°C durant 30min puis stockés à température ambiante.

-*Milieu LB :*

Le milieu LB est constitué pour 1 litre d'eau déminéralisée de 10g de tryptone, 5g d'extrait de levures et 10g de NaCl.

-*Milieu BHM :*

Le milieu BHM (Bushnell-Haas modifié) est un milieu minéral carencé en fer et en magnésium préparé par dissolution dans un litre d'eau ultrapure de : 22,5mg (Na_2HPO_4 , 2 H_2O), 20mg (NaH_2PO_4, $2H_2O$), 20mg(KCl), 100mg(KNO_3), 65mg $(NH_4)_2SO_4$, 20mg ($CaCl_2$, H_2O). Il a été supplémenté en solution de glucose (4g/L) stérilisée par filtration sur membrane Millipore à 0,22 µm.

- *Milieu MM9:*

Le milieu MM9 est utilisé pour révéler la présence des sidérophores (Schwyn et Neilands, 1987). C'est un milieu carencé en phosphate à 0,03% KH_2PO_4 et tamponné par un tampon Tris. La composition de ce milieu (par litre) est la suivante : 6,0 g Na_2HPO_4, 0,3 g KH_2PO_4, 0,5 g NaCl, 1,0 g NH_4Cl, et 6,06 g Tris base (50 mM). Pour chaque litre de solution minérale, sont ajoutés 20 mL de casamino acid (Difco Laboratories) traité avec 10% (w/v) de chelex-100 afin d'éliminer les traces de fer, 2 mL $MgSO_4$ (1M), 10 mL de glucose 20% (w/v) et 0,1mL $CaCl_2$ (1M) (Schwyn and Neilands, 1987 ; Kalinowski et al., 2000). Ces dernières solutions sont préparées et stérilisées séparément par filtration sur membrane Millipore à 0,22 µm.

II.2.3.2. Suspensions bactériennes

Un prélèvement de la culture mère (conservée à -80°C) est remis en culture sur boîte de LB gélosé à 28°C. Un isolement de colonies est ensuite réalisé sur ces boîtes. La remise en culture d'une colonie est réalisée en milieu LB liquide (2 mL) durant une nuit à 28°C et à 150 rpm (Stuart Scientific, 150 rpm). Les bactéries sont récoltées par centrifugation (Multifuge 1 S-R, Heraeus) à 4500g durant 10 min suivie de trois lavages par centrifugations successives avec le milieu de culture choisi pour la suite des expérimentations, i.e. BHM ou MM9. La suspension bactérienne est finalement ajustée, par dilution dans le milieu de culture, à une

absorbance d'environ 0,06 u.A. à 600nm, soit environ $4*10^7$ CFU/ ml.

II.3. Etude de l'altération minérale: systèmes « GSH – bactéries »

Le système « GSH-bactérie » est réalisé à partir de gels de silice hybrides auxquels on a ajouté une suspension bactérienne selon un ratio volumique 1:2. L'ensemble est incubé à 28°C sous agitation à 150 rpm. Des triplicats sont réalisés par colonie.

Après incubation, les suspensions obtenues sont filtrées à 0,22 μm grâce à des microplaques filtrantes (Multiscreen, Millipore) pour les biotests sur petits volumes, ou sur membrane Millipore pour des biotests sur de plus grands volumes de filtrats. Pour le dosage des acides organiques, le filtrat est stocké à -20 °C puis analysé par chromatographie ionique.

II.3.1. Biotests

Le pH, le glucose ainsi que le fer contenus dans les filtrats sont quantifiés en triplicats dans des boîtes 96 puits transparentes (Greiner Bio-one) en utilisant le spectrophotomètre FLX Xenius (SAFAS, Monaco).

II.3.1.1. Mesure du pH

Dans la plupart de nos expériences, le pH est déterminé par une électrode miniaturisée et adaptée aux puits de microplaques pour des volumes de 200 à 300 μl (MeterLab® ; PHM210). Le Bromocresol Green (BCG, Sigma-aldrich) a également été utilisé afin de déterminer par spectrophotométrie le pH selon les protocoles de Uroz et al. (2007) et Balland (2010). 10 μl de bromocrésol green (1 g L^{-1}) sont ajoutés à 200 μl de filtrat. Une double mesure d'absorbance est effectuée à λ = 440 nm (coloration jaune du bromocresol à pH < 3.8) et λ = 618 nm (coloration bleue du bromocrésol à pH > 5.8).

II.3.1.2. Dosage du glucose

Le glucose en solution est déterminé après ajout de 300 μl de la solution GOD-PAP (Kit enzymatique, BioLabo) à 3 μl de filtrat. Le principe est basé sur l'oxydation enzymatique du glucose en présence de glucose oxydase (GOD). Les principaux produits de l'oxydation sont

l'acide gluconique et l'eau oxygénée (H_2O_2), c'est ce dernier qui réagit en présence de 4-amino-antipyrine (PAP) et de péroxydase (POD) avec le chloro-4-phénol pour former des quinone-imines rouges. Après 20 minutes à l'obscurité, l'absorbance du complexe coloré est déterminée à λ = 505 nm. La valeur est reportée sur une droite d'étalonnage réalisée pour une gamme de concentrations de glucose en 6 répétitions variant de 0 à 5 g L^{-1}.

II.3.1.3. Dosage du fer total dissocié des particules minérales

Le fer en solution est déterminé à λ=565 nm par ajout de 20 µl d'un indicateur coloré, le Ferrospectral® (Merck 1.14761) à 200 µl du filtrat. La limite de détection du fer dans nos conditions expérimentales est de 20 µg L^{-1}. Le fer amorphe ou précipité durant l'expérience est également récupéré après ajout d'un volume de solution d'hydroxylamine et de chlorure de potassium (NH_2OH 0,2% ; KCl 1M ; pH 5) pour 2 volumes de GSH. Après 1 heure d'incubation à 28°C, le fer dissout est quantifié par ajout de 20 µl de Ferrospectral® à 200 µl de la solution filtrée d'hydroxylamine et de chlorure de potassium (Uroz et al., 2007; Balland et al., 2010; Grybos et al., 2010). Le fer total libéré correspond à la somme du fer dissout et du fer précipité remis en solution après traitement à l'hydroxylamine et au chlorure de potassium.

II.3.2. Dosages spécifiques aux métabolites bactériens

II.3.2.1. Les sidérophores

Pour les tests qualitatifs et quantitatifs des sidérophores, un triplicat est réalisé par échantillon.

- *Test quantitatif CAS*

Les sidérophores produits par les microorganismes sont dosés en utilisant le milieu CAS liquide selon le protocole de Schwyn et Neilands, (1987). Le test est basé sur une compétition pour le fer entre le complexe ferrique du Chrome Azurol S (CAS) de couleur bleue et les sidérophores bactériens présents dans le milieu. La décoloration du milieu est proportionnelle à la concentration en sidérophores. La concentration en sidérophores est déterminée sur une

courbe de calibration au desferroxamine B (DFOM) variant de 1 à 150 μM et elle est exprimée en équivalents DFOM (Payne, 1994).

- *Test qualitatif O-CAS*

Le test qualitatif O-CAS est réalisé en deux étapes selon la procédure de Schwyn and Neilands (1987) et Pérez-Miranda et al. (2007). Des boîtes de Pétri contenant du milieu MM9 gélosé sont ensemencées avec les bactéries (spot de 10 μl de bactéries à 0.06 UDO par boîte) et incubées à 28°C sans agitation pendant 3 à 5j. La présence de sidérophores est révélée par ajout de 10 à 30 ml de milieu CAS gélosé de couleur bleue à la surface de la boîte. Après une nuit à l'obscurité et à température ambiante, une variation de couleur est observée à la périphérie des colonies dans le cas d'une production et diffusion de sidérophores dans le milieu. Le halo autour des spots bactériens est coloré selon la nature chimique des sidérophores produits d'après Pérez-Miranda et al. (2007) : une décoloration du bleu à l'orange indique la présence de sidérophores type hydroxamate ou du bleu au pourpre la présence de sidérophores type catécholate.

II.3.2.2. Les acides organiques

La quantification des acides organiques produits par les bactéries est réalisée par chromatographie ionique (ICS 3000, Dionex corp.) équipée d'une colonne analytique échangeuses d'anions (AS 11 HC, Dionex corp.) thermostatée à 35°C. L'échantillon est élué avec une solution de KOH dont le gradient d'élution varie de 0,9 à 60 mM dans le temps et un débit en phase mobile de 1,3 ml min^{-1}. Les solutions de référence utilisées sont le formiate de sodium, le citrate de sodium tribasique, l'oxalate de sodium, le propionate de sodium, l'acétate de sodium, le sel d'acide succinique disodique, le sel DL- acide malique disodique (Sigma Aldrich), le L-lactate de sodium et le sel d'acide malonique disodique (Fluka). L'incertitude sur la mesure est proche de 0,5% pour tous les acides organiques. La limite de détection est de 0,1 ppm.

II.4. Techniques utilisées

II.4.1. Structure et propriétés physico-chimiques des GSH

II.4.1.1. La spectrométrie optique sur GSH

Dans ce travail, les gels ont été étudiés par spectroscopie UV-VIS entre 300 et 800nm afin de caractériser les transformations minéralogiques des particules à différents stades d'altération des GSH. La spectroscopie UV-VIS est utilisée en minéralogie et dans l'industrie des matériaux, pour caractériser le statut de métaux dans des échantillons minéraux (e.g. oxydes de fer) ou pour évaluer les propriétés optiques comme le degré de blancheur de certaines matières minérales (tels les kaolins), via des diagrammes trichromatiques (Delineau 1994, Villieras, 1993). Les spectres UV-Vis peuvent être obtenus par réflexion diffuse lorsque le matériel se présente sous forme de poudre ou par transmission lorsque le matériau est transparent.

L'excellente conduction optique des GSH permet de travailler directement en absorbance *in vitro* sans être obligé de sécher et réduire en poudre l'échantillon. L'absorbance suit donc la loi de Beer-Lambert.

Acquisition et Traitement numérique des spectres optiques

Les GSH sont analysés in vitro avant, pendant et après traitement biologique ou chimique par spectrométrie d'absorption UV-Vis dans le but de caractériser l'évolution du statut du fer dans la structure des nontronites NAu-2. Les spectres UV-Visible ont été enregistrés grâce à un spectrofluorimètre (SAFAS, Xenius FLX) en mode transmission entre 300 et 800nm. Le spectromètre est équipé d'un porte-échantillon motorisé permettant l'analyse de gels de 1 à 2mm d'épaisseur disposés dans les puits d'une microplaque à fond plat transparent (24,48 ou 96 puits) en polypropylène ou polystyrène. La résolution est de 1 nm et la vitesse de balayage est d'environ 2nm/s. Les mesures sont exprimées en absorbance en fonction de la longueur d'onde. Leur linéarité est garantie sur 5 ordres de grandeur (entre 0,001 et 3 A.U.). Un puits rempli d'air ou d'eau osmosée sert de référence. La transmission du fond de plaque ne permet pas d'acquérir des spectres au delà de 820 nm.

II.4.1.2. Caractérisation de la structure des gels par Small-Angle X-ray Scattering, SAXS

Dans le cadre de cette thèse, les analyses de diffusion des rayons X aux petits angles (Small-Angle X-ray Scattering, SAXS) ont été réalisées à l'institut Jean Barriol, dans le laboratoire de chimie et physique moléculaires et biomoléculaires ICPMB (FR 2843) de l'université de Lorraine.

a. *Présentation du matériel utilisé*

Le modèle SAXess mc^2 (Anton Paar) utilisé est adapté à l'analyse de la nanostructure des gels de silice hybrides (GSH) selon le principe suivant illustré par la figure II.4 (Michaux, 2009).

Un générateur de rayonnement X émet un spectre de raies dont l'une est sélectionnée par un système optique comprenant un miroir courbe de quartz qui réfléchit et focalise le faisceau puis un système de collimation, constitué de fentes, qui « nettoie » le faisceau et sélectionne un rayonnement monochromatique de longueur d'onde λ. Ce rayonnement incident traverse l'échantillon. L'intensité diffusée I est collectée par le détecteur en fonction de l'angle de diffusion 2θ. La mesure aux petits angles permet d'étudier les tailles caractéristiques du matériau, de 1 à 100 nm dans notre cas.

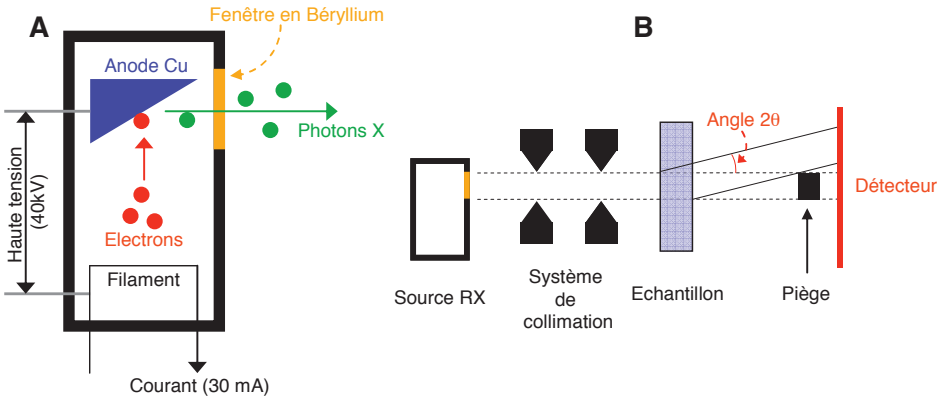


Figure II.4 : Schéma d'un tube RX (A) et d'un montage SAXS (B) (Michaux, 2009).

Le montage « SAXSess mc² » (Anton Paar) utilisé (Figure II.5) est composé de :

- un générateur de rayons X (tube PANalytical, $\lambda_{\text{Cu K}\alpha} = 0{,}1542$ nm ; paramètres de fonctionnement : 40 kV, 50 mA)

- un miroir (utilisé pour convertir le faisceau polychromatique divergent à la sortie du tube en un faisceau linéaire convergent arrivant sur l'échantillon),
- une chambre de mesure sous vide à 20°C (contrôleur de température à effet Peltier) où est introduit le capillaire contenant l'échantillon,
- une caméra CCD (charged-couple device) correspondant au détecteur, se trouve à une distance de 309 mm de l'échantillon.

Les données sont analysées grâce au logiciel SAXSQuant (Anton Paar).

Un diffractogramme représentant l'intensité diffusée à une dimension I(q) en fonction du vecteur d'onde, q (*en* nm^{-1}) = $(4\pi/\lambda)\sin(\theta)$ où 2θ représente l'angle de diffusion après intégration des images 2D obtenues par la CCD. Les données sont ensuite traitées et mises en valeur absolue. Pour cela, plusieurs étapes sont nécessaires :

- soustraction du bruit de fond de la CCD
- normalisation par rapport au faisceau primaire
- soustraction du « blanc » (ici, celui du capillaire contenant de l'eau ultrapure)
- « desmearisation » (car on travaille avec un faisceau linéaire)
- mise à la valeur absolue



Figure II.5 : Instrument SAXSess mc² (Anton Paar) pour l'analyse de la structure des GSH par SAXS

b. *Préparation des échantillons*

Les échantillons sont préparés dans des capillaires en borosilicate de diamètre 1,5 mm (GLAS, Schönwalde, Allemagne). Un volume de 60µL d'une solution de « sol » fraîchement préparée (cf. paragraphe II.1.2.) est introduit dans la partie supérieure des capillaires. Afin que le liquide ou « sol » descende au fond du capillaire, une centrifugation à 3000*g* durant 30 secondes est appliquée. La transition sol-gel survient après une vingtaine de minutes. Après repos du gel une nuit, un ajout d'eau (60 µL) suivi d'une centrifugation à 1000*g* durant 10 secondes est réalisé dans le capillaire afin de maintenir les gels hydratés dans le temps. Enfin, les capillaires sont scellés par traitement thermique (bec benzène) en respectant la longueur nécessaire à l'insertion sur le porte-échantillon. Les capillaires préparés avec ou sans nontronite (NAu-2), sont analysés sous vide sur un appareil SAXess mc^2(Anton Paar). L'effet du traitement hydrothermal sur la structure de l'échantillon est réalisé avant passage puis après passage à l'autoclave à 110°C durant 30 min.

c. *Traitement théorique des données SAXS*

Afin de préciser les dimensions caractéristiques de tels systèmes consistant en des agrégats fractals, les données expérimentales ont été traitées selon les principaux modèles théoriques décrivant la variation de l'intensité diffusée en fonction du vecteur de diffusion q. L'intensité I(q) s'exprime de la façon suivante :

$$I(q) = AP(q)S(q) \qquad (1)$$

A est une constante qui dépend du nombre de particules diffusantes et de la différence de contraste électronique entre les particules et le milieu, P(q) est le facteur de forme, qui ne dépend que de la géométrie des entités de base de l'agrégat et S(q) est le facteur de structure. S(q) est lié aux interactions entre les particules au sein de l'agrégat.

Facteur de structure, S(q)

Dans le cas de systèmes consistants en agrégats fractals de taille finie et formés de petites particules compactes, Freltoft et al (1986) et indépendamment Teixeira (1988) ont dérivé chacun deux expressions analytiques pour décrire le facteur de structure, S(q).

La formule de Teixeira est la suivante :

$$S(q) = 1 + \frac{D}{(qr)^D} \frac{1}{\left(1 + 1/q^2\xi^2\right)^{(D-1)/2}} \Gamma(D-1) \sin\left((D-1)\operatorname{atan}(q\xi)\right) \quad (2)$$

avec D la dimension fractale de l'agrégat, r le rayon caractéristique de l'unité élémentaire, ξ une longueur de corrélation correspondant à la taille de l'agrégat, et Γ la fonction gamma.

La formule développée par Freltoft et al. (1986) présente quelques différences, notamment un nouveau paramètre C, qui est une constante :

$$S(q) = 1 + \frac{C\xi^D}{q\xi} \frac{1}{\left(1 + q^2\xi^2\right)^{(D-1)/2}} \Gamma(D-1) \sin\left((D-1)\operatorname{atan}(q\xi)\right) \quad (3)$$

A partir de C, il est possible de recalculer (B+1) qui est le nombre moyen de particules primaires par agrégat selon la formule : $B = C(D-1)\Gamma(D-1)\xi^D$

Facteur de forme, P(q)

Si les unités de base sont des particules sphériques de rayon r, le facteur de forme s'écrit :

$$P(q) = \left(3 * \frac{\sin(qr) - qr\cos(qr)}{(qr)^3}\right)^2 \quad (4)$$

Dans le cas des fractals de masse, il est fréquent d'utiliser le facteur de forme décrit par Debye-Bueche, r étant alors une longueur de corrélation à petite échelle :

$$P(q) = \left(\frac{1}{1 + q^2r^2}\right)^2 \quad (5)$$

Le facteur de forme décrit par Debye et Bueche a été modifié par Emmerling et al. (1995) en ajoutant un préfacteur $\left(\sqrt{2}/3\right)$ pour que le facteur de forme s'approche de celui d'une sphère pour les grandes valeurs de q :

$$P(q) = \left(\frac{1}{1 + \left(\sqrt{2}/3\right)q^2r^2}\right)^2 \quad (6)$$

Les trois types de facteurs de forme sont illustrés sur la figure II.6 ci-dessous, pour un rayon de 1 nm :

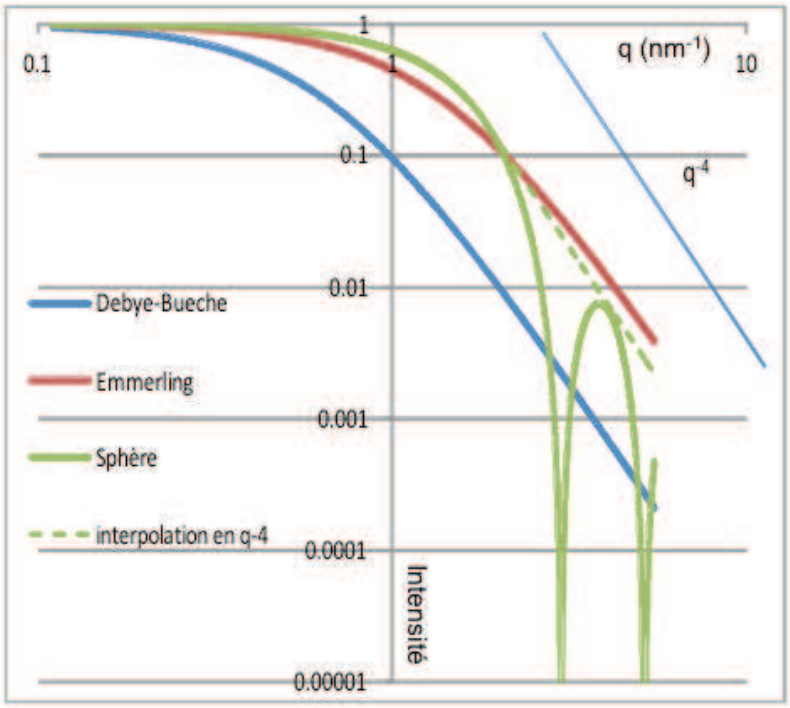


Figure II.6: Facteurs de forme P(q) de Debye-Bueche et Emmerling, et facteur de forme d'une Sphère. L'atteinte du plateau de Guinier pour les petites valeurs de q est visible. La loi en puissance du domaine de Porod pour les plus grandes valeurs de q est indiquée en q^{-4}

Le facteur de forme de la sphère présente des oscillations de période π/r. Ces oscillations ne sont pas observées sur les courbes expérimentales, les raisons pouvant être multiples : polydispersité en taille des particules élémentaires, résolution instrumentale. Dans un but de simplification, nous avons utilisé ce facteur de forme en interpolant sur le domaine de présence des oscillations par une relation en $I(q) \propto q^{-4}$. En ce qui concerne le facteur de forme de Debye, les deux régions extrêmes « domaine de Guinier-domaine de Porod » sont moins marquées sur la gamme en q. La modification du facteur de forme de Debye par le pré-facteur d'Emmerling tend à le faire rapprocher du facteur de forme de la sphère.

Les courbes expérimentales ont été modélisées en utilisant les combinaisons des deux facteurs de structure de Teixeira et Freltoft et les trois facteurs de forme prédéfinis *i.e.* sphère, Debye et Emmerling, ce qui donne 6 solutions possibles. Les ajustements ont été obtenus par moindre carrés, avec trois paramètres dans la cas du facteur de structure de Teixeira (ξ, r et D) et quatre pour celui de Freltoft (les trois précédents plus la constante C). L'ajustement est obtenu au sens des moindres carrés, i.e. en minimisant la somme quadratique des déviations :

$$S = \sum_{i}^{N} ((\log(I\exp_i) - \log(Icalc_i))^2 \quad (7)$$

Avant l'ajustement, les courbes expérimentales ont été lissées afin de limiter la dispersion pour les grandes valeurs de q.

II.4.1.3. Caractérisation des interactions eau – GSH

a. Sorption dynamique de vapeur d'eau : Dynamic Vapour Sorption, DVS

Les analyses DVS ont été réalisées à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA), dans le laboratoire d'ingénierie des biomolécules (LIBIO) de l'université de Lorraine. L'instrument utilisé (DVS, Surface Measurement Systems Ltd., London, UK) est équipé d'une microbalance de Cahn dans une enceinte thermostatée (Figure II.7).

La sorption dynamique de vapeur d'eau est une technique gravimétrique qui mesure en fonction du temps la quantité de solvant absorbé ou desorbé par un échantillon. L'eau est le solvant couramment utilisé, mais il est également possible d'utiliser une large gamme de solvants organiques.

Le protocole ainsi que les résultats de cette étude figurent dans la publication **: Oulkadi D. et al. (2012) Water sorption in hybrid silica gels containing colloidal nontronite. Journal of Sol-Gel Science and Technology , 64 : 653-660.**



Figure II.7 : Instrument DVS (Surface Measurement Systems Ltd., London, UK) pour l'analyse de la sorption et désorption d'eau par les GSH

b. Mesures de diffusion d'eau et de relaxométrie par Résonance magnétique nucléaire

Les analyses RMN ont été réalisées à l'institut Jean Barriol, dans le service commun de Méthodologie RMN (FR CNRS 2843, UMR UHP-CNRS CRM2 7036) de l'université de Lorraine.

Dans cette partie nous utilisons l'aspect dynamique de la résonance magnétique nucléaire (RMN), qui permet d'accéder aux mouvements moléculaires, grâce aux coefficients de diffusion et aux temps de relaxation pour étudier le comportement de la molécule d'eau, dans la matrice de silice (gels de silice hybride) préparée avec 100% de précurseurs hydrophiles (Tetraéthoxysilane : TEOS) ou un mélange TEOS-Methyltrimethoxysilane (MTMS).

Les mesures de diffusion (liées aux coefficients d'auto-diffusion d'eau) ont été réalisées sur un spectromètre BRUKER 300 et 600 MHz avec une séquence standard. Pour l'obtention des courbes de relaxométrie (R_1=f (fréquence)), nous avons utilisé un relaxomètre STELAR

couvrant une gamme de fréquence de 5kHz à 10 MHz. Deux autres mesures ont été réalisées à plus haut champ pour compléter les courbes à 300MHz et 600MHz en utilisant la séquence d'inversion récupération classique.

Le principe général de la RMN appliqué à nos gels hybrides de silice est présenté dans ce paragraphe. Par contre, le protocole et les résultats obtenus sont présentés dans la publication : **Oulkadi et al., (2013) Water behavior in hybrid silica gels as studied by ^{1}H Nuclear Magnetic Resonance relaxometry. Evidence of two hydration layers. Microporous and Mesoporous Materials. 172 : 213-216.**

i. Les mouvements moléculaires accessibles par RMN

La résonance magnétique nucléaire (RMN) en solution permet d'accéder à deux types de mouvements moléculaires: la translation, appréhendée grâce au coefficient d'auto-diffusion et la réorientation assimilable à des rotations, accessible grâce aux temps de relaxation T_1.

Les mouvements translationels caractérisés par le coefficient d'auto-diffusion

Nous avons essayé dans un premier temps de voir si la différence d'hydrophobicité de la matrice siliceuse (100% TEOS : gels hydrophile ; 20% MTMS : gels hydrophobes) pouvait entrainer des **modifications de la taille des pores à l'intérieur de ces matrices**. Dans ce but, nous avons entrepris des mesures de coefficient d'auto-diffusion de la molécule d'eau à l'intérieur des gels afin de détecter des évolutions qui pourraient nous renseigner sur la structure interne des gels.

Les techniques permettant de mesurer le coefficient d'auto-diffusion utilisent des impulsions de gradient du champ magnétique statique B_0 (utilisé pour polariser les spins lors d'une expérience de RMN). Cette polarisation des spins nucléaires (dans notre cas, les deux protons de la molécule d'eau) entraîne l'apparition d'une aimantation nucléaire qui, à l'équilibre, est orientée selon la direction de B_0. Si cette aimantation est écartée de sa position d'équilibre en l'amenant dans un plan perpendiculaire à B_0, elle acquiert un mouvement de rotation (appelé précession) à la fréquence

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \qquad (8)$$

γ étant une constante appelée rapport gyromagnétique et qui définit l'amplitude de l'aimantation nucléaire, ν_0 étant généralement appelée fréquence de Larmor. En fait, le signal RMN provient de la détection au moyen d'un capteur approprié (bobine radio-fréquence), de ce mouvement de précession. La figure II.8 permet de comprendre le principe de la mesure du coefficient d'auto-diffusion : l'excitation initiale est une impulsion de champ radio-fréquence qui comme indiqué plus haut, permet de basculer l'aimantation nucléaire dans le plan perpendiculaire à B_0. Une première impulsion de gradient ($+g$) assure un marquage spatial où chaque molécule est marquée selon sa position dans l'échantillon. En effet, toute modification du champ magnétique (ici grâce au gradient) entraine d'après l'équation (8) une modification de la fréquence de Larmor, d'où cette notion de marquage spatial, le gradient étant lui même défini par rapport à une direction de l'espace. Cette première impulsion de gradient est suivie par un délai de diffusion (Δ) pendant lequel les molécules peuvent translater librement. Une deuxième impulsion de gradients ($-g$) de signe opposé permet de suivre le changement de position des molécules après ce délai de diffusion (Δ).comme la deuxième impulsion de gradient est exactement l'opposée de la première, on s'attend à ce que le marquage spatial dû à la première impulsion de gradient soit exactement annihilé par la deuxième. En fait, ceci n'est vrai que si les molécules ne se sont pas déplacées durant l'intervalle Δ. A contrario, si les molécules ont pu diffuser de façon significative durant ce délai Δ, cette annihilation (que l'on appelle souvent refocalisation) n'est que partielle et le signal RMN est donc atténué comme indiqué dans l'équation (9) ci-dessous (que l'on obtient à partir de l'équation de la diffusion et en faisant l'hypothèse d'une distribution gaussienne des déplacements translationnels). Connaissant ce délai Δ, la valeur du gradient g, la durée d'application des gradients δ, ainsi que d'autres constantes intervenant dans la mesure, on peut déterminer le coefficient d'auto-diffusion qui n'est autre qu'une vitesse exprimée en surface par unité de temps ($m^2.s^{-1}$).

$$I = I_0 e^{-\gamma^2 g^2 \delta^2 \Delta \underline{D}} \tag{9}$$

avec g, la puissance des gradients ($G.cm^{-1}$) ; δ, durée d'application des gradients (s); γ, rapport gyromagnétique du noyau observé ($Hz.G^{-1}$); Δ, délai de diffusion (s) et D, coefficient d'auto-diffusion ($m^2.s^{-1}$)

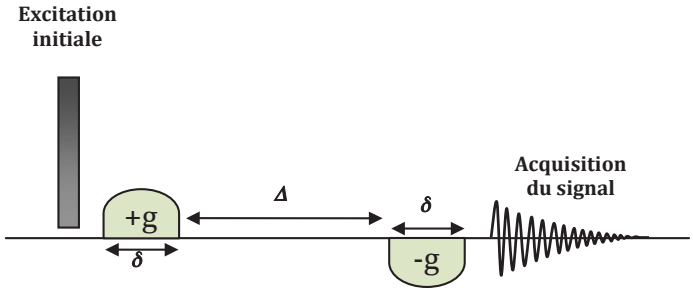


Figure II.8 : Schéma de principe de la mesure du coefficient d'auto-diffusion par RMN.

Dans la pratique, une série de mesures est effectuée à différentes valeurs de puissance de gradient g et une série de spectres est enregistrée en incrémentant la puissance du gradient g. L'évolution de l'intensité du signal mesuré *I* (Figure II.9) sera fonction du coefficient d'auto-diffusion selon l'équation (9).

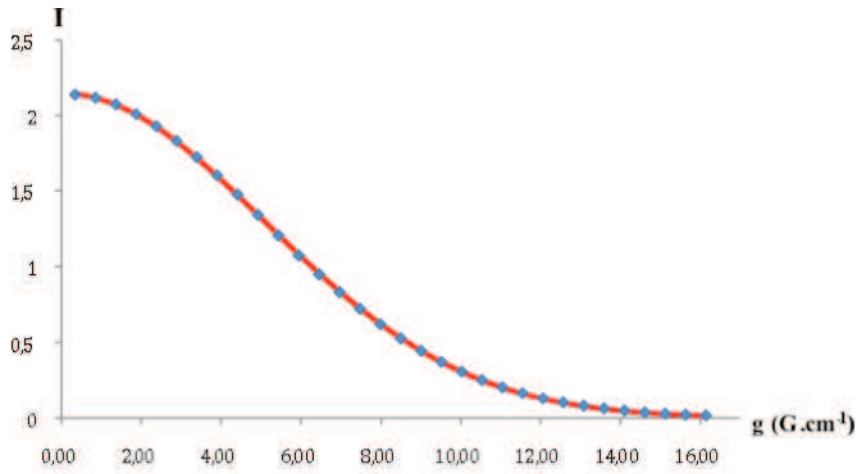


Figure II.9 : Exemple de courbe de diffusion I=f(g) obtenue à 300MHz avec δ = 4ms et Δ = 100ms. Points bleus (valeurs expérimentales, courbe rouge (courbe théorique).

Bien évidemment, les coefficients de diffusion dépendent de la taille de la molécule ainsi que de son environnement. Dans un même solvant, une petite molécule diffuse plus vite qu'une grosse molécule. De même une molécule donnée diffusera plus vite dans un solvant moins visqueux. De fortes interactions moléculaires sont également susceptibles d'abaisser le coefficient d'auto-diffusion (par exemple, comme nous le verrons ci-après, l'interaction de l'eau avec une surface d'un gel de silice). Par ailleurs, si la molécule étudiée est confinée dans

une structure de petite taille (milieu de faible porosité), elle sera soumise à un certain nombre de réflexions durant l'intervalle Δ. Dans ce cas, on parle de diffusion restreinte et on ne mesure qu'un coefficient de diffusion apparent qui dépend de Δ.

Dans notre étude, nous avons mesuré les coefficients d'auto-diffusion de l'eau dans tous les échantillons préparés (100% TEOS, 95% TEOS et 80% TEOS). Aucune différence significative n'est observée concernant le coefficient d'auto-diffusion par rapport au coefficient d'auto-diffusion de l'eau pure, ce qui pourrait en première analyse, nous conduire à dire que **notre système « gel de silice hybride » est quasiment composé d'eau**. En fait, ces gels existent, et sont visible à l'œil nu et nous nous devons donc expliquer nos résultats. Pour cela, nous allons adopter une démarche classique qui consiste à supposer que l'eau libre et l'eau liée à la structure siliceuse du gel sont en échange rapide de telle sorte que le coefficient de diffusion nommé (observé) D_{obs} relève de l'équation ci dessous

$$D_{obs} = pD_b + (1-p)D_f \tag{10}$$

où p est la proportion d'eau liée dont le coefficient de diffusion est noté D_b (b pour « bound »), D_f étant le coefficient de diffusion de l'eau libre (f pour « free »). Il est généralement admis, que D_b est très inférieur à D_f ce qui fait que l'équation (10) se ramène à :

$$D_{obs} \approx (1-p)D_f \tag{11}$$

d'après l'équation (11), on remarque que D_{obs} est quasiment identique au coefficient de diffusion de l'eau pure (donc de D_f), et on conclut que p est sans doute inférieure à 0.01 (1% étant au mieux la marge d'erreur de mesure d'un coefficient d'auto-diffusion par RMN). La proportion d'eau liée est donc extrêmement petite par rapport à l'eau libre. Cette conclusion sera précisée par les mesures de relaxométrie présentées dans le paragraphe ci-après.

Les temps de relaxation en RMN

La relaxation de spin en RMN correspond à l'ensemble des mécanismes qui sont à l'origine du retour à l'équilibre de l'aimantation nucléaire. Lorsqu'un échantillon est placé au sein d'un champ magnétique statique B_0, une aimantation nucléaire M_0 alignée selon un axe (Z) colinéaire à B_0 se forme (figure II.10), si cette aimantation est amenée hors de sa position d'équilibre par une impulsion radio fréquence (*rf*), deux processus distincts ramènent l'aimantation vers son état d'équilibre : la relaxation longitudinale (caractérisée par le temps de relaxation T_1) qui décrit la reconstruction de l'aimantation le long de l'axe longitudinal (Z),

et la relaxation transversale (caractérisée par le temps de relaxation T_2) qui gouverne la disparition des composantes de l'aimantation dans le plan transversal (X,Y).

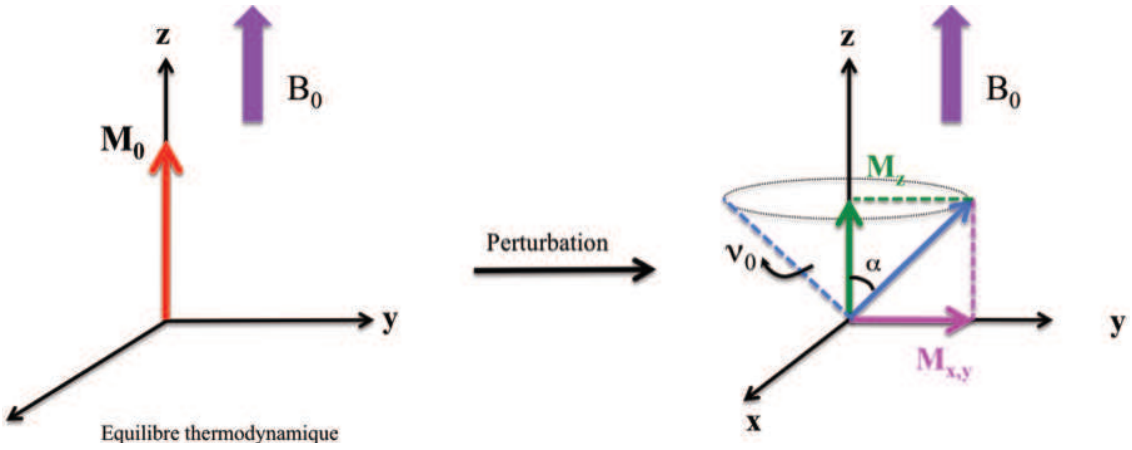


Figure II.10 : Aimantation nucléaire à l'équilibre (gauche) et après basculement de l'aimantation nucléaire par un angle α (droite). L'aimantation précesse à la fréquence de Larmor, ν_0 , et revient à l'équilibre grâce aux deux processus de relaxation T_1 (reconstruction selon l'axe z) et T_2 (disparition de l'aimantation dans le plan transversal x, y)

ii. Origine de la relaxation

Le retour à l'équilibre de l'aimantation nucléaire ne peut se faire que par un processus inverse à celui qui l'a amenée dans la situation de non-équilibre. Cela implique que les mécanismes de relaxation doivent, dans une certaine mesure, agir comme un champ radio-fréquence. Ces mécanismes doivent donc dépendre du temps et présenter un certain degré de cohérence. Dans le cas qui nous intéresse (les deux protons de la molécule d'eau), on considèrera l'interaction intramoléculaire entre les deux dipôles (ou moments) magnétiques associés aux deux moments de spin des protons, et on fera abstraction des interactions spin-spin intermoléculaires sans que cela ne nuise réellement aux traitements développés plus loin. Implicitement, nous supposons donc que la contribution intermoléculaire est approximativement la même pour les différents types d'eau existant dans le système étudié (gels de silice). Les temps de relaxation seront considérés comme provenant de l'interaction dipôle magnétique-dipôle magnétique intramoléculaire qui ne dépend du temps que par les mouvements de réorientations moléculaires. La cohérence de ces mouvements de rotation est définie par ce que l'on appelle communément, le temps de corrélation τ_c ou temps nécessaire à une réorientation moléculaire de 1 radian. Ces temps de corrélation varient de la

picoseconde (ps) pour les petites molécules dans un solvant peu visqueux à la microseconde pour des grosses entités en passant par la nanoseconde pour les molécules comme les protéines ou l'eau interagissant par exemple avec une surface. Enfin ce mécanisme de relaxation doit être actif à certaines fréquences, en relation avec la fréquence de travail des spectromètres RMN. La quantité qui traduit cette propriété s'appelle « densité spectrale » et s'exprime par la formule suivant :

$$J(\omega_0) = \frac{2\tau_c}{1+\omega_0{}^2\tau_c^2} \tag{12}$$

Nous ne nous préoccupons ici que du temps de relaxation longitudinale T_1 (appelé encore temps de relaxation spin-réseau). Celui-ci concerne seulement le retour à l'équilibre de la composante selon la direction du champ magnétique statique B_0. Il est en effet, relativement plus facile à mesurer et à interpréter que l'autre temps de relaxation T_2 (appelé temps de relaxation transversale ou spin-spin). On présentera et on interprétera les résultats plutôt sous la forme de l'inverse de T_1 que l'on note R_1 (= $1/T_1$), et que l'on appelle « vitesse de relaxation » dans le cas de la relaxation dipolaire intramoléculaire R_1 s'exprime comme suit :

$$R_1(\omega_0) = K_{HH}\left[4J(2\omega_0) + J(\omega_0)\right] \tag{13}$$

$\omega_0 = \gamma B_0$ est la pulsation de résonance (cf. fréquence de Larmor ν_0 avec $\nu_0 = \frac{\omega_0}{2\pi}$), K_{HH} est une constante dépendante de la distance r_{HH} entre les deux protons et elle s'exprime de cette façon :

$$K_{HH} = \left(\frac{3}{20}\right)\left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\gamma^4 h^2}{r_{HH}^6} \tag{14}$$

μ_0 est la perméabilité du vide et h la constante de Planck divisée par 2π.

Par ailleurs, on peut montrer qu'une bonne approximation de l'équation (13) est de la forme :

$$R(\omega_0) = K_{HH}\left[5J\left(\sqrt{3\omega_0}\right)\right] \tag{15}$$

Avec $J\left(\sqrt{3\omega_0}\right)$ qui peut s'écrire : $J\left(\sqrt{3\omega_0}\right) = \frac{2\tau_c}{1+\omega_0^2\left(\sqrt{3}\,\tau_c\right)^2} = \frac{A}{1+\omega_0^2\left(\sqrt{3}\,\tau_{c_{ieff}}\right)^2}$ (16)

Avec $\tau_{c_{ieff}} = \sqrt{3}\ \tau_c$ et $A = 2\tau_c$

On pourra enfin mentionner que pour des temps de corrélation courts de l'ordre de la picoseconde (ps.) et compte tenu des fréquences de mesure des appareils de la RMN, $j(\sqrt{3\omega_0})$ se réduit à A (il s'agit du régime de rétrécissement extrême : $\omega_0^2\tau_c^2 <<< 1$). Compte tenu des considérations précédentes, nous pouvons modéliser la vitesse de relaxation de l'eau dans les milieux que nous étudions (gels de silice) par :

$$R(\omega_0) = A_0 + \sum_{i=1}^{n} \frac{A_i}{1 + \omega_0^2 \tau_{c_i}^2} \qquad (17)$$

A_0 représente la contribution de l'eau libre (qui relève du rétrécissement extrême). Dans l'équation 17, on a fait l'hypothèse de n types d'eau liée, chaque type d'eau étant caractérisée par son temps de corrélation τ_{c_i} et un facteur A_i indiquant l'importance de sa contribution.

II.4.2. Microscopie électrochimique SECM et système « GSH-bactéries »

Les analyses en microscopie à sonde électrochimique (SECM), ont été réalisées au Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie Pour l'Environnement LCPME (FR CNRS, UMR UHP-CNRS 7564) de l'Université de Lorraine.

L'analyse du comportement des bactéries isolées sur une surface solide (= gel hybride de silice dopé en particules minérales) par SECM a comme objectif de se rapprocher des conditions d'un sol à humidité relative basse où les bactéries sont en interaction avec une matrice solide. Le pH est choisi comme **indicateur chimique du fonctionnement du système bactérie/minéral**. La détection des pH locaux à l'interface bactérie/minéral rend compte du potentiel d'acidolyse du minéral à l'échelle micrométrique.

Dans ce paragraphe, le principe général, la préparation des ultramicroélectrodes de travail et de référence ainsi qu'une expérience préliminaire seront présentés. Les éléments complémentaires sur la préparation des échantillons et les conditions d'utilisation choisies pour l'analyse de nos systèmes sont détaillés dans la publication à soumettre: **Oulkadi D. et al. "Local pH measurement at wet mineral-bacteria/air interface".**

II.4.2.1. Principe de la SECM

La microscopie à sonde électrochimique (SECM) est une technique qui sonde la topographie et la réactivité chimique des surfaces. Cette technique est basée sur l'utilisation d'ultramicroélectrodes (UME) qui ont un comportement électrochimique spécifique. Ces électrodes de taille réduite peuvent être exactement positionnées au-dessus des échantillons grâce à à des systèmes de positionnement de grande résolution (moteurs pas-à-pas couplés à un NanoCube®, 1 nm de résolution dans les trois directions de l'espace X, Y, Z). Le principe de la SECM repose sur la mesure du courant traversant l'UME (électrode de rayon *r* allant de quelques nanomètres à environ 25 μm) pendant que celle-ci balaye la surface d'un échantillon en le survolant à une très faible distance d'où l'intérêt de cette technique. Une particularité du montage utilisé à Nancy est que ces électrode de petites dimensions sont alors équipées d'un système d'excitation et de détection des forces de cisaillement permettant le déplacement fin de l'électrode à proximité de l'objet bactérien avant les mesures électrochimiques.
L'échantillon, également appelé « substrat », peut être solide ou liquide (cependant, dans notre cas d'étude nous nous limiterons au cas de substrats solides : gels de silice contenant des particules colloïdales de nontronite, NAu-2). La présence de l'échantillon à faible distance de l'UME va entraîner une perturbation de la réponse électrochimique de la sonde, ce qui donne accès à des informations sur la nature et les propriétés du substrat. Les UME peuvent aussi être utilisées afin d'acquérir les images électrochimiques de ces échantillons. L'analyse des faibles courants mesurés aux ultramicroélectrodes donne accès à des données topographiques et cinétiques qui permettent d'élucider plusieurs questions concernant les réactions de surface. L'UME constitue ainsi la sonde SECM : la résolution de la SECM sera ainsi limitée par la taille de l'UME et sa sensibilité par le courant minimal pouvant être mesuré précisément à celle-ci. Dans le cadre de cette étude, nous travaillerons non pas avec des UME, mais avec des sondes potentiométriques donnant accès au pH locaux. De même que pour les UME, la résolution spatiale de la mesure dépend de la taille de l'électrode formée à partir d'un microcapillaire. Mais à l'opposé de la détection ampérométrique pour laquelle le courant à l'électrode est mesuré, la mesure potentiométrique se fait à courant nul en utilisant un potentiomètre à haute impédance.

II.4.2.2. Équipement de base de la SECM

Le dispositif SECM basique est constitué de quatre éléments principaux (Figure II.11):

- Une cellule électrochimique, incluant la sonde potentiométrique, l'échantillon, l'électrode de référence et la contre-électrode (pour simplifier dans certains cas, l'électrode de référence peut aussi servir de contre-électrode) ;
- un dispositif permettant de contrôler les positions relatives de l'UME et de l'échantillon (substrat) ;
- un potentiostat simple (pour imposer un potentiel lors de la mesure) ou un bipotentiostat, si un potentiel doit être appliqué aux échantillons pour les mesures ampérométrique ; ou un potentiomètre à haute impédance pour la mesure potentiométrique ;
- un système d'acquisition des données.

Certains montages de SECM sont couplés à une caméra qui permet de suivre l'approche de la pointe de l'électrode de travail sur la surface de l'échantillon afin de permettre un positionnement de l'électrode plus aisé en surface de l'échantillon. C'est le cas de l'appareil SECM du LCPME utilisé dans notre étude.

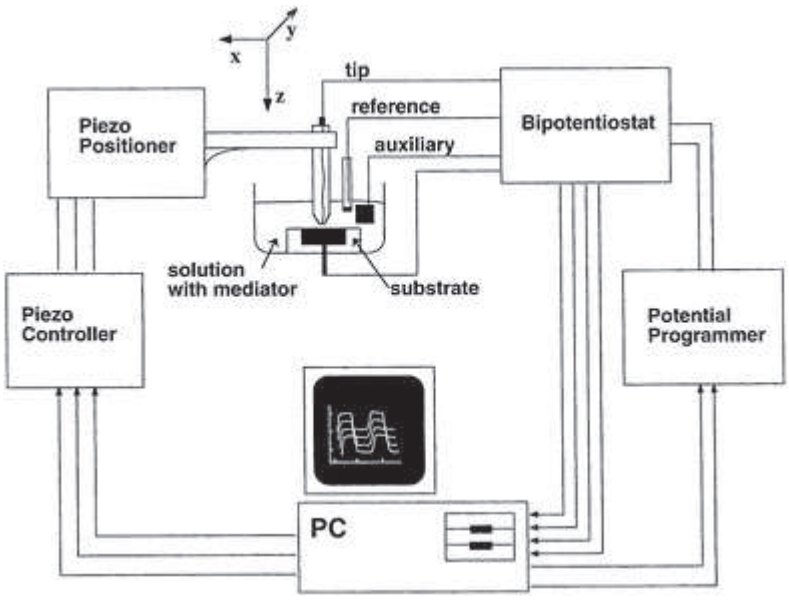


Figure II.11 : Schéma représentatif de l'expérience en SECM (Bertoncello, 2010)

Le montage utilisé au LCPME est par ailleur équipé d'un dispositf de détection des forces de cisaillement permettant de positionner l'électrode de manière non-électrochimique, ce qui est fort utile pour les sondes de type potentiomètrique.

II.4.2.3. Préparation des ultramicroélectrodes de travail et de référence

La microélectrode de pH est préparée à partir de capillaire en verre de borosilicate (1,5mm diamètre externe ; 1,1mm diamètre interne ; 100mm longueur; Hilgenberg, Malsfeld, Germany) la société scientific manufacturing industries (diamètre extérieur 1,5 mm ; ref. 1095-c). Les capillaires sont étirés sous l'effet de la chaleur pour donner des capillaires de quelques µm de diamètre. Une double silanisation est ensuite effectuée, par injection de 200 µL d'Hexamethyldisilazane (HMDS 98%, Fluka) suivie d'un passage au four à 200°C pendant une heure. L'électrode de travail est composée d'une membrane sélective aux protons (hydrogène Ionophore II - cocktail A, Fluka). Cette membrane est introduite dans l'électrode silanisée en utilisant une autre microélectrode sous microscopie optique. Un fil de chlorure d'argent est inséré à l'intérieur de l'électrode de travail, celui-ci correspond à la référence interne de l'électrode. Une référence externe est fabriquée de la même façon que l'électrode de travail sans silanisation des capillaires en verre. Une solution de 0,1 M KCl est introduite dans les capillaires, toujours sous microscope avec une autre microélectrode de faible diamètre externe. La microélectrode de travail est calibrée en utilisant des solutions tampons à pH 4 et 7 adaptés à notre gamme de travail. Les deux électrodes sont ensuite fixées sur la machine SECM pour réaliser les mesures électrochimiques (Figure II.12).

II.4.2.4. Mesure du gradient de pH à l'interface des bactéries immergées dans du BHm.

Pour les mesures en SECM, le pH est choisi comme indicateur chimique du fonctionnement du système bactérie/minéral. La figure II.12 présente de façon schématique le montage expérimental utilisé dans les expériences. Un montage électrochimique classique à 2 électrodes est introduit dans la solution d'analyse (BHm). L'électrode de travail est alors approchée du GSH recouvert de bactéries. L'ensemble du système bactéries/GSH est immergé dans la solution de BHm. L'approche de l'électrode est automatisée. Le potentiel caractéristique du pH est alors mesuré lorsque l'électrode se trouve à proximité du système bactéries/GSH qui est alors considéré comme un obstacle pour le système de mesure. L'intérêt de cette technique réside en particulier dans la possibilité de sonder cette interface, au plus près du système bactérien (quelques µm). Seule la mesure localisée, offerte

notamment par la microscopie à sonde électrochimique, peut permettre d'atteindre cette information en relation avec le processus d'adhésion bactérienne sur le gel.

Dans la phase préliminaire, le choix s'est porté sur un système bactéries/GSH immergé dans le milieu BHm.

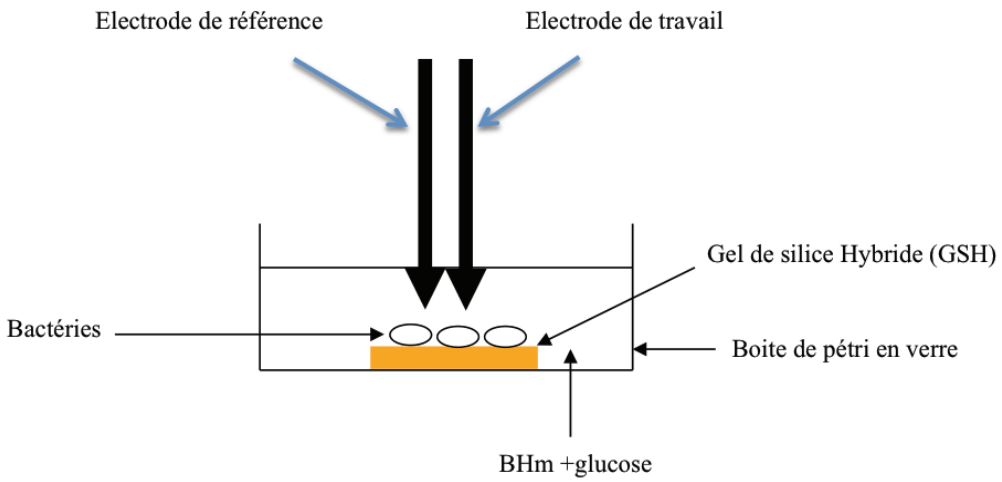


Figure II.12: Représentation schématique de l'expérience de microscopie à sonde électrochimique positionnée à proximité des bactéries adsorbées sur un gel de silice dopé ou non en particules minérales immergé dans la solution de BHm. Les deux électrodes (référence et travail) sont placées ensemble sur la SECM.

a. Préparation des boîtes de pétri

Des boîtes de pétri en verre (VWR) sont utilisées comme support de travail. Dans ces boîtes, du coton (Baumwolle Cotton) imprégné d'une solution de BHm stérile, est placé afin d'assurer le maintien d'une humidité relative suffisante dans la boîte, éviter la dessication des gels et permettre le développement des bactéries. Les boîtes ainsi préparées sont autoclavées à 110°c pendant 30 mn avant utilisation. Ce type de support (boîte de pétri) est utilisé pour toutes les expériences en SECM.

b. Préparation de l'inoculum bactérien

Deux souches sont utilisées dans cette étude, *Rahnella aquatilis* RA1 isolée de la rhizosphère du blé, et *Burkholderia sp.* G5 isolée d'un sol podzolique (Vosges, France)(Balland et al., 2010). A partir de boîtes de LB gélosées, des colonies de *Rahnella aquatilis* RA1 et de *Burkholderia sp.* G5 sont prélevées et mises en culture dans 2mL d'un milieu riche en nutriments (LB), à 28°C et 200 rpm (agitateur horizontal, Stuart Scientific, SI50). Après une nuit d'incubation, les culots de bactéries sont récupérés par trois centrifugations successives

(Multifuge 1 S-R, Heraeus) dans un milieu minimum (BHm) à 4500*g* pendant 5 minutes à 22°C. La densité optique à 600 nm est ajusté en BHM à environ 0,1 U.A., i.e. de 3- 6 x10^7 cellules bactériennes/mL pour *Burkholderia sp.* G5 et *Rahnella aquatilis* RA1. 10µL de chaque suspension sont déposés stérilement par pipetage sur la surface des gels. Puis les gels sont placés dans les boîtes de pétri en verre stérile et incubés à 28°c pendant 24 à 48 heures sans agitation. A l'issue de l'incubation, la présence de colonies en surface des GSH est vérifiée visuellement.

c. Préparation des gels hybride de silice

Les gels de silice hybride utilisés sont obtenus en utilisant la technique sol-gel décrite précédemment. Le volume des gels utilisés pour cette étude est de 1,5 mL (gels de forme arrondie à fond plat). Ils sont obtenus en microplaques de 48 puits (Greiner Bio-one).

Pour les premières analyses SECM, les GSH ensemencés par les bactéries, sont immergés dans le milieu BHm. Un profil d'acidification est mesuré entre la surface des gels où les bactéries sont adhérées jusqu'à une distance de 3000 µm au dessus du gel dans le milieu BHm.

d. Résultats préliminaires

La figure II.13 montre la variation du pH mesurée par SECM à l'interface GSH/*Burkholderia sp*. G5/BHm après 48 heures d'incubation de la bactérie *Burkholderia sp*. G5 sur les gels contenant de la nontronte NAu-2 à une distance de 3000 µm. Sur la figure II.13A, on peut voir la variation du pH local mesuré après 48 h d'incubation à 28°C entre la surface des gels sur lesquelles est inoculé *Burkholderia sp*. G5 et le milieu BHm (jusqu'à une distance de 3000 µm au dessus du gel). Une valeur de pH 5,64 est mesurée à 3000 µm de la surface du gel tandis qu'une valeur de pH 3,64 est mesurée au contact des bactéries (*Burkholderia sp*. G5). Cette acidification est liée sans doute à l'activité métabolique du tapis bactérien en surface du gel, i.e. synthèse de métabolites (i.e. acides organiques et protons). Cette acidification peut entraîner l'altération du minéral immobilisé (NAu-2) dans la matrice siliceuse. Comme les gels+bactéries sont immergés dans un milieu à faible force ionique (BHm), l'équilibre ionique du système (gels/ *Burkholderia sp.* G5) avec le BHm environnant commence à être visible au bout de quelques heures à température ambiante. En effet, la figure II.13B montre bien l'atteinte d'un quasi-équilibre du pH après 4 heures à température ambiante entre le tapis

bactérien de *Burkholderia sp*. G5 à la surface du gel (pH 4,04 à 0µm) et le milieu BHm au dessus (pH 4.14 à 3000 µm).

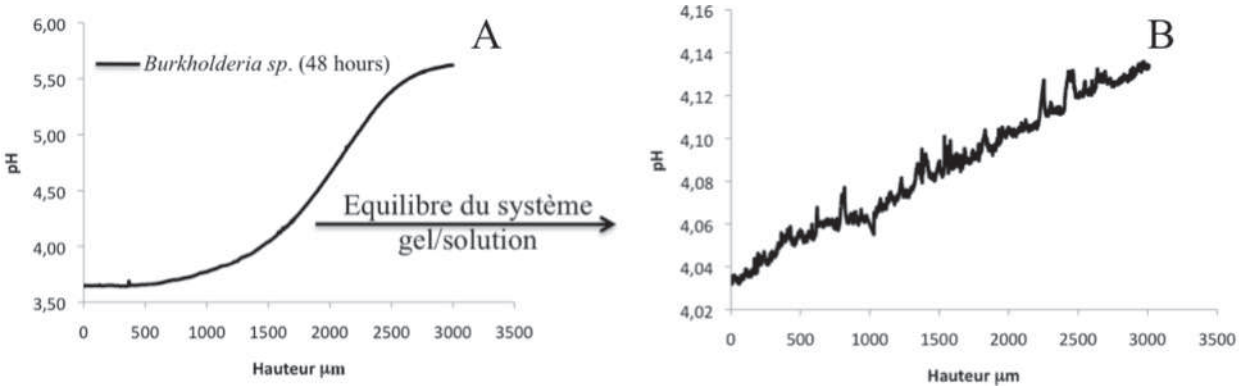


Figure II.13 : Variation du pH mesuré par SECM en fonction de la distance de mesure (µm) pour le traitement *Burkholderia sp*. (G5) après 48 d'incubation à 28°C sur GSH immergé dans BHm (A) et le même traitement *Burkholderia sp*. (G5) incubé 48h à 28°C et laissé 4 heures à température ambiante immergé dans le milieu BHm (B)

Le système (GSH/bactéries/BHm) est en équilibre total après une nuit à température ambiante. Cela veut dire qu'aucune différence de pH ne peut être observée entre la surface du gel (tapis bactérien) et le milieu (jusqu'à 3000 µm au-dessus du tapis bactérien dans la solution BHm). Le pH à l'équilibre est de 4,03. Les mêmes résultats sont mis en évidence pour la bactérie *Rahnella aquatilis* RA1. Ces résultats montrent qu'un gradient de pH existe entre la surface des bactéries adhérées au support GSH et la solution environnante. Cependant, le rééquilibre en protons dépendant du temps entre les GSH et la solution BHm limite l'utilisation de cette technique pour une étude du gradient de pH sur plusieurs heures. Ainsi, le choix des expérimentations s'est porté sur des systèmes (gels/bactéries) placés sur du coton imbibé de BHm afin de maintenir une humidité ambiante saturée en eau. Seul un film d'eau en surface du système « gels/bactéries » est utilisé pour réaliser les mesures électrochimiques. Ce travail est détaillé dans la publication en préparation : « **Local pH measurement at wet mineral-bacteria/air interface ».**

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

III.1. Caractérisation physico-chimique des gels de silice hybrides

Ce premier chapitre de résultats concerne la caractérisation physico-chimique des gels de silice. Il comprend deux parties principales : *(i)* l'étude de la variation de structure des GSH en fonction de différents facteurs : temps de stockage et traitement hydrothermal par autoclave de stérilisation, *(ii)* l'étude des interactions de l'eau avec les GSH en fonction de l'humidité relative et dans l'eau.

III.1.1. Etude de la variation de structure des GSH par SAXS

La variation de structure des GSH a été déterminée par diffusion du rayonnement X aux petits angles (SAXS). Les gels de silice non dopés en particules de nontronite ont été choisis pour étudier l'effet du vieillissement des gels et du traitement par autoclave, les signaux de diffusion obtenus en présence ou non de nontronite (NAu-2) étant similaires. Il est possible que la teneur en particules de NAu-2 du gel (2 $g.L^{-1}$) soit trop faible pour que le signal de NAu-2 se différencie du signal de la silice dans la gamme d'angles de mesure de l'intensité diffusée utilisée.

III.1.1.1. Vieillissement des gels

Les courbes SAXS mesurées sur les gels de silice à différents temps de vieillissement sont présentées en échelle log-log de l'intensité diffusée (exprimée en cm^{-1}) en fonction du vecteur de diffusion q (figure III.1). Les courbes de diffusion présentent 3 domaines : un comportement asymptotique vers un plateau pour les faibles valeurs de q (éventuellement assimilable à un domaine de Guinier), une zone intermédiaire linéaire en log (I) vs log (q) avec un exposant compris entre 2 et 3 (domaine fractal), puis une zone où l'intensité varie en q^{-4} pour les grandes valeurs de q (domaine de Porod). Les caractéristiques sont typiques d'une structure présentant des agrégats fractals finis. Ainsi, le système serait constitué d'un assemblage d'entités dont l'interface est bien définie et lisse (d'après la valeur de l'exposant q^{-4} dans le domaine de Porod), arrangés selon un mode de fractal de masse (car la pente log (I) vs log(q) est comprise entre 2 et 3 dans la zone linéaire intermédiaire), et de dimension finie comme l'illustre l'atteinte du plateau de Guinier pour les plus faibles valeurs de q. Pour les

gels de silice comme pour des systèmes poreux connectés, la présence du plateau peut être reliée non pas à une taille d'agrégats finis mais plutôt à une longueur de corrélation au-delà de laquelle la loi de puissance ne s'applique plus et le système n'est plus fractal.

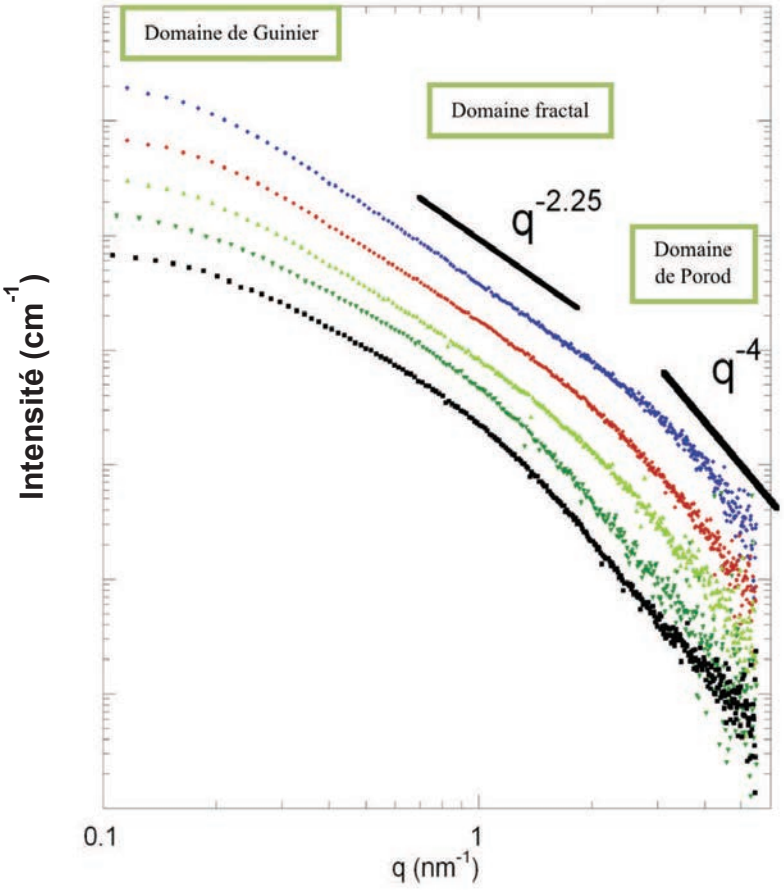
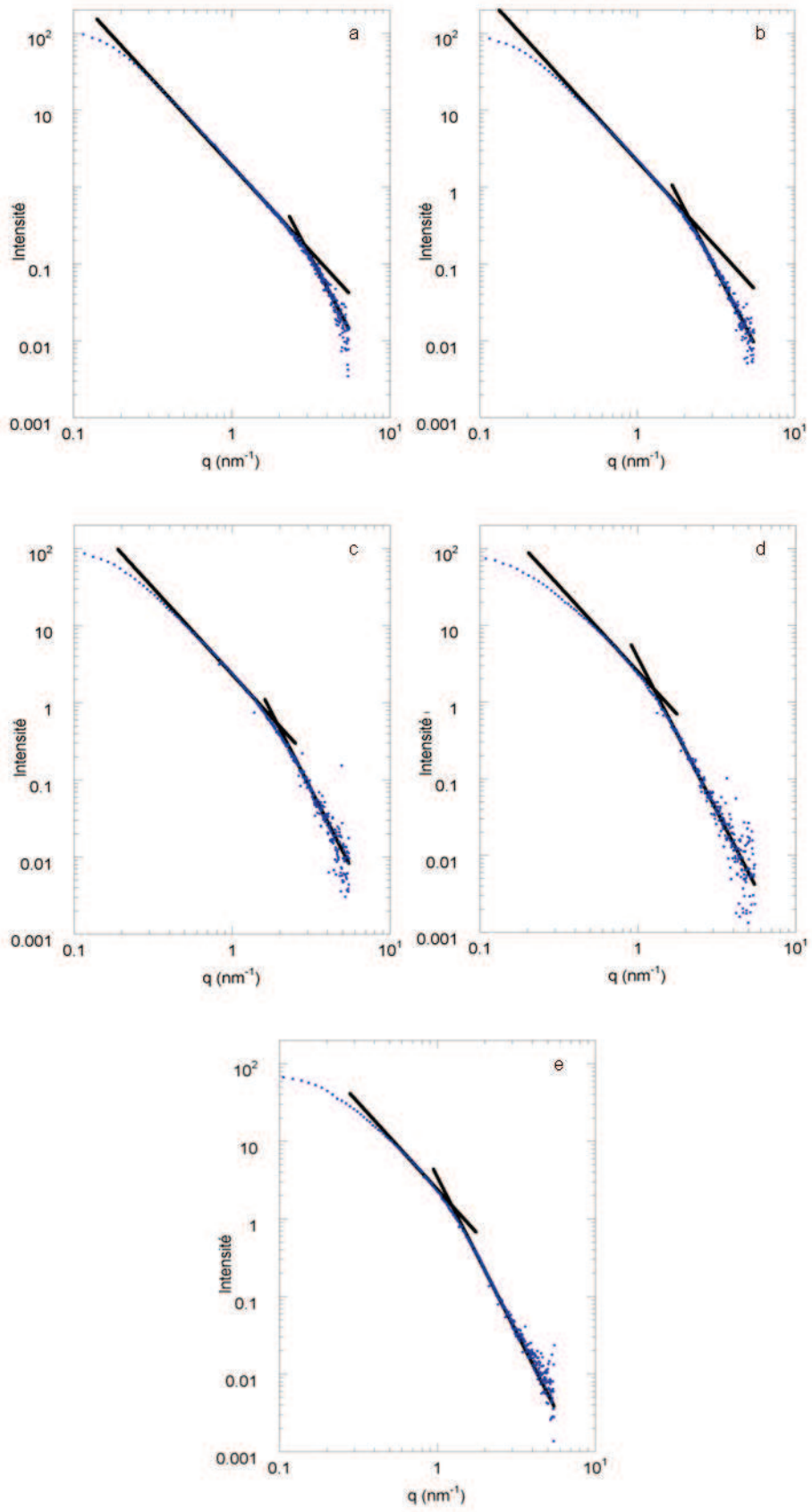


Figure III.1 : Représentation log-log de l'intensité diffusée en cm^{-1} par les GSH en fonction du vecteur d'onde q. Les courbes sont décalées selon l'axe des ordonnées pour plus de lisibilité et correspondent à différents temps de vieillissement des GSH : temps initial (bleu), 3 semaines (rouge), 3 mois (vert clair), 7 mois (vert foncé), 8 mois (noir)

Afin de suivre le vieillissement des gels de silice, seuls les deux domaines sur lesquels l'intensité des courbes SAXS suit une loi de puissance en fonction de q sont considérés. Les figures III-2 montrent les représentations log-log suivant le temps de vieillissement des GSH.



Figures III.2 : Représentation log-log de l'intensité diffusée en cm^{-1} en fonction de q en nm^{-1} et indication des droites des deux domaines de loi en puissance pour les différents temps de vieillissement des gels : temps initial (a), 3 semaines (b), 3 mois (c), 7 mois (d), 8 mois (e).

Le tableau III.1 présente les valeurs expérimentales déterminées d'après les graphiques log-log (figures III.2). Il s'agit *(i)* du domaine en q sur lequel l'intensité varie en fonction de $q^{-2.25}$ et *(ii)* de la valeur en q du « cross-over » des deux domaines de loi en puissance *i.e.* à l'intersection des deux droites sur les graphiques en log-log.

Tableau III.1 : Indication du domaine en q de pente égale à 2,25 et valeur en q du cross-over des deux domaines de loi en puissance

Durée de vieillissement des GSH	Domaine en q (en nm^{-1}), pente de 2.25	valeur de q (nm^{-1}) à l'intersection des deux domaines de loi en puissance de I vs q
Initial	0,36-2,0	2,9
3 semaines	0,54-1,6	2,1
1 mois	0,45-1,45	1,9
7 mois	0,58-1,05	1,25
8 mois	0,55-0,95	1,22

D'après le tableau III.1, il apparaît que le vieillissement entraîne une évolution du cross-over vers les plus petites valeurs de q, ce qui correspond à une extension du domaine de Porod où l'intensité varie en q^{-4}. Le tableau III.2. donne les valeurs calculées d'après l**a combinaison** des 6 modèles de Teixeira et de Freltoft**.** Deux combinaisons de modèles peuvent être éliminées d'emblée : les combinaisons **facteur de structure Freltoft-facteur de forme Debye** et **facteur de structure Freltoft- facteur de forme Emmerling** qui conduisent à des dimensions fractales pouvant être supérieures à 3 alors que l'hypothèse d'un fractal de masse correspond à une dimension fractale comprise entre 2 et 3. Les combinaisons linéaires entre **facteur de structure de Freltoft-facteur de forme Sphère** et **facteur de structure Teixeira-facteur de forme Sphère** donnent des évolutions similaires avec le vieillissement, c'est à dire une augmentation de la taille des unités de base (r) (figure III.3), une diminution de la longueur de corrélation caractéristique du système (ξ), alors que la dimension fractale (D) varie peu. Peu de différences par rapport à ces conclusions sont mises en évidence entre les deux combinaisons alors que le facteur de structure de Freltoft fait appel à un paramètre de plus (C). Le paramètre C diminue avec le temps et traduit la réduction du nombre de particules dans les agrégats qui correspondrait au processus de fusion et croissance des agrégats suggéré précédemment. En considérant que C n'apporte pas d'informations

Tableau III.2 : Valeurs calculées d'après les 6 modèles de Teixeira et de Freltoft appliqués aux courbes expérimentales préalablement lissées afin de limiter la dispersion aux grandes valeurs de q. D représente la dimension fractale des agrégats ; r, le rayon caractéristique de l'unité élémentaire ; ξ, une longueur de corrélation correspondant à la taille de l'agrégat, Γ la fonction gamma et C une constante complémentaire des 3 modèles de Freltoft. La somme quadratique minimale, Σ, des déviations entre valeurs expérimentales et calculées est indiquée dans la dernière colonne pour chaque modèle.

	Teixeira Sphere				Teixeira Debye				Teixeira Emmerling			
	r (nm)	ξ (nm)	D	Σ quad	r (nm)	ξ (nm)	D	Σ quad	r (nm)	ξ (nm)	D	Σ quad
Initial	0,86	4,59	2,53	0,75	0,19	6	2,23	1,13	0,41	6,15	2,2	1,32
3 semaines	1,09	4,14	2,55	0,91	0,34	5,92	2,09	1,02	0,73	6,17	2,04	1,28
1 mois	1,24	3,96	2,59	0,95	0,44	6,03	2,02	0,86	0,92	6,35	1,96	1,16
7 mois	1,78	3,91	2,59	0,96	0,94	8,67	1,54	0,96	1,66	10,29	1,45	1,45
8 mois	1,64	3,09	2,77	1,08	0,77	5,6	1,78	0,45	1,44	5,85	1,72	0,65
	(1,65)	(3,52)	(2,59)	(1,32)								
	Freltoft Sphere				Freltoft Debye				Freltoft Emmerling			
	r (nm)	ξ (nm)	D	C Σ quad	r (nm)	ξ (nm)	D	C Σ quad	r (nm)	ξ (nm)	D	C Σ quad
Initial	0,71	5,37	2,34	10,3 0,26	0,59	4,57	2,55	0,99 0,31	0,86	4,57	2,55	0,99 0,31
3 semaines	0,85	4,88	2,31	7,88 0,51	0,88	3,6	2,86	0,24 0,31	1,28	3,6	2,86	0,24 0,31
1 mois	0,99	4,59	2,35	5,08 0,64	1,07	3,19	3,15	0,1 0,34	1,55	3,19	3,15	0,1 0,34
7 mois	1,63	4,24	2,42	1,05 0,86	0,58	6,37	1,84	18,58 0,10	0,84	6,37	1,84	18,58 0,10
8 mois	1,58	3,17	2,71	0,87 1,11	0,59	4,97	1,93	8,98 0,33	0,85	4,97	1,93	8,98 0,33

supplémentaires et utiles à l'interprétation, le modèle le plus simple est retenu soit **le facteur de structure de Teixeira associé au facteur de forme Sphère.**

Analyse des résultats obtenus avec le facteur de structure de Teixeira et le facteur de forme Sphère.

L'évolution des courbes (figures III.4) montre un facteur de forme dont l'ampleur augmente avec le temps, et un facteur de structure qui tend asymptotiquement vers 1 pour les grandes valeurs de q. L'ajustement de la courbe à 8 mois donne des paramètres qui diffèrent de ceux trouvés sur les autres courbes, notamment au niveau de la dimension fractale qui est sensiblement plus élevée (2,77) que les dimensions fractales trouvées pour les temps plus court (2,59 à 7 mois), alors que la courbe à 8 mois semble peu différente de la courbe à 7 mois. La courbe à 8 mois a été réajustée en fixant la dimension fractale à 2,59 (valeur obtenue à 7 mois). Les nouvelles valeurs de r et ξ sont les suivantes : 1,65 et 3,52 nm à comparer aux valeurs précédentes de 1,64 et 3,09. La nouvelle valeur de r diffère peu de l'ancienne, alors que celle de ξ évolue plus. Ces résultats indiquent que lorsque les unités de base grossissent, la sensibilité diminue pour la détermination à la fois de la dimension fractale et de ξ. Pour l'échantillon à 8 mois, les paramètres obtenus en fixant la dimension fractale semblent les plus pertinents car plus dans la logique de ceux obtenus aux temps plus courts.

L'évolution des différents paramètres en fonction du temps montre en 8 mois un doublement du rayon de la taille des unités de base, associé à une diminution de la longueur de corrélation et une légère augmentation de la dimension fractale. Alors que les unités de base grossissent, le système semble se contracter et se densifier très localement.

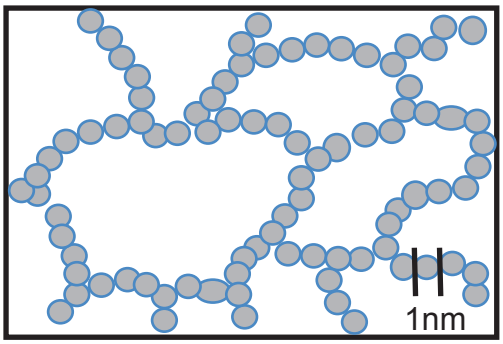


Figure III.3 : Représentation schématique des unités de base la matrice siliceuse des GSH. Réseau fractal de particules primaires de silice de taille nanométrique.

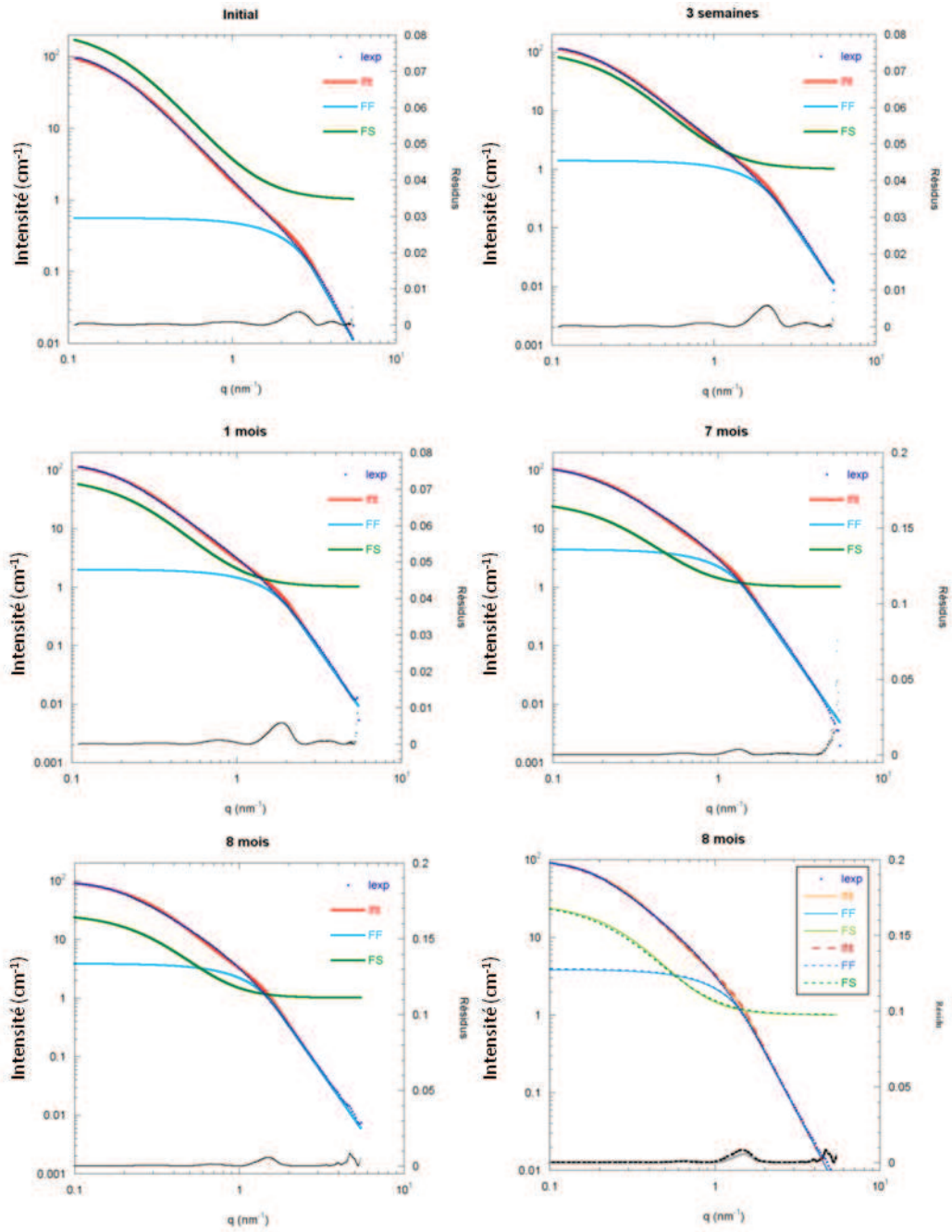
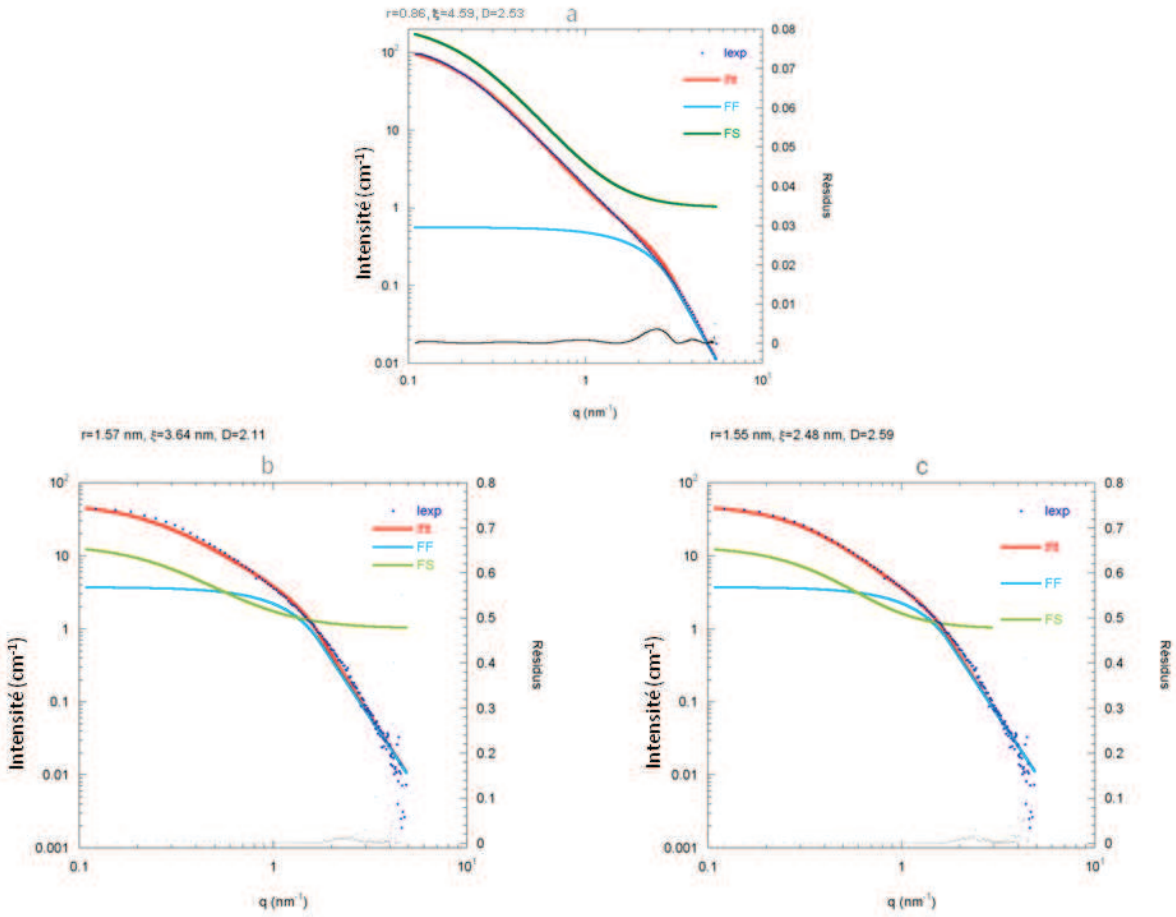


Figure III.4 : Représentation log-log de I vs q des valeurs expérimentales et modélisées selon la combinaison facteur de structure de Teixeira (FS) et facteur de forme Sphère (FF) en fonction du temps de vieillissement des gels. Réajustement des valeurs calculées à 8 mois avec une dimension fractale fixée à 2,59 (valeur obtenue à 7 mois) au lieu de 2,77.

III.1.1.2. Traitement par autoclave des gels

La courbe de l'échantillon après passage à l'autoclave a été ajustée en prenant le facteur de structure de Teixeira et le facteur de forme sphère définis précédemment (figures III.5). L'ajustement conduit aux valeurs suivantes : r=1,57 nm, ξ=3,64 nm et D=2,11. Comme il a

été remarqué lors de l'effet du vieillissement (courbe à 8 mois) *i.e.* une sensibilité sur ξ et D faible lorsque r est grand, la courbe a également été ajustée en fixant D à 2,59. Les paramètres alors obtenus sont : r=1,55nm et ξ=2,48 nm. **Le traitement hydrothermal par autoclave est qualitativement similaire à celui du vieillissement : augmentation de la taille des unités de base et diminution de la longueur de corrélation. Le traitement hydrothermal, utilisé pour stériliser les GSH et permettre leur utilisation en culture avec des microorganismes, stabilise la structure du gel et correspond à un vieillissement accéléré de la structure.**



Figures III.5 : Représentation log-log de I vs q des valeurs expérimentales et modélisées selon la combinaison facteur de structure de Teixeira (FS) et facteur de forme Sphère (FF) avant (a) et après traitement par autoclave des gels (b et c). Les valeurs données par le modèle en (b) sont réajustées avec une dimension fractale fixée à 2,59 (c).

III.1.2. Etude des interactions eau-GSH

Les interactions entre l'eau et les GSH ont été étudiées afin de mieux comprendre le comportement des GSH en tant que matériau dans des atmosphères à humidité relative variable et dans l'eau. Les travaux relatifs à ces deux approches ont été publiés.

La première publication intitulée « Water sorption in hybrid silica gels containing colloidal nontronite » a comme objectif de modéliser la sorption et désorption d'eau dans des GSH fabriqués à partir de deux précurseurs de silice (un précurseur de silice hydrophobe, le Methyltrimethoxysilane ou MTMS et un précurseur de silice hydrophile, le Tétraethoxysilane ou TEOS). Ces travaux permettent d'étudier les propriétés des GSH placés dans des conditions d'humidité relative variable comme celles d'un sol. A terme, les GSH pourraient être utilisés *in situ* afin d'évaluer le fonctionnement biogéochimique des sols.

Le deuxième article est intitulé "Water behavior in hybrid silica gels as studied by ^{1}H Nuclear Magnetic Resonance relaxometry. Evidence of two hydration layers ». L'aspect dynamique de la résonance magnétique nucléaire (RMN) est utilisé avec les mesures de coefficients de diffusion et de temps de relaxation. Cela permet d'étudier le comportement de la molécule d'eau en interaction avec la matrice de silice de GSH préparée avec 100% de précurseurs hydrophiles (Tetraéthoxysilane : TEOS) ou un mélange TEOS- MTMS (figure III.6).

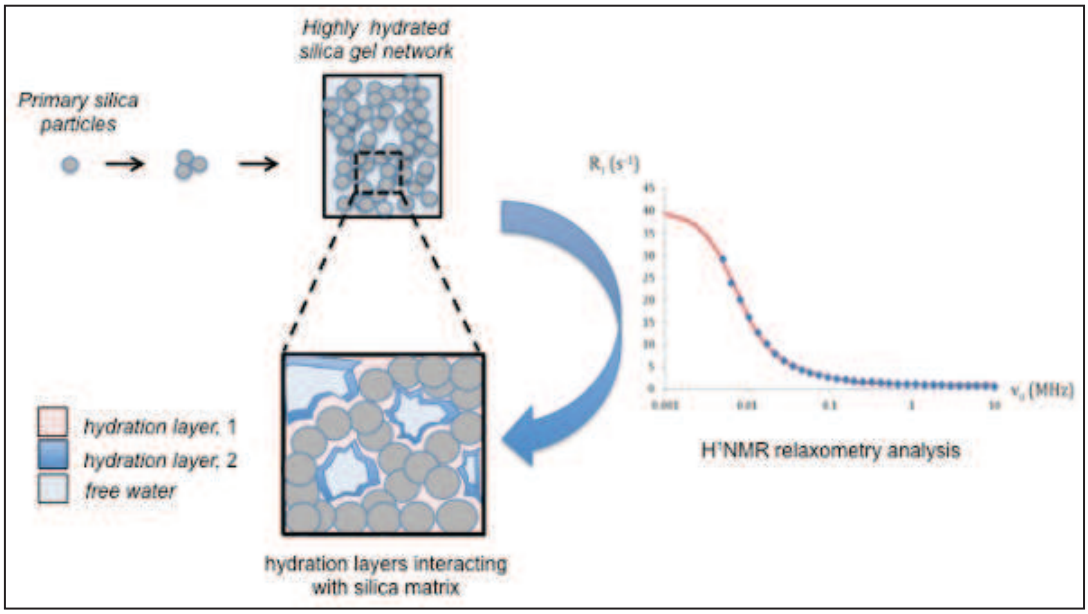


Figure III.6 : Représentation des couches de molécules d'eau en interaction avec la matrice de silice des GSH mises en évidence par relaxométrie en RMN du proton (^{1}H). (Oulkadi et al., 2013).

III.1.2.1. Caractérisation de la sorption et désorption d'eau dans les gels de silice hybride contenant des particules colloïdales de nontronite (publication n°1)

Water sorption in hybrid silica gels containing colloidal nontronite

Oulkadi D, Desobry S, Mustin C, Desobry-Banon S.

Article publié dans Journal of Sol-Gel Science and Technology (2012) 64 :653-660

Résumé

Les gels de silice hybrides (GSH) sont préparés par une méthode sol-gel à partir de précurseurs tétraéthoxysilane (TEOS) et méthyltriméthoxysilane (MTMS) et de suspensions colloïdales de particules d'argile (nontronite, NAu-2). La surface de la matrice siliceuse est hydrophile grâce aux groupements silanols hydrolysés par la catalyse acide du procédé. L'hydrophobicité des surfaces est modulée en substituant des groupements silanols par des groupements méthyles grâce à l'ajout de précurseurs hydrophobes (methyltrimethoxysilane, MTMS). L'objectif de la présente étude est de prédire les effets de la teneur en eau dans le sol sur des GSH hydratés en caractérisant les cinétiques de désorption d'eau par DVS (Dynamic Vapour Sorption). Les cinétiques de désorption montrent l'évaporation et la diffusion plus rapide de l'eau des échantillons GSH TEOS (hydrophiles) par rapport aux GSH TEOS-MTMS (hydrophobes). Après une déshydratation complète des gels de silice, des isothermes de sorption de type II sont obtenus. Ces isothermes sont traités avec deux modèles : Brunauer-Emmett-Tellet (BET) et Guggenheim, Andersen, de Boer (GAB). Les valeurs élevées de la monocouche d'eau adsorbée sur les gels contenant des particules minérales suggèrent une forte influence des particules d'argile sur l'hydratation globale des GSH. Cependant, l'énergie de liaison de l'eau dépend de la nature de la matrice de silice qui indique des liaisons plus faibles en présence de groupes méthyles de surface pour les GSH MTMS-TEOS. Les diffusivités apparentes de sorption d'eau, D_{app} sont calculées selon le modèle de diffusion de Fick. Les valeurs maximales D_{app} sont obtenues dans la gamme d'activité d'eau de 0,2 à 0,3. Au delà de ces valeurs, le D_{app} diminue en relation avec le phénomène de condensation capillaire.

Mots clés : matériaux hybrides, silice, sorption, isotherme, nontronite

Author's personal copy

J Sol-Gel Sci Technol (2012) 64:653–660
DOI 10.1007/s10971-012-2898-0

ORIGINAL PAPER

Water sorption in hybrid silica gels containing colloidal nontronite

Djihad Oulkadi · Stéphane Desobry · Christian Mustin · Sylvie Desobry-Banon

Received: 20 July 2012 / Accepted: 9 October 2012 / Published online: 18 October 2012
© Springer Science+Business Media New York 2012

Abstract Hybrid silica gels (HSGs) were prepared according to an acid-catalyzed sol–gel method using tetraethoxysilane (TEOS) as silica precursors and colloidal suspension of nontronite clay mineral. The silica surfaces were hydrophilic in relation to silanol groups and it was of interest to increase hydrophobicity by substituting silanol by methylated groups through addition of methyltrimethoxysilane (MTMS) in a molar ratio TEOS: MTMS equaled to 1:0.4. The aim of the present paper was to predict effects of water content in soil on HSG hydration by characterizing HSG water desorption and sorption with dynamic vapor sorption device. From desorption kinetics, TEOS HSGs showed higher ability to water surface evaporation and diffusion compared to the TEOS–MTMS HSGs. After complete dehydration, water sorption isotherms Type II were obtained for HSGs. Isotherms were fitted with Brunauer-Emmett-Tellet (BET) and Guggenheim, Andersen, de Boer (GAB) models. The higher monolayer values of water adsorbed for HSGs containing nontronite suggested a major influence of clay minerals on overall hydration. However, the water binding energy depended upon the nature of silica matrix indicating weaker bonds with methylated groups at solid surface in MTMS–TEOS HSGs. Apparent water sorption diffusivities, D_{app} were calculated according to Fick's diffusion model. Maximal D_{app} values were obtained in the range 0.2–0.3 a_w after which the D_{app} decreased in relation with capillary condensation.

Keywords Hybrid material · Silica · Sorption · Isotherm · Nontronite

D. Oulkadi · C. Mustin · S. Desobry-Banon (✉)
Faculté des Sciences et Technologies, Université de Lorraine, LIMOS, UMR CNRS 7137, Bd des Aiguillettes, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France
e-mail: sylvie.desobry@univ-lorraine.fr

S. Desobry
Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio), ENSAIA, Université de Lorraine, 2 avenue de la Forêt de Haye, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

1 Introduction

Mineral-weathering in natural ecosystems is controlled by chemical, physical and biological processes. The diffusion of inorganic and organic acids, the sorption and desorption of metal-ligands through soil solutions on minerals particles are identified as key steps in their dissolution [1–5]. Due to their nanometric size, clay mineral colloids are promising candidate to the study of mineral weathering in relation with their large specific surface area [6]. However, they can easily flocculate and precipitate in suspensions or adhere to cell bacteria. In order to prevent these phenomena, a new method was developed by dispersing clay mineral colloidal particles in a silica gel matrix [7, 8] via a conventional sol–gel pathway [9]. The hybrid silica gels, i.e. HSGs, synthesized by this method have an amorphous structure with small pores size (around 10–50 nm in diameter) that excludes bacteria as showed by confocal laser scanning microscopy imaging of GFP-tagged bacteria [8]. This implies that only metabolites produced by the bacteria should be able to diffuse inside HSGs and dissociate metals from mineral. The HSG method allowed studying the abiotic and biotic dissolution of nontronite, an iron-rich clay mineral [7, 8]. Far from these laboratory conditions performed in stirred liquid medium, other way to further investigate mineral weathering involves using HSG directly into soils. This should permit to analyze how

Author's personal copy

well defined clay particles in HSG react to environmental conditions. Rose [10] showed that water moved predominantly as vapor between pF 5.8 and 4.2 in a swelling clay soil and as a liquid in the pF range 5.1–4.2 for a non swelling silicate soil (sepiolite). This implies to characterize HSG behavior as a function of low and moderate relative humidity when water molecules exhibit distinct behavior than bulk water. The water sorption and diffusivity are the most important parameters to evaluate affinity for water and molecular mobility within HSG. Only few authors modeled the relation between moisture sorption and mobility [11, 12] and these works were applied to biomaterials. These authors observed that fickian diffusion occurred and that diffusivity varied significantly with matter hydration level. The original objective of the present paper is to model water sorption and to determine apparent water diffusivity within HSG containing nontronite clay mineral at various steps of gel hydration. HSG produced from silica precursors, i.e. TEOS, are mainly hydrophilic at interface in relation to silanol groups. As it was pointed out that available silanol groups at the solid surface influenced greatly multilayer water adsorption at low and intermediate relative humidity, it was of interest to vary the silica matrix composition by addition of MTMS–TEOS to get more hydrophobic interface for adjacent fluid phases.

2 Materials and methods

2.1 Hybrid silica gels (HSG) synthesis

Hybrid silica gels were prepared through a sol–gel procedure [7, 8] using natural colloidal nontronite (NAu-2) clay particles and silica precursors in aqueous solution. NAu-2 was purchased from Source Clays Minerals Repository at Purdue University. NAu-2 is a natural dioctahedral clay mineral rich in iron (III) defined by the following structural formula $[Si_{7.55}Al_{0.16}Fe_{0.29}]$ $[Al_{0.34}Fe_{3.54}Mg_{0.05}]$ $O_{20}(OH)_4Na_{0.72}$ [13]. NAu-2 particles were obtained from clay suspension that was exchanged three times with 1 M NaCl then washed by centrifugation and dialysis against Milli-Q water. Size fractionation was performed by centrifugation from 7,000 to 35,000 *g* [13]. To get the maximum of homogeneity in the gel structure a particular nontronite size was selected. The size fraction of nontronite used in this study was obtained at a 7,000 g gravitational field that corresponds to average size values equaled to 705 nm in length, 138 nm in width and 1.05 nm in thickness [13]. Two types of silica precursors were used, i.e. pure TEOS (Fluka) or one mixture of TEOS and MTMS (Fluka) as organic modifier in a molar ratio TEOS:MTMS equaled to 1:0.4. A clear solution of silica precursors, Milli-Q H_2O, and HCl (0.1 M), defined by the molar ratio 1:2.45:0.1 was prepared by sonication (Ultrasonic cleaner, Branson 2410 DTH) at ambient temperature. In order to avoid NAu-2 dissolution, the pH was increased to 4.0 using NaOH (0.1 M) prior to the addition of NAu-2 suspension, or Milli-Q water for NAu-2-free-HSG. After homogenization in the silica sol, pH was further increased up to 5.0 using NaOH (0.1 M) to accelerate self-condensation and sol–gel transition. Hybrid silica sol (250 µl) was distributed into 96 cylindrical well microplates (Greiner) and left at room temperature for gelation. Each HSG piece contained then 0.5 mg NAu-2. Hybrid silica gels were then sterilized twice by autoclaving in Milli-Q water for 30 min at 110 °C and stored in Milli-Q water until use to stabilize the hydration level and the silica structure. The shape of the HSG is cylindrical. After complete dehydration at 0 a_w, cylinder dimensions were 5 mm high with a radius of 1.5 mm. Four HSG types were used in this study, i.e. TEOS NAu-2-free-HSG, TEOS NAu-2-HSG, MTMS NAu-2-free-HSG and MTMS NAu-2-HSG.

2.2 Water desorption (liquid and gas phases)

To study dehydration process, HSGs were stored in the regulated chamber of a dynamic vapor sorption analyzer (DVS, Surface Measurement Systems Ltd., London, UK) equipped with a Cahn microbalance. Temperature was set at 25 ± 1 °C and relative humidity (RH) was adjusted at 50 % in the chamber surrounding air. Approximately 150 mg of fully hydrated gel was loaded onto the quartz sample pan. The weight loss was recorded versus time until equilibrium was reached at 0.5 aw. After this equilibrium, air RH was reduced down to 30 % inducing again gels dehydration. After equilibrium at 0.3 aw, the air RH was reduced down to 0 % and complete gels dehydration occurred. Weight loss was recorded during the all experiment to observe desorption kinetic (1 measurement per 10 s). At the end of the dehydration process, the gels were fully dehydrated at 0 aw and the HSGs were used for the following hydration stage (water vapor sorption). Maximum desorption rate data, dm/dt, were analyzed using Tukey HSD test (significance threshold of $p < 0.005$ with $n = 3$) (XLSTAT 2011 version 14.1.3).

2.3 Water vapor sorption isotherms

HSG isotherms were obtained by progressive rehydration in the DVS chamber. Experiments were carried out at a constant temperature (25 °C) and different RH values ranging between 0 and 70 % by 10 % increment steps. The samples were considered to be at equilibrium when the value dm/dt, i.e. slope of mass change versus time was below 0.002 mg min^{-1} or for an equilibration time above 1,000 min. Experiments were performed in duplicate for

Author's personal copy

each sample. The weight increase was also recorded at one data each 10 s.

2.4 BET and GAB sorption modeling

The BET equation has been often used to model water sorption data, from 0–0.5 a_w. The BET isotherm model is given by:

$$m = m_{0\,BET}\frac{C_{BET}a_w}{(1-a_w)(1-a_w+C_{BET}a_w)} \quad (1)$$

where a_w is the water activity, m is the moisture content (g/100 g), $m_{0\ BET}$ is the monolayer moisture sorption capacity (g/100 g) and C_{BET} is a constant related to water binding energy to the primary binding sites [14].

The GAB equation, is a model adapted from BET model for a larger a_w range (from 0 up to 0.7) and has also been extensively used for the modeling of sigmoidal sorption isotherms [15]. The GAB equation is:

$$m = m_{0\,GAB}\frac{C_{GAB}K_{GAB}a_w}{(1-K_{GAB}a_w)(1-K_{GAB}a_w+C_{GAB}K_{GAB}a_w)} \quad (2)$$

where $m_{0\ GAB}$ is the monolayer moisture capacity (g/100 g), C_{GAB} is a dimensionless measure of the strength of water binding to the primary binding sites and K_{GAB} is a constant. BET is actually a specific case of GAB, with $K_{GAB} = 1$.

The origin® 7.5 software was used for regression and parameters calculations for BET and GAB modeling.

2.5 Diffusivity calculation

Fick's second law was applied to describe the diffusion process through gels during water vapor sorption in HSG versus time [16]. The total amount of water adsorbed in HSG at any time t, M_t, normalized with respect to amount adsorbed at equilibrium, M_∞ is given by:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty}\frac{4}{a^2\alpha_n^2}\exp\left[-D\alpha_n^2 t\right] \quad (3)$$

where α_n are the positive roots of Bessel function and a is the cylinder radius.

For short time and when the concentration at the surface of the cylinder remains constant $\left(\frac{M_t}{M_\infty} < 0.6\right)$, Eq. 3 can be simplified to Eq. 4, according to Crank [16]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{4}{\pi^{1/2}}\left(\frac{Dt}{a^2}\right)^{1/2} - \frac{Dt}{a^2} - \frac{1}{3\pi^{1/2}}\left(\frac{Dt}{a^2}\right)^{3/2} + \cdots \quad (4)$$

Cranks showed that for diffusivities below 10^{-5} m^2 s^{-1} three terms have to be considered and the fourth, fifth… terms can be neglected. In the present work, calculations showed that, for diffusivities in the range from 10^{-11} to 10^{-10} m^2 s^{-1}, the only significant term in the equation is the first one. This is clearly due to the power of the second and the third terms that make those terms negligible. So, in the transient regime when $\frac{M_t}{M_i} < 0.6$, Eq. 4 can be simplified to give Eq. 5:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{4}{\pi^{1/2}}\left(\frac{Dt}{a^2}\right)^{1/2} \quad (5)$$

D is the slope of a plot representing $\frac{M_t}{M_\infty}$ versus $t^{0.5}$. To validate Eq. 5 simplification, modeling with one term (Eq. 5) and three terms (Eq. 4) were done and the calculated diffusivities were the same.

3 Results and discussion

3.1 Desorption phase

The first part of the study concerned HSG progressive dehydration. Figure 1 shows an example of mass variation plotted versus time and RH for TEOS NAu-2-HSG. HSG mass was initially high (153.17 mg), the dehydration was very fast and equilibrium at 50 % RH was reached after less than 1,500 min at 34.50 mg. The final dry mass of TEOS NAu-2-HSG was recorded at 28.67 mg after 3,000 min at 0 % RH. Then, HSG water content, initially equaled to 124.50 mg_{water} was reduced down to 5.83 mg_{water} at equilibrium at 50 % RH. This huge water loss resulted from two dehydration steps in relation with rapid evaporation of liquid capillary water. This first step appeared as a quasi-linear desorption flow. The duration of the first step was 720 min and the remaining water content was 21.3 mg_{water}. Then, a second step occurred when HSG surface water activity started to diminish and evaporation driving force decreased slowly. Hybrid silica gels weight decreased progressively until equilibrium (0.5 a_w). At that time, HSG mass did not change any more. During dehydration process, HSG cylinders volume, initially equal to 132.2 mm^3 was reduced down to 6.7 mm^3.

As external RH was modified in the DVS apparatus down to 30 % at 1,500 min, a dehydration driving force was created again and a new weight loss was observed until HSG reached 0.3 a_w. The same process occurred in the last step at 0 % RH. At equilibrium, HSG dry matter was determined at 28.67 mg (Fig. 1). These measurements showed that HSG was very reactive to changes in surrounding RH and quickly released water. For both 30 and 0 % RH dehydration steps, dehydration occurred very rapidly signifying a poor water sorption heat in gels.

From derivation of weight loss curve, Fig. 2 shows gels dehydration kinetic under the three RH conditions. During

Author's personal copy

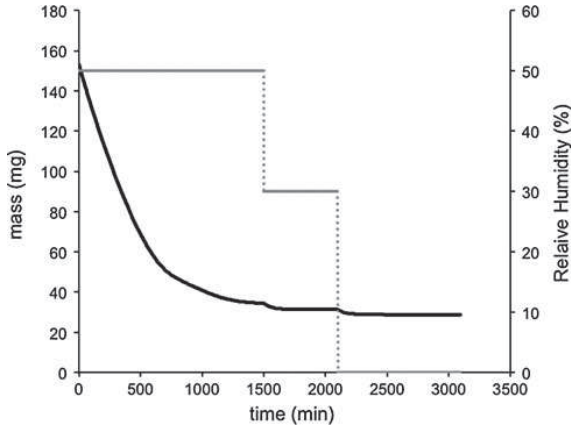


Fig. 1 Example of kinetic water desorption profile for TEOS NAu-2-HSG as a function of Relative Humidity (%) variation at 25 °C. The sample was first equilibrated to 50 % RH, then equilibrated to 30 % RH, and then equilibrated to 0 % RH

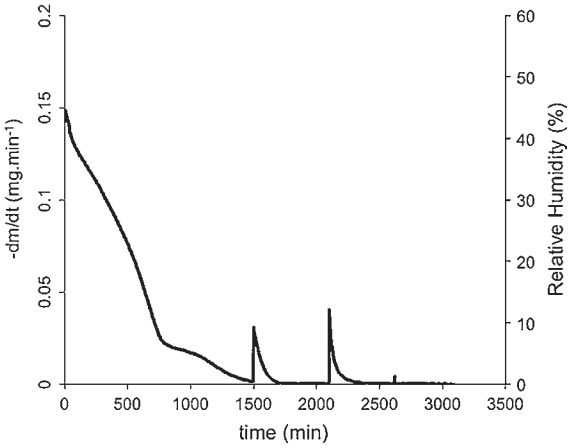


Fig. 2 Water desorption kinetic of fully hydrated gels as a function of Relative Humidity (%) variation for TEOS NAu-2-HSG. The sample was first equilibrated to 50 % RH, then equilibrated to 30 % RH, and then equilibrated to 0 % RH

the first dehydration step to 50 % HR, two main phases were observed. A first dehydration phase ($0 < t < 800$ min) started where dehydration kinetic was high and decreased rapidly with mass loss. In this phase, water loss concerned mainly liquid free water. The surface water activity of the gel was kept close to 1. Capillarity and surface evaporation were the main processes involved in weight loss. During this step, dehydration kinetic decreased with time because interactions between HSG and water increased progressively leading to decreasing water mobility. Then, a second phase was observed (800 min $< t <$ 1,500 min) where desorption kinetic decreased slowly. At this step, no capillary liquid water remained in the gel and diffusion became the main

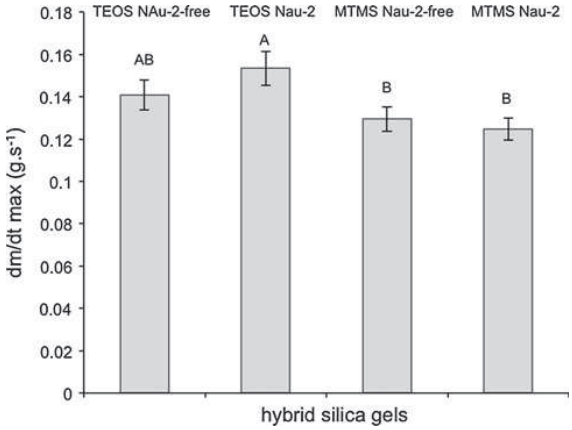


Fig. 3 Initial maximal desorption rates of HSGs when samples are equilibrated to 50 % RH at 25 °C. All the values are means of four replicates ± SD. Values indexed by *different letters* are significantly different ($p < 0.005$) according to Tukey's test

transport process. The water loss kinetic was nearly constant but gel volume reduction led to an apparent reduction of water loss kinetic. A second parameter progressively accelerated the apparent decrease of water loss kinetic, i.e. a_w reduction at gel surface that limited the dehydration driving force. At the end of the 50 % RH dehydration process, when HSG equilibrated at 0.5 a_w, no water flow was measurable. For the other dehydration conditions (30 and 0 % RH), the two-stage dehydration occurred in a similar way than for 50 % HR step.

To evaluate interactions between HSGs and liquid water, the maximal initial dehydration rates were measured (Fig. 3). The surface evaporation flow was very close for the four types of HSGs studied. Nevertheless, the kinetic was faster for the TEOS HSGs (Tukey HSD test, $p < 0.005$) compared to the MTMS HSGs meaning greater surface evaporation and diffusion in TEOS HSGs.

3.2 Sorption phase

For sorption phase study, the dehydrated gel cylinders produced by the previous three-steps dehydration procedure were used. These gels were progressively rehydrated to evaluate the sorption capacity of water vapor and calculate sorption and diffusion parameters.

The steps of gel hydration from 0 up to 70 % RH are shown in Fig. 4. As previously observed for dehydration, water vapor sorption occurred rapidly. For each successive 10 % RH increase in the air, equilibrium time increased progressively with hydration level. It took less than 100 min for complete equilibrium from 0 up to 10 % RH and equilibration time increased up to 500 min between 60 and 70 % RH. Silica gels appeared highly hygroscopic and increasing times for equilibrium resulted from two additive

Author's personal copy

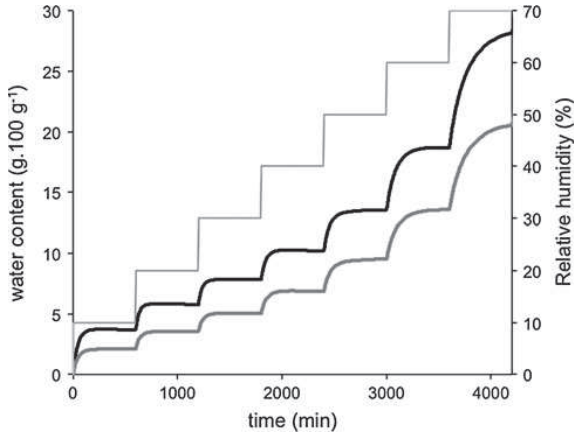


Fig. 4 Water contents in TEOS (*black line*) and MTMS (*grey line*) NAu-2-free-HSG at equilibrium as a function of relative humidity variation

phenomena. The first one was linked to the non-linear relation between water content in the air and RH attributed to the humid air diagram. The second one was linked to water sorption attraction forces that decreased progressively with the saturation of the hydrophilic sites in the gels. The more hydration layers existed, the weaker were the attraction forces.

Moreover, no hysteresis was observed between desorption and adsorption water contents at 30 and 50 % RH. Hydration/dehydration process was then fully reversible in our experimental conditions.

From water contents reached at equilibrium for each air RH value, water adsorption isotherms were obtained (Fig. 5). The TEOS and MTMS HSGs exhibited type II water isotherms [15] whatever the presence of nontronite colloidal particles inside silica matrices. The type II isotherms are concave to a_w axis, then almost linear and finally convex to a_w axis [15]. If the presence of nontronite particles in HSG does not change the overall isotherm shape, it gives rise to higher amount of water content than in nontronite free HSG. The four water sorption isotherms were fitted with BET and GAB models that generated parameters $m_{0\ BET}$ and $m_{0\ GAB}$, i.e. water adsorbed in hydration monolayer, C_{BET} and C_{GAB}, i.e. the latent heat of sorption between water molecules and gel sorption sites (Table 1). It appeared that both model showed a R^2 at 0.99 and that parameters given by both models are fully in agreement. The differences between the GAB and BET models are related to the K_{GAB} constant; BET is a specific case of GAB with $K_{GAB} = 1$. The BET adapted sorption was shown by the constant K_{GAB} value ranged from 1.04 ± 0.02 to 1.10 ± 0.03 closed 1. Table 1 also shows that sorption heat was higher for the TEOS HSGs. It means that the hydrophilic TEOS HSG developed more water/silica interactions than more hydrophobic MTMS HGSs, as it was expected. From the water vapor adsorption isotherms of HSGs (Fig. 5), three sorption phases can be described: the monolayer, the multilayer and the capillary hydration phases. During the first phase, the water monolayer was created. According to $m_{0\ GAB}$ values (Table 1), hydration monolayer was formed at around 0.25 a_w for TEOS HSGs and 0.33 a_w for MTMS HSGs. In that phase, water vapor molecules interacted with hydrophilic sites in HSGs and particularly with highly hygroscopic sites of nontronite. The higher m_0 values for HSGs containing nontronite demonstrated the major influence of this clay mineral on hydration behavior. However, the water binding energy is still dependent upon the nature of silica matrix, i.e. the presence of methylated groups at the solid surface. The

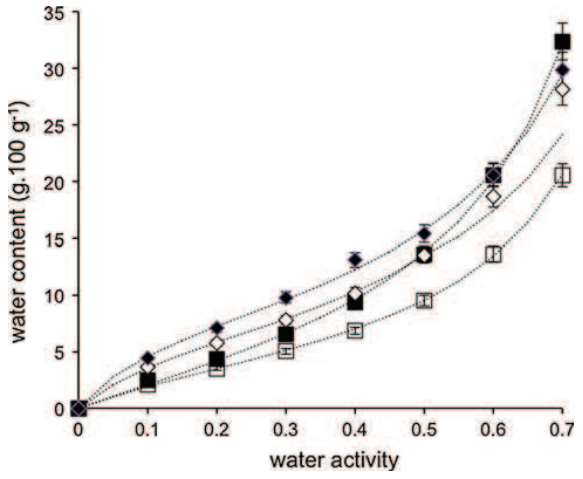


Fig. 5 Water adsorption isotherms for HSGs from 0 to 0.7 a_w: *open square*, MTMS NAu-2-free-HSG; *filled square*, MTMS NAu-2-HSG; *empty diamond*, TEOS NAu-2-free-HSG; *filled diamond*, TEOS NAu-2-HSG

Table 1 BET and GAB model parameters calculated from water adsorption isotherms for HSG: $m_{0\ BET}$ and $m_{0\ GAB}$, water adsorbed in hydration monolayer, C_{BET} and C_{GAB}, the constant of water binding energy or surface heat constant between water molecules and gel sorption sites, the GAB constant, K_{GAB}

BET and GAB parameters	TEOS NAu-2-free-HSG	TEOS NAu-2-HSG	MTMS NAu-2-free-HSG	MTMS NAu-2-HSG
$m_{0\ BET}$[a]	7.75 ± 0.18	8.98 ± 0.33	6.03 ± 0.22	9.77 ± 0.60
C_{BET}[b]	6.05 ± 0.61	7.42 ± 1.27	3.49 ± 0.40	2.17 ± 0.33
$m_{0\ GAB}$[a]	6.77 ± 0.08	8.38 ± 0.47	5.29 ± 0.19	8.35 ± 0.63
C_{GAB}[b]	7.24 ± 0.37	8.31 ± 1.75	3.87 ± 0.38	2.32 ± 0.37
K_{GAB}[c]	1.10 ± 0.03	1.04 ± 0.02	1.09 ± 0.01	1.10 ± 0.02

[a] Monolayer moisture capacity in g water per 100 g HSG

[b] Constant of water binding energy or surface heat constant

[c] GAB constant

Author's personal copy

substitution of silanol with methylated groups by addition of MTMS reduced the interactions between water molecules and surface groups then resulting in lower sorption energy (C values) for MTMS HSGs compared to TEOS HSGs (Table 1). When hydration monolayer was formed, several layers of water molecules were structured around each hydrophilic site. In this second hydration phase, the sorption energy progressively decreased with increasing distance between water molecules and sorption site due to progressive saturation of hydrophilic sites. TEOS and MTMS NAu-2-free-HSGs adsorbed less water than TEOS and MTMS NAu-2-HSGs as expected from the swelling behavior of nontronite particles [17, 18]. In the last capillary hydration phase, above 0.65 a_w, HSG slightly swelled and more water was incorporated. This capillary phase starts at 0.65 and does not clearly appear in Fig. 5. This is one of the reasons why GAB and BET parameters were very close (no capillary water influence on GAB parameters).

3.3 Diffusivity calculation

As previously discussed, hydration in vapor phase corresponded to water vapor diffusion process. Bulk moisture diffusivity is the major parameter to explain diffusion/sorption in gels. From Crank initial work [16], Fick's diffusion model was applied to reach apparent diffusivity, D_{app}, through HSG cylinders and study water mobility versus gel composition and hydration level. Methyltrimethoxysilane NAu-2-free-HSG was chosen as an example of D_{app} calculation from Eq. 5 (Fig. 6). Hydration followed a typical behavior of fickian diffusion process, according to Eq. 3. As the mass of adsorbed water at a given hydration step was low, cylinder swelling during the 10 % RH increase was neglected. From Fig. 6, initial water sorption for the first $\frac{M_t}{M_\infty} < 60\ \%$ moisture adsorption was drawn versus $t^{0.5}$ according to Eq. 4 (Fig. 7). The linear shape of adsorption curves gave R^2 values ranging from 0.999 to 0.990 that confirmed that Fick's model could be applied to calculate D_{app} from the slope of this linear sorption phase. Figure 8 shows the changes in apparent water diffusivity values for each gel formulation and for hydration levels from 0.1 to 0.7 a_w. The apparent water diffusivity values we found for HSGs in the range 10^{-10}–10^{-11} $m^2\ s^{-1}$ are quite similar to data found for $CaCl_2$ confined to mesoporous silica [19], composite silica modified by calcium nitrate [20] or silica gel particles [21, 22]. Maximum water diffusivity values were measured between 0.20 and 0.25 a_w for NAu-2-HSGs and shifted to 0.25–0.30 for NAu-2-free-HSGs.

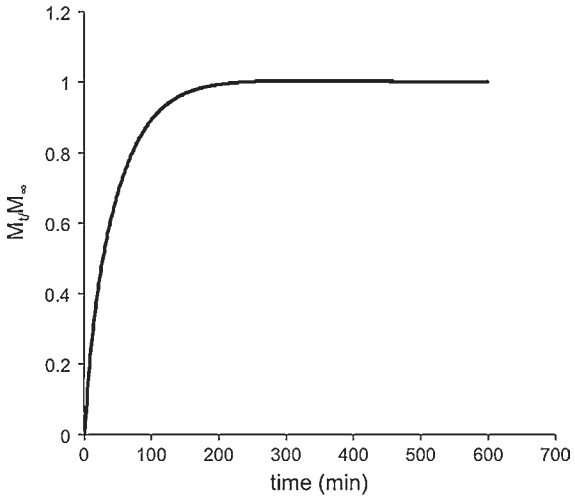


Fig. 6 M_t/M_∞ plotted as a function of time in min for MTMS NAu-2-free-HSG adsorption of moisture. During this step, the sample is equilibrated at 20 % RH at 25 °C

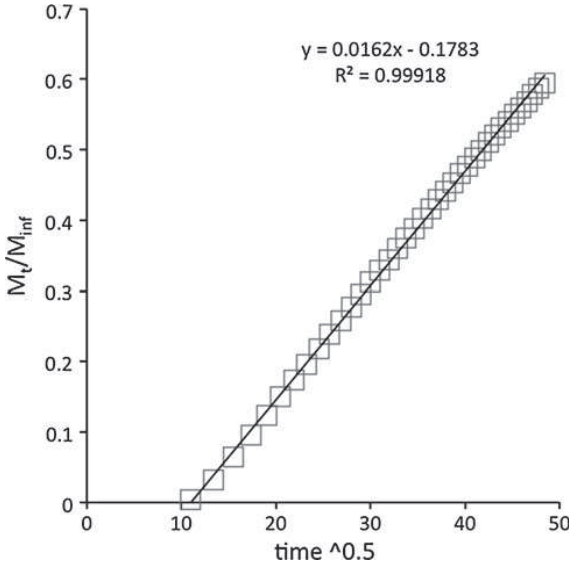


Fig. 7 M_t/M_∞ values plotted as a function of the square root time, with time in min, for MTMS NAu-2-free-HSG adsorption of moisture. During this step, the sample is equilibrated at 20 % RH at 25 °C

Below maximal D_{app} value, the first phase corresponds to initial hydration in which water monolayer was being formed and in which water vapor attraction by hydrophilic sites was maximum. Hydrogen bonds are created between water molecules and free hydroxyl groups of silica matrix and clay particles surfaces. Water clustering around ionic sites is also expected [23]. Simultaneously, HSG structure that contained strong physical constraints in the silica network started a relaxation process due to increased mobility provided by water molecules. Those parameters

Author's personal copy

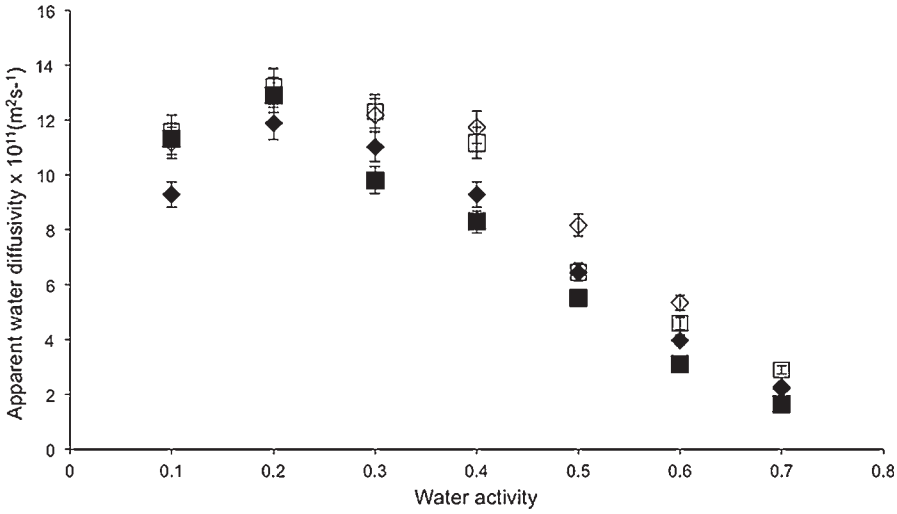


Fig. 8 Apparent water vapor diffusivities for HSGs plotted as a function of the water activity at 25 °C: *open square*, MTMS NAu-2-free-HSG; *filled square*, MTMS NAu-2-HSG; *empty diamond*, TEOS NAu-2-free-HSG; *filled diamond*, TEOS NAu-2-HSG

made diffusion process faster and apparent water diffusivity increasing.

Above maximal D_{app} value, diffusivities decreased with increasing water activity. In this phase, the monolayer was completed and hydration multilayer phase started with water clustering [23]. The distance between water molecules and hydroxyl sites of silica surfaces became larger and attraction forces decreased progressively. Due to reduction in mass transport driving force, apparent water diffusivities of the four gels decreased with hydration level. This illustrated changes in diffusion mechanisms from vapor to liquid diffusion [4]. The pore filling by water molecules should also prevent other water molecules from diffusing through pores [24]. The decrease of D_{app} was enhanced in intermediate a_w values ranging from 0.3 to 0.6 for NAu-2-HSGs.

4 Conclusion

Hybrid silica gels were prepared through sol–gel technique using nontronite colloidal particles and silica precursors, i.e. TEOS or one mixture of TEOS and MTMS. These hybrid materials exhibited new functional properties related to both clay minerals and silica matrix. The clay minerals permitted to reveal the bioweathering potential of soil microorganisms. The silica matrix maintained the dispersed structure of colloidal particles during bioweathering. The hydration properties were analyzed by DVS and revealed the distinct contribution of these components, i.e. clay particles and silica matrix. It was observed that nontronite exerted a major role in water retention resulting in higher mass of water adsorbed in hydration monolayer, m_0, and lower apparent water diffusivity, in intermediate a_w values from 0.3 to 0.6. Water binding energy to the primary binding sites, i.e. C_{BET} and C_{GAB} values, was dependent upon methyl organic ligand presence in silica matrix. At the methyl surface content used, lower C values, i.e. weaker water bonds, were obtained for MTMS–TEOS HSGs in accordance with lower hydroxyl density and higher electron donating methyl groups at the solid surface of these gels. From the present results, the role of nontronite on water sorption monolayer and the role of methyl and other organic ligands on water/silica interactions merit to be further investigated. This should permit to explore the ability to formulate HSG doped with clay minerals to get specific hydration properties, i.e. targeted water sorption (m_0) and water interactions values (C).

References

1. Bennett PC, Rogers JR, Choi WJ (2001) Silicates, silicate weathering, and microbial ecology. Geomicrobiol J 18:3–19
2. Drever J, Stillings LL (1997) The role of organic acids in mineral weathering. Colloids Surf A 120:167–181
3. Jones LJ (1998) Organic acids in the rhizosphere—a critical review. Plant Soil 205:25–44
4. Reichard PU, Kretzschmar R, Kraemer SM (2007) Dissolution mechanisms of goethite in the presence of siderophores and organic acids. Geochim Cosmochim Acta 71:5635–5650
5. Robert M, Berthelin J (1986) Role of biological and biochemical factors in soil mineral weathering. Soil Sci Soc Am 12:453–495
6. Citeau L, Lamy I, Van Oort F, Elsass F (2003) Colloidal facilitated transfer of metals in soils under different land use. Colloids Surf A 217:11–19
7. Grybos M, Michot LJ, Skiba M, Billard P, Mustin C (2010) Dissolution of anisotropic colloidal mineral particles: evidence for basal surface reactivity of nontronite. J Colloid Interf Sci 343:433–438
8. Grybos M, Billard P, Desobry-Banon S, Michot LJ, Lenain JF, Mustin C (2011) Bio-dissolution of colloidal size clay minerals

Author's personal copy

entrapped in microporous silica gels. J Colloid Interf Sci 362:317–324
9. Brinker CJ, Scherer GW (1990) Sol-Gel Science. The physics and chemistry of sol-gel processing. Academic Press, New York
10. Rose DA (1968) Water movement in dry soils. J Soil Sci 19:81–93
11. Yu X, Schmidt AR, Bello-Perez LA, Schmidt SJ (2008) Determination of the bulk moisture diffusion coefficient for corn starch using an automated water sorption instrument. J Agric Food Chem 56:50–58
12. Murrieta-Pazos I, Gaiani C, Galet L, Cuq B, Desobry S, Scher J (2011) Comparative study of particle structure evolution during water sorption: skim and whole milk powders. Colloids Surf B 87:1–10
13. Michot LJ, Bihannic I, Maddi S, Baravian C, Davidson P, Levits P (2008) Sol/gel and isotropic/nematic transition in aqueous suspensions of natural nontronite clay. Influence of particle anisotropy. 1. Features of the I/N transition. Langmuir 24:3127–3139
14. Brunauer S, Emmett PH, Teller E (1938) Adsorption of gases in multimolecular layers. Am Chem Soc 60:309–319
15. Rouquerol F, Rouquerol J, Singh K (1999) Adsorption by powders and porous solids. Academic Press, London
16. Crank J (1975) The mathematics of diffusion, 2nd edn. Oxford University Press, London
17. Suquet H, Malard C, Pezerat H (1987) Structure et propriétés d'hydratation des nontronites. Clay Miner 22:157–167
18. Luca V (1991) Fe Mössbauer spectroscopic study of structural changes during dehydration of nontronite: effect of different exchangeable cations. Clay Miner 39:478–489
19. Aristov YI, Glaznev IS, Freni A, Restuccia G (2006) Kinetics of water sorption on SWS-1L (calcium chloride confined to mesoporous silica gel): influence of grain size and temperature. Chem Eng Sci 61:1453–1458
20. Simonova IA, Freni A, Restuccia G, Aristov YI (2009) Water sorption on composite ''silica modified by calcium nitrate''. Micropor Mesopor Mat 122:223–228
21. Aristov YI, Tokarev MM, Freni A, Glaznev IS, Restuccia G (2006) Kinetics of water adsorption on silica Fuji Davison RD. Micropor Mesopor Mat 96:65–71
22. Demir H, Mobedi M, Ulku M (2011) Microcalorimetric investigation of water vapor adsorption on silica gel. J Therm Anal Calorim 105:375–382
23. Alix S, Lebrun L, Marais S, Philippe E, Bourmaud A, Baley C, Morvan C (2012) Pectinase treatments on technical fibres of flax: effects on water sorption and mechanical properties. Carbohydr Polym 87:177–185
24. Chen GQ, Scholes CA, Doherty CM, Hill AJ, Qiao GG, Kentish SE (2012) Modeling of the sorption and transport properties of water vapor in polyimide membranes. J Membr Sci 409:96–104

III.1.2.2. Le Comportement de l'eau dans les gels de silice hybrides étudiés par relaxométrie en résonance magnétique nucléaire du proton (^{1}H). Mise en évidence de deux couches d'hydratation (publication n°2)

Water behavior in hybrid silica gels as studied by ^{1}H Nuclear Magnetic Resonance relaxometry. Evidence of two hydration layers

Oulkadi D, Yemloul M, Desobry-Banon S, Canet D

Article publié dans Microporous and Mesoporous Materials (2013) 172 : 213-216

Résumé

Le comportement de l'eau dans des gels de silice dont les sites hydrophiles ont été substitués par des sites hydrophobes a été étudié par relaxométrie en RMN du proton (^{1}H). Cette dernière technique découle de l'évolution du temps de relaxation longitudinal T1 en RMN en fonction de la fréquence de Larmor (fréquence de mesure en RMN). Les mesures du temps longitudinal T1 des protons de l'eau ont été réalisées entre 5 kHz et 10 MHz. Cette gamme de fréquences s'est avérée suffisante pour détecter et caractériser les deux couches d'hydratation même si elles existent dans une proportion très faible (10^{-5}-10^{-6}). Le coefficient d'auto-diffusion de l'eau dans ces deux couches peut être estimé. Il s'avère que seule la première couche d'eau est influencée par l'hydrophobicité de la matrice de silice.

Mots clés: gel de silice hybride, RMN (^{1}H), temps de relaxation T1, relaxométrie

Author's personal copy

Microporous and Mesoporous Materials 172 (2013) 213–216

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Microporous and Mesoporous Materials

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

Water behavior in hybrid silica gels as studied by ^{1}H nuclear magnetic resonance relaxometry. Evidence of two hydration layers

Djihad Oulkadi [a,1], Mehdi Yemloul [b,c,1], Sylvie Desobry-Banon [a,*], Daniel Canet [b,c]

[a] Université de Lorraine, LIEC, UMR 7360 CNRS, Vandœuvre -lès-Nancy F-54500, France
[b] Université de Lorraine, CRM2, UMR 7036, Vandœuvre -lès-Nancy F-54500, France
[c] CNRS, CRM2, UMR 7036, Vandœuvre -lès-Nancy F-54500, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 4 December 2012
Received in revised form 23 January 2013
Accepted 26 January 2013
Available online 8 February 2013

Keywords:
Hybrid silica gel
^{1}H NMR
T_1 relaxation time
Relaxometry

ABSTRACT

Water behavior in silica gels involving hydrophobic sites that have been substituted to hydrophilic sites has been approached by ^{1}H NMR relaxometry techniques. The latter method stems from the evolution of NMR longitudinal relaxation time T_1 as a function of the Larmor frequency (the NMR measurement frequency). T_1 measurements of the water protons have been carried out between 5 kHz and 10 MHz. This frequency range proved to be sufficient for detecting and characterizing two hydration layers although they exist in a very weak proportion (10^{-5}–10^{-6}). Self-diffusion coefficient of water in these two layers could be estimated. It turns out that only the first layer is influenced by hydrophobicity.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

It is now established that the dissolution-rate of minerals in soils is related to the concentration of organic compounds (siderophores, organic acids) produced by microorganisms or plant roots but also to inorganic acids and protons [1–10]. The diffusion of these mineral-weathering agents into soil solution [5], the sorption and desorption of metal–ligands on mineral particles [9] are identified as key steps in mineral dissolution. In order to study these processes at a colloidal scale known to be reactive in relation to high specific surfaces [11], a new method was developed by dispersing clay mineral colloidal particles in a silica gel matrix [12,13] via a conventional sol–gel pathway [14]. This permitted to prevent flocculation and precipitation of clay colloidal particles but also adhesion to cell bacteria [15,16]. The Hybrid Silica Gels, i.e. HSGs, synthesized by this method have an amorphous structure with small pores size (around 10–50 nm in diameter) that excludes bacteria as showed by confocal laser scanning microscopy imaging of GFP (Green Fluorescent Protein)-tagged bacteria [13]. This implies that only metabolites produced by the bacteria should be able to diffuse inside HSGs and dissociate metals from mineral. The water sorption and diffusivity within HSGs are then important parameters to get a better understanding on molecular mobility. HSGs produced from silica precursors, i.e. tetraethoxysilane (TEOS), are mainly hydrophilic at interface in relation to silanol groups [17]. As it was pointed out that available silanol groups at the solid surface influenced greatly multilayer water interactions, it was of interest to vary the silica matrix composition by addition of methyltrimethoxysilane (MTMS)–TEOS to get more hydrophobic interface for adjacent fluid phases [18]. The original objective of the present paper is then to study interaction between water molecules and hydrophilic and hydrophobic silica surfaces used in HSGs. In order to characterize bound water and possibly different types of water, NMR techniques have been used throughout. They include the determination of water self-diffusion coefficient and the measurement of the spin–lattice (longitudinal) relaxation time T_1 of water protons as a function of the Larmor frequency (NMR measurement frequency). This latter technique, called "relaxometry" [19], proved to be very sensitive to bound water even when it is in very weak proportion. Moreover, a proper interpretation of the experimental results should lead to the characterization of different types of water in terms of mobility thus in relation with the interaction of water with the HSG surface, as a function of its hydrophobic character. Indeed, water behavior in HSG is important for the understanding of the gel interface reactivity.

2. Material and methods

Silica gels were produced through an acid catalyzed sol–gel procedure using two silica precursors, i.e. pure tetraethoxysilane (TEOS, Fluka) or a mixture of TEOS and methyltrimethoxysilane (MTMS, Fluka). Three samples with different hydrophobicity have

* Corresponding author. Tel.: +33 (0) 3 83 68 42 83; fax: +33 (0) 3 83 68 42 88.
E-mail address: sylvie.desobry@univ-lorraine.fr (S. Desobry-Banon).
[1] These authors have equally contributed to this work.

1387-1811/$ - see front matter © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2013.01.030

Author's personal copy

been studied. They will be denoted 100% TEOS, 95% TEOS and 80% TEOS, these figures corresponding to the percentage in volume of TEOS vs. MTMS.

A clear solution of silica precursors, Milli-Q H_2O, and HCl (0.1 M) was prepared by sonication (Ultrasonic cleaner, Branson 2410 DTH) at ambient temperature. For 100% TEOS, the initial molar ratio TEOS:H_2O:HCl was 1:2.45:0.003. For 95% and 80% TEOS, TEOS:MTMS:H_2O:HCl molar ratios were defined as 1:0.08:2.6:0.003 and 1:0.4:3.1:0.003, respectively. Then, Milli-Q water was added to the mixture to give final stoichiometric ratios TEOS:H_2O equaled to 1:15, 1:16 and 1:19 for 100% TEOS, 95% TEOS and 80% TEOS respectively. In order to accelerate self-condensation and sol–gel transition, pH was increased to pH 5.0 by NaOH (0.1 M) with NaOH/HCl molar ratio of 1. Silica sol (2.5 ml) was distributed into glass tubes and left at room temperature for gelation. Silica gels were twice sterilized by autoclaving in Milli-Q water for 30 min at 110 °C and stored in Milli-Q water until use. All chemicals used were high purity grade.

All NMR experiments rely on the resonance of water protons and have been carried out at 25 °C on silica gels stored in Milli-Q water until measurements. Excessive water was eliminated from gels that were then placed into dry glass tube then sealed to prevent gel drying during NMR measurement. Self-diffusion coefficients were measured with a Bruker Avance 300 MHz spectrometer using the standard Stimulated Echo method with bipolar gradient pulses [19]. In the 5 kHz–10 MHz frequency range, T_1 relaxation times were measured with a SMARtracer relaxometer (Stelar Company, Mede, Italy) according to the fast field cycling procedure [20]. Although a plateau seems to be reached at the higher frequencies, an additional measurement was performed at 300 MHz according to the classical inversion-recovery sequence [21] and essentially confirmed the plateau value. Therefore, only the relaxometer data will be presented and discussed in the following.

2.1. Relaxometry theoretical outline [21,22]

The interpretation of spin relaxation rates is generally difficult because they depend on various mechanisms such as inter- and intra-molecular dipolar interactions. In the present study, we shall neglect the intermolecular contribution because (i) it is expected to be small with respect to the intra-molecular contribution in the case of bound water, (ii) and, anyway, it will be assumed to be similar for the different types of bound water. As we are dealing with the water molecule, only the H–H dipolar interaction is involved in the interpretation of these intra-molecular relaxation rates. In that case, the relaxation rate (the inverse of the relaxation time, *i.e.* $1/T_1$) can be written as:

$$R_1(\omega) = K_{HH} \times [4J(2\omega) + J(\omega)] \tag{1}$$

In (1), ω is the measurement frequency (in rad s^{-1}) that is proportional to the magnetic field of the NMR instrument, K_{HH} is a constant detailed below and $J(\omega)$ is a so-called spectral density function that is responsible for the frequency dependence of relaxation parameters. Whenever molecular reorientation is isotropic, it has a very simple form:

$$J(\omega) = \frac{2\tau_C}{1 + \omega^2\tau_C^2} \tag{2}$$

τ_C is the so-called correlation time which describes the molecular reorientation. It can be viewed as the time required for a rotation by an angle of 1 radian.

Moreover, the linear combination of the two spectral density functions in (1) can be approximated by [23]:

$$4J(2\omega) + J(\omega) \approx 5J(\sqrt{3}\omega) \tag{3}$$

With these conventions, the constant K_{HH} is:

$$K_{HH} = \left(\frac{3}{20}\right)\left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\gamma_H^4 \hbar^2}{r_{HH}^6} \tag{4}$$

μ_0 is the vacuum permeability, γ_H is the proton gyromagnetic ratio, $\hbar$ is the Planck constant divided by 2π and r_{HH} is the distance between the two protons in the water molecule.

In the present context, we expect several types of water, at least free (bulk) water and bound water [24]. It can be noticed that the correlation time of bulk water is so short (around 4 ps) that its contribution to the global relaxation rate lies in the so-called "extreme narrowing" regime ($\omega^2\tau_C^2 << 1$). Owing to Eq. (2), this evidently entails no frequency dependency. Assuming that the reorientation of the H–H vector can be considered as isotropic for any type of water, we can write the global relaxation rate as:

$$R_1(\omega) = A_0 + \sum_{i=1}^{n} \frac{A_i}{1 + \omega^2\tau_{C_i}^2} \tag{5}$$

where n is the number of bound water types (supposed to be outside the extreme narrowing regime). In (5) τ_{C_i} is an effective correlation time equal to $\sqrt{3} \times \tau_{C_i}^{true}$ (see Eq. (3)). The coefficients A_0 and A_i in Eq. (5) arise from Eqs. (1) and (2). Thus, denoting by p_i the proportion of water type i, they have the following meaning:

$$A_0 = \left(1 - \sum_{i=1}^{n} p_i\right) K_{HH}(10\tau_{C_0}) \tag{6}$$

for free water, τ_{C_0} being the correlation time describing its reorientation.

$$A_i = p_i K_{HH}\left(\frac{10}{\sqrt{3}}\tau_{C_i}\right) \tag{7}$$

It can be noticed that Halle [25] proposed a decomposition of dispersion curves in a series of Lorentzian functions as in Eq. (5). As his treatment is very general, the meaning of the different correlation times is not as straightforward as it is here. This is why Halle's approach was dubbed "Model Free". Indeed, τ_{C_i} values are meaningful because we are dealing exclusively with an intra-molecular dipolar relaxation mechanism.

Finally, it must be emphasized that Eq. (5) is valid under the assumption of fast exchange between the different species. In our case, this is verified experimentally since, in the course of a relaxation measurement, the evolution of nuclear magnetization is invariably mono-exponential, thus leading to a unique relaxation time. In a general way, the fast exchange condition is fulfilled provided that the residence time in the various sites is much smaller than any relaxation time. Again, this is very likely the case here.

2.2. Relaxometry data processing

Experimental data (*i.e.* R_1 vs. ω), which constitute what is generally called "dispersion curves", have been processed according to Eq. (5) and with a procedure detailed in a previous paper [26]. Briefly, we start with a set of guessed τ_{C_i} with which A_0 and the A_i's are determined by Linear Least Squares (LLS). This latter procedure is quite reliable, as it does not require any minimum search. With this new set of A_0 and A_i's, new values for the τ_{C_i} can be calculated by Non Linear Least Squares (NLLS) and again a new set of A_0 and A_i's, and so on until convergence. Owing to the number of parameters to be determined, this method has proven to be much more reliable than a global non-linear least squares fit. Moreover, it can be appreciated that correlation times are exclusively deduced from the frequency variation of relaxation rates as this would be done intuitively by considering the inflection points of dispersion curves. This affords some confidence in the final results.

Author's personal copy

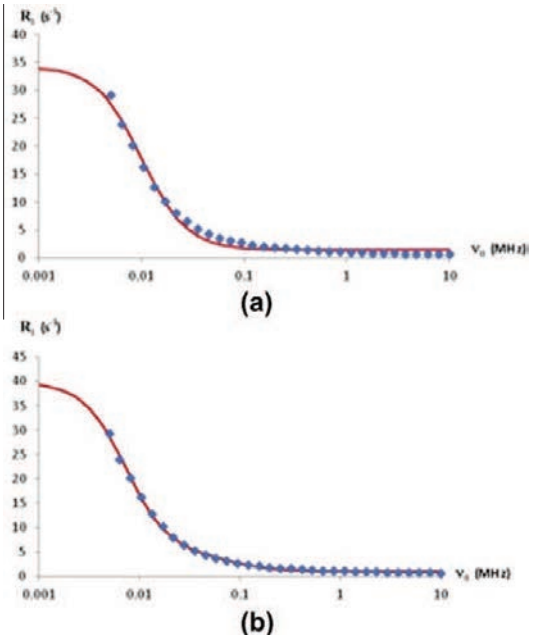


Fig. 1. Experimental dispersion curves (lozenges) along recalculated dispersion curves (continuous curves) of relaxation rate, R_1 (s^{-1}) as a function of measurement frequency ν_0 in MHz. Right: fit with one correlation time. Left: fit with two correlation times. The root mean square deviation (rmsd) has improved by a factor of four from one to two correlation times.

For each sample, data were first tentatively fitted with only one correlation time τ_{C_1} (in addition to τ_{C_0}). As the agreement between experimental data and recalculated dispersion curves did not appear quite satisfactory, the inclusion of a second correlation time was attempted with the hope to improve the root mean square deviation. This systematically succeeded for all the investigated samples. Fig. 1 illustrates the improvement of the fit in such a situation.

3. Results and discussion

Three samples with different hydrophobicity have been studied. They will be denoted 100%, 95%, and 80%, these figures corresponding to the percentage in volume of TEOS vs. MTMS.

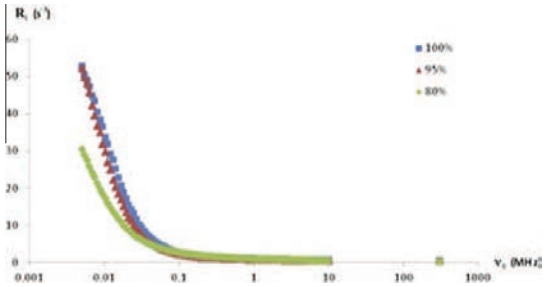


Fig. 2. Experimental relaxation rate (R_1) dispersion curves for the three samples investigated here. From top to bottom: 100% (squares), 95% (triangles), 80% (lozenges) TEOS vs. MTMS (v/v). As in Fig. 1, the horizontal scale (in MHz) indicates the measurement frequency (ν_0). For the sake of completeness, the data at 300 MHz are also shown.

3.1. Self-diffusion

For all these three samples, the water self-diffusion coefficient was found to be identical to that of pure water in the limit of experimental accuracy (1% at best). This can be explained by assuming fast exchange between bound and free water so that the diffusion coefficient D_{obs} can be expressed as [27]

$$D_{obs} = pD_{bound} + (1-p)D_{free} \tag{8a}$$

p being the proportion of bound water. As it can be very reasonably inferred that $D_{bound} \ll D_{free}$, (8a) reduces to

$$D_{obs} \approx (1-p)D_{free} \tag{8b}$$

Consequently, the experimental results, which appeared *a priori* rather disappointing, are in fact deceptively simple. Owing to the experimental uncertainty, they clearly mean that p is smaller than 0.01. This is a conclusion *per se*, which will be confirmed by the interpretation of relaxometry data.

3.2. Relaxometry

The differences between the three samples are illustrated by the raw data displayed in Fig. 2.

As stated above, three types of water are systematically detected. Their parameters are given in Table 1. The assignment of Table 1 arises from the following considerations. 0 corresponds to an extreme narrowing situation, thus obviously to free water. 1 corresponds to the largest correlation time, thus to the lowest mobility, in other words, to water molecules presenting the strongest interaction with the surface. It remains number 2, still outside the extreme narrowing regime. A_0, corresponding to the dc component, is necessarily ill-defined because the relaxation rates continue to decrease (very slowly) beyond 10 MHz. Nevertheless, its uncertainty has presumably no incidence on A_1 and A_2. Actually, it corresponds to water less mobile than free water but more mobile than water of the first hydration layer. Therefore, this type of water can be safely attributed to a second hydration layer.We now define the quantity x_i that will be shown to be proportional to p_i

$$x_i = A_i/\tau_{ci} \tag{9}$$

Moreover, referring to Eqs. (6) and (7), we can notice that x_1 and x_2 are very small and therefore very reasonably assume that $p_0 \approx 1$. As a consequence, with $x_0 = A_0/\tau_{c0}$ (τ_{c0} assumed to be equal to 4 ps), one has

$$x_i/x_0 = p_i \quad \text{for} \quad i = 1,2 \tag{10}$$

We can at the onset draw some qualitative conclusions. Concerning the first hydration layer, we notice that p_1, as expected, decreases when hydrophobicity increases. This is evidently to be related to less hydrophilic sites. On the other hand, water molecules will move less easily from one site to the other and this is easily confirmed by the increase of the correlation time. Concerning the second hydration layer, we notice that neither p_2 nor τ_{c2} evolve significantly with hydrophobicity. This means that the second hydration layer, which necessarily interacts with the gel surface, is not significantly affected by the hydrophobic sites.

We shall now attempt to describe more quantitatively the motion of water molecules in both hydration layers. Translational diffusion around a curved surface amounts to a rotation [28]. The correlation times of Table 1 are related to this rotation. As a correlation time can be considered as the time required for a one-radian rotation and assuming that the surface is a sphere of radius R, it is easy to show that

$$\tau_c = R^2/D \tag{11}$$

Table 1
Parameters deduced from the relaxometry data.

Percentage of TEOS (%)	τ_{c1} (ns)	A_1	τ_{c2} (ns)	A_2	A_0	x_1	x_2	x_0	$p_1 = x_1/\bar{x}_0$	$p_2 = x_2/\bar{x}_0$
80	$1.8\ 10^4$	34.5	$8.3\ 10^2$	2.37	0.81	0.0019	0.0028	202	$9.8\ 10^{-6}$	$1.4\ 10^{-5}$
95	$1.8\ 10^4$	64.6	$9.7\ 10^2$	1.75	0.66	0.0036	0.0018	165	$1.9\ 10^{-5}$	$9.3\ 10^{-6}$
100	$1.4\ 10^4$	58.7	$8.9\ 10^2$	1.64	0.86	0.0041	0.0018	215	$2.1\ 10^{-5}$	$9.3\ 10^{-6}$

Mean value of x_0: $\bar{x}_0 = 194$.

Table 2
Water self-diffusion coefficients in the two hydration layers.

Percentage of TEOS (%)	D_1 ($m^2\ s^{-1}$)	D_2 ($m^2\ s^{-1}$)
80	$3.5\ 10^{-11}$	$7.4\ 10^{-10}$
95	$3.5\ 10^{-11}$	$6.4\ 10^{-10}$
100	$4.5\ 10^{-11}$	$7.0\ 10^{-10}$

Formula (11) is deduced from the mean square displacement during τ_c, equal to τ_c times the diffusion coefficient D. Although this may appear somewhat simplistic, it provides at least a good estimate because the correlation time appearing in (11) concerns exclusively overall tumbling. Correlation times describing other motions (*e.g.* rotation around the symmetry axis of the water molecule) are definitely much smaller. D values (D_1 for the first layer, D_2 for the second layer), obtained from (11) and from the experimental correlation times of Table 1 with again a R value of 250 Å (roughly estimated from the literature on silica gels), are reported in Table 2. By reference to $2.3\ 10^{-9}\ m^2\ s^{-1}$ which is the diffusion coefficient of pure water, we notice that diffusion in the second layer is as expected (that is slowed down by more than an order of magnitude). Conversely, in the first hydration layer, self-diffusion coefficients are slowed down by about two orders of magnitude (with respect to free water) and, interestingly (as already noticed), they tend to decrease when hydrophobicity increases.

4. Conclusion

To the best of our knowledge, we applied for the first time NMR relaxometry techniques to the study of water in hybrid silica gels. It turns out that this method is very efficient as far as the detection of different types of bound water is concerned. Indeed, in spite of a very weak proportion of bound water (10^{-5}–10^{-6}), we were able to characterize a first hydration layer, which senses hydrophobicity, and a second hydration layer (occupying roughly the same volume) that is not affected by hydrophobicity. In fact, this characterization of water in such silica matrices is a prerequisite in view of future applications that concern insertion of swelling clay particles in these matrices. The same methodology could be employed and would probably provide important information about the interaction of water not only with the silica gel surface but also with the clay surfaces.

References

[1] C. Balland, A. Poszwa, C. Leyval, C. Mustin, Geochim. Cosmochim. Acta 74 (2010) 5478–5493.
[2] P.C. Bennett, J.R. Rogers, W.J. Choi, Geomicrobiol. J. 18 (2001) 3–19.
[3] S.F. Cheah, S.M. Kraemer, J. Cervini-Silva, G. Sposito, Chem. Geol. 198 (2003) 63–75.
[4] J. Drever, L.L. Stillings, Colloid Surf. A 120 (1997) 167–181.
[5] L.J. Jones, Plant Soil 205 (1998) 25–44.
[6] P.U. Reichard, R. Kretzschma, S.M. Kraemer, Geochim. Cosmochim. Acta 71 (2007) 5635–5650.
[7] M. Robert, J. Berthelin, Soil Sci. Soc. Am. J. 12 (1986) 453–495.
[8] J.R. Rogers, P.C. Bennett, Chem. Geol. 203 (2004) 91–108.
[9] M. Shirvani, F. Nourbakhsh, Appl. Clay Sci. 48 (2010) 393–397.
[10] S. Uroz, P. Oger, C. Lepleux, C. Collignon, P. Frey-Klett, M.P. Turpault, Res. Microbiol. 162 (2011) 820–831.
[11] L. Citeau, I. Lamy, F. Van Oort, F. Elsass, Colloid Surf. A 217 (2003) 11–19.
[12] M. Grybos, L.J. Michot, M. Skiba, P. Billard, C. Mustin, J. Colloid Interface Sci. 343 (2010) 433–438.
[13] M. Grybos, P. Billard, S. Desobry-Banon, L.J. Michot, J.F. Lenain, C. Mustin, J. Colloid Interface Sci. 362 (2011) 317–324.
[14] C.J. Brinker, G.W. Scherer, Sol-Gel Science. The Physics and Chemistry of Sol–gel Processing, Academic Press, Inc., New York, 1990.
[15] D.P. Jais, H. Don, C. Liu, Environ. Sci. Technol. 41 (2007) 2437–2444.
[16] B.E. Kalinowski, L.J. Liermann, S. Givens, S.L. Brantley, Chim. Geol. 169 (2000) 357–370.
[17] R. Iler, The Chemistry of Silica, Wiley & Sons Inc., New York, 1979.
[18] V.C. Menon, S. Komarneni, M. Park, M. Schmücker, H. Schneider, J. Sol–Gel Sci. Technol. 11 (1998) 7–16.
[19] W.S. Price, NMR Studies of Translational Motion, Cambridge University Press, Cambridge, 2009.
[20] R. Kimmich, E. Anoardo, Progr. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 44 (2004) 257–320.
[21] D. Canet, Adv. Inorg. Chem. 57 (2005) 3–40.
[22] J. Kowalewski, L. Mäler, Nuclear Spin Relaxation in Liquids: Theory, Experiments and Applications, Taylor & Francis, New York, 2006.
[23] S.H. Koenig, W.E. Schillinger, J. Biol. Chem. 244 (1969) 3283–3289.
[24] J. Hassan, E. Reardon, H. Peemoeller, Micropor. Mesopor. Mater. 122 (2009) 121–127.
[25] B. Halle, H. Johannesson, K. Venu, J. Magn. Reson. 135 (1998) 1–13.
[26] E. Steiner, S. Bouguet-Bonnet, A. Robert, D. Canet, Concepts Magn. Reson. A 40A (2012) 80–89.
[27] B. Jönsson, H. Wennerström, P.G. Nilsson, P. Linse, Colloid Polym. Sci. 264 (1986) 77–88.
[28] R. Kimmich, NMR – Tomography, Diffusometry, Relaxometry, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1997.

III.2. Etude de l'altération minérale sur gels de silice hybrides

Ce second chapitre des résultats concerne l'étude de l'altération des minéraux immobilisés dans une matrice de silice (gels de silice hybrides ou GSH).Suite à l'analyse par SAXS des gels de silice, les gels dopés en particules de smectites sont considérés dans cette deuxième partie comme des milieux poreux de nature fractal (Df ≅ 2,5) dans lesquels les métabolites de faibles poids moléculaires peuvent diffuser librement. Les particules minérales sont piégées au sein de la matrice et on suppose que la réactivité est préservée. La porosité, de l'ordre de 50 nm, ne permet pas aux bactéries de s'introduire dans le gel. Leur interaction avec les particules minérales se fait à distance via des mécanismes d'altération indirectes (i.e. production et excrétion de métabolites). L'altération minérale au sein des GSH est suivie, à l'échelle macroscopique du réacteur et microscopique à l'interface gel/bactérie. Les aspects biotique et abiotique sont traités: (i) altération minérale par voie bactérienne, en présence de bactéries hétérotrophes aérobies (ii) altération minérale par voie chimique en présence d'acides forts et de chélatants organiques des métaux. Le chapitre se présente sous forme de trois articles (soumis ou en cours de préparation) et de résultats complémentaires.

Le premier article «Hybrid silica gels to study bacterial dissolution of colloidal phyllosilicates » (soumis) traite de l'altération de particules colloïdales de smectites (nontronite et montmorillonite) immobilisés dans les GSH (figure III.7). Trois bactéries sont testées i.e. *Rahnella aquatilis RA1*, *Pantoae agglomerans* PA1 et *Burkholderia sp.* G5. Ces bactéries isolées à partir de sols rhizosphériques (RA1 et PA1) et d'un sol podzolique (G5) présentent des profils d'altération distincts (Balland Bolou Bi, 2010) intéressants dans l'objectif de valider l'utilisation des GSH. L'objectif de cet article est de comparer le comportement des trois bactéries en interaction avec des minéraux de teneur en fer élevée pour NAu-2 et basse pour SWy-2.

Le second article (en préparation) intitulé « Bioweathering of nontronite colloids in hybrid silica gel (HSG): Implications for iron mobilization », concerne l'étude cinétique de l'altération de la nontronite (NAu-2) immobilisée dans les GSH par une bactérie de la rhizosphère du blé, i.e. *Rahnella aquatilis RA1*. L'objectif de cet article est d'étudier plus précisément le rôle des métabolites bactériens, i.e. acides organiques et sidérophores, dans l'altération minérale.

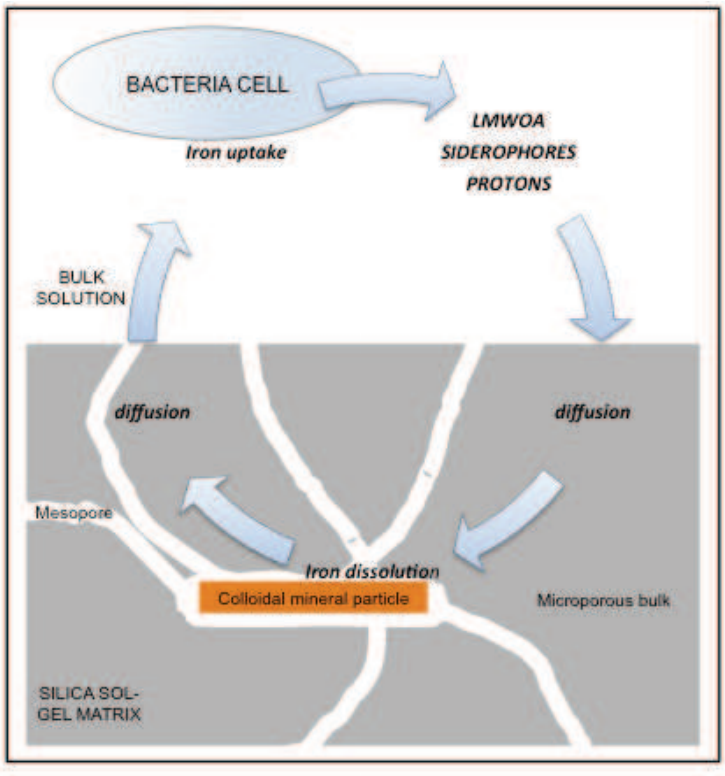


Figure III.7 : Mise en évidence des interactions entre cellules bactériennes/particules minérales colloïdales au sein du réseau de silice micro et mésoporeux via la diffusion de métabolites (Low Molecular Weight Organic Acids, LMWOA ; sidérophores) et de protons (d'après Oulkadi et al., 2013. Soumis)

Dans la continuité de ces résultats, les résultats complémentaires présentés concernent l'étude de l'altération minérale sur GSH dopés en NAu-2 par des mutants de *Rahnella aquatilis* RA1. Ces mutants ont été criblés à partir d'une banque de 1100 mutants pour la perte partielle à totale de « synthèse des sidérophores ». La comparaison du comportement de la souche sauvage sidérophore (+) aux mutants sidérophores (-) devrait permettre d'avoir une approche plus complète du rôle des sidérophores dans le processus global d'altération minérale de NAu-2 par *R. aquatilis* RA1.

Enfin, l'article « Local pH measurement at wet mineral-bacteria/air interface » (à soumettre) est une nouvelle approche permettant de suivre la variation de pH à l'interface bactérie/minéral. Les propriétés physico-chimiques des GSH sont exploitées dans un montage adapté pour la microscopie à sonde électrochimique. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le LCPME (UMR 7564 UL, Nancy).

III.2.1. Des gels de silice hybrides pour l'étude de la dissolution bactérienne de particules colloïdales de phyllosilicates (publication n°3, soumise)

Hybrid silica gels to study bacterial dissolution of colloidal phyllosilicates

Oulkadi, D., Balland-Bolou-Bi, C., Billard, P., Parrello, D., Mustin, C. Desobry-Banon, S*

Résumé

L'objectif de ce travail est d'étudier l'altération minérale bactérienne grâce à des gels hybrides de silice (GSH) dopés en phyllosilicates, i.e. un minéral riche en fer (nontronite, NAu-2) et un minéral pauvre en fer (montmorillonite, SWy-2). Trois bactéries hétérotrophes ont été sélectionnées pour leur capacité d'altération des minéraux. *Pantoae agglomerans* PA1 et *Rahnella aquatilis* RA1 sont isolées de la rhizosphere de hêtre et de blé respectivement (Vosges, France). *Burkholderia sp.* G5 est sélectionnée à partir d'un sol acide et pauvre en nutriments (podzol) (Vosges, France). Le fer dissocié à partir des minéraux et la production des métabolites, i.e. acides organiques et sidérophores, sont principalement suivis. Deux profils d'acides organiques sont observés avec la production majeure d'acide gluconique (9 mM) pour *Burkholderia sp.* G5 et la production diversifiée (<300 µM) de lactate, acétate, propionate, formate, oxalate, citrate et succinate par *Rahnella aquatilis RA1* et *Panloae agglomerans PA1*. Le pourcentage de fer libéré normalisé au fer contenu dans les minéraux donne en moyenne une valeur de 2% excepté pour l'altération de NAu-2 par *Burkholderia sp.* G5 et *Pantoae agglomerans* PA1 où les valeurs atteignent 3,25 et 1,35% respectivement. Le comportement des bactéries obtenu expérimentalement en présence de gels de silice hybride (GSH) dopés en particules minérales reflète celui des milieux naturels d'origine, i.e. la rhizosphère et le sol podzolique.

Mots clés: altération, nontronite, montmorillonite, colloïdes, matériaux hybrides.

Hybrid silica gels to study bacterial dissolution of colloidal phyllosilicates

Oulkadi[1], D., Balland-Bolou-Bi[2], C., Billard[1], P., Parrello[1], D., Mustin[1], C., Desobry-Banon[1], S.*

[1]Université de Lorraine, LIEC, UMR CNRS 7360, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

[2]Department of Geological Sciences, Stockholm University, Frescativägen 8, SE 114 18 Stockholm, Sweden

*Corresponding author: sylvie.desobry@univ-lorraine.fr

Tel: +33 (0) 3 83 68 42 83 , Fax : +33 (0) 3 83 68 42 84

Abstract

Hybrid silica gel (HSG) methodology is a novel way of separating bacteria cells from a colloidal mineral source. The aim of this work was to use HSG in a comparative study on clay mineral bioweathering. Three heterotrophic bacterial strains, selected for their ability to leach iron from silicate minerals, were compared to chemical leaching in experiments using HSG doped with two phyllosilicates, i.e. iron-rich nontronite (NAu-2) and low-iron content montmorillonite (SWy-2). *Pantoae agglomerans* PA1 and *Rahnella aquatilis* RA1 were isolated from silicate-rich soils, i.e. beech and wheat rhizospheres (Vosges, France), *Burkholderia sp.* G5 was selected from acidic and nutrient-poor Podzol soils (Vosges, France). Fe release from clay minerals and production of bacterial metabolites, i.e. low molecular weight organic acids (LMWOA) and siderophores, were monitored. Two LMWOA profiles were observed with major gluconate (> 9,000 µM) production for *Burkholderia sp.* G5 and moderate production (< 300 µM) of lactate, acetate, propionate, formate, oxalate, citrate and succinate for *Rahnella aquatilis* RA1 and *Pantoae agglomerans* PA1. The HSG methodology demonstrated its usefulness in revealing bacteria bioweathering behavior.

Keywords Bioweathering. Nontronite. Montmorillonite. Colloids. Hybrid material

Introduction

Under aerobic conditions, Fe solubility in soil is too low for trees and microorganisms nutritional needs. Therefore, bacteria adopt various strategies for iron uptake, i.e. colonization of mineral surfaces, production of low molecular weight organic acids (LMWOA) and siderophores (Hider and Kong 2010; Hiebert and Bennett 1992; Barker et al. 1997; Bennett et al. 2001; Rogers and Bennett 2004; Sandy and Butler 2009). Proton-promoted and ligand-promoted dissolution mechanisms are the two main biogeochemical processes explaining bacterial-mineral interactions in oxic conditions (Banfield et al. 1999; Berthelin 1983). Proton-promoted is related to the protonation of coordinative partners of iron ions at the mineral surface. Ligand-promoted dissolution is proposed to follow a three-step process (Furrer and Stumm 1986) i) fast surface complex formation by ligand exchange ii) slow surface detachment of metal ion iii) fast regeneration of the surface. The rate of ligand-promoted dissolution is dependent of pH, surface coverage and adsorption of organic and inorganic ligands (Kraemer 1984). Under laboratory anaerobic conditions, the production of exogeneous reductant or cell-associated reducing ability cause extensive dissolution of Fe(II) from clays (Jaisi et al. 2005, 2007 a, 2007 b, 2007 c, 2008; Kim et al. 2004). In natural soils and sediments, water can fill soil pores or forms film around mineral providing local anaerobic conditions until then water evaporation and drainage restore aerobic conditions. Heterotrophic bacteria switch from anaerobic to aerobic metabolism and then contribute to iron redox cycles of clay (Stucki 2011). In order to understand the single or combined complex biogeochemical events involved in mineral bioweathering, most of the studies have been carried out using large size (a few hundred micrometers) natural minerals (Barker et al. 1998; Bennett et al. 1996; Drever and Stillings 1997) or smaller size fractions (< 2 μm) obtained by centrifugation (Jaisi et al. 2007 a, 2007 b, 2007 c ; Shirvani and Nourbakhsh 2010). In order to reduce mineral natural heterogeneity, synthetic minerals such as hematite (Hersman et al. 1995) or Fe-silicate hornblende (Buss et al. 2007) were also employed.

Recently, a new support for mineral weathering study was proposed, i.e. Hybrid Silica Gel (HSG). It consisted in dispersing colloidal clay particles in a silica gel matrix by a conventional sol-gel procedure (Grybos et al. 2010). The pore size of wet silica gels is usually less than ten of nanometers diameter whereas bacterial cells are about 1 to 2 μm length (Dickson and Ely 2013). This implied that bacteria were excluded from HSG as demonstrated for GFP-tagged derivatives of *Pseudomonas putida* KT2440 (Grybos et al. 2011). The HSG prevented bacteria-colloidal mineral adhesion and subsequent physical

instability (flocculation and precipitation) (Jaisi at al. 2008). Fig1 illustrates the process expected to occur when bacteria were incubated with HSG containing colloidal mineral particles. LMWOA, siderophores and protons produced by the bacteria cell diffuse through HSG and dissolve the mineral to respond to bacterial nutritional needs.

The aim of the present work was to use Hybrid Silica Gels (HSG) doped with colloidal clay minerals as a new geomicrobiological tool to quantify and compare bioweathering processes in aerated conditions. *Pantoae agglomerans* PA1, *Rahnella aquatilis* RA1 and *Burkholderia sp.* G5 were chosen for their distinct ecological origin and their ability to dissolve mineral powders (Balland et al. 2010; Grybos et al. 2011). Nontronite (NAu-2) and montmorillonite (Wyoming, Swy-2) were selected for their distinct iron pool content, i.e. iron rich and iron low content respectively.

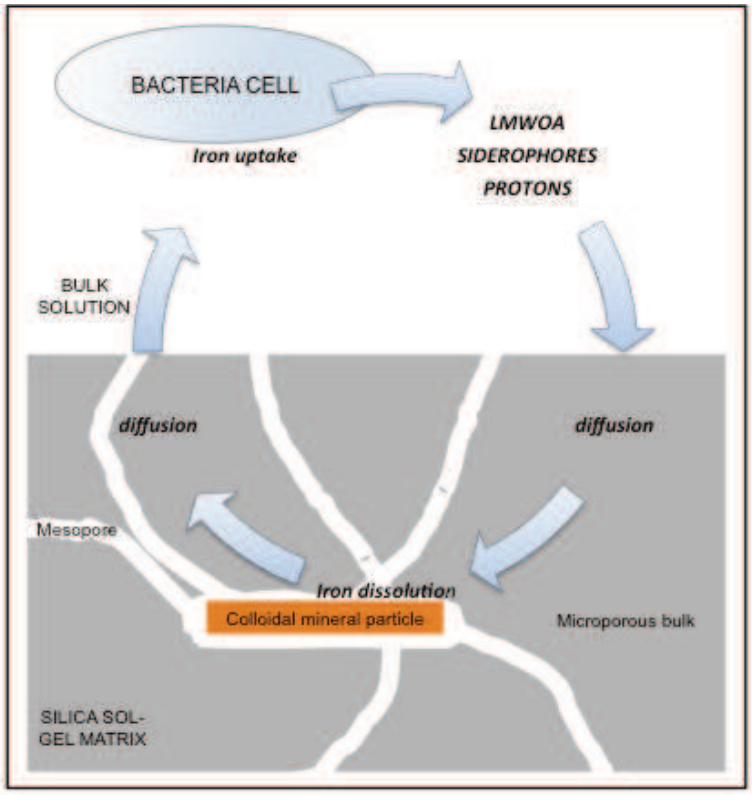


Figure 1 Schematic representation of a bacterial cell in interaction with HSG. Bacterial metabolites and protons diffuse through HSG micropores and mesopores to mineral colloidal particles. Iron solubilization occurs then Fe (III) bound to ligands (LMWOA and siderophores) diffuse back to bacteria cell.

Materials and methods

Mineral source

Nontronite (NAu-2), purchased from the Source Clays Minerals repository at Purdue University, was defined by the structural formula $[Si_{7.55}Al_{0.16}Fe_{0.29}]$ $[Al_{0.34}Fe_{3.54}Mg_{0.05}]$ $O_{20}(OH)_4Na_{0.72}$ (Gates et al. 2002). Montmorillonite (Wyoming, SWy-2) from Iko Erbslöh (Germany) was described by the structural formula $[Si_{7.74}Al_{0.26}]$ $[Al_{3.06}Mg_{0.48}Fe^{II}_{0.03}Fe^{III}_{0.42}]$ $O_{20}(OH)_4$ $Na_{0.77}$ (Vantelon et al. 2003). Purified Nau-2 and SWy-2 size fractions were obtained according to the procedure previously described by Michot et al. (2008) and briefly summarized hereafter. Clay suspensions were exchanged three times with 1M NaCl, and then washed by centrifugation and dialysis against Milli-Q water until a conductivity of less than 5 µS was reached. The suspensions were left for 24hrs in Imhoff cones. After discarding the bottom of the cones, size fractionation was performed by centrifuging suspensions from 7,000g to 35,000g (Michot et al. 2008). The size fraction selected from a 17,000 g gravitational field was chosen for this study. The morphological properties of NAu-2 particles were determined using Transmission Electron Microscopy on a Philips Microscope. The average size values for the fraction we used were 705 nm in length, 138 nm in width and 1.05 nm in thickness, which proves that the layers were exfoliated in suspension (Michot et al. 2008).

Hybrid silica gels (HSG) synthesis

HSG were produced through an acid catalyzed sol-gel procedure using tetraethoxysilane (TEOS, Fluka) (Grybos et al. 2010). A clear solution of TEOS, Milli-Q H_2O, and HCl (0.1 M), defined by the molar ratio 1:2.45:0.003 was prepared by sonication (Ultrasonic cleaner, Branson 2410 DTH) at ambient temperature. Adjustment of pH from pH 2.0 to pH 4.0 with NaOH (0.1 M) permitted to prevent NAu-2 dissolution when added in the silica sol. The pH was further increased up to pH 5.0 (NaOH, 0.1M) to accelerate self-condensation and sol-gel transition. Hybrid silica solution (250 µl) was distributed into 96 well microplates (Eppendorf Deepwell) and left at room temperature for gelation that occurred within minutes. HSGs pieces were then sterilized twice by autoclaving in Milli-Q water for 30 min at 110°C and stored in Milli-Q water at ambient temperature until use. The hydrothermal treatment permitted to discard ethanol produced during preparation and to stabilize the gel structure

(SAXS measurements not shown). HSG mineral-free (controls) were made according to the same procedure by replacing mineral suspension with Milli-Q water. All chemicals used were of extra pure grade.

Weathering experiments

Biotic experiments

Pantoae agglomerans PA1 and *Rahnella aquatilis* RA1 were isolated from the rhizosphere of beech and wheat respectively. *Burkholderia sp*. G5 was isolated from type podzol soil (Vosges, France) (Balland et al. 2010; Grybos et al. 2011). Selected clones were grown overnight in 2 mL sterilized Luria-Bertani broth at 28°C under constant shaking at 150 rpm (Stuart Scientific, orbital incubator SI50). The cells suspensions were harvested by centrifugation (Multifuge 1 S-R, Heraeus) at 4500 g for 10 min at 10°C and the pellets were washed three times in a Fe-Mg-deficient Bushnell-Hass medium (BHm) adjusted at pH 6.5 (Balland et al. 2010; Grybos et al. 2010). BHm medium was prepared with analytical reagents and double deionized water (Milli-Q) and contained per liter: 22.5 mg $Na_2HPO_4.2H_2O$, 20mg $NaH_2PO_4.2H_2O$, 20 mg KCl, 100 mg KNO_3, 65 mg $(NH_4)_2\ SO_4$, 20 mg $CaCl_2.2H_2O$. Prior to experiments, BHm was autoclaved for 30 min at 110°C and supplemented with sterile filtered (0.22 μm pore size membrane, Millipore) glucose solution to a final concentration of 3.3 g L^{-1}. The bacteria suspension was adjusted to an absorbance of 0.06 at 600 nm in BHm. Two mL were used to inoculate each assay containing four pieces of 250 μL HSGs doped with NAu-2 or SWy-2 particles. pH, Fe, glucose and organic acids were analyzed after 6 and 12 days incubation.

Abiotic experiments

In order to simulate proton-promoted dissolution, abiotic weathering experiments were performed in BHm medium adjusted with HNO_3 (1M) to pH ranging from 1.5 to 5.0. HSGs doped with NAu-2 or SWy-2 particles were added in pH-adjusted BHm in a volume ratio 1:2. After 6 and 12 days, Fe and pH measurements were determined.

Biotic and abiotic experiments were performed with HSG mineral-free for Fe measurements controls. All weathering experiments were performed in 14 mL sterile tube (Falcon™) in triplicate at 28°C under shaking at 150 rpm (Stuart Scientific, orbital incubator SI50).

Elemental analyses

All solutions from weathering experiments were filtered through 0.22 μm pore size filter (Millipore). The organic acids analysis was performed on frozen solutions at -20°C.

The pH was measured by using standard pH meter electrode (MeterLab®, pHM210). The colorimetric analysis of glucose and Fe were performed in clear bottom 96 well microplates using a FLX Xenius spectrofluorometer (SAFAS, Monaco). Glucose consumption was determined by measuring the glucose remaining in 3 μl of filtrate aliquot after addition of 300 μl of GOD-PAP (enzymatic Kit, BioLabo). After 20 min in dark, the glucose concentration was calculated through absorbance measurement at 505 nm.

Since Fe can precipitate and/or adsorb onto the silica and mineral surfaces, 1 volume HSG was treated with 2 volumes of potassium chloride and hydroxylamine (KCl 1 M; NH_2OH 0.2%) to extract amorphous Fe at the end of each experiment (Balland et al. 2010; Grybos et al. 2010). After 1 hour at 28 °C, amorphous Fe extracted from HSG with potassium chloride and hydroxylamine solution and soluble Fe in weathering solutions were quantified by absorbance measurement at 565 nm after addition of 20 μl of Ferrospectral® dye indicator to 200 μl of filtered solutions. The detection limit was found as low as 20 μg L^{-1} under our conditions. The total amount of clay-dissociated Fe was calculated as the sum of soluble Fe and Fe released from HSG after KCL-Hydroxylamine treatment.

Organic acids produced from biotic experiments were quantified using Ion Chromatograph (ICS 3000, Dionex corp.) equipped with an on-line hydroxide eluent generator, an ion suppressor and a conductivity detector. The separation was realized using an Ion Pac® column (AS 11 HC, Dionex corp.) with a KOH gradient of 0.9-60 mM over 50 min at a flow rate of 1.3 mL per min. Standard solutions (0.1 mM) used were sodium acetate, sodium citrate, sodium formate, sodium gluconate, sodium D, L-malate, sodium oxalate, sodium propionate, sodium succinate, (Sigma Aldrich), sodium lactate and sodium malonate (Fluka). Quantification measurement uncertainty was better than 0.5% for all organic acids and the detection limit was close to 0.1 ppm.

Assay for siderophore production

The quantification of siderophores produced by *Rahnella aquatilis* RA1*, Pantoae agglomerans PA1* and *Burkholderia sp.* G5 was performed according to the Chrome Azurol S (CAS) liquid assay (Schwyn and Neilands 1987) after 6 days incubation at 28°C in liquid MM9 medium. The MM9 growth medium was derived from M9 medium by decreasing the

phosphates level to 0.03% KH_2PO_4 and it is composed of (per liter) 6.0 g Na_2HPO_4, 0.3 g KH_2PO_4, 0.5 g NaCl, 1.0 g NH_4Cl, and 6.06 g Tris base (50 mM). Each liter of salt solution was supplemented with sterilized filtered solutions of 10% (w/v) Chelex 100-treated Casamino acids (Difco Laboratories) 20 mL, $MgSO_4$ (1M) 2 mL, 20% (w/v) glucose 10 mL, and $CaCl_2$ (1M) 0.1mL (Kalinowski et al. 2000). The siderophore concentration was determined via absorbance measurements at 630_{nm} and expressed in Desferrioxamine mesylate (DFOM, Sigma-Aldrich) equivalent according to the calibration curve made with DFOM (data not shown) (Payne 1994).

Data analysis

Data were analyzed by Tukey's HSD tests on XLSTAT Version 2011.4.02.

Bacterial strains characterization

The genus of the three bacterial strains selected for this work was determined by amplification of 16S rRNA genes and sequencing. Polymerase chain reactions were performed using an universal set of primers in a total reaction volume of 50 µl containing 1 × PCR mastermix (Eppendorf ®), 0.1 µM of primers (966 F and 1401 F) and 1 µl cell extract (Felske et al. 1998). Before being sequenced by MWG biotech Company (Courtaboeuf, France), the PCR products (PCR product size: 433 base pair) were purified and concentrated using mini-columns (High PureTM PCR product Purification Kit, Roche diagnostic). A blast program was used to compare sequences with those of GenBank databases (http://www.nbci.mlm.nih.gov.blast). The following identification was made with a maximum identification of about 99% summarized in Table 1: *Rahnella aquatilis* RA1, *Pantoae agglomerans* PA1, *Burkholderia sp.* G5.

Table 1. Identification of bacterial strains used in this paper (size of PCR product about 433 bp). The number for accession to the Genbank databases is indicated (http://www.nbci.mlm.nih.gov.blast)

Bacterial strains	Authors	Closest match according to16S RNA gene sequence	% Similarity	Access
RA1	Balland et al., 2010	*Rahnella aquatilis*	99	DQ862542.1
PA1	Balland et al., 2010	*Pantoae agglomerans*	98	GQ862542.1
G5	Grybos et al., 2011	*Burkholderia sp*.	99	EU184087.1

Results

Swy-2 and NAu-2 mineral weathering was performed in a Fe-Mg deprived medium (BHm) supplemented with glucose as sole carbon source. *Burkholderia sp.* G5 consumed all the glucose available after 6d incubation while *Pantoae agglomerans* PA1 and *Rahnella aquatilis* RA1 consumed less than 50% glucose after 12d (Table 2). In relation with high glucose uptake by *Burkholderia sp.* G5 after 6d incubation, the pH values dropped from 6.5 to 2.91 and 2.93 in NAu-2 and SWy-2 treatments respectively then stabilized until 12d (Table 2). After 12d incubation, *Rahnella aquatilis* RA1 acidified down to pH 3.74 and pH 4.01 the SWy-2 and NAu-2 samples respectively. For all the experiments performed with *Pantoae agglomerans* PA1, the pH values dropped from 6.5 to around pH 3.6 after 6d up to 12d (Table 2).

As a consequence of bacterial metabolic activity, Fe mineral dissolution was observed in all treatments (Table 2). 8.15 $mg.g^{-1}$ of total Fe were dissociated from NAu-2 particles after 12d incubation with *Burkholderia sp.* G5 whereas 5.25 and 3.43 $mg.g^{-1}$ was released by *Pantoae agglomerans* PA1 and *Rahnella aquatilis* RA1 respectively (Table 2). Fe leached from low-iron montmorillonite (SWy-2) was in the range 0.62-0.98 $mg.g^{-1}$ after 12d (Table 2). In order to take into account the eight-fold Fe level in NAu-2 compared to SWy-2, Fe leached was normalized to total Fe (Fig 2).

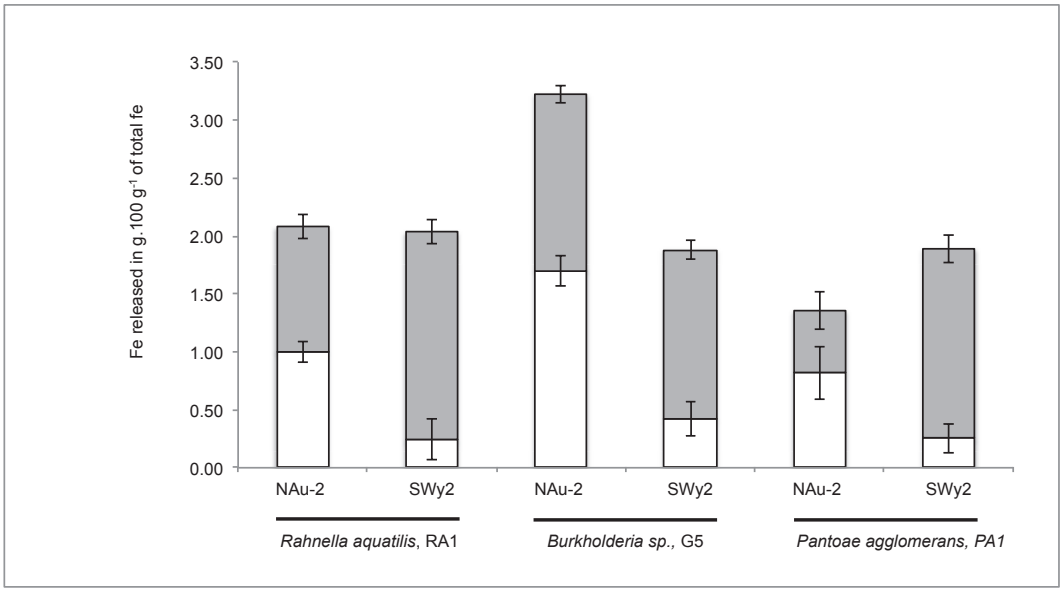


Figure 2 Soluble Fe (□) and immobilized Fe (■) (in $g.100g^{-1}$ Fe) released by *Rahnella aquatilis* RA1, *Pantoae agglomerans* PA1 and *Burkholderia sp.* G5 from colloidal minerals trapped in HSGs after 12d incubation at 28°C.

Table 2. General composition of medium containing HSGs doped with minerals (NAu-2, SWy-2) after 6 and 12 days incubation with three bacteria strains (*Rahnella aquatilis* RA1, *Pantoae agglomerans* PA1 and *Burkholderia sp.* G5) including glucose remaining in solution, pH, soluble and immobilized Fe.

Mineral	Bacteria	Time (d)	pH	SD pH	Glucose* remaining	SD glucose	Fe** Soluble	SD Fe	Fe** immobilized	SD Fe
	RA1	6	4.33^{a}	0.04	2.16^{a}	0.26	0.58^{e}	0.15	0.53^{e}	0.06
		12	4.01^{b}	0.15	1.81^{ab}	0.15	2.07^{c}	0.57	1.36^{d}	0.40
NAu-2	*G5*	6	2.91^{d}	0.01	-	-	2.65^{b}	0.05	2.60^{bc}	0.31
		12	2.94^{d}	0.01	-	-	4.31^{a}	0.34	3.84^{a}	0.19
	PA1	6	3.61^{c}	0.04	1.97^{ab}	0.28	1.38^{d}	0.13	1.96^{c}	0.44
		12	3.62^{c}	0.07	2.15^{a}	0.07	2.52^{bc}	0.23	2.73^{b}	0.26
	RA1	6	3.67^{c}	0.04	1.79^{ab}	0.07	-	-	0.42^{e}	0.04
		12	3.74^{c}	0.18	1.63^{b}	0.52	0.07^{ef}	0.04	0.55^{e}	0.04
SWy-2	*G5*	6	2.93^{d}	0.01	-	-	0.14^{ef}	0.03	0.84^{de}	0.06
		12	2.95^{d}	0.01	-	-	0.14^{ef}	0.05	0.49^{e}	0.03
	PA1	6	3.66^{c}	0.03	1.96^{ab}	0.09	-	-	0.43^{e}	0.03
		12	3.56^{c}	0.03	1.90^{ab}	0.18	0.08^{ef}	0.06	0.60^{e}	0.03

"-": below detection limit, *glucose average concentration remaining in solution expressed in g L^{-1}, **Fe average concentration expressed in mg g^{-1} mineral, standard deviation "SD" calculated from triplicate. Means not followed by the same letter are significantly different according to Tukey's HSD test ($p<0.05$), N = 36 observations.

An average Fe release value of 2.0 % was obtained after 12d bioweathering except for NAu-2 incubated with *Burkholderia sp.* G5 and *Pantoae agglomerans* PA1 that released 3.25 and 1.35 % Fe respectively. Lower soluble Fe values were systematically obtained during SWy-2 bioweathering (Fig 2). According to abiotic experiments (Fig 3A and 3B), it appeared that, except for SWy-2 bioweathering by *Burkholderia sp.* G5, all biotic treatments were above the proton-promoted dissolution line released in BHm medium adjusted with HNO_3 (1M) to pH ranging from 1.5 to 5.0 which indicated the effect of ligand-promoted dissolution. Strong Fe chelatants, i.e. siderophores, were measured in MM9 treatments for *Rahnella aquatilis* RA1 and *Burkholderia sp.* G5 giving 52+/- 0.3 µM and 45+/-1.2 µM (equivalent DFOM) respectively, whereas *Pantoae agglomerans* PA1 produced only 16+/- 1.5 µM (equivalent DFOM).

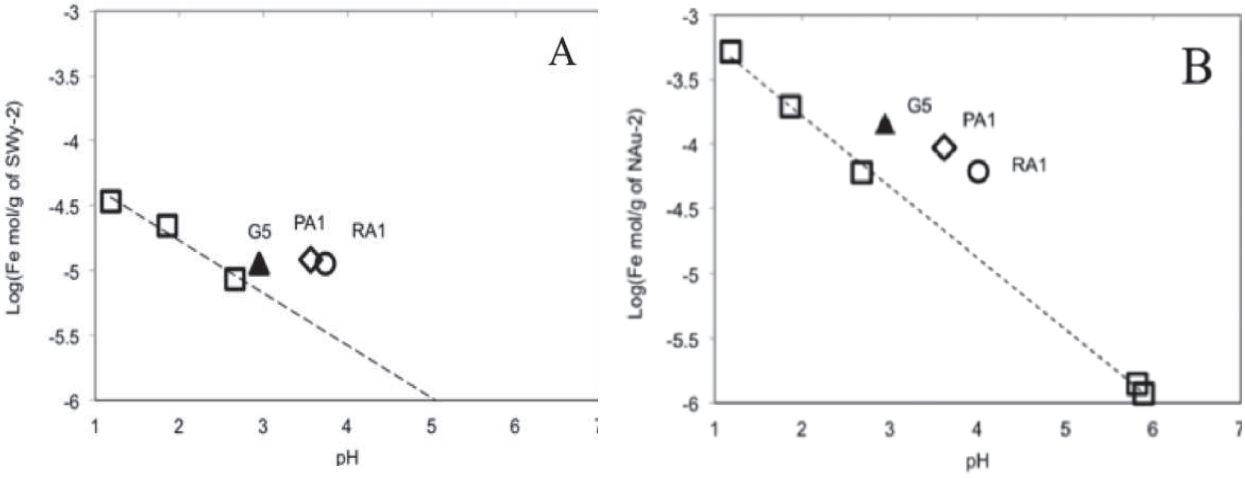


Figure 3 Log-Log plots of Fe released in solution (mol g^{-1} mineral) versus pH from HSGs containing SWy-2 (Fig 3 A) and NAu-2 (Fig 3 B) after 12d of incubation at 28°C with *Rahnella aquatilis* RA1 (○), *Pantoae agglomerans* PA1 (◊) and *Burkholderia sp.* G5 (▲). The proton-promoted dissolution from HNO_3 experiments (□) is indicated by dashed line

Determination of other ligands, i.e. LMWOA (Table 3), gave for *Rahnella aquatilis* RA1 and *Pantoae agglomerans* PA1 high amount of lactic and acetic acids (<300 µM) and moderate levels of other monodentate acids, i.e. succinic, propionic and formic acids. Di and tri-dentate, i.e. oxalic and citric acids, were produced up to 200 µM for *Pantoae agglomerans* PA1 after 12d incubation with NAu-2 (Table 3). High concentration of gluconic acid (>9,000 µM) was

Table 3. Major organic acids excreted by bacteria strains *Rahnella aquatilis* RA1, *Pantoae agglomerans* PA1 and *Burkholderia sp.* G5 after 6 and 12 days incubation of HSGs doped with minerals (NAu-2, SWy-2) in BHM medium.

Mineral	Bacteria	Time (d)	Gluconic acid *	Citric acid *	Succinic acid *	Lactic acid *	Acetic acid *	Propionic acid *	Oxalic acid *	Formic acid *	Pyruvic acid *
	RA1	6	-	47.9^{b}	11.3^{bc}	51.4^{de}	76.6^{c}	10.8^{b}	28.9^{ef}	8.0^{e}	-
		12	4.4^{c}	84.6^{a}	46.6^{abc}	55.8^{de}	141.6^{abc}	14.4^{b}	41.1^{de}	13.03^{cde}	
NAu-2	*G5*	6	11633^{a}	-	-	-	80.5^{c}	9.9^{b}	3.3^{g}	10.9^{de}	-
		12	11733^{a}	-	2.2^{c}	-	$116b^{c}$	3.8^{b}	10^{fg}	21.03^{cde}	-
	PA1	6	37.7^{c}	39.4^{bc}	92.2^{ab}	182.3^{ab}	146.5^{abc}	9.4^{b}	152.2^{b}	92.0^{b}	-
		12	35.5^{c}	55.4^{ab}	99.3^{a}	200^{ab}	298.3^{a}	5.8^{b}	199^{a}	128.3^{a}	11.3^{a}
	RA1	6	-	94.6^{a}	68.9^{abc}	92.2^{cd}	68.3^{c}	12.5^{b}	36.3^{de}	7.2^{e}	-
		12	-	81.6^{ab}	20.3^{abc}	153.6^{bc}	285.3^{a}	12.1^{b}	41.1^{de}	8.7^{e}	23.8^{a}
SWy-2	*G5*	6	9526^{b}	-	-	-	60.5^{c}	32.4^{a}	10^{fg}	11.6^{de}	-
		12	11300^{a}	-	5.7^{c}	-	83.3^{c}	12.1^{b}	3.3^{g}	10.2^{e}	-
	PA1	6	-	70.3^{ab}	117.33^{a}	144^{bc}	110^{bc}	6.25^{b}	57.0^{cd}	25.3^{cd}	-
		12	-	78.4^{ab}	80.5^{abc}	258^{a}	258.3^{ab}	8.1^{b}	70.7^{c}	27.5^{c}	59.4^{a}

"-" below detection limit, * organic acid average concentration expressed in $\mu mol.l^{-1}$ (n=3). Means not followed by the same letter are significantly different according to Tukey's HSD test ($p<0.05$), N = 36 observations.

produced by *Burkholderia sp.* G5 in NAu-2 and SWy-2 weathering experiments with some acetic, formic, propionic and oxalic acids in micromolar concentrations. No lactic, citric, pyruvic acids were produced by G5 after 12d. Metabolized carbon, calculated from carbon produced in organic acids normalized to carbon consumed in glucose (Table 4), gave 58% for *Burkholderia sp.* G5 and less than 7% and 12% for *Rahnella aquatilis* RA1 and *Pantoae agglomerans* PA1 respectively after 12d for both NAu-2 and SWy-2 bioweathering experiments.

Table 4. Metabolized carbon (%) by *Rahnella aquatilis* RA1, *Pantoae agglomerans* PA1 and *Burkholderia sp.* G5 during NAu-2 and SWy-2 bioweathering. The percentage values were calculated from carbon produced in organic acids normalized to carbon consumed in glucose after 12d at 28°C.

	Metabolized C (%)	
	NAu-2 HSG	SWy-2 HSG
Rahnella aquatilis RA1	4.61	6.55
Burkholderia sp. G5	58.86	57.16
Pantoae agglomerans PA1	11.56	10.37

Discussion

The hybrid silica gels methodology permitted to evaluate bacterial Fe leaching from two colloidal clays (Fig 2). Ligand-promoted dissolution was observed in all cases except for SWy-2 bioweathering with *Burkholderia sp.* G5 that followed proton-promoted dissolution processing (Fig 3A and 3B). The acidifying bacterial activity resulted from organic acids production but also from CO_2 release that was not measured in this study (Balland et al. 2010; Welch and Ullman 1993). Two distinct organic acids profiles were observed as a function of bacteria ecological origin. From acidic podzol type soil, *Burkholderia sp.* G5 metabolized 58% carbon and produced mainly gluconate (10,000 µM) while *Rahnella aquatilis* RA1 and *Pantoae agglomerans* PA1, isolated from silicate-rich rhizosphere, metabolized less than 12% carbon and produced moderate levels (< 300 µM) of mono, di- and tri-dentate organic acids.

Previous studies showed that bacteria such as *Burkholderia sp.* efficiently decreased pH (pH<3) in poor-nutrients conditions to acquire metals from minerals by glucose oxidation and gluconic acid production (Balland-bolou-bi and Poszwa 2012; Balland et al. 2010; Grybos et al. 2011; Lin et al. 2006; Song et al. 2008; Vandevivere et al. 1994; Wu et al. 2007). Vandevivere et al. (1994) used the term gluconate-promoted dissolution to describe the central role of gluconic acid on silicate mineral weathering as also previously reported in other works (Lin et al. 2006; Mailloux et al. 2009; Welch and Ullman 1999). The di- and tri-dentate organic acids, produced by *Rahnella aquatilis* RA1 and *Pantoae agglomerans* PA1, were also found efficient in silicate dissolution (Welch and Ullman 1993). Citric and oxalic acids are characterized by Fe (III)-binding affinity constants of $10^{+24.8}$ and $10^{+7.6}$ respectively (Neilands 1981; Silva et al. 2009). Other chelating agents, i.e. siderophores, were produced in micromolar concentrations by *Rahnella aquatilis* RA1, *Burkholderia sp.* G5 and *Pantoae agglomerans* PA1. Siderophores have a high coordination affinity with ferric ions and a binding constant varying between 10^{+23} and 10^{+52} (Ams et al. 2002; Sandy and Butler 2009). Adsorption of siderophores molecules on clay mineral surfaces entrapped in HSG and formation of stable and soluble metal-organic complexes might act efficiently in our weathering experiments (Cama and Ganor 2006; Haack et al. 2008; Ullman and Welch 2002; Welch and Ullman 1999). Under aerated conditions at pH5.0, inorganic iron is extremely insoluble and its concentration is less than optimal for microbial growth. To overcome this limitation, *Burkholderia sp*. G5, *Rahnella aquatilis* RA1 and *Pantoae agglomerans* PA1, were expected to produce early siderophores that have a high coordination affinity with ferric ions. In addition, synergistic mechanisms with LMWOA could occur at the mineral surface, as demonstrated in experiments dealing with Fe (III) and oxalate and DFOM (Cheah 2003; Reichard et al. 2007). Acker and Bricker (1992) suggested that mineral "controlled" the organic acids production in relation with Fe localization in octahedral or tetrahedral sheet. Fe is essentially found into octahedral sheet for Swy-2 while NAu-2 contains mainly octahedral Fe and some tetrahedral Fe (Gates et al. 2002; Michot et al. 2008; Vantelon et al. 2003). Grybos et al. (2010), in a previous study on HSG doped with four sizes of colloidal NAu-2, suggested that tetrahedral Fe was mainly dissociated in relation with high basal/edge surfaces ratios. The average percentage of total Fe release from both minerals in our experiments revealed the efficiency of the two distinct bacterial metabolic profiles representative of two soil origins i.e. poor acidic and organic-rich soils.

Conclusion

Hybrid silica gel methodology is a novel way of separating cells from a colloidal mineral source. The ligands diffuse through HSG and dissolve the minerals. In this work, it permitted to compare mineral bioweathering of colloidal phyllosilicates. *Pantoae agglomerans* PA1 and *Rahnella aquatilis* RA1 showed clearly ligand-promoted dissolution type behavior by producing moderate acidification and efficient ligands, i.e. di-, tri-dentate organic acids, and siderophores. *Burkholderia sp.* G5, selected from acidic podzolic soils, acidified the medium down to pH<3.0 by producing large amounts of gluconic acid. The nature and concentration of organic acids produced in our experiments reflected the distinct ecological origin of bacteria, i.e. rhizosphere and poor acidic soils, that usually contains from 0.1 to 1,000 μM LMWOA. Using HSG permitted to prevent cell attachment and biofilm formation on mineral surfaces and facilitate the quantification of biogeochemical processes. Further investigations are necessary to get details about a size exclusion function for organic ligands of different sizes. Changing the silica precursors nature (i.e. MTMS-Methyltrimethoxysilane precursor) should also provide variation of silica surface hydrophobicity and variation of ligands partition. Screening ligand as a function of size or polarity should be of great interest in order to decompose the complex bioweathering processes.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (Programme HÆSPRI ANR-09-BLAN-0336), Region Lorraine and Université de Lorraine. All of these are gratefully acknowledged. We thank Géraldine Kitzinger for her assistance during organic acid analysis.

Reference

Acker JG, Bricker OP (1992) The influence of pH on biotite dissolution and alteration kinetics at low temperature. Geochim Cosmochim Acta 56**:** 3073–3092

Ams DA, Maurice PA, Hersman LE , Forsythe JH (2002) Siderophore production by an aerobic *Pseudomonas mendocina* bacterium in the presence of kaolinite. Chem Geol 188: 161–170

Balland C, Poszwa A, Leyval C, Mustin C (2010) Dissolution rates of phyllosilicates as a function of bacterial metabolic diversity. Geochim Cosmochim Acta 74: 5478–5493

Balland-Bolou-Bi C, Poszwa A (2012) Effect of calco-magnesian amendment on the mineral weathering abilities of bacterial communities in acidic and silicate-rich soils. Soil Biol Biochem 50: 108–117

Banfield JF, Barker WW, Welch S, Taunton A (1999) Biological impact on mineral dissolution: application of the lichen model to understanding mineral weathering in the rhizosphere. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 3404–3411

Barker WW, Welch SA, Banfield JF (1997) Biogeochemical weathering of silicate minerals. Rev Mineral Geochem 35: 391–428

Bennett PC, Hiebert FK, Choi WJ (1996) Microbial colonization and weathering of silicates in a petroleum-contaminated groundwater. Chem Geol 132: 45–53

Bennett PC, Rogers JR, Choi WJ (2001) Silicates , Silicate Weathering , and Microbial Ecology. Geomicrobiol J 18: 3–19

Berthelin J (1983) Microbial weathering process. In Microbial geochemistry, Blackwell, London, pp 223-262

Cama J, Ganor J (2006) The effects of organic acids on the dissolution of silicate minerals: A case study of oxalate catalysis of kaolinite dissolution. Geochim Cosmochim Acta 70: 2191–2209

Cheah SF, Kraemer SM, Cervini SJ, Sposito G (2003) Steady-state dissolution of goethite in the presence of desferrioxamine B and oxalate ligands: implications for the microbial acquisition of iron. Chem Geol 198: 63-75

Dickson DJ, Ely RL (2013) Silica sol-gel encapsulation of cyanobacteria: lessons for academic and applied research. Appl Microbiol Biotechnol 97:1809-1819

Drever JI, Stillings LL (1997) The role of organic acids in mineral weathering. Colloid Surface A 120: 167–181

Felske A, Akkermans ADL, De Vos WM (1998) Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. Appl Environ Microb 64: 4581–4587

Furrer G, Stumm W (1986) The coordination chemistry of weathering. 1. Dissolution kinetics of delta-Al2O3 and beO. Geochim Cosmochim Acta 50:1847-1860

Gates WP, Slade PG, Manceau A, Lanson B (2002) Site occupancies by iron in nontronites. Clay clay miner 50: 223–239

Goyne KW, Brantley SL, Chorover J (2006) Effects of organic acids and dissolved oxygen on apatite and chalcopyrite dissolution: Implications for using elements as organomarkers and oxymarkers. Chem Geol 234**:** 28–45

Grybos M, Michot LJ, Skiba M, Billard P, Mustin C (2010) Dissolution of anisotropic colloidal mineral particles: evidence for basal surface reactivity of nontronite. J Colloid Interf Sci 343**:** 433–8

Grybos M, Billard P, Desobry-Banon S, Michot LJ, Lenain JF, Mustin C (2011) Bio-dissolution of colloidal-size clay minerals entrapped in microporous silica gels. J Colloid Interf Sci 362: 317–24

Haack EA, Johnston CT, Maurice PA (2008) Mechanisms of siderophore sorption to smectite and siderophore-enhanced release of structural Fe^{3+}. Geochim Cosmochim Acta 72: 3381–3397

Hider RC, Kong X (2010) Chemistry and biology of siderophores. Nat Prod Rep 27: 637–57

Hiebert FK, Bennett PC (1992) Microbial control of silicate weathering in organic-rich ground water. Science 258: 278–81

Jaisi DP, Kukkadapu RK, Eberl DD, Dong HL (2005). Control of Fe(III)site occupancy on the rate and extent of microbial reduction of fe(III) in nontronite. Geochim Cosmochim Acta 69: 5429-5440

Jaisi DP, Dong H, Liu C (2007a) Kinetic analysis of microbial reduction of Fe (III) in nontronite. Environ Sci Technol 41:2437-2444

Jaisi DP, Dong H, Liu C (2007b) Influence of biogenic Fe (II) on the extent of microbial reduction of Fe (III) in clay minerals nontronite, illite, and chlorite. Geochim Cosmochim Acta 71:1145-1158

Jaisi DP, Dong H, Kim J, He ZQ, Morton JP, (2007c) Nontronite particle aggregation induced by microbial Fe(III) reduction and exopolysaccharide production. Clays Clays Miner 55: 96-107

Jaisi DP, Ji SS, Dong H, Blake RE, Eberl DD, Kim J. (2008) Role of microbial Fe(III) reduction and solution chemistry in aggregation and setting of suspended particles in the Mississipi river & delta; plain Louisiana, USA. Clays Clays Miner 56: 416-428

Jones LJ (1998) Organic acids in the rhizosphere – a critical review. Plant Soil 205**:** 25-44

Kalinowski BE, Liermann LJ, Givens S, Brantley SL (2000) Rates of bacteria-promoted solubilization of Fe from minerals: a review of problems and approaches. Chem Geol 169: 357–370

Kraemer SM (1984) Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. Aquat Sci 66: 3-18

Lin TF, Huang HI, Shen FT, Young CC (2006) The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-Al74. Bioresource Technol 97: 957–60

Mailloux BJ, Alexandrova E, Keimowitz AR, Wovkulich K, Freyer G, Herron M, Stolz JF, Kenna TC Pichler T, Polizzotto ML, Dong H, Bishop M,Knappett PSK (2009) Microbial mineral weathering for nutrient acquisition releases arsenic. Appl Environ Microb75: 2558–65

Michot LJ, Bihannic I, Maddi S, Baravian C, Levitz P,Davidson P (2008) Sol/gel and isotropic/nematic transitions in aqueous suspensions of natural nontronite clay. Influence of particle anisotropy. 1. Features of the i/n transition. Langmuir 24: 3127–39

Neilands JB (1981) Microbial iron compounds. Annu Rev Biochem 50:715-732

Payne SM (1994) Detection, Isolation, and Characterization of Siderophores. Method Enzymol 235: 329–344

Perdrial JN, Warr LN, Perdrial N, Lett MC,Elsass F (2009) Interaction between smectite and bacteria: Implications for bentonite as backfill material in the disposal of nuclear waste. Chem Geol 264: 281–294

Rogers JR,Bennett PC (2004) Mineral stimulation of subsurface microorganisms: release of limiting nutrients from silicates. Chem Geol 203: 91–108

Sandy M, Butler A (2009) Microbial iron acquisition: Marine and Terrestrial Siderophores. Chem Rev 109: 4580–4595

Schwyn B, Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore. Anal Biochem 160: 47–56

Shirvani M, Nourbakhsh F (2010) Desferrioxamine-B adsorption to and iron dissolution from palygorskite and sepiolite. Appl Clay Sci 48: 393–397

Silva AMN, Kong X, Parkin MC, Cammack R, Hider RC (2009) Iron (III) citrate speciation in aqueous solution. Dalton T 0: 8616-8625

Sherman M, Vergo N (1988) Optical (diffuse reflectance) and Mossbauer spectroscopic study of nontronite and related Fe-bearing smectites. Am Mineral 73: 1346-1354

Song O, Lee S, Lee Y, Lee S, Kim K, ChoiY (2008) Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA 23 isolated from cultivated soil. Braz J Microbiol 39: 151–156

Stucki J.W. (2006) Properties and behaviour of iron in clay minerals, in: Handbook of Clay Science. p. 4352.

Stucki JW (2011) A review of the effects of iron redox cycles on smectite properties. CR Geosci 343: 199-209

Ullman WL, Kirchman DL, Welch SA,Vandevivere P (1996) Laboratory evidence for microbial mediated silicate mineral dissolution in nature. Chem Geol 132: 11-17

Ullman WL, Welch SA (2002) Organic ligands and feldspar dissolution. In: R. Hellmann, & S. A. Wood (Ed) Water–Rock Interactions, Ore Deposits and Environmental Geochemistry: A tribute to David A Crerar. Special publication n°7. St. Louis: The Geochemical Society. pp. 3–35.

Vandevivere P, Welch SA, Ullman WJ, Kirchman DL (1994) Enhanced dissolution of silicate minerals by bacteria at near neutral pH. Microb Ecol 27: 241–251

Vantelon D, Montarges-Pelletier E, Michot LJ, Briois V, Pelletier M, Thomas F (2003) Iron distribution in the octahedral sheet of dioctahedral smectites. An Fe K-edge X-ray absorption spectroscopy study. Phys Chem Miner 30: 44–53

Welch S.A, Ullman WJ (1993) The effect of organic acids on plagioclase dissolution rates and stoichiometry. Geochim Cosmochim Acta 57: 2725–2736

Welch SA,Ullman WJ (1999) The effect of microbial glucose metabolism on bytownite feldspar dissolution rates between 5 and 35°C. Geochim Cosmochim Acta 63: 3247–3259

Wu L, Jacobson A, Chen H,Hausner M (2007) Characterization of elemental release during microbe–basalt interactions at T=28°C. Geochim Cosmochim Acta 71: 2224–2239

III.2.2. Altération des particules colloïdales de nontronite dans les gels hybrides de silice : Implications concernant la mobilisation du fer par les bactéries (publication n°4 soumise)

Bioweathering of nontronite colloids in hybrid silica gel (HSG): Implications for iron mobilization

D. Oulkadi, C. Balland-Bolou-Bi, P. Billard, M. Grybos, L. Michot, C. Mustin1 and S*. Desobry-Banon

Résumé

Dans cet article, des gels hybride de silice (GSH) contenant des particules minérales de nontronite (NAu-2), sont utilisés comme seule source de Fe en milieu de culture carencé en cet élément. *Rahnella aquatilis* RA1, isolée à partir de la rhizosphère de blé, est choisie pour sa capacité à solubiliser les minéraux en produisant divers acides organiques et des sidérophores. L'objectif principal est l'étude cinétique des métabolites produits par la bactérie *Rahnella aquatilis* RA1 dans ces conditions de carence. Les acides pyruvique, acétique et lactique sont les principaux acides organiques produits avec les acides oxalique et citrique en fin d'incubation. La comparaison des expériences abiotiques et biotiques révèle une plus grande efficacité de *R. aquatilis* RA1 pour la dissolution du fer des particules de NAu-2, suggérant ainsi l'action optimisée des ligands qui solubilisent ou qui mobilisent le fer. Les GSH ont permis de cibler l'étude de l'altération minérale par la diffusion des métabolites sans l'effet de l'adhésion bactérienne en surface du minéral. L'étude des paramètres influents de la diffusion, i.e. taille et hydrophobicité des métabolites, peut être envisagée par variation des caractéristiques de porosité et d'hydrophobicité des GSH.

Mots clés: Altération, nontronite, colloïdes, matériaux hybrides, *Rahnella aquatilis*

Bioweathering of nontronite colloids in hybrid silica gel (HSG): Implications for iron mobilization

Oulkadi[1], D., Balland-Bolou-Bi[2], C., Billard[1], P., Grybos[3] M., Michot[1] L., Mustin[1], C., Desobry-Banon[1], S.*

[1]Université de Lorraine, LIEC, UMR CNRS 7360, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

[2]Department of Geological Sciences, Stockholm University, Frescativägen 8, SE 114 18 Stockholm, Sweden

[3] Université Limoges, FST Laboratoire GRESE, EA 4330

*Corresponding author: sylvie.desobry@univ-lorraine.fr

Tel: +33 (0) 3 83 68 42 83 , Fax : +33 (0) 3 83 68 42 84

Abstract

The iron acquisition strategy of heterotrophic bacteria is mainly explained by the colonization of mineral surfaces, the synthesis of organic acids and siderophores. We propose here to quantify the ligand production and the nontronite (NAu-2) dissolution that bacteria promote in Hybrid Silica Gel (HSG). In HSG, mineral colloidal particles embedded in a porous silica matrix are prevented from bacterial adhesion. *Rahnella aquatilis RA1,* isolated from a wheat rhizosphere was chosen for its ability to dissolve minerals by producing various organic acids and siderophores. Organic acids kinetics showed that pyruvic, acetic and lactic acids were the major organic acids produced by *R. aquatilis RA1* with oxalic and citric acids at the end of incubation. Comparison of abiotic and biotic experiments revealed the higher efficiency of *R. aquatilis RA1* for iron dissolution suggesting the optimized action of ligands that solubilize and others that mobilize iron. HSG permitted to focus on the colloidal mineral weathering by metabolites diffusion without bacterial adhesion effect. By adjusting HSG porosity and hydrophobicity, this should open the way to study the influence of limiting diffusion of siderophores or aliphatic organic acids on mineral weathering.

Keywords Weathering . Nontronite . Colloids . Hybrid material . *Rahnella aquatilis*

Introduction

In aerobic conditions, bacteria adopt various strategies to acquire mineral nutrients, e.g. colonization of mineral surfaces, synthesis of organic acids and siderophores (Hiebert and Bennett 1992; Barker et al. 1997; Bennett et al. 2001; Rogers and Bennett 2004 ; Sandy and Butler 2009; Hider and Kong 2010). Microbial weathering of minerals mainly proceeds via proton-promoted and ligand-promoted dissolution mechanisms (Banfield et al. 1999; Berthelin 1983). Most studies dealing with mineral weathering have been carried out using large size (a few hundred micrometers) natural minerals (Watteau and Berthelin 1994; Bennett et al. 1996; Drever and Stillings 1997; Barker et al. 1998) or smaller size fractions (< 2 μm) obtained by centrifugation (Jaisi et al. 2008; Shirvani and Nourbakhsh 2010). In order to reduce the natural heterogeneity of the studied minerals, other studies used synthetic minerals such as hematite (Hersman et al. 1995) or Fe-silicate hornblende (Buss et al. 2007). Although colloid-size minerals are regarded as highly reactive at the solid/solution interface, very few studies have investigated about them so far. Nontronites are iron-rich clay minerals formed from the weathering of silicate minerals (Barker and Banfield 1996), which can also form in soils through the nucleation and precipitation of the ferrihydroxide phase with dissolved silica and aluminium onto bacterial cell surfaces (Konhauser and Urrutia 1999). Several works have focused on bacterial weathering of nontronite in suspension under anaerobic and aerobic conditions (O'Reilly et al. 2006; Jaisi et al. 2007a; Jaisi et al. 2007b; Jaisi et al. 2008). Recently, hybrid material was developed using a conventional sol-gel procedure with tetraethoxysilane precursors (TEOS) and colloidal nontronite particles in order to study mineral weathering. Four sizes-calibrated colloidal fractions of anisotropic nontronite (NAu-2) embedded into a silica gel were compared for abiotic (Grybos et al. 2010) and biotic (Grybos et al. 2011) dissolution as a function of the basal/edge surface ratio. It was demonstrated that bacteria cells (GFP-tagged derivatives of *Pseudomonas putida* KT2440) were excluded from the hybrid silica gel (HSG) porosity (Grybos et al. 2011).

The aim of this work was to quantify the ligand production and the nontronite (NAu-2) dissolution that bacteria promote in Hybrid Silica Gel (HSG). The none microbial adhesion to mineral surfaces implied that iron dissociation was mainly due to metabolites diffusion inside HSG. In the present paper, we mainly focus on the role of bacterial metabolites on weathering by examining the influence of low molecular weight organic acids (LMWOA) and siderophores. *Rahnella aquatilis RA1,* isolated from a wheat rhizosphere (Balland et al. 2010)

was chosen for its ability to dissolve minerals by producing various organic acids and siderophores (Jafra et al. 2009).

Materials and methods

Mineral colloids

Nontronite (NAu-2) was purchased from the Source Clays Minerals repository at Purdue University. Nontronite is a 2:1 clay mineral containing two tetrahedral sheets per octahedral sheet, and defined by the following structural formula $[Si_{7,55}Al_{0,16}Fe_{0,29}]$ $[Al_{0,34}Fe_{3,54}Mg_{0,05}]$ $O_{20}(OH)_4Na_{0,72}$ (Gates et al. 2002). Purified Nau-2 size fractions were obtained according to procedure previously described by Michot et al. (2008) and briefly summarized hereafter. Clay suspensions were exchanged three times with 1M NaCl, then washed by centrifugation and dialysis against Milli-Q water until a conductivity of less than 5 mS was reached. The suspensions were left for 24hrs in Imhoff cones. After discarding the bottom of the cones, size fractionation was performed by a step-by-step centrifugation from 7,000g to 35,000g. The size fraction of nontronite we used was obtained at a 7,000g gravitational field. Mineralogical purity was checked by X-ray diffraction (XRD, D8 Bruker, Co Ka radiation) and infrared spectrometry (Bruker IFS-55). The morphological properties of NAu-2 particles were determined using Transmission Electron Microscopy on a Philips Microscope. The average size values for the fraction we used were 705 nm in length, 138 nm in width and 1.05 nm in thickness, which proves that the layers were exfoliated in suspension. The total surface area, equal to 662.8 $m^2.g^{-1}$, was calculated from edge and basal surfaces areas according to the detailed procedure provided by Grybos et al. (2010).

Hybrid silica gel (HSG) synthesis

Porous HSG were obtained through a sol-gel procedure described elsewhere (Grybos et al. 2010 ; Grybos et al. 2011) based on the addition of well-dispersed NAu-2 particles in suspension to a weakly acidic solution of hydrolyzed alkoxide precursor (tetraethylorthosilicate, TEOS, Fluka). In text, NAu-2-HSG and NAu-2-free-HSG refer to HSG containing NAu-2 particles and HSG free of NAu-2 particles. To ensure HSG purity, all chemicals used were of extra pure grade. A clear solution of TEOS, Milli-Q H_2O, and HCl (0.1 M) with a volume ratio of 1: 0.2: 0.12 and a hydrolysis ratio of 2.5 was prepared by

sonication (Ultrasonic cleaner, Branson 2410 DTH) at room temperature. At that point, the silica sol pH was around 2.0. To avoid particle dissolution, the sol pH was then increased to about 4.0 using NaOH (0.1M) before adding the NAu-2 colloidal suspension. After homogenizing NAu-2 particles in the silica sol, the pH was further increased to 5.0 using NaOH (0.1M) to speed up self-condensation and sol-gel transition. In order to form gel pieces for the experiments, hybrid silica sol (250 μL) was distributed into 96-well microplates (Eppendorf Deepwell) and left at room temperature for gelation, which occurred within minutes. Hybrid silica gels were then sterilized twice by autoclaving in Milli-Q water for 30 min at 110°C, and stored in Milli-Q water at room temperature until use. NAu-2 density in HSG pieces was adjusted for colloid concentrations to vary within the 0 to 1.0 g L^{-1} range in the weathering media, with controlled particle-particle interactions. In this work, the NAu-2 contents in the silica gel matrix were 0, 0.1, 0.2, 0.4 and 0.5 mg NAu-2 per HSG piece.

Inoculum preparation

Rahnella aquatilis RA1 strain was isolated from a wheat rhizosphere (Balland et al. 2010). Culture cells were prepared by growing bacteria overnight in Luria-Bertani broth at 28°C and 150 rpm in an orbital incubator (Stuart Scientific, SI50). After incubation, the bacteria were collected by centrifugation (Multifuge 1 S-R, Heraeus) at 4,500 g for 10 min at 10°C. The pellets were washed three times and resuspended in sterile BHm medium, at a concentration of around 4.0 x 10^7 bacteria per mL as estimated by optical density at 600nm.

Experimental set-up

Nontronite weathering experiments were performed in abiotic (HNO_3, organic acids, DFOM) and biotic (in the presence of *R. aquatilis RA1*) conditions. The experimental device consisted of four pieces of 250 μL of HSG immersed in 2 mL of weathering medium in 14 mL tubes (Falcon™). NAu-2 densities in HSG varying from 0.1 to 0.5 mg per HSG piece made it possible to adjust NAu-2 concentrations in weathering medium within the 0.2 to 1.0 g L^{-1} range. Except for experiments devoted to the influence of NAu-2 density on biotic iron weathering, the NAu-2 concentration level in BHm was adjusted at 1.0 g L^{-1}. Falcon™ tubes were incubated at 28°C under aerobic conditions at 150 rpm in an orbital shaker (Stuart Scientific, SI50).

Weathering medium

The synthetic medium used for weathering experiments was an Fe-Mg-deficient medium derived from Bushnell-Hass medium (BHm) (Balland et al. 2010). That way, colloidal nontronite entrapped in HSG was the sole iron source available to sustain bacterial growth. BHm medium was prepared with analytical reagents and double deionized water (Milli-Q) and contained, per liter: 22.5 mg $Na_2HPO_4.2H_2O$, 20mg $NaH_2PO_4.2H_2O$, 20 mg KCl, 100 mg KNO_3, 65 mg $(NH_4)_2SO_4$, 20 mg $CaCl_2.2H_2O$. Prior to experiments, BHm was autoclaved for 30 min at 110°C and supplemented with sterile filtered (0.22 μm membrane) glucose solution to a final concentration of 3.3 g L^{-1}.

Biotic experiments

For the time-course study, 15 replicates of the original *R. aquatilis RA1* inoculum were performed, and one triplicate was used for analysis after 0, 1, 3, 6 and 9 days, respectively. Changes in proton, iron release, glucose consumption and metabolite excretion were determined as detailed below.

The influence of NAu-2 density inside HSG was assessed with two distinct R. aquatilis RA1 inocula. Each inoculum was used to prepare the 5 different NAu-2 densities in triplicate (0, 0.1, 0.2, 0.4 and 0.5 mg NAu-2 per HSG piece). Total released iron was measured after a 6-day incubation period.

Abiotic experiments

Abiotic weathering experiments were performed according to a two-way procedure in order to distinguish ligand-promoted dissolution from proton-promoted dissolution. In proton-promoted dissolution experiments, BHm was adjusted to various pH values ranging from 1.5 to 5.0 pH range using HNO_3 (1M). After 6 days incubation, total iron was measured. Ligand-promoted dissolution experiments were performed in BHm supplemented with 10^{-5} to 10^{-2}M acetic, pyruvic, oxalic, citric and gluconic acids (Sigma-Aldrich) as relevant organic acids, and the mesylate salt of the hydroxamate siderophore desferrioxamine B (DFOM, Sigma). The pH value of the organic compound solutions was adjusted to pH 4.00 ± 0.02 using HNO3 (1M). After 6 days incubation, total iron was measured.

Analysis of nontronite weathering solutions

Solutions from bioweathering experiments were filtered through 0.22 μm pore size filter plates (Multiscreen, Millipore). pH, glucose and iron content analyses were performed in

triplicate in clear-bottom 96-well microplates using an FLX Xenius spectrofluorometer (SAFAS, Monaco). For organic acid analyses, pooled triplicates were frozen at -20°C.

pH measurements

pH values were determined using Bromocresol green (BCG, Sigma-aldrich) as a pH indicator and reading the solution absorbance at λ = 440 nm (maximal absorbance of the acidic yellow form) and λ = 618 nm (maximal absorbance of the alkaline blue form), (Balland et al. 2010; Grybos et al. 2010 ; Grybos et al. 2011; Uroz et al. 2011). pH measurements were performed directly in microplates by adding 10 µl of BCG (1 g L^{-1}) to 200 µl of filtrate.

Glucose concentration assay

Glucose consumption was monitored using the GOD-PAP diagnostic kit method (Biolabo), and determined by measuring at 505 nm the glucose remaining in 3 µl filtrate aliquots after adding 300 µl of GOD-PAP solution (BioLabo).

Metabolite production

The identification and quantification of organic acids produced by bacteria was carried out on filtered pooled triplicates with an Ion Chromatograph (ICS 3000, Dionex corp.) equipped with an on-line hydroxide eluent generator, an ion suppressor and a conductivity detector. The separation of anionic metabolites was performed using an Ion Pac® column (AS 11 HC, Dionex corp.) with a KOH gradient of 0.9–60 mM over 50 min at a flow rate of 1.3 mL per min. Standard solutions (0.1mM) (prepared with sodium salts purchased from Sigma Aldrich or Fluka) containing formate, citrate, oxalate, propionate, acetate, succinate, D,L-malate, L-lactate and malonate, were mixed to calibrate retention time and estimate detection limits. Apart from succinate and malate (co-elution), all organic anions were completely resolved under these gradient conditions. Quantification measurement uncertainty was close to 0.5% for all organic acids and the detection limit was close to 0.1 ppm.

Siderophore production

Siderophore production was evidenced by Chromazurol-S Assay (Schwyn and Neilands 1987). Siderophore detection was achieved on agar plates overlaid with 10 mL or 30 mL of CAS medium (Pérez-Miranda et al. 2007). The occurrence of orange haloes surrounding the colonies against the blue background after 72 hours incubation at 28°C indicated siderophore excretion.

The quantification of siderophores produced during incubation was performed on culture aliquots according to the CAS liquid assay (Schwyn and Neiland 1987). Siderophore concentration was calibrated by generating a standard curve at 630 nm for standards containing 1-150 μM (DFOM) (Payne 1994).

Monitoring iron release

As iron can precipitate within the silica gel matrix or adsorb onto the clay particles, the dissolution rate of nontronite in HSG was monitored through a two-step analysis.

Iron species in solution were determined directly by spectrophotometric measurements at 565 nm by adding 20 μl of Ferrospectral® dye indicator (Merck 1.14761) to 200 μl of solution. The method made it possible to determine the total iron ions (Fe^{+2} and Fe^{+3}) released in the filtrate via the addition of Ferrospectral® buffered by ammonium thioglycolate. This mineralizes weak iron complexes, and reduces iron (III). The purple color iron complex harbors a high molar absorptivity value (ε=27500 $mol^{-1}.cm^{-1}$) that permits a sensitive detection of low iron concentrations in small volumes. The quantification limit was estimated to be close to 0.35 μM of iron.

Iron species entrapped into HSG were dissolved or desorbed by adding 2 ml of a buffered solution (pH 5.0 with sodium acetate) made of 0.2% hydroxylamine hydrochloride ($NH_2OH.HCl$) and 1 M KCl to four pieces of 250 μl of HSG. In contrast to the common hydroxylamine extraction method (Chao and Zhou 1983) performed at pH 2.0 in the presence of chlorhydric acid, pH was adjusted to 5.0 in our experiments using sodium acetate in order to reduce nontronite dissolution. After a 1 hour incubation at 28°C, iron released from HSG was quantified by Ferrospectral® as described above.

Results and discussion

Biotic experiments

Evolution of pH and glucose consumption over time

In both biotic conditions (with NAu-2-HSG or NAu-2-free-HSG), glucose concentrations decreased continuously as a function of time from 3.3 ± 0.1 to 2.0 ± 0.1 g L^{-1} after 9 days (Table 1). The evolution of pH over time was similar whatever the HSG used. A slight initial pH shift from 5.0 to 5.5 could be noticed with the presence of negatively charged nontronite particles in HSG. Acidification by *R. aquatilis* down to pH 3.8 after 3 days (table 1) confirmed that partial oxidation of glucose can lower pH. The acidifying activity of *R. aquatilis RA1* is related to CO_2 release during respiration and organic acid production (Welch and Ullman 1993; Balland et al. 2010).

Metabolite production

As shown in Table 1, *R. aquatilis RA1* produced many organic acids in the 10- to 2,000-µM range. At first sight, pyruvic and acetic acids are the main metabolites produced whatever the kind of HSG used (supplemented with nontronite or not). Probably as a result of recycling organic matter and nutrients (Gottschalk 1986), most of organic acids increased later during incubation. In NAu-2-free-HSG. lactic acid was the third major organic acid produced. Di- or tridentate acids such as oxalic and citric acids appeared to develop after 3 days incubation. Their concentrations were higher in nontronite-free experiments than in nontronite-enriched experiments suggesting that stressed bacteria tried to overcome nutrient scarcity by synthesizing and excreting efficient iron-ligands.

In our experiments with pure cultures of *R. aquatilis* RA1, the nature and the concentration of organic acids produced reflect what can be found in soil compartments (e.g. the rhizosphere of podzolic soils) as shown elsewhere (Balland-Bolou-Bi and Poszwa 2012: Jones 1998). These authors measured micromolar concentrations of oxalic, acetic and formic acids, ranging from 0.1 to 1,000 µM, as well as traces of other acids such as malic, citric and succinic acids. Kalinowski et al. (2000) proposed that pore water might contain 1,000 µM oxalic acid, 174 µM acetic acid and 240 µM siderophores.

Growth of *R. aquatilis* in the Fe(III)-depleted MM9 medium was accompanied by excretion of siderophores evidenced by the overlaid CAS assay. After one night in the dark at room

temperature, distinct orange haloes were observed in the overlaid medium surrounding RA1 colonies (Fig. 1).



Fig.1 O-CAS test highlighting siderophore production by *R. aquatilis RA1*. « Control » (left) shows an absence of reaction compared to a positive reaction for *R. aquatilis RA1* (right).

The color transition from blue to orange characterizes microorganisms that produce siderophores with hydroxamate functional groups. In contrast, purple or pink, which indicates the secretion of catechol-type siderophores, was not observed (Milagres et al. 1999; Schwyn et Neilands 1987). The production of siderophores by *R. aquatilis RA1* was quantified in liquid MM9 medium after two days incubation. Without NAu-2 enrichment, 14-µM-equivalent DFOM were produced, while only 2-µM-equivalent DFOM were produced in the presence of HSG-NAu-2. From our time-course study comparison, siderophores can be produced earlier (<2 days) by *R. aquatilis* whereas bi- and tri-dentate organic acids, e.g. oxalic and citric acids, are produced after 3 days incubation (table 1).

Table 1. General characteristics of solutions collected during biotic experiments with *R. aquatilis RA1*, including pH, remaining glucose and major organic acids released by bacteria. Experiments were performed in BHm with NAu-2-HSG (1 $g.L^{-1}$) or NAu-2-free-HSG, at 28°C in triplicates.

Mineral	Bacteria	Times (day)	pH	Std pH	Glucose g/l	Std glucose	Pyruvic acid #	Acetic acid #	Lactic acid #	Oxalic acid #	Citric acid #	Propionic acid #	Succinic acid #
NAu-2	*Rahnella aquatilis RA1*	0	5.49	0.58	3.29	0.01	-	-	-	-	-	-	-
		1	3.76	0.36	2.61	0.02	840	583	15	20	5	-	30
		3	4.06	0.03	2.46	0.02	670	1099	84	18	-	26	-
		6	3.91	0.15	2.17	0.05	22	1799	-	41	7	27	60
		9	3.84	0.10	2.04	0.01	5	583	33	48	57	26	49
-	*Rahnella aquatilis RA1*	0	4.98	0.58	3.35	0.02	-	-	-	-	-	-	-
		1	3.76	0.28	2.87	0.01	1067	283	70	9	1	n.m.	10
		3	4.06	0.28	2.55	0.01	3	57	12	23	10	n.m.	3
		6	3.51	0.08	2.07	0.04	55	500	153	36	39	n.m.	13
		9	3.75	0.19	2.02	0.02	-	533	322	66	94	n.m.	18

n.m.: not measured, - : below detection limit, # : µmol l-1. The standard deviation was calculated from analyses of triplicate.

Iron release

During incubation, the total amount of iron dissolved from NAu-2 particles increased almost linearly with time when incubating gels with *R. aquatilis RA1* (Fig. 2). After 9 days incubation, 6.0 ± 0.9 mg of Fe per gram of nontronite had leached, which accounts for 2.4% of the total iron in NAu-2 particles. The iron dissolution rate in HSG was 3.75 x 10^{-13} mol m^{-2} s^{-1} for *R. aquatilis* RA1. This result is similar to iron dissolution rates obtained with *R. aquatilis* RA1 for phlogopite and biotite powders, i.e. 5 x 10^{-13} mol m^{-2} s^{-1} and 10^{-12} mol m^{-2} s^{-1}, respectively (Balland et al. 2010). Changes in mineralogy and particle size, e.g. from colloids in HSG to mineral powders, have few implications on the overall iron dissolution rate observed for *R. aquatilis RA1*. Then none bacteria-mineral contact in HSG did not affect iron dissolution rate. As a consequence, the dissolution rate may depend on textural properties of HSG controlling molecular diffusion.

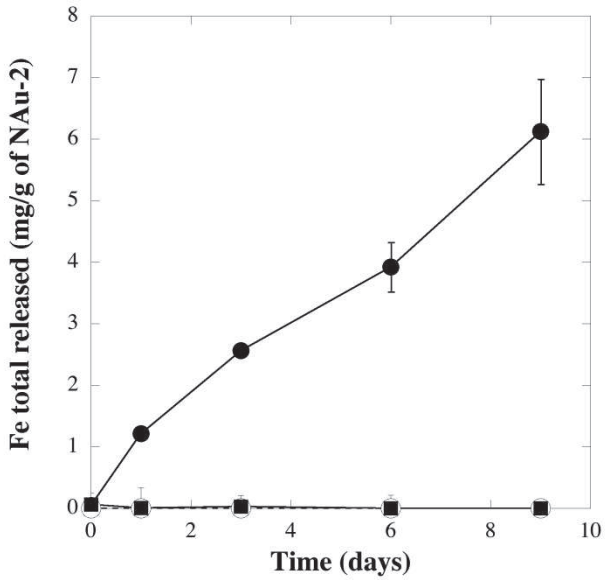


Fig. 2 Total iron release, in mg per gram of NAu-2, vs. time in BHm medium at 28°C and 150 rpm. Control treatment (■) and biotic treatments containing NAu-2-HSG (1 $g.L^{-1}$) (●) and NAu-2-free-HSG (○) (mean values ± SD, n = 3).

Effect of nontronite enrichment

To determine whether NAu-2 enrichment of HSG influences iron release, two independent experiments were performed with *R. aquatilis RA1* over 6 days. Total released iron increased with NAu-2 content in HSG up to 0.8 g. L^{-1}, and then a plateau was reached (Fig. 3A). Out of total iron, the percentage of immobilized iron increased from 55 to 95% with nontronite

density varying from 0.2 to 0.8 g. L^{-1}, and then stabilized (Fig. 3B). After 6 days incubation, bacteria produced organic compounds and acidified the medium, which resulted in higher NAu-2 bioweathering as nontronite density increased.

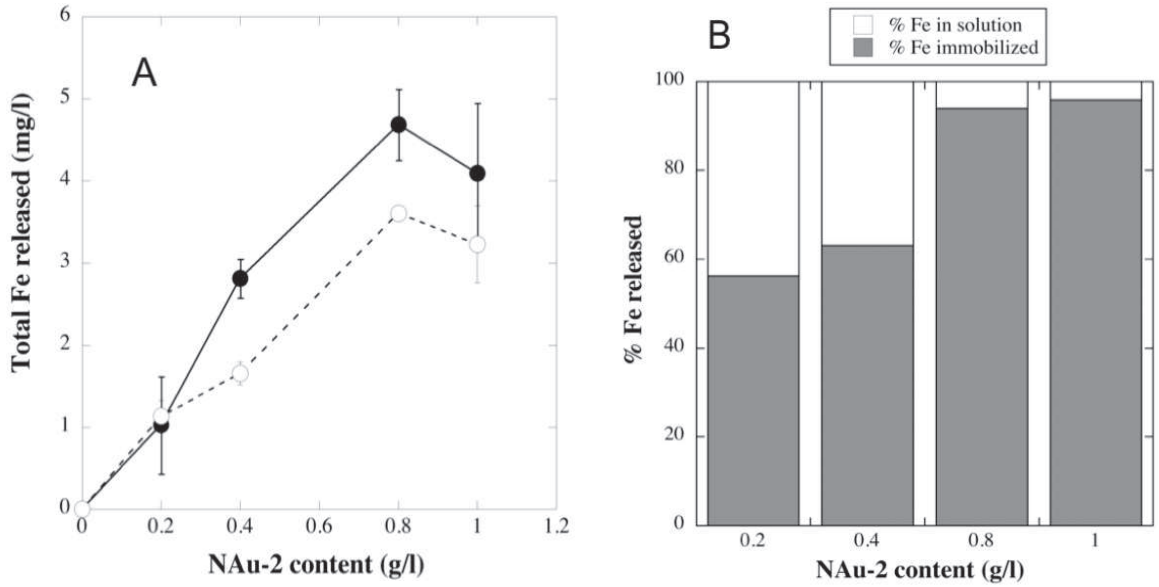


Fig. 3 Iron dissociation by *R. aquatilis RA1* from various density of NAu-2 in HSG. Bioweathering was evaluated after 6 days at 28°C and 150 rpm (mean values ± SD, n = 3). (A) Total iron released by two inocula of *R. aquatilis RA1* (●,○); (B) The results are expressed in percent of iron released in solution and immobilized iron.

Based on all the amounts of dissociated iron, we supposed that bacterial uptake was less than the amount of iron available in solution that can precipitate and/or adsorb onto NAu-2 surfaces (O'Reilly et al. 2006) in HSG. The pH value and the low ionic strength of the BHm medium are supposed to favor sorption phenomena onto NAu-2 surfaces (Jaisi et al. 2008) in HSG during a 6-day incubation. This increased iron immobilization can be attributed to adsorbed Fe(III), oxi-hydroxides and adsorbed Fe-ligands. Oxi-hydroxides and adsorbed Fe(III) can easily be solubilized or desorbed by a hydroxylamine-KCl mixture and then quantified using the Ferrospectral® dye indicator (Balland et al. 2010). These results suggest that a great amount of the Fe(III) species sequestered in HSG was KCl-exchangeable or hydroxylamine-reducible. However, less is known about the nature of the interaction between hydroxylamine and adsorbed iron complexes, i.e. Fe-oxalate, Fe-citrate, Fe-siderophores. We

therefore propose that the efficiency of Fe extraction using hydroxylamine depends on the Fe(III)-binding constant of each ligand.

Abiotic experiments

Proton-promoted nontronite dissolution

In order to assess the proton-promoted dissolution of nontronite, NAu-2-HSG were incubated for 6 days in nitric acid solutions (Fig. 4A). As expected from the geochemical behavior of iron in solution, the lower the pH, the higher the amount of released iron. The proton-promoted nontronite dissolution rate constant for NAu-2 was 1.1 x 10^{-12} mol Fe m^{-2} $s^{-1,}$ in accordance with previous results obtained for four size-fractions of NAu-2 particles in HSG (Grybos et al. (2010). This is comparable to values obtained for goethite and hematite, i.e. around 0.5 x 10^{-12} mol Fe m^{-2} s^{-1} (Brantley et al. 2006). Balland et al. (2010) found higher values for phlogopite and biotite, i.e. 3.4 x 10^{-9} and 3.6 x 10^{-8} mol Fe m^{-2} s^{-1}, respectively. Furthermore, the percentage of immobilized iron (Fig. 4B) during nontronite leaching increased with pH.

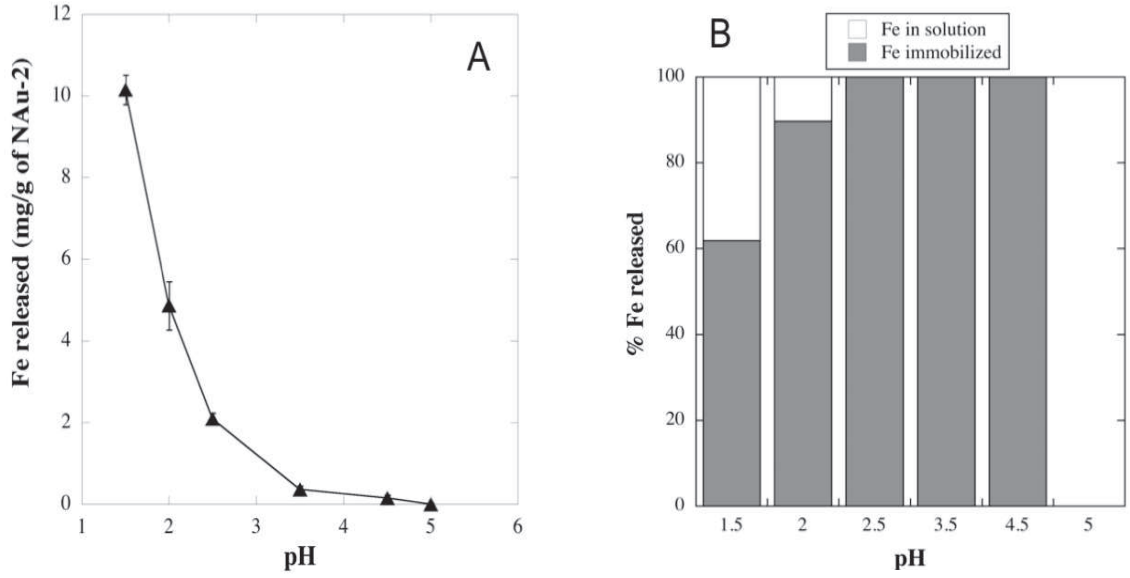


Fig. 4 Abiotic iron dissociation from NAu-2-HSG (1g.L^{-1}) in BHm medium adjusted to distinct pH values by nitric acid (1M). Proton-promoted dissociation was measured after 6 days at 28°C and 150 rpm (mean values ± SD, n = 3). (A) Total iron released, in mg per gram of NAu-2. (B) The results are expressed in percent of iron released in solution and immobilized iron.

Ligand-promoted nontronite dissolution

Ligand-promoted nontronite dissolution was assessed using the ubiquitous and major organic acids identified during biotic experiments as well as DFOM, a hydroxamate-type siderophore. All organic acids except gluconic acid led to iron dissolution from nontronite (Fig. 5). In agreement with Robert and Berthelin (1986), efficiency increased along with organic acid concentrations, while iron leaching ranked in the order oxalic acid > citric acid> pyruvic acid> acetic acid. Such a sequence agrees with the higher efficiency of di- and tri-dentate acids compared to monodentate ones for iron dissolution (Brantley et al. 2006). The behavior of DFOM was different from that of organic acids, as this compound was the most efficient one at submillimolar concentrations. Brantley et al. (2006) proposed that multi-dentate siderophore molecules saturate the mineral surface at lower concentrations than carboxylic acids. In our case, at neutral or weakly acidic pH values, cationic DFOM (pKa 8.5) was attracted by the negatively charged nontronite surface (isoelectric point < pH2.0). Furthermore, both trihydroxamate and iron complexes remain relatively hydrophilic. Then, siderophores might interact with clay surfaces while other ligands do not. Hydrophobic or uncharged iron complexes rapidly diffuse inside HSG and are not immobilized. This can have implications on the measurable amounts of iron extracted from the HSG matrix in our experiments. Moreover, because the silicate weathering mechanisms involved are surface-controlled, the increase of dissolution rates from nontronite promoted by trihydroxamate siderophores is limited due to mineral surface saturation. From data obtained with 10 mM ligand concentration (data not shown), we determined that the iron leached from nontronite into HSG was totally soluble in the case of DFOM and partially immobilized at 10% and 68% for citric and oxalic acids, respectively. This is consistent with the affinity for Fe (III), which ranks in the order DFOM (binding constant of $10^{+30.6}$) > citric acid (binding constant of $10^{+24.8}$) > oxalic acid (binding constant of $10^{+7.6}$) (Neilands, 1981; Ams et al. 2002; Silva et al. 2009). This can involve that hydroxylamine chloride at pH5.0 did not fully extract iron complexes that had been strongly adsorbed onto clay surfaces. The amount of iron released from NAu-2 into HSG along with increasing DFOM concentrations might then be underestimated (Fig. 5).

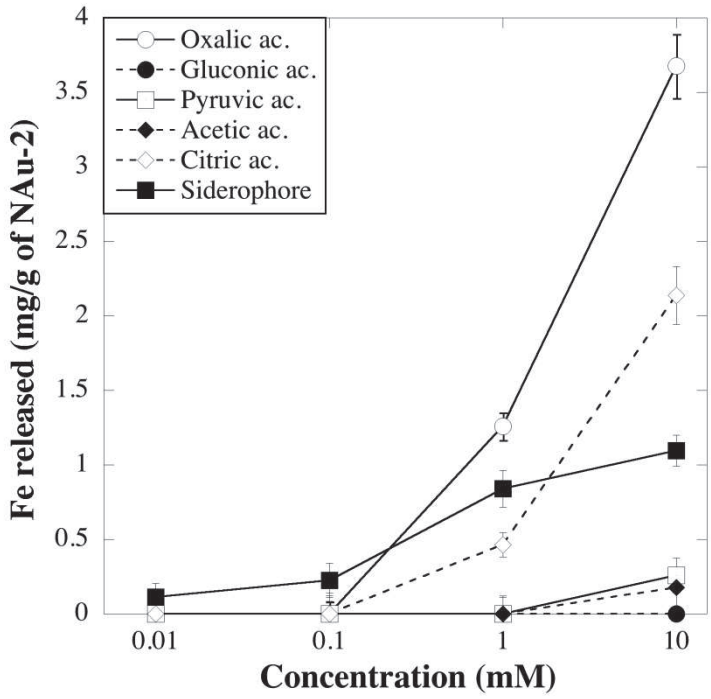


Fig. 5 Iron release, in mg per gram of NAu-2 in HSG (1 $g.L^{-1}$), vs. concentrations of organic acids in BHm after 6 days at 28°C at pH 4.0 (mean values ± SD, n = 3).

Biotic vs. abiotic weathering

In order to evaluate the role of bacterial metabolites on weathering, the biotic and abiotic results presented above were compared in figure 6. The pH-dependence of iron released from nontronite was plotted for *R. aquatilis RA1*, HNO_3, LMWOA (10mM) and DFOM (10 mM). The data (Fig. 6) relative to pyruvic and acetic acids are located close to the proton-promoted dissolution line, which indicates no additional iron dissolution effects for these monodentate acids. In contrast, oxalic acid, citric acid and siderophores (DFOM) are located above the line. These organic compounds clearly display ligand-promoted dissolution in addition to proton-promoted dissolution. Such a behavior is explained by mineral-ligand complex formation at mineral surfaces (Boyle et al. 1974; Robert and Berthelin 1986; Drever and Stillings 1997; Brantley et al. 2006). The high levels of iron dissolution obtained for *R. aquatilis RA1* (Fig. 6) indicated that these metabolites, i.e. siderophore, oxalate and citrate, play a major role. Under aerated conditions at pH5.0, inorganic iron is extremely insoluble and its concentration is less than optimal for microbial growth. To overcome this limitation, *R. aquatilis RA1* is expected to produce early siderophores that have a high coordination affinity with ferric ions (with a binding constant ranging between 10^{23} and 10^{52}) (Ams et al. 2002; Sandy and Butler 2009).

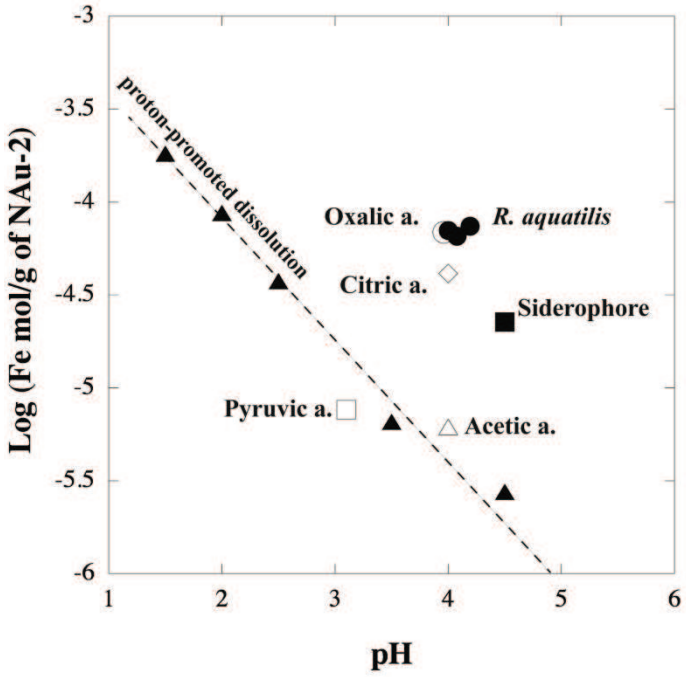


Fig. 6 Iron released from NAu-2 in HSG (1 $g.L^{-1}$) as a function of pH for biotic and abiotic experiments (10 mM) after 6d.

In addition, synergistic mechanisms with LMWOA could occur at the mineral surface, as demonstrated in experiments dealing with Fe (III) and oxalate and DFOM (Cheah et al. 2003; Reichard et al. 2007). However, these authors demonstrated that adsorption of the trihydroxamate siderophore could also be strongly affected by the presence of oxalate.

High iron dissolution by *R. aquatilis RA1* could also be related to the existence of "highly reactive zones" in the bacterial microenvironment where favorable physicochemical conditions (pH and metabolite flows) are expected to induce higher mineral dissolution (Vandevivere et al. 1994). Attraction of cations or cationic ligands by the negatively charged surface of HSG-Nau2 could also create microenvironments enriched in ligands, which favor the dissolution of nontronite within the silica gel matrix.

Conclusion

In the present paper, we quantified the colloidal nontronite dissolution induced by diffusion of bacterial metabolites through HSG. In conditions when no bacteria adhesion to mineral occurred, iron release rates lie in the same range as the values obtained in literature dealing with mineral powders. By comparison of abiotic and biotic HSG experiments, siderophore, oxalic and citric acids were proved to be the major ligands inducing iron dissolution for

R. aquatilis RA1. Actually, iron release from minerals in HSG was principally due to ligand promoted mechanisms. The steady texture of HSG permits to maintain mineral particles well-dispersed inside a transparent porous silica matrix. Further investigations will focus on an *in situ* analysis of mineral surfaces at a nano-scale and a molecular level by spectroscopic and microscopic analyses. Micro-Raman investigations should permit to get details about ligands and mineral interactions during bioweathering. HSG should also open the way to study iron uptake by microorganisms as a function of porosity and hydrophobicity of the silica matrix in order to limit siderophores or aliphatic organic acids diffusion to mineral particles.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (Programme HÆSPRI ANR-09-BLAN-0336), Region Lorraine and Université de Lorraine. All of these are gratefully acknowledged. We thank Géraldine Kitzinger for her assistance during organic acid analysis.

References

Ams DA, Maurice PA, Hersman LE, Forsythe JH. 2002. Siderophore production by an aerobic Pseudomonas mendocina bacterium in the presence of kaolinite. Chem Geol 188:161–170.

Balland C, Poszwa A, Leyval C, Mustin C. 2010. Dissolution rates of phyllosilicates as a function of bacterial metabolic diversity. Geochim Cosmochim Acta 74:5478–5493.

Balland-Bolou-Bi C and Poszwa A. 2012. Effect of calco-magnesian amendment on the mineral weathering abilities of bacterial communities in acidic and silicate-rich soils. Soil Biol Biochem 50:108-117.

Banfield JF, Barker WW, Welch SA, Taunton A. 1999. Biological impact on mineral dissolution: application of the lichen model to understanding mineral weathering in the rhizosphere. PNAS 96:3404-3411.

Barker W, Benfield J. 1996. Biologically versus inorganically mediated weathering reactions: relationships between minerals and extracellular microbial polymers in lithobiontic communities. Chem Geol 132:55-69.

Barker WW, Welch SA, Banfield JF. 1997. Geomicrobiology of silicate mineral weathering. In: Banfield and Nealson KH. eds. Geomicrobiology, Interaction between Microbes and Minerals. Review in Mineralogy 35, the Mineralogical Society of America, Washington. P 391-428.

Barker W, Welch S, Chu S, and Banfield J. 1998. Experimental observations of the effects of bacteria on aluminosilicate weathering. American mineralogist 83:1551-1563.

Bennett PC, Hiebert FK, and Joo Choi W. 1996. Microbial colonization and weathering of silicate in a petroleum contaminated ground water. Chem Geol 132:45-53.

Bennett PC, Rogers JR, Choi WJ. 2001. Silicates, silicate weathering, and Microbial Ecol. Geomicrobiol J 18:3-19.

Berthelin J. 1983. Microbial weathering process. Microbial geochemistry, Blackwell, London, 223-262.

Boyle JR, Voigt GK, Sawhney BL. 1974. Chemical weathering of biotite by organic acids. Soil Sci 117:42-45.

Brantley SL, Ruebush S, Jang JH, Tien M. 2006. Analysis of. bio.geochemical kinetics of Fe. III. oxides. In: Maurice PA and Warren LA. eds. Methods of investigating microbe-mineral interactions, The clay Mineral Society, Chantilly, 14. P 79-116.

Buss HL, Luttge A, Brantley SL. 2007. Etch pit formation on iron silicate surfaces during siderophore-promoted dissolution. Chem Geol 240:326-342.

Chao T and Zhou L. 1983. Extraction techniques for selective dissolution of amorphous iron oxides from soils and sediments. Soil Sci Soc Am J 47:225-232.

Cheah SF, Kraemer SM, Cervini-Silva J, Sposito G. 2003. Steady-state dissolution of goethite in the presence of desferrioxamine B and oxalate ligands: implications for the microbial acquisition of iron. Chem Geol 198:63-75.

Drever J, and Stillings LL. 1997. The role of organic acids in mineral weathering. Colloid Surface A 120:167-181.

Gates WP, Slade PG, Manceau A, Lanson B. 2002. Site occupancies by iron in nontronites. Clay Clay Miner 50:223-229.

Grybos M, Michot LJ, Skiba M, Billard P, Mustin, C. 2010. Dissolution of anisotropic colloidal mineral particles: Evidence for basal surface reactivity of nontronite. J Colloid Interf Sci, 343:433-438.

Grybos M, Billard P, Desobry-Banon S, Michot LJ, Lenain JF, Mustin C. 2011. Bio-dissolution of colloidal size clay minerals entrapped in microporous silica gels. J Colloid Interf Sci 362:317-324.

Gottschalk G. 1986. Bacterial metabolism. Springer-Verlag, New York.

Hersman L, Lloyd T, Sposito G. 1995. Siderophore-promoted dissolution of hematite. Geochim Cosmochim Acta 59:3327-3330.

Hider RC, Kong X. 2010. Chemistry and biology of siderophores. Nat Prod Rep 27: 637-657.

Hiebert FK, Bennett PC. 1992. Microbial control of silicate weathering in organic-rich ground water. Science 258:278-281.

Jafra S, Przysowa J, Gwizdek-Wisniewska A, Van Der Wolf JM. 2009. Potential of bulb-associated bacteria for biocontrol of hyacinth soft rot caused by Dickeya zeae. J Appl Microbiol 106:268-277.

Jaisi DP, Dong H, Liu C. 2007a. Kinetic analysis of microbial reduction of Fe. III. in nontronite. Environ Sci Technol 41:2437-2444.

Jaisi DP, Dong H, Liu C. 2007b. Influence of biogenic Fe. II. on the extent of microbial reduction of Fe. III. in clay minerals nontronite, illite, and chlorite. Geochim Cosmochim Acta 71:1145-1158.

Jaisi DP, Liu C, Dong H, Blake RE, Fein JB. 2008. Fe^{+2} sorption onto nontronite. NAu-2. Geochim Cosmochim Acta 72:5361-5371.

Jones LJ. 1998. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. Plant Soil 205:25-44.

Kalinowski BE, Liermann LJ, Givens S, Brantley SL. 2000. Rates of bacteria-promoted solubilization of Fe from minerals: a review of problems and approaches. Chem Geol 169:357-370.

Konhauser KO, Urrutia MM. 1999. Bacterial clay authigenesis: a common biogeochemical process. Chem Geol 161:399-413.

Michot LJ, Bihannic I, Maddi S, Baravian C, Davidson P, Levits P. 2008. Sol/gel and Isotropic/Nematic transition in aqueous suspensions of natural nontronite clay. Influence of particle anisotropy. 1. Features of the I/N transition. Langmuir 24:3127-3139.

Milagres AM, Machuca A, Napoleao D. 1999. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of Chrome Azurol S. CAS. agar plate assay. J Microbiol Meth 37:1- 6.

Neilands JB. 1981. Microbial iron compounds. Annu Rev Biochem, 50,715-732.

O'Reilly SO, Furukawa Y, Newell S. 2006. Dissolution and microbial Fe. III. reduction of nontronite. NAu-2.. Chem Geol 235:1-11.

Payne, SM. 1994. Detection, isolation and characterization of siderophores. Meth Enzymol 235:329-344.

Pérez-Miranda S, Cabirol N, George-Téllez R, Zamudio-Rivera LS, Fernadez FJ. 2007. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. J Microbiol Meth 70:127-131.

Reichard PU, Kretzschmar R, Kraemer SM. 2007. Dissolution mechanisms of goethite in the presence of sidérophores and organic acids. Geochim Cosmochim Acta 71:5635-5650.

Robert M, Berthelin J. 1986. Role of biological and biochemical factors in soil mineral weathering. Soil Sci Soc Am 12:453-495.

Rogers JR, Bennett PC. 2004. Mineral stimulation of subsurface microorganisms: release of limiting nutrients from silicates. Chem Geol 203:91-108.

Sandy M, Butler A. 2009. Microbial iron acquisition: marine and terrestrial siderophores. Chem Rev 109:4580-4595.

Schwyn B, Neilands JB. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal Biochem 160:47-57.

Shirvani M, Nourbakhsh F. 2010. Desferroxiamine-B adsorption to and iron dissolution from palygorskite and sepiolite. Appl Clay Sci 48:393-397.

Silva AMN, Kong X, Parkin MC, Cammack R, Hider RC. 2009. Iron. III. citrate speciation in aqueous solution. Dalton T 86:16-8625.

Vandevivere P, Welch SA, Ullman WJ, Kirchman DL. 1994. Enhanced dissolution of silicate minerals by bacteria at near-neutral pH. Microbial Ecol 27:241–251.

Watteau F, Berthelin J. 1994. Microbial dissolution of iron and aluminium from soil minerals: efficiency and specificity of hydroxamate siderophores compared to aliphatic acids. Eur J Soil Biol 30:1-9.

Welch SA, Ullman WJ. 1993. The effect of organic acids on plagioclase dissolution rates and stoichiometry. Geochim Cosmochim Acta 57: 2725-2736.

III.2.3. Rôle des sidérophores de *Rahnella aquatilis* RA1 dans l'altération minérale

Les acides organiques produits par *R. aquatilis* RA1 jouent un rôle important dans l'altération de la nontronite, la place des sidérophores dans le processus de dissolution et les liens avec le métabolisme du fer chez ce microorganisme sont encore mal compris. Nous avons choisi d'aborder cette question par une approche génétique afin d'évaluer les compétences pour l'altération de la nontronite par des mutants de RA1 déficients dans la production de sidérophores. Une banque d'un millier de mutants de RA1 obtenus par transposition aléatoire de Tn5-gfp (Eberl et al., 1997) a été criblée à l'aide du test Chromazurol S. Ce criblage qualitatif a permis d'isoler cinq clones de *Rahnella aquatilis* RA1 présentant un défaut partiel ou total de synthèse de sidérophores RA1-C7, RA1-A6, RA1-B8, RA1-B12 et RA1-F9.

III.2.3.1. Analyse génétique

L'analyse génétique a pu être réalisée pour quatre mutants : RA1-B8, RA1-B12, RA1-F9 et RA1-C7. Les sites d'intégration du transposon Tn5-gfp dans le génome de RA1 sont caractérisés dans la figure III.9. Dans tous les cas, les séquences bordant le site d'intégration présentaient de fortes similarités de séquences avec des gènes de *Rahnella* sp. Y9602, *Rahnella aquatilis* HX2 et de *Rahnella aquatilis* CIP 78.65, dont les génomes ont été séquencés récemment (tableau III.3) (Martinez et al., 2012 a, 2012 b ; Guo et al., 2012).
Pour le clone RA1-F9, le transposon s'est inseré dans un gène codant une décarboxylase dépendante du pyridoxal phosphate, connue pour catalyser une des premières étapes de synthèse de sidérophores de type catécholate et hydroxamate chez diverses bactéries (Figure III.8). Cela devrait se traduire par une déficience en synthèse de sidérophore.

Il s'avère que pour le clone RA1-C7, la transposition de Tn5-gfp a eu lieu dans la région promotrice du même gène, et non pas dans la phase ouverte de lecture comme pour RA1-F9 (Figure III.8). Dans ce cas, le gène codant la décarboxylase potentielle n'est pas inactivé mais son expression est fortement affectée, ce qui devrait correspondre à une diminution de la synthèse de sidérophores.

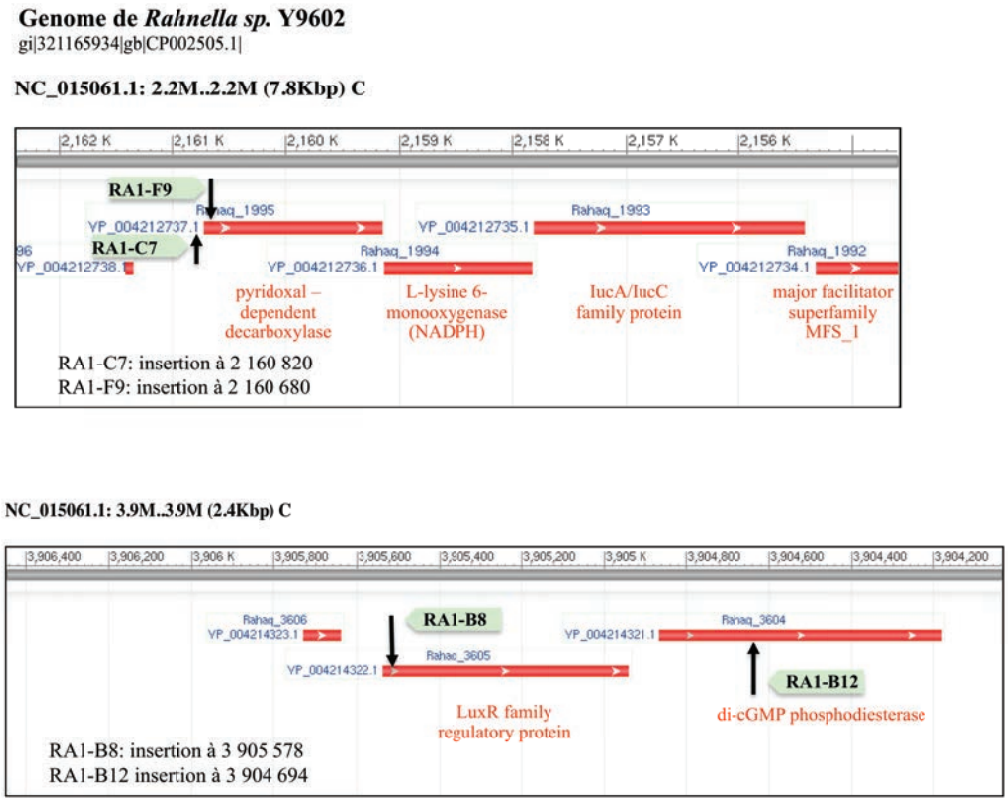


Figure III.8 : Position des sites d'insertion de Tn5-gfp chez les mutants RA1 affectés dans la production de sidérophores sur une carte du génome de *Rahnella sp*. Y9602. Les flèches vertes indiquent l'orientation du gène *gfp* dans le transposon Tn5-gfp.

Chez les mutants RA1-B8 et RA1-B12, le séquençage des régions bordant Tn5-gfp montre que le transposon s'est inséré dans deux gènes adjacents dans le génome de *Rahnella* Pour le clone RA1-B8, la transposition a eu lieu dans la région promotrice d'un gène codant un régulateur transcriptionnel de la famille LuxR tandis que pour RA1-B12, c'est le gène adjacent codant une diguanylate phosphodiesterase potentielle qui a été inactivé. Cette dernière enzyme participe au contrôle (par hydrolyse) des concentrations intracellulaires de di-GMP cyclique (di-GMPc), un messager secondaire spécifique des bactéries qui joue un rôle essentiel dans des fonctions clés dont la virulence, la motilité, la formation de biofilms, ou encore la synthèse de polysaccharides extracellulaires. De manière intéressante, le mutant RA1-B12 forme des colonies mucoïdes d'aspect visqueux sur milieu gélosé, ce qui est cohérent avec une des fonctions supposées du gène muté, i.e. un contrôle négatif de la production d'exopolysaccharides. Par ailleurs, le mutant RA1-B8 présente le même phénotype mucoïde que RA1-B12, ce qui suggère que les deux gènes mutés participent à la même fonction physiologique et que le régulateur transcriptionnel putatif de type LuxR contrôlerait positivement l'expression du gène adjacent codant la phosphodiesterase.

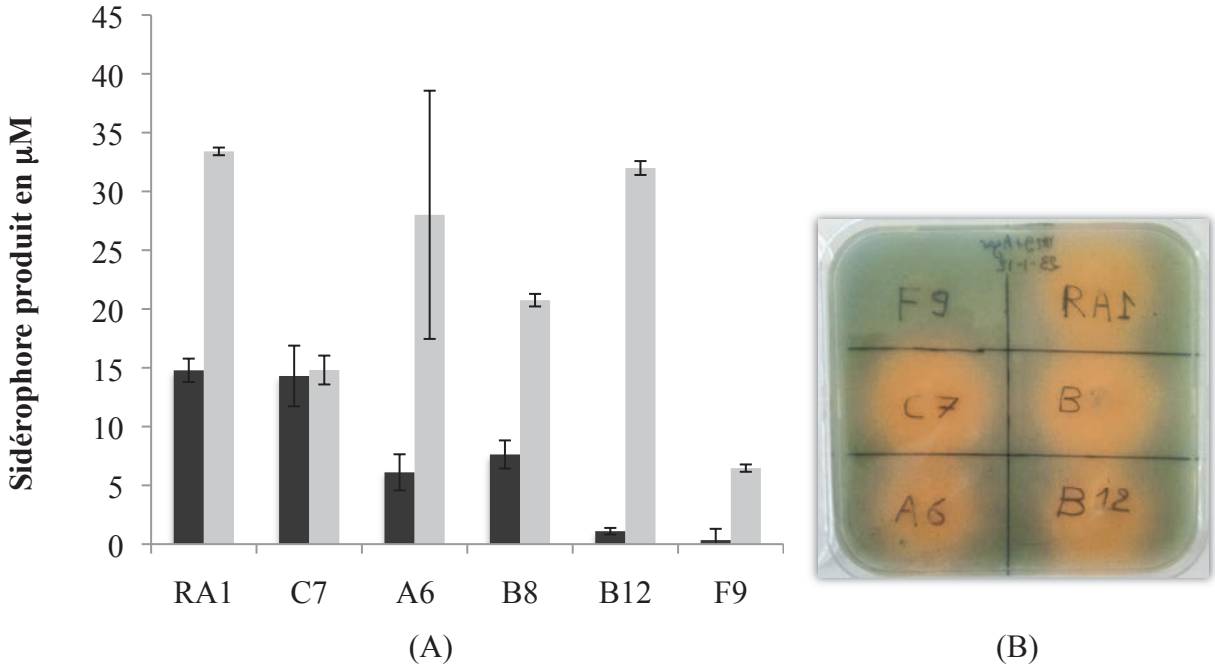
Tableau III.3 : Comparaison dans la base de données GenBank (programme BlastN) des séquences bordant les sites d'insertion de Tn5-gfp des mutants affectés dans la production de sidérophores.

Mutant	Séquence la plus proche dans les bases de données	% identité	Organisme	N° accession
RA1-B8	Régulateur contenant un domaine CheY et un site de fixation à l'ADN HTH	81%	Rahnella aquatilis CIP 78.65	gb|CP003244.1|
RA1-B12	Diguanylate phosphodiestérase	73%	Rahnella aquatilis HX2	gb|CP003403.1|
RA1-C7	Région intergénique Décarboxylase pyridoxal-dépendante / pyruvate kinase	76%	Rahnella sp. Y9602	gb|CP002505.1|
RA1-F9	Décarboxylase pyridoxal-dépendante	83%	Rahnella sp. Y9602	gb|CP002505.1|

En conclusion, le criblage de la banque de mutants a permis d'identifier plusieurs gènes affectant la production de sidérophores chez *Rahnella* sp. RA1. Un de ces gènes code une décarboxylase impliquée dans la voie de biosynthèse de sidérophores de nombreuses bactéries. Les deux autres gènes codent des enzymes connues pour contrôler le niveau de di-GMPc dans la cellule bactérienne, mais qui, à notre connaissance, n'ont jamais été associées à la production des sidérophores.

III.2.3.2. Production de sidérophores et altération minérale par les mutants de *Rahnella aquatilis RA1*

Les productions de sidérophores estimées par dosage colorimétrique en milieu CAS pour les 5 clones sélectionnés sont présentées dans les figures III.9 suivantes.



Figures III.9 : Quantité de sidérophores produits par *Rahnella aquatilis* RA1 et les clones mutants C7, B8, B12, F9 et A6 ; (A) en milieu liquide après incubation de 3 j (barres sombres) et 5 j (barres claires) à 28°C et 200 rpm, (B) en milieu gélosé après 3 j d'incubation à 28°C puis révélation selon la méthode O-CAS.

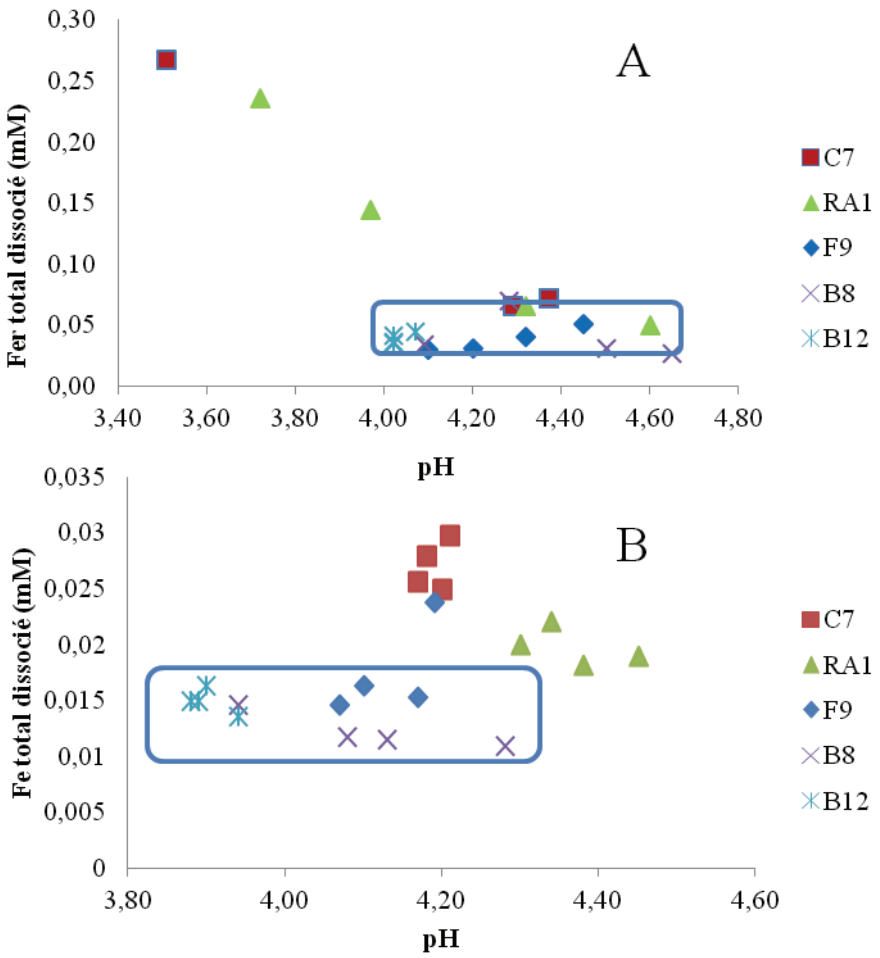
Les mutants RA1-C7, RA1-A6, RA1-B8, produisent des sidérophores au bout de 3 jours en milieu liquide. Ce résultat est confirmé sur milieu gélosé par la présence d'un halo de décoloration lié à la diffusion des sidérophores et la décoloration du chromazurol S autour des colonies. Au bout de 5 jours, la production de sidérophores en milieu liquide est amplifiée pour atteindre celle de la souche sauvage (33 µM) pour RA1-B12 et RA1-A6 ; les mutants RA1-B8 et RA1-C7 montrent des productions moindres en sidérophores de 20 et 15 µM respectivement.

Comme cela était suggéré d'après l'analyse génétique, les incubations en milieu liquide et solide montrent que le mutant RA1-F9 ne synthétise pas de sidérophores au bout de 3 jours d'incubation car aucun halo de décoloration n'est observé. Cependant, au bout de 5 jours d'incubation en milieu liquide, une faible production de sidérophores est cependant détectable (5 µM). L'ensemble de ces résultats permet de supposer que *R. aquatilis RA1* synthétise des sidérophores précocement avec un maximum atteint au bout de 5 jours d'incubation en conditions de carence en fer. Une perte quasi-totale de la production de sidérophore est observée pour le mutant RA1-F9 ce qui laisse supposer qu'un seul type de sidérophore serait donc produit par RA1.

L'altération minérale par les mutants de *R aquatilis* RA1 a été étudiée sur des GSH contenant des particules de nontronite de taille 1 et de taille 4 (cf. paragraphe II.1.2.2). Les acidifications obtenues après 5 jours d'incubation à 28°C montrent que les particules de plus petite taille s'altèrent plus facilement et libèrent davantage de fer, dont l'origine est sans doute en partie tétraédrique. Des processus de dissolution similaires, dans le cas de l'acidification abiotique des particules colloïdales de nontronite, ont permis à Grybos et al. (2010) de proposer que le fer tétraédrique était aussi libéré. Dans les figures III.10 A et B, les concentrations en Fe total dissocié sont indiquées en fonction du pH final du milieu pour les deux tailles de particules. Deux comportement bactériens sont distingués qui correspondent à :

- une dissolution proportionnelle au pH pour RA1 et RA1-C7, visible notamment sur les particules de petites tailles (A) pour lesquelles des acidifications plus importantes ont été atteintes jusqu'à pH 3,72 pour RA1 et pH 3,51 pour RA1-C7.

- une dissolution de fer peu importante (< 51μM Figure III.10 A et <15 μM Figure III.10 B) et constante dans la gamme de pH obtenue pour RA1-B8, RA1-B12 (bactéries mucoïdes) et RA1-F9 (bactérie produisant peu de sidérophores)



Figures III.10 : Fer total dissocié de GSH dopés en particules NAu-2 de taille 4(A) et de taille 1 (B) à 28°C et 6j.

Les conditions de culture en présence de GSH dopés en NAu-2 sont particulièrement favorables pour révéler une altération minérale déficiente car (*i.)* la nontronite est un minéral réfractaire à l'altération et requiert la mise en place de mécanismes de dissolution efficaces, (*ii.)* Les bactéries ne sont pas en contact direct avec les particules minérales, (*iii.)* l'altération est dépendante de la diffusion des ligands et des protons ainsi, que des complexes avec le Fe dissocié.

Dans ces conditions, les mutants RA1-B8, RA1-B12 et RA1-F9 provoquent une dissolution peu importante du fer. C'est particulièrement vrai pour le clone RA1-F9 qui ne produit pas (ou peu) de sidérophores, ce qui tendrait à démontrer la participation potentielle des sidérophores dans les mécanismes de dissolution minérale.

Les deux autres clones RA1-B8 et RA1-B12 ont un comportement en altération minérale semblable à RA1-F9 avec un phénotype producteur d'EPS (exopolysaccharides) et une

production de sidérophores qui tend vers celle de la souche sauvage après 5jours (Figure III.10). Le taux faible de fer dissocié pourrait être expliqué par un ralentissement des processus d'altération dû à une diminution de la diffusion dans le milieu des métabolites et des ions suite à la variation de viscosité du milieu, mais également à une adsorption des polymères EPS sur les surfaces des GSH. La présence d'EPS pourrait également interférer avec le dosage du fer pour ces mêmes raisons.

Le mutant RA1-C7 se comporte comme la souche sauvage malgré une production en sidérophores amoindrie par rapport à RA1. Il semble que la mutation chez RA1-C7 soit moins déterminante pour l'altération que celle de RA1-F9.

III.2.4. Influence de la composition de la matrice siliceuse sur l'altération des particules minérales dans les GSH

La diffusion de métabolites et de protons au sein de la matrice siliceuse jusqu'aux particules minérales est prépondérante dans la dissolution minérale et l'acquisition du fer par les bactéries. Les résultats obtenus en RMN et en DVS montrent que les GSH sont extrèmement hydratés et que l'eau est principalement sous forme libre ce qui facilite la diffusion des molécules en son sein. Cependant, l'hydrophobicité de la matrice siliceuse influence la première couche d'eau liée et les groupements chargés de la matrice siliceuse peuvent intervenir dans les interactions aux interfaces avec les métabolites bactériens. De plus, la porosité du gel intervient dans l'exclusion de molécules à haut poids moléculaire comme le montre la figure III.11 où les différences de diffusion de deux marqueurs de chromatographie d'exclusion, le bleu dextran et le cytochrome C sont mises en évidence pour des gels à 100% TEOS. Le bleu dextran est exclu de la porosité du gel qui demeure transparent alors que le cytochrome C est concentré au sein de la matrice siliceuse. L'hypothèse du partage des molécules en fonction de leur charge, de leur hydrophobicité et de leur taille entre un « compartiment » aqueux et un « compartiment » GSH est proposée.



Figure III.11 : GSH à 100% TEOS après 1 semaine d'équilibre dans une solution contenant soit du Bleu Dextran (MW 2 000 000) soit du cytochrome C (MW 12 400).

Afin de mettre en évidence l'influence de la composition de la matrice siliceuse sur l'altération minérale dans les GSH, des incubations de 6j ont été réalisées avec *Rahnella aquatilis* RA1 (figure III.12) pour des teneurs en MTMS jusqu'à 20% et des concentrations en NAu-2 variant de 0 à 1,5 $g.L^{-1}$. Les concentrations en fer total dissocié des GSH d'hydrophobicité différentes sont semblables ce qui permet de supposer que les mécanismes de dissolution ne sont pas limités par les interactions avec les interfaces des GSH ou par la porosité des GSH. Sur la base de ces résultats, des expérimentations exploitant les propriétés optiques de la matrice siliceuse ont été réalisées.

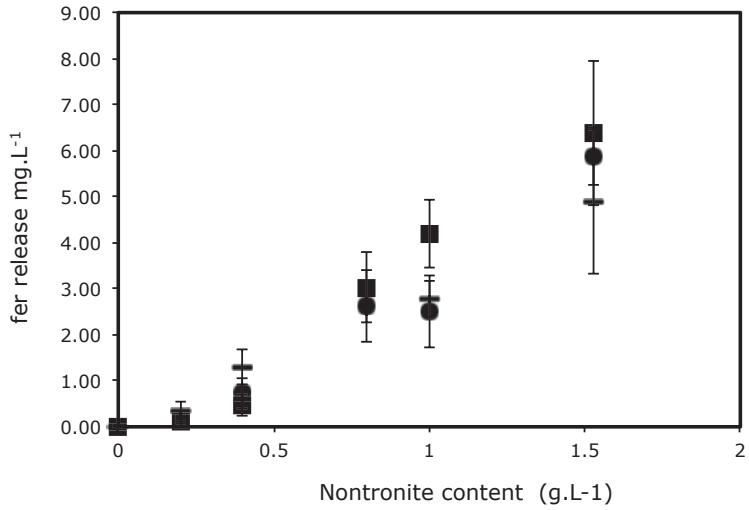


Figure III.12 : Fer total dissocié en fonction de la concentration en particules de NAu-2 dans des GSH à taux variables de MTMS (0, - ; 5, • ; 20, ■) en milieu BHM2 inoculé avec R aquatilis à 28°C et 150 rpm après 6 jours (valeurs moyennes ± ET, n = 3) .

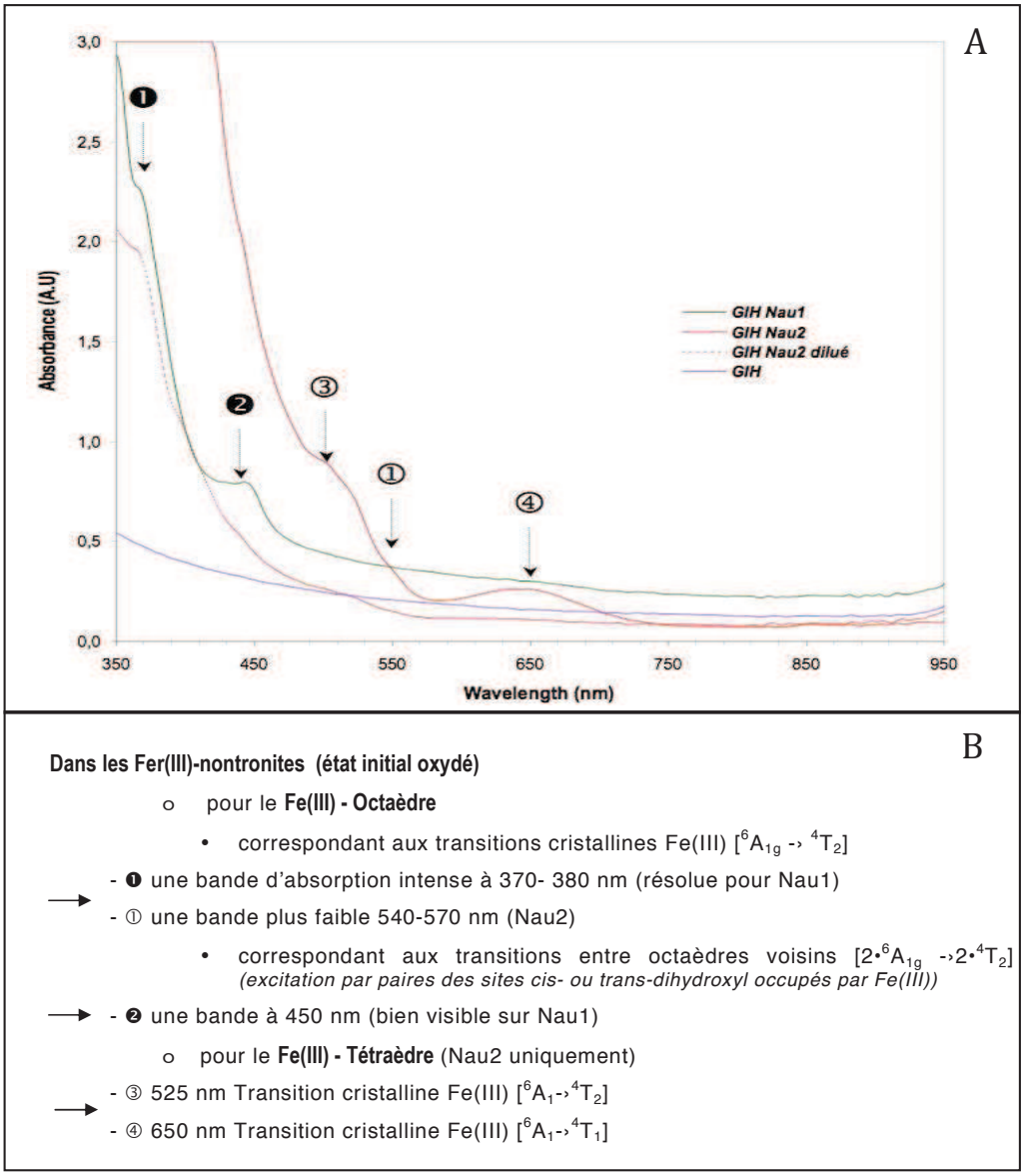
III.2.5. Evaluation de l'altération des particules minérales dans les mGSH par spectrophotométrie UV-Visible

Dans le cadre de cette étude, des microgels (μGSH) de 60 μl de volume ont été réalisés pour les expérimentations en altération et les lectures directes en spectrophotométrie UV-Vis.
La transparence optique des GSH est une propriété intéressante si elle permet de mettre en évidence des transformations minéralogiques des particules minérales immobilisées au cours des incubations biotiques et abiotiques. Sur la base de travaux précédents réalisés sur des gels de silice hybrides dopés en nontronite (Esnault, 2010), nous avons mesuré en transmission les variations de spectres UV-Vis sur des μGSH, (*i.)* pour différentes compositions de la matrice siliceuse en TEOS:MTMS et (*ii.)* après altération par *Rahnella aquatilis* RA1 ou *Burkholderia sp.* G5. Afin de pouvoir extraire les informations concernant les bandes caractéristiques de NAu-2, les spectres mesurés par Esnault (2010) et interprétés d'après les travaux antérieurs de Merola et Mc Guire (2009) et de Sherman et Vergo (1988) sont pris comme référence (Figure III.15 d'après Esnault, 2010). D'un point de vue minéralogique, la distinction entre NAu-2 et NAu-1 concerne principalement la proportion de Fer tétraédrique plus élevée pour NAu-2 que NAu-1 (tableau III.4).

Tableau III.4 : formules structurales des nontronites NAu-2 et NAu-1 (d'après Esnault, 2010 ; Gates et al.2002 ; Grybos et al., 2010)

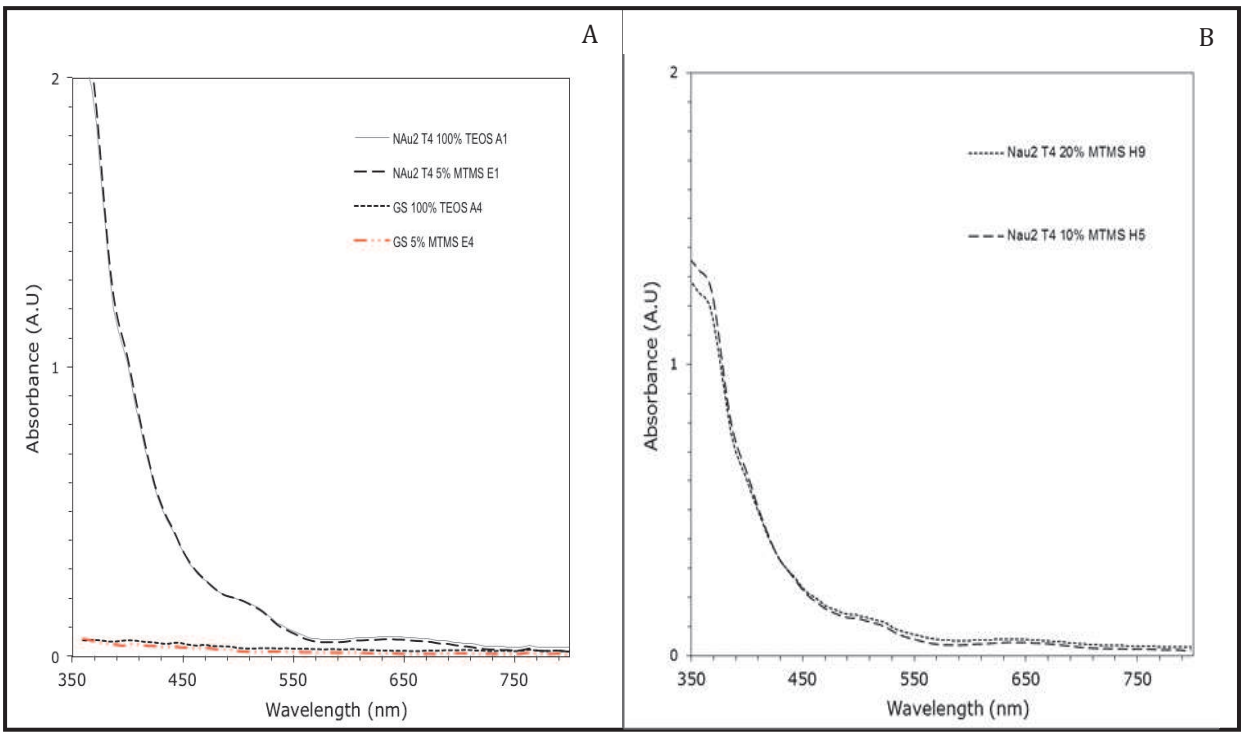
	Tétraèdres			**Octaèdres**		
Formules	Si	Al	Fe	Al	Fe	Mg
NAu-2	7,55	0,16	**0,29**	0,34	3,54	0,05
NAu-1	6,98	0,95	**0,07**	0,36	3,61	0,04

Les particules minérales de nontronite que nous avons utilisées dans notre étude (NAu-2) contiennent à l'état initial du fer oxydé Fe (III) distribué entre les couches octaédrique et tétraédrique. Les bandes du Fe(III) tétraédrique de NAu-2 sont les plus visibles et donne une absorption à 525 et 650 nm (Figure III.13 et Figure III.14).



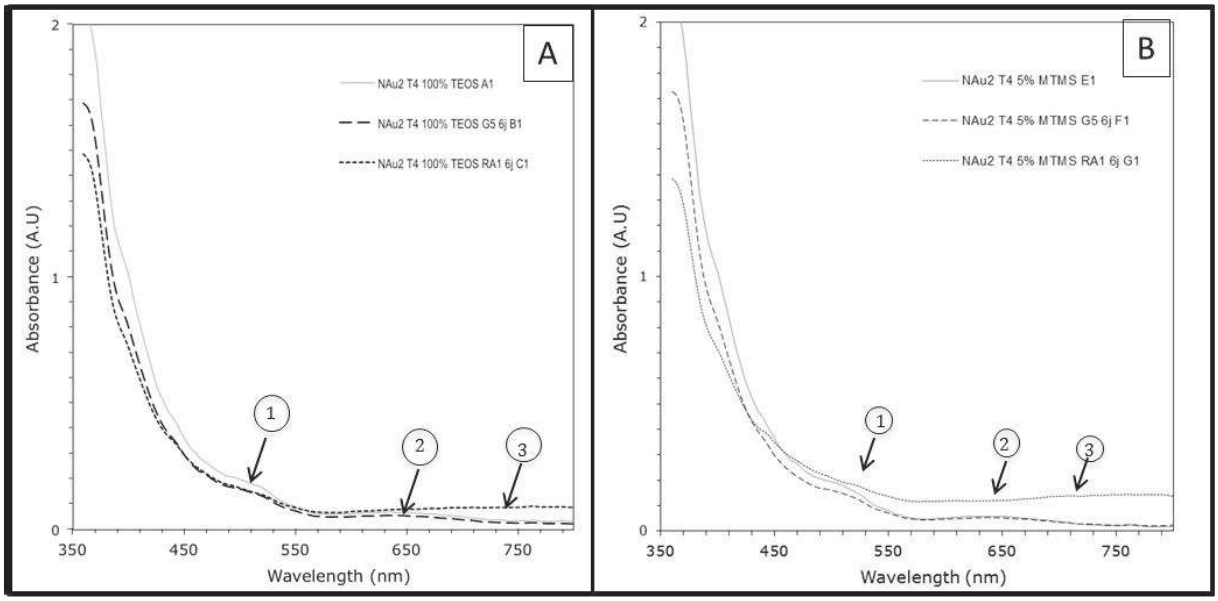
Figures III.13 : (A) Spectres UV-Vis par transmittance de gels de silice hybrides dopés en nontronite (GIH NAu-2 et GIH NAu-1) et d'un gel de silice sans particules (GIH) ; la teneur en particules minérales réduite dans le gel correspond au spectre GIH NAu-2 dilué. (B) Indication des principales bandes d'absorption des GIH dopés en nontronite (d'après Esnault, 2010).

Les spectres UV-Vis des gels à 100% TEOS et 5% MTMS ne montrent pas de différences spectrales alors que les gels à 10 et 20% MTMS donnent des valeurs d'absorbance atténuées (Figures III.15). L'élévation de la teneur en MTMS à 10% et 20% donne des gels moins transparents d'où une réflexion de la lumière plus importante et une diminution globale de la transmittance.



Figures III.14 : Spectres UV-Vis par transmittance de μGSH dopés en NAu-2 de taille 4 à 100% TEOS et 5% MTMS (A), à 10% et 20% MTMS (B). Les gels de silice sans NAu-2 sont notés GS. Les bandes spectrales caractéristiques de NAu-2 sont à 525 nm (1) et à 650 nm (2) selon Esnault (2010).

Après altération bactérienne des GSH dopés en NAu-2 (Figures III.15), il est montré une diminution du signal d'absorbance dans la gamme de longueurs d'ondes comprises entre 350 et 530 nm environ. Les deux épaulements du fer (III) tétraédrique sont observés à 525 nm et 650 nm pour l'altération par *Burkholderia sp.* G5. Une bande d'absorption plus large apparaît pour *Rahnella aquatilis* RA1 dans la zone de 700 à 750 nm. Selon Stucki (2011), cette bande de 700 à 750 nm, visible également par spectrométrie de réflectance diffuse sur des poudres de smectites riches en fer, correspondrait à une réduction bactérienne du Fe(III) octaédrique suivie d'une réoxydation par O_2. Cette hypothèse confirme les observations visuelles de coloration verte réversible des GSH dopés en NAu-2 en culture avec *Rahnella aquatilis* RA1 seulement.



Figures III.15 : Spectres UV-Vis par transmittance de μGSH dopés en NAu-2 de taille 4 à 100% TEOS (A) et 5% MTMS (B) altérés par *Rahnella aquatilis* RA1 (...) ou *Burkholderia sp.* G5 (‑ ‑) avec le témoin (—). Les bandes spectrales caractéristiques de NAu-2 sont à 525 nm (1) et à 650 nm (2) (Esnault, 2010) et dans la gamme de 700 à 750 nm (Stucki, 2011).

Ainsi, il serait possible de mettre en évidence des variations qualitatives des particules minérales de NAu-2 par mesure directe de transmittance sur des μGSH en fond de microplaques. Ces premières observations demandent à être approfondies et interprétées en relation avec des mesures spectroscopiques comme la spectrométrie Raman. Les essais réalisés dans le cadre de cette thèse en Raman ont pu montrer la faisabilité des expérimentations sur des GSH mais aucun résultat suffisamment robuste n'est encore disponible.

III.2.6. Vers une mesure local du pH à l'interface bactérie du sol/minéral (publication n°5 en préparation)

"Local pH measurement at wet mineral- bacteria /air interface"

-article à soumettre à Electrochemistry communications-

Oulkadi D., Desobry-Banon S., Mustin, C., Etienne M.

La stratégie d'acquisition du fer par les microorganismes est liée à la production de protons et de métabolites. La question scientifique posée concerne l'existence de gradients de protons dans le microenvironnement des bactéries qui pourrait expliquer une plus grande efficacité de l'altération minérale. L'objectif de ce travail est de quantifier localement la concentration en protons générée par la bactérie rhizosphérique *Rahnella aquatilis* RA1. Des gels de silice hybrides (GSH) dopés en particules minérales colloïdales de nontronite (NAu-2) sont utilisés comme support de culture bactérienne. La microscopie à sonde électrochimique (SECM) est choisie afin de mesurer le pH dans le film liquide à l'interface du système GSH-bacterie/air. Après la validation des mesures en SECM du pH local, cette technique est appliquée à l'analyse de la variation de pH induite par les bactéries en surface des GSH. Il est démontré que la SECM permet de suivre les variations de pH en fonction du temps et de différencier les cinétiques d'acidification en relation avec la stratégie d'absorption du fer par les bactéries. La SECM peut être utilisée pour étudier les interactions bactérie/minéral dans un film d'eau dans des conditions proches de sols naturels ou de sédiments.

Mots clés: microscopie à sonde électrochimique (SECM), gels de silice hybrides, altération, minéraux colloïdaux, bactéries.

Local pH measurement at wet mineral-bacteria/air interface

-Article à soumettre à Electrochemistry communications-

Oulkadi D.[1], Desobry-Banon S.[1]*, Mustin, C.[1], Etienne M[2].

[1]Université de Lorraine, LIEC, UMR 7360 CNRS, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54500, France

[2]Université de Lorraine, LCPME, UMR 7564 CNRS, Villers-lès-Nancy, F-54601, France

*Corresponding author: sylvie.desobry@univ-lorraine.fr

Université de Lorraine, LIEC, UMR 7360 CNRS, Vandœuvre -lès-Nancy, F-54500, France

Tel: +33 (0) 3 83 68 42 83, Fax: +33 (0) 3 83 68 42 88

Abstract

The iron acquisition strategy is mainly related to the production of protons and metabolites by microorganisms. As the rate and mechanism of clays dissolution are pH-dependent, the question that arises concerns the exploration of bacterial microenvironments in interaction with mineral. The aim of this work was to quantify local proton concentrations generated by the rhizospheric bacteria Rahnella aquatilis RA1. Hybrid silica gels (HSG), made of colloidal clay minerals (nontronite NAu-2) trapped in porous silica gel, were used as a support for a bacterial culture. Scanning electrochemical microscopy (SECM) was used to measure local pH in the thin water film located at the HSG-bacteria/air interface. SECM method was validated for such local pH measurement and then applied to the analysis of pH variation induced by bacterial biofilm layered on HSG surfaces. SECM permitted to follow pH variation as a function of time and allowed also differentiating acidification kinetics. SECM can be used to study wet mineral-bacteria/air interface in conditions close to natural soils and sediments where water can form film around mineral.

Key words: Scanning electrochemical microscopy SECM, hybrid silica, weathering, mineral, bacteria.

Introduction

Clay minerals play an important role in many environmental processes, i.e. soil stability, plant and microorganism nutrition, element cycling. In oxic conditions, bacteria uptake of limiting nutrients as Fe from clay minerals is acquired by the release of protons and low molecular weight metabolites (organic acids, siderophores) that change pH and induce soluble Fe (III) complexes formation. Most of the studies on bacteria-clay mineral interactions have been made in well-controlled laboratory bulk-systems when protons and metabolites were easily measured in solution (Dong et al., 2009; Kalinowski et al., 2000). We recently proposed to study mineral bioweathering in Hybrid Silica Gels, i.e. HSG, made of colloidal clay minerals trapped in a porous silica gel. This new material permitted to study bioweathering in stirred liquid medium (Grybos et al., 2011) but also should be used in low and moderate relative humidity conditions directly into soils (Oulkadi et al., 2012). As the rate and mechanism of clays dissolution are pH-dependent (Grybos et al., 2010), the question that raised concerns the way to explore bacterial microenvironments where pH fluxes should act on mineral dissolution more efficiently than in bulk. In order to improve the understanding of bioweathering at the micrometric scale, electron microscopic studies have already been carried out on silicate minerals (Rogers & Bennett, 2004) and silicate assemblages colonized by lithobiontic communities (Barker & Banfield, 1998). The direct biochemilithic zone was defined as the intimate association of mineral surfaces with microorganisms and their extracellular products. In this micrometric zone, it was possible to demonstrate that microbes can cause low pH microenvironments. The pH values can be measured by microelectrodes (Dexter & Chandrasekaran, 2000; Horrocks et al., 1993) or, in even smaller volumes, by using confocal-laser based techniques with pH-sensitive fluorescent dye set. Extremely low pH values, below pH2, were measured in a microbial biofilm forming on passive metal in marine environment using microelectrodes (Dexter & Chandrasekaran, 2000). Higher pH values around pH3-4 were detected closed to bacterial cells within cleavage in biotite when the bulk solution pH was 7.0 (W. Barker, Welch, Chu, & Banfield, 1998). Scanning electrochemical microscopy (SECM) has demonstrated to be pertinent in studying local etching of a wide variety of materials (Tampion & Tampion, 1987). It has been recently used in analyzing the proton-promoted dissolution kinetics of calcite in abiotic conditions (Mc Geouch et al., 2012).

In the present paper, we used SECM for probing interfacial processes involved in proton-promoted mineral bioweathering.

The aim of this work was to quantify local proton concentrations generated by *Rahnella aquatilis* RA1. The novelty of this work is related to the application of SECM analysis in the thin water film located at the mineral/bacteria interface, with the goal to model a typical interface that can be encountered in soil environment. Shear force detection was applied here for the precise positioning of the electrode tip at the air/water/bacteria/gel interface. SECM method was validated for such local pH measurement and then applied to the analysis of local pH variations induced by bacteria biofilm layered on the HSG surfaces.

2- Materials and methods

2.1. Hybrid silica gels (HSG) preparation

Size-selected natural colloidal particles of nontronite NAu-2 $[Si_{7.55}Al_{0.16}Fe_{0.29}]$ $[Al_{0.34}Fe_{3.54}Mg_{0.05}]$ O_{20} $(OH)_4$ $Na_{0.72}$ were used in this study. The size characteristics were 705 nm for average length, 138 nm for average width and an average thickness of 1.05 nm (Michot et al., 2008). The total surface area was calculated equaled to 662.8 $m^2.g^{-1}$ (Grybos et al., 2010). These nanoparticles were immobilized in an inorganic silica matrix by a synthesis pathway using tetraethyl orthosilicate (TEOS, Fluka) precursors (Grybos, Michot, Skiba, Billard, & Mustin, 2010). A clear solution of TEOS, Milli-Q H_2O, and HCl (0,1 M) was prepared by sonication (55 kHz) at ambient temperature. The initial molar ratio TEOS:H_2O:HCl was 1:2.45:0.003 giving an initial pH 1.5 required for silica hydrolysis. Then, pH was increased to pH 4.0 with NaOH (0,1 M) to prevent mineral dissolution. The addition of NAu-2 suspension or Milli-Q water for NAu-2-HSG and NAu-2-free-HSG respectively gave final stoichiometric ratios TEOS: H_2O equaled to 1:15. In order to accelerate self-condensation and sol-gel transition, pH was increased to pH 5.0 by NaOH (0.1M) with NaOH/HCl molar ratio of 1. To design gels for microbial assays, hybrid silica sol (1.5 ml) was distributed into 24 well microplates (Greiner bio-one) and left at room temperature for gelation that occurs within minutes. HSG were then sterilized twice by autoclaving in Milli-Q water (calibration samples) or BHm (microbial samples) for 30 min at 110°C. HSG were stored at ambient temperature in the medium used for SECM experiments for at least 2 weeks in order to achieve an ionic equilibrium state within HSG. All chemicals used were high purity grade.

2.2- Samples preparation for SECM

Calibration samples

NAu-2-free-HSG was prepared as described below. Gels were stored in buffered solutions at pH 4.0 and 7.0 for 2 weeks. Before use, HSG was put down sterile glass petri dishes containing cotton at bottom to prevent mechanical shocks. A buffered solution pH4.0 or pH7.0 in which gels have been stored was added (4.5mL) to prevent HSG dehydration and to permit subsequent electrochemical measurements.

R. aquatilis RA1 samples

Selected colonies of *Rahnella aquatilis RA1* were grown overnight in 2ml sterile nutrient broth (Luria-Bertani broth) at 28°C and 150 rpm (Orbital incubator, Stuart Scientific, SI50). Bacteria were harvested by centrifugation (Multifuge 1 S-R, Heraeus) at 4,500 g for 10 min and pellets were collected and washed three times with sterile BHm (derived from Bushnell-Hass Medium) supplemented with filtered (Millipore, 0.2 µm) glucose at a final concentration of $4gL^{-1}$ (Balland et al., 2010). Bacterial suspension in BHm was finally adjusted to 4.10^7 bacteria per mL as estimated by a 0.1 optical density at $600_{nm.}$ 30 µl of the bacterial suspension was spread on the surface of NAu-2-free-HSG and Nau-2-HSG. Two controls (NAu-2-HSG and NAu-2-free-HSG without bacteria) were prepared. All HSG were put down in sterile glass petri dishes (VWR) containing cotton layer (Baumwolle Cotton) impregnated with 4.5 ml of BHm supplemented with glucose (Figure 1). BHm permitted to maintain bacteria growth by providing nutrients and maintaining sufficient relative humidity. SECM samples were incubated at 28°C for two days in order to get viable cells layer of *Rahnella aquatilis* RA1 at the HSG surface.

2.3- SECM experimental set-up

The selective H^+ microelectrodes used for determining local pH by SECM were prepared with borosilicate glass capillaries (1.5mm outer diameter, 1.1mm inner diameter, 100mm length; Hilgenberg, Malsfeld, Germany) drawn with a home-made puller to produce tapered micropipets with 1-cm-long flexible tips as needed for the shear force-based distance control (Etienne et al., 2004). The inner wall of microelectrodes was silanized twice by injecting 200 µL of Hexamethyldisilazane (≥ 98% fluka), followed by heating in oven at 200°C for 1hour. Thereafter, it was filled with H^+ selective membrane (Hydrogen Ionophore II - cocktail A, Sigma Aldrich) and finally back-filled with a 0.1 M KCl solution as internal electrolyte.

Ag/AgCl wire was incorporated as an internal electrode. An external reference microelectrode, prepared without silanization, was filled with 0.1 M KCl solution. The two microelectrodes (reference and working electrodes) were finally mounted on the SECM device to control the position and programming the measurements. Potentiometric H^+ activity measurements were carried out with a high-sensitive potentiometer (J. Meyer, Bochum, Germany)

The SECM setup is based on the instrument developed by Sensolytics (Ruhr-Universität, Bochum, Germany), equipped with a PalmSens Bipotentiostat (Palm Instruments BV, Houten, The Netherlands). The module for shear force control (setup and software) was designed and developed at the laboratory (LCPME, Nancy, France). Positioning of the potentiometric probe at sample surface was performed automatically by automate with using shear force detection.

The local activity of H^+ was measured by the pH sensitive microelectrode in the perpendicular direction (Z) above the sample surface (figure 1). The reference microelectrode was immersed in wet cotton saturated with standard pH buffers or BHm. Potentials of the electrodes in solutions buffered at pH 7.0 and 4.0 were regularly measured for calibration of the sensor, giving rise to a typical slope of ~59 mV per pH unit. These calibrations have been performed systematically before each experiment.

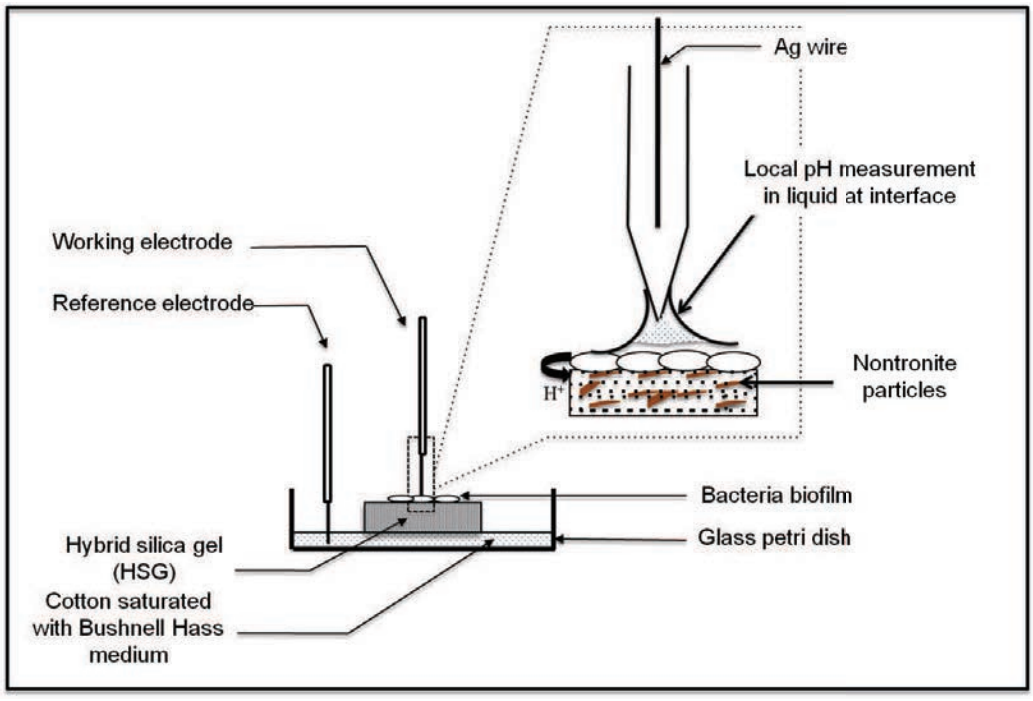


Figure 1: Schematic representation of SECM experiment at bacteria/mineral interface

3- Results and discussion

SECM setup and validation of the measurement at wet mineral/air interface

The bacteria/mineral system to be analyzed here is illustrated in Figure 1. Bacteria were localized at the surface of NAu-2-HSG where Nau-2 particles are homogeneously distributed. The local pH measurement had to be performed in a very small thickness of liquid located at the complex interface composed of NAu-2-HSG, bacteria and solution. Approaching the electrode to this interface led to a sudden change in the measured potential (from 0.7 V to approximately 0 V) when a meniscus was formed at the end of the electrode tip, allowing the measurement of the local potential (Figure 2A, curve a). Approaching further the tip to the interface led to the detection of shear force interaction between the vibrating potentiometric tip and the interface (Figure 2B, curve a). Moving backward electrode from interface gave a slightly different potential profile versus tip-to-sample distance (as determined by shear force detection). Potential was here constant for almost 30 µm, before to change dramatically at 30 µm from interface (Fig. 2A, curve b). This sudden change in measured potential was due to the absence of electrical connection between sensor and reference electrode when pH electrode get out of solution.

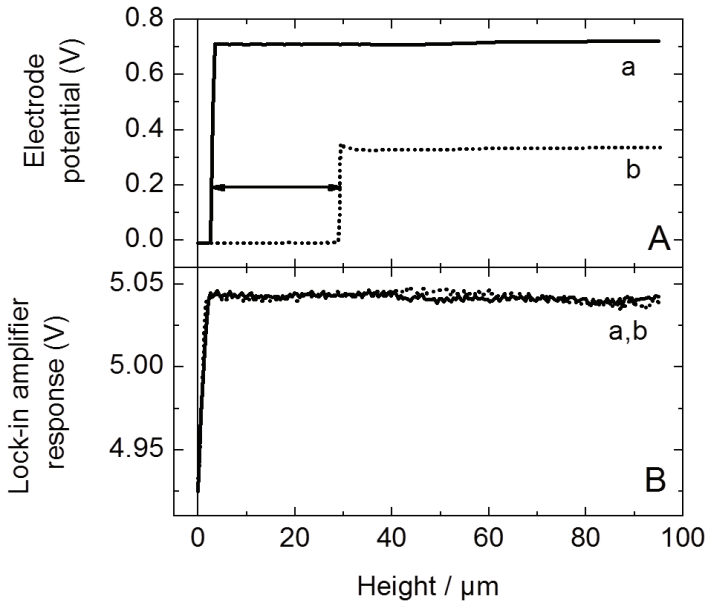


Figure 2: Approach curves of a microelectrode obtained at the interface air-gel (HSG) in a BHM medium solution. A) Simultaneously recorded amplitude of the tip vibration (measured with the piezoelectric shear-force detection system versus tip-to sample distance. B) Lock-in amplifier response (a and b) versus tip to sample distance

This first experiment indicated that potential could be measured at such complex interface. Only potential measurement allowed detecting air/liquid interface. However, the detection of shear force provided additionally the exact position of the mineral (and bacteria)/water interface throughout the experiment.

After validation of the protocol for electrode positioning, it was necessary to validate that potential measured at this interface was indeed indicative of the pH of related solutions. For this, NAu-2-free-HSG materials have been stored for 2 weeks in solutions respectively buffered at pH 4.0 and 7.0 (Figure 3). pH was then measured with the same electrode, in solution and at the wet NAu-2-free-HSG /air interface. As expected, pH 4.0 and 7.0 were measured in buffered solutions. When applied to the wet NAu-2-free-HSG /air interface, the correspondence with pH in solution was very good. The measurements gave pH 4.01 and pH 6.89 for acidic and neutral conditions respectively. We suppose that carbonation of solution in contact with surrounding air was responsible of the small difference between the solution at pH 7.0 and the interface at pH 6.89. This effect was negligible in acidic medium.

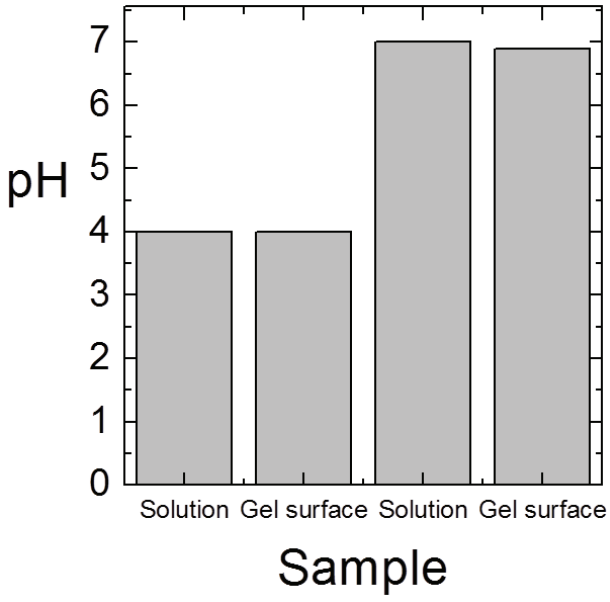


Figure 3: SECM experiment validation and local pH measurement at gel (HSG) surface and in buffer solution at pH 4.0 and 7.0

Evolution of pH and proton concentration over time

The method was then applied to pH monitoring at wet NAu-2-HSG and NAu-2-free-HSG/bacteria/air interfaces. Local pH measurements by SECM showed a progressive acidification with time at wet interfaces for NAu-2-HSG (fig. 4A c) and NAu-2-free-HSG

(fig. 4A d) inoculated with *Rahnella aquatilis* RA1. This was related to viable cells layer at HSG surfaces that metabolized glucose to produce organic acids and CO_2 during respiration. pH values measured after 48h decreased to pH4.35 and pH4.25 at NAu-2-HSG and NAu-2-free-HSG wet interfaces respectively. The pH values obtained in wet interfaces to around pH 4.3 after 2d are close to those get in aerated bulk conditions.

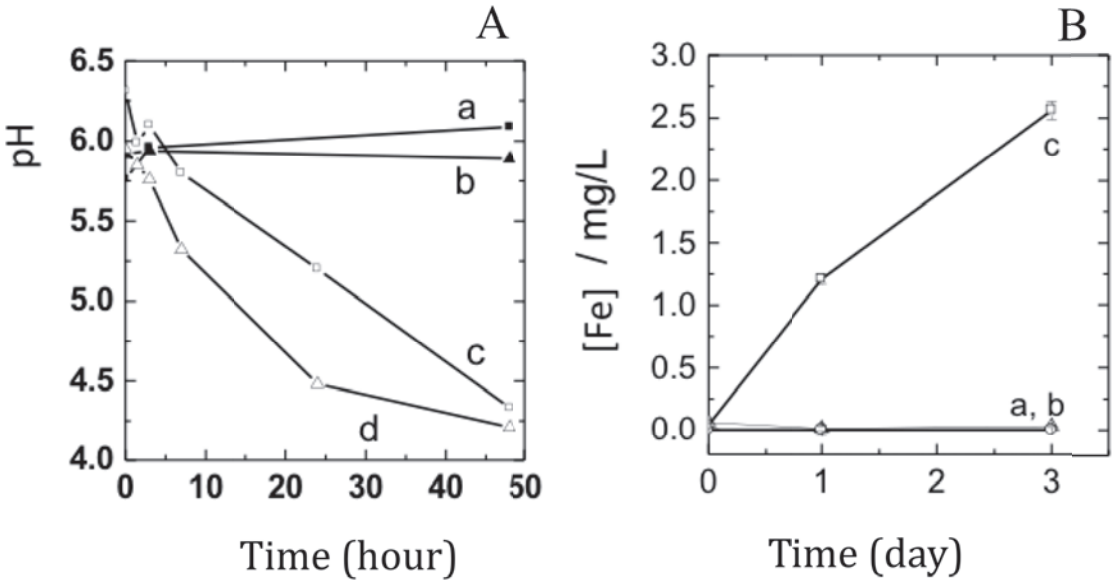


Figure 4: (A) SECM measurements of local pH for controls (abiotic conditions) at wet NAu-2-HSG/air (a) and NAu-2-free-HSG/air (b) interfaces and when inoculated with *Rahnella aquatilis* RA1 at wet NAu-2-HSG-bacteria/air (c) and NAu-2-free-HSG-bacteria/air (d) interfaces. (B) Fe^{III} (in mg/g NAu-2) released from gels after 3 days incubation at 28°C and constant shaking at 150 rpm for the two controls, NAu-2-HSG in abiotic conditions (a) NAu-2-free-HSG (b) and NAu-2-HSG (c) in biotic conditions inoculated with *Rahnella aquatilis* RA1.

As an example, *Rahnella aquatilis* RA1 acidification to pH 4.10 after 3d in bulk permitted to dissociate up to 2.5 mg Fe (III) per gram of NAu-2 from NAu-2-HSG (fig. 4B c) as measured by microplate assays (Uroz et al., 2008). If we consider the overall pH profile obtained in biotic conditions for NAu-2-free-HSG, higher acidification rate could be noticed in the first hours (fig 4A d) compared to the NAu-2-HSG biotic assay (fig 4A c). This should illustrate the earlier bacterial acidification strategy for iron uptake in deprived-Fe-system (NAu-2-free-HSG). After this first step, acidification rate decreased with time (Fig 4A d) whereas constant acidification rate was observed from NAu-2-HSG biotic assay (Fig 4A c). Then measuring local pH at wet interfaces should permit to differentiate acidification kinetic more precisely.

4-Conclusion

This work demonstrated the ability of SECM to target bacterial microenvironments for local pH measurements. Using Hybrid Silica Gels doped with NAu-2 nanoparticles permitted to reveal the potential use of SECM in bioweathering studies. The SECM device used in this paper permitted to follow pH variation as a function of time. It allowed also differentiating acidification kinetics in relation with iron uptake strategy of bacteria. Monitoring pH at wet mineral-bacteria/air interfaces should be an original way to get a better understanding of the metabolic pathways employed for uptake of iron or other essential element.

Acknowledgments

This study was supported by grants from Region Lorraine (project RL38/10), CNRS (project INSU/Interrvie), and Université de Lorraine. All of these are gratefully acknowledged.

References

1. Balland, C., Poszwa, A., Leyval, C., & Mustin, C. (2010). Dissolution rates of phyllosilicates as a function of bacterial metabolic diversity. Geochimica et Cosmochimica Acta, 74(19), 5478–5493.

2. Ballesteros Katemann, B., Schulte, A., & Schuhmann, W. (2003). Constant-distance mode scanning electrochemical microscopy (SECM)-Part I: Adaptation of a non-optical shear-force-based positioning mode for SECM tips. Chemistry a European Journal, 9(9), 2025–33.

3. Barker, W. W., & Banfield, J. F. (1998). Zones of Chemical and Physical Interaction at Interfaces Between Microbial Communities and Minerals : A Model Zones of Chemical and Physical Interaction at Interfaces Between Microbial Communities and Minerals : A Model. Geomicrobiology Journal, 15(3), 223–244.

4. Dexter, S. C., & Chandrasekaran, P. (2000). Direct measurement of pH within marine biofilms on passive metals. Biofouling : The Journal of Bioadhesion research, 15(4), 313–325.

5. Dong H., Jaisi DP, Kim J and Zhang G (2009) Microbe-clay mineral interactions. American mineralogist. 94(11-12), 1505-1519.

6. Etienne, M., Schulte, A., Mann, S., Jordan, G., Dietzel, I. D., & Schuhmann, W. (2004). Constant-distance mode scanning potentiometry. 1. Visualization of calcium carbonate dissolution in aqueous solution. Analytical chemistry, 76(13), 3682–8.

7. Grybos, M., Billard, P., Desobry-Banon, S., Michot, L. J., Lenain, J.-F., & Mustin, C. (2011). Bio-dissolution of colloidal-size clay minerals entrapped in microporous silica gels. Journal of colloid and interface science, 362(2), 317–24.

8. Grybos, M., Michot, L. J., Skiba, M., Billard, P., & Mustin, C. (2010). Dissolution of anisotropic colloidal mineral particles: evidence for basal surface reactivity of nontronite. Journal of colloid and interface science, 343(2), 433–8.

9. Horrocks, B. R., Mirkin, M. V., Pierce, D. T., & Bard, A. J. (1993). Scanning Electrochemical Microscopy. 19. Ion-Selective Potentiometric Microscopy. Analytical chemistry, 65(12), 1213–1224.

10. Kalinowski et al. 2000 . Rates of bacteria-promoted solubilization of Fe from minerals: a review of problems and approaches Chemical Geology 169 2000 357 – 370

11. McGeouch, C.A., Peruffo, M., Edwards, M.A., Bindley, L.A., Lazenvy, R.A., Mbogoro, M.M., McKelvey, K., Unwin, P.R. (2012). Quantitative localized proton-promoted dissolution kinetics of calcite using scanning electrochemical microscopy (SECM). The Journal of physical chemistry. 116, 14892-14899.

12. Michot, L. J., Bihannic, I., Maddi, S., Baravian, C., Levitz, P., & Davidson, P. (2008). Sol/gel and isotropic/nematic transitions in aqueous suspensions of natural nontronite clay. Influence of particle anisotropy. 1. Features of the i/n transition. Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids, 24(7), 3127–39.

13. Oulkadi, D., Desobry, S., Mustin, C., Desobry-Banon, S. (2012a). Water sorption in hybrid silica gels containing colloidal nontronite. Journal of Sol-Gel Science and Technology. doi : 10.1007/s10971-012-2898-0.

14. Oulkadi, D., Baland-Bolou-Bi, C., Michot, L., Grybos, M., Billard, P., Mustin, C., Desobry-Banon, S. (2012b). Bioweathering of nontrnoite colloids in hybrid silica gel (HSG): implication for iron mobilization. Submitted to Geomicrobiology J.

15. Rogers, J. R., & Bennett, P. C. (2004). Mineral stimulation of subsurface microorganisms: release of limiting nutrients from silicates. Chemical Geology, 203(1-2), 91–108.

16. Tampion, J., & Tampion, M. D. (1987). Immobilized Cells: Principles and Applications. Cambridge studies in biotechnology 5 (p. 249).

17. Welch, S. A., & Ullman, W. J. (1993). The effect of organic acids on plagioclase dissolution rates and stoichiometry. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *57*(12), 2725–2736

CHAPITRE IV

DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

IV.1. Discussion générale

La caractérisation de la structure et des propriétés physico-chimiques réalisée dans le premier volet de la thèse permet de proposer une représentation multi-échelle des GSH en interaction avec les bactéries (figure IV.1). A l'échelle nanométrique, un réseau fractal de particules primaires nanométriques de silice est mis en évidence par SAXS. La porosité serait de 10 à 50 nm dans un réseau de silice amorphe. Les particules minérales ne sont pas révélées à cette échelle par SAXS qui donnent des profils équivalents en présence ou en absence de particules minérales suggérant que la structure de base de la matrice est préservée.

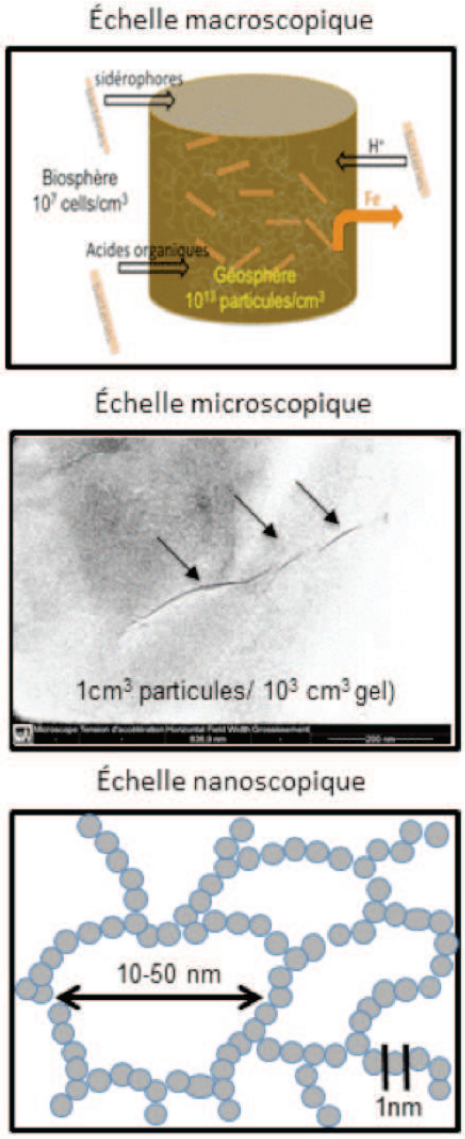


Figure IV.1 : Représentation multi-échelle des GSH. Echelle macroscopique : GSH en interaction avec les bactéries. Echelle mésoscopique : photographie de GSH par MET, les flèches indiquent la présence des particules minérales exfoliées dans la matrice siliceuse. Echelle nanoscopique : particules primaires nanométriques de silice organisées en un réseau fractal dont les pores ont une taille de l'ordre de 10 à 50 nm.

A l'échelle microscopique, les particules minérales sont visualisées par MET comme des feuillets exfoliés et peu nombreux. Le calcul de la fraction volumique des particules dans le gel hydraté donne un ordre de grandeur de 1 cm^3 de particules minérales pour 1 litre de gel soit un taux d'occupation statistique de 0,1%.

En considérant les particules minérales les plus grandes (L=705 nm, l=138 nm, e=1 nm), un volume moyen de 10^{-16} cm^3 par particule, on dénombre 10^{16} particules par litre de gel. Compte-tenu de l'ensemencement du milieu par des suspensions de 10^7 cellules/cm^3 et le ratio GSH : milieu de culture égal à 1:2, un pool réactif de 10^6 particules minérales/bactérie est disponible (figure IV.1).

Apport des GSH dans l'étude de l'altération minérale

Nouveaux matériaux d'étude pour l'environnement. La création de nouveaux matériaux à partir de la transition sol-gel est une approche intéressante car elle se déroule dans des conditions de pression et de température modérées avec un matériel de laboratoire usuel (hotte d'extraction des solvants durant la préparation et bain à ultra-sons). De plus, la synthèse chimique permet de créer des GSH variés avec peu d'impuretés puisque les différents éléments entrant dans la composition sont contrôlés. Le choix des précurseurs permet de diversifier les interfaces grâce à l'hydrophobicité des groupements liés de façon covalente à la silice. L'inclusion de particules minérales sous forme de suspensions colloïdales donne les propriétés fonctionnelles recherchées à ces matériaux, utiles pour l'étude de l'altération minérale. Les gels obtenus sont homogènes et présentent une distribution uniforme des particules minérales grâce au respect des conditions de répulsions électrostatiques entre les particules minérales et les particules primaires de silice au cours des processus de transition sol-gel et de gélification. La charge électrique des phyllosilicates testés (NAu-2, SWy-2) comme celle des agrégats de silice demeure négative durant la synthèse grâce aux conditions de pH utilisées et cela permet d'éviter l'agrégation et l'éventuelle séparation de phases du milieu. Ces conditions doivent être satisfaites afin de réaliser un support minéral « substrat » optimal quant à la distribution de surfaces réactives aux métabolites microbiens et aux protons. La dispersion homogène des particules minérales est aussi importante pour préserver la conduction optique de la matrice siliceuse. L'exploitation des propriétés optiques des gels hybrides a été abordée dans le cadre de cette thèse grâce au choix de la nontronite qui possède des propriétés spécifiques d'absorption en spectroscopie UV-Vis. Un compromis est à respecter afin que la mise en forme des gels et la concentration en minéraux permettent d'accéder au spectre UV-Vis de la nontronite. C'est un autre point positif des GSH qui

adoptent des formes variées au moment de la transition sol-gel : films par « spin-coating », capillaires pour les mesures en SAXS, fonds de microplaques pour les « µGSH » destinés aux mesures UV-Vis, puits de microplaques, boîtes de pétri…Cette versatilité est utile tant pour la caractérisation des gels que pour l'optimisation de leurs propriétés : épaisseur de 1 à 2 mm pour la mesure des spectres UV-Vis de NAu-2, tablette pour les supports de culture destinés à la SECM…

Les gels de silice hybrides sont également stérilisables après leur synthèse par traitement hydrothermal (type autoclavage) ce qui est indispensable pour leur usage en microbiologie. La caractérisation SAXS a, de plus, mis en évidence que le traitement hydrothermal choisi permet de stabiliser plus rapidement la structure du matériau. Le « vieillissement accéléré » des GSH dû au passage à l'autoclave permettrait d'accélérer la phase transitoire de structuration-condensation pour aboutir à un matériau dont la structure « quasi-stationnaire » évolue graduellement, mais de façon linéaire et limitée. La conservation des GSH dans le temps est possible dans un milieu aqueux et stérile (type eau ultrapure). Hors d'un milieu aqueux, la structure des GSH est très sensible aux conditions d'humidité relative de l'environnement. La déshydratation est rapide et le phénomène peut être considéré comme réversible tant que l'eau capillaire est présente. Ainsi, pour une utilisation *in situ* des GSH, dans les sols par exemple, les conditions d'activité de l'eau (a_w) pourraient être compatibles avec celles qui correspondent à la croissance des bactéries (a_w = 0,9), des champignons et moisissures (a_w = 0,7.)

Amélioration de la connaissance sur l'altération minérale des GSH. D'après l'ensemble des résultats obtenus dans ce travail sur l'altération des GSH, il apparaît que les bactéries tolèrent et intègrent assez bien ce matériau synthétique et « exotique » dans leur environnement. Les profils d'acides organiques produits par les bactéries ne semblent pas perturbés par la présence de GSH : production majeure d'acide gluconique par *Burkholderia sp G5* alors que *Rahnella aquatilis RA1* et *Pantoae agglomerans PA1* excrètent une large variété de petits acides organiques et sidérophores. Ces productions ne sont pas significativement différentes de celles observées en milieu liquide simple (sans GSH). La matrice siliceuse est « transparente » et sa présence ne perturbe pas l'équilibre cellulaire. En revanche, le GSH modifie les interactions bactéries/particules dans le système. Il assure la libre circulation des métabolites microbiens en prévenant l'adhésion des bactéries aux particules minérales. Dans ce travail, les phyllosilicates utilisés sont particulièrement « réfractaires » à l'altération (NAu-2) mais il apparaît que l'activité métabolique cellulaire « ordinaire» des bactéries est

suffisante pour leur dissolution comme le suggèrent les cinétiques de production d'acides organiques par *R. aquatilis* semblables pour des gels avec et sans particules minérales.

Les résultats biotiques obtenus sur les GSH dopés en NAu-2 pour *R. aquatilis RA1* montrent des vitesses de dissolution du fer du même ordre de grandeur que celles obtenues précédemment sur des minéraux du sol ou, en laboratoire, sur des particules minérales en suspension ($\approx 10^{-13}$-10^{-12} mol m^{-2} s^{-1}, §III.2.2.). Un fonctionnement bactérien « parcimonieux » ne prélevant que les éléments nécessaires à la croissance et la survie de l'espèce est proposé afin d'expliquer les résultats « peu spectaculaires » des GSH en termes d'altération malgré la grande surface spécifique minérale proposée aux bactéries (2 m^2 cm^{-3}). Dans une première phase de carence en minéraux, la production de sidérophores permettrait d'initier l'altération minérale puis elle serait rapidement relayée par la production des petits acides organiques, i.e. les produits du métabolisme bactérien. La combinaison synergique des acides organiques et des sidérophores expliquerait l'efficacité biologique de l'altération minérale comparativement au processus abiotique. Dans ce contexte, les GSH sont des matériaux synthétiques adaptés à l'approfondissement des connaissances sur les mécanismes d'altération minérale par les voies biotiques et abiotiques. Ils facilitent la séparation des phases « solide-liquide » (surnageant de culture et GSH) et « solide-solide » (particules minérales colloïdales et cellules bactériennes). Même si ces phénomènes sont présents dans les environnements naturels, les GSH préviennent la floculation particulaire et la formation d'agrégats cellules bactériennes/particules minérales colloïdales ainsi que le développement de biofilms en surface des minéraux. Les GSH simplifient donc les interactions particules/cellules et permettent d'étudier les processus d'altération dans des phases transitoires et difficiles d'accès lorsque la structure du milieu est instable (agrégation colloïdale dans les environnements aqueux). Ils figent aussi la structure du système afin d'étudier son fonctionnement aux temps longs. En ce sens, ils se rapprochent d'un sol où les particules minérales sont piégées dans une matrice organique et/ou inorganique complexe. Les phénomènes de floculation et de sédimentation dans un sol ne sont pas ceux d'un milieu dispersé agité (type cours d'eau) et la stabilisation des particules dans une matrice siliceuse permet de proposer un matériau poreux qui peut simuler ce type d'environnement. Notamment, le gel permettrait de rétablir des « distances » entre bactéries et particules pour la décomposition des activités des protons, acides organiques et sidérophores… La microscopie électrochimique a permis de mettre en évidence les gradients locaux de protons produits par la bactérie qui pourraient accroître l'efficacité de l'altération minérale.

Limites de l'utilisation des GSH

Nature du matériau. Les GSH sont des matériaux sensibles aux variations physico-chimiques de l'environnement. Cependant, la matrice siliceuse n'est pas inerte et elle est également sensible à l'évolution de la charge des particules minérales ou aux échanges des cations (et de leur sphère d'hydratation) compensateurs de charge entre feuillets et solvant. Ces évènements peuvent se répercuter sur les interactions matrice siliceuse/particules minérales/solvant et générer des variations de volume qui modifient la structure intime du gel.

D'un point de vue macroscopique, l'abrasion mécanique des GSH peut être responsable du relargage de silice colloidale notamment dans des récipients type erlenmeyer utilisés sous forte agitation en conditions de laboratoire. La dissolution chimique de la silice des GSH peut aussi être envisagée même si dans nos conditions de pH acide, ce phénomène peut être considéré comme mineur.

Altération minérale. La structuration du GSH peut être considérée comme trop éloignée du milieu réel et ne pas refléter le fonctionnement d'un environnement naturel. La possibilité de ségrégation des métabolites en fonction de la charge et ou de la taille des pores peut aussi être envisagée comme un point critique.

IV.2. Conclusion générale

L'objectif principal de cette thèse a été d'étudier les interactions entre les microorganismes du sol et les minéraux tout en essayant de mettre en évidence les processus impliqués dans l'altération minérale. L'originalité du travail repose sur l'utilisation de gels de silice hybrides (GSH) dopés en particules colloïdales de smectite ferrifère (2 :1). Pour étudier les processus d'altération microbienne de minéraux, ce nouveau « substrat » mis au point précédemment au laboratoire a été développé dans cette thèse en termes de variations de propriétés de surface et de composition minéralogique.

Dans un premier volet de la thèse, différentes approches physico-chimiques ont été utilisées afin de caractériser la structure et les propriétés des GSH dans des conditions physico-chimiques proches de celles de l'environnement.

La caractérisation de la structure a permis de donner une représentation multi-échelle des GSH qui aboutit à un pool de 10^6 particules minérales/bactérie disponible pour l'altération minérale. Ces particules sont dispersées dans une matrice siliceuse très poreuse et hydratée dont les pores sont de l'ordre de 10 à 50 nm. Les bactéries, de taille micrométrique, ne

peuvent pénétrer dans la porosité du gel et l'altération minérale est la conséquence de la diffusion des métabolites et des protons vers les surfaces minérales. Outre l'utilisation des GSH en milieu liquide, ces supports « substrats » pourraient également être placés en conditions d'a_w compatibles avec la croissance des microorganismes dans le sol. La détection de l'altération minérale est réalisée par des biotests chimiques et nous avons tenté de trouver une alternative non dénaturante qui permettrait de suivre les cinétiques d'altération des GSH sans interruption des expérimentations. Les propriétés optiques de la nontronite (NAu-2) ont ainsi été exploitées dans le but de détecter l'altération « *in situ* ». Les résultats obtenus suggèrent qu'il est possible de mettre en évidence des processus de dissolution type acidolyse ou complexolyse couplés à l'oxydo-réduction de Fe grâce aux bandes caractéristiques de ces processus.

Dans le second volet de la thèse, l'action des micro-organismes sur les GSH a été étudiée en termes de cinétiques de production de métabolites impliqués dans l'altération minérale (acides organiques et sidérophores). Des bactéries, de niches écologiques distinctes, ont été testées en présence de GSH afin d'évaluer si ces conditions *in vitro* pouvaient donner des réponses proches de celles trouvées soit dans le sol soit en contact avec des minéraux sous forme de particules micrométriques en suspension. Afin de mieux comprendre les mécanismes d'altération, les principaux acides organiques produits et un sidérophore témoin ont été utilisés en conditions abiotiques. Dans la même optique, des mutants sidérophores (-) ont été sélectionnés afin d'évaluer leur potentiel d'altération des GSH.

Le pool important de particules colloïdales de grande surface spécifique donne finalement des résultats en altération peu différents de ceux trouvés dans la littérature soit une vitesse de dissolution de Fe (NAu-2) de l'ordre de 10^{-13}-10^{-12} mol m^{-2} s^{-1}. Quantitativement et qualitativement, les profils d'acides organiques varient peu, que les bactéries soient en présence ou non de minéraux dans les GSH. Ainsi, ces productions et excrétions systématiques de métabolites (acides organiques) par les bactéries permettraient une altération « fortuite » des minéraux, procurant à celles-ci l'esentiel des éléments indispensables à leur survie et à leur croissance. Toutefois, la production spécifique de sidérophores en conditions carencées accroît significativement le potentiel d'altération des bactéries, en assurant, probablement via une complexation très efficace, une meilleure solubilité au fer libéré par attaque acide au sein du gel. La synthèse excessive d'exopolysaccharides influence également

le potentiel d'altération des bactéries et l'hypothèse de la réduction de la diffusion des ions et métabolites à l'interface bactéries/GSH est proposée.
Afin d'étudier les interfaces « humides » air/bactéries/GSH, la microscopie électrochimique (SECM) a été appliquée. L'intérêt de cette technique, est de sonder l'activité métabolique via la variation de concentration d'une espèce caractéristique (ici, H^+). L'existence de gradients locaux de protons générés par les bactéries est mis en évidence. Par rapport à une solution à concentration homogène, la création de tels gradients par voie biologique est susceptible de renforcer l'efficacité de la dissolution bactérienne.

IV.3. Perspectives d'étude

Les perspectives d'étude sont nombreuses mais, dans un premier temps il semble important d'améliorer la mise en évidence des phénomènes d'altération puis de diversifier les matériaux pour des applications spécifiques.
L'étude approfondie des propriétés optiques de la nontronite dispersée dans les GSH pourrait permettre de concevoir un matériau révélateur des différents mécanismes d'altération mis en jeu : acidolyse-complexolyse et/ou oxydo-réduction.

Le suivi des gradients d'altération des particules minérales de la périphérie au cœur des GSH pourrait traduire les différentes étapes de l'altération minérale. Ceci pourrait être réalisé notamment par spectroscopie RAMAN dont les premiers essais réalisés dans le cadre de ce travail sont prometteurs.

Afin d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes de l'altération minérale, il faudrait étudier la spéciation des éléments après dissolution (Fe, Al,…) sorbés ou adsorbés sur la matrice siliceuse. La présence d'oxy-hydroxydes de fer devrait être également recherchée. Les techniques d'extraction sélective et séquentielle employées pour caractériser les compartiments minéraux dans les sols pourraient être utilisées aussi pour les GSH comme suit : extraction des fractions échangeables par des sels ioniques (e.g. KCl), puis dissolution des colloïdes de fer amorphes ou bien cristallisés par des agents réducteurs ou complexants (hydroxylamine, citrate, dithionite à pH7 en condition ménagée). Dans ce travail, seule la fraction soluble de fer a été distinguée de la fraction retenue (précipitée ou adsorbée) dans les gels après action conjointe du KCl et de NH_2OH.

Tester les GSH sur le terrain n'a pas été réalisé dans ce travail, seuls des essais préliminaires ont montré la faisabilité de mesurer la dissolution de particules minérales dans les GSH placés en colonnes remplies de billes de verre dans des conditions de débit d'éluant très faibles. Afin de pouvoir mesurer l'altération minérale après séjour dans un sol, il serait important de développer une méthode d'analyse indirecte. Par exemple, une dissolution en conditions abiotiques par HNO_3 à pH 1,5 permettrait de doser le fer dans le GSH par rapport à un témoin et d'en déduire indirectement le fer dissocié. La dissolution du fer dans ce cadre, serait la résultante de l'activité des microorganismes mais aussi des racines des plantes. L'étude de la nutrition des plantes avec la distribution de minéraux naturels ou de synthèse via les GSH pourrait être facilement développée.

La diversification physico-chimique des GSH exploré dans ce travail de thèse a porté sur le mélange en proportions variables de deux précurseurs alkoxydes. Il serait possible d'optimiser les formulations afin de moduler le caractère hydrophobe et la charge électrostatique du gel, voire sa porosité en utilisant des « agents structurants » ayant des encombrements stériques plus ou moins importants (*e.g* tensioactif). Dans ce cadre, le domaine de la chimie des polymères ouvre un large champ d'investigation à la création de matériaux hybrides, aux interfaces biocompatibles, destinées à des applications biologiques pour l'environnement.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques hors publications

-A-

Albrecht-Gary, A.M., Blanc, S., Rochel, N., Ocaktan, A.Z., Abdallah, M.A., 1994. Bacterial iron transport - coordination properties of pyoverdin Paa, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. Inorganic Chemistry 33, 6391-6402.

Amrhein, C., Suarez, D.L., 1988. The use of a surface complexation model to describe the kinetics of ligand-promoted dissolution of anorthite. Geochimica et Cosmochimica Acta 52, 2785–2793.

-B-

Balland C., 2010. Caractérisation expérimentale des relations entre les bactéries des sols, les Phyllosilicates et les solutions : Modélisation et Rôle des Paramètres Environnementaux. Thèse de doctorat de l'Université Henri Poincaré (Nancy 1). 278p.

Balland, C., Poszwa, a., Leyval, C., Mustin, C., 2010. Dissolution rates of phyllosilicates as a function of bacterial metabolic diversity. Geochimica Cosmochimica Acta 74, 5478–5493.

Barker, W.W., Welch, S.A., Banfield, J.F., 1997. Biogeochemical weathering of silicate minerals. Reviews in Mineralogy and Geochemistry 35, 391–428.

Barker, W.W., Banfield, J.F., 1998. Zones of Chemical and Physical Interaction at Interfaces Between Microbial Communities and Minerals : A Model. Geomicrobiology Journal 15, 223–244.

Barker, W.W., Welch, S.A., Chu, S., Banfield, J.F., 1998. Experimental observations of the effects of bacteria on aluminosilicate weathering. American mineralogist 83, 1551–1563.

Bertoncello, P., 2010. Advances on scanning electrochemical microscopy (SECM) for energy. Energy & Environmental Science 3, 1620 p.

Brinker, C.J., Scherer, G.W., 1990. Sol-gel science: the physics and and chemistry of sol-gel processing, Academic P. ed. United Kingdom Edition.

Barker, W.W., Banfield, J.F., 1996. Biologically versus inorganically mediated weathering reactions : relationships between minerals and extracellular microbial polymers in lithobiontic communities. Chemical Geology 132, 55–69.

Bennett, P.C., Melcer, M.E., Siegel, D.I., Hassett, J.P., 1988. The dissolution of quartz in dilute aqueous solutions of organic acids at 25°C. Geochimica et Cosmochimica Acta 52, 1521–1530.

Benzerara, K., Morin, G., Yoon, T.H., Miot, J., Tyliszczak, T., Casiot, C., Bruneel, O., Farges, F., Brown, G.E. J.r., 2008. Nanoscale study of As biomineralization in an acid mine drainage system. Geochimica et Cosmochimica Acta 72, 3949–3963.

Bonneau, M., Souchier, B., 1979. Pédologie: Constituants et propriétés du sol, MASSON, Pa. ed.

Brandt, F., Bosbach, D., Krawczyk-Bärsch, E., Arnold, T., Bernhard, G., 2003. Chlorite dissolution in the acid ph-range: a combined microscopic and macroscopic approach. Geochimica Cosmochimica Acta 67, 1451–1461.

Breemen, N.V.A.N., Finlay, R., Lundström, U., Jongmans, A.G., Giesler, R., Olsson, M., 2000. Mycorrhizal weathering : A true case of mineral plant nutrition ? Biogeochemistry 49, 53–67.

Buss, H.L., Lüttge, A., Brantley, S.L., 2007. Etch pit formation on iron silicate surfaces during siderophore-promoted dissolution. Chemical Geology 240, 326–342.

-C-

Calvaruso, C., Mareschal, L., Turpault, M.P., Leclerc, E., 2009. Rapid Clay Weathering in the Rhizosphere of Norway spruce and Oak in an Acid Forest Ecosystem. Soil Science Society of America Journal 73, 331–338.

Calvaruso, C., Turpault, M., Frey-klett, P., 2006. Root-Associated Bacteria Contribute to Mineral Weathering and to Mineral Nutrition in Trees : a Budgeting Analysis. Applied and environmental microbiology 72, 1258–1266.

Charlot, G., 1983. Les réactions chimiques en solution aqueuse et caractérisaion des ions, MASSON. ed. 7e édition refondue. 413p.

Chen, F., Li, J.Y., Guo, Y.B., Wang, J.H., Wang, H.M., 2009. Biological control of grapevine crown gall: purification and partial characterisation of an antibacterial substance produced by *Rahnella aquatilis* strain HX2. European Journal of Plant Pathology 124, 427–437.

Cihlar, J., 1993. Hydrolysis and polycondensation of ethyl silicates. 1. Effect of pH and catalyst on the hydrolysis and polycondensation of tetraethoxysilane (TEOS). Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 70, 239–251.

Coker, V.S., Byrne, J.M., Telling, N.D., Van Der Laan, G., Lloyd, J.R., Hitchcock, A. P., Wang, J., Pattrick, R. A. D., 2012. Characterisation of the dissimilatory reduction of Fe (III)-oxyhydroxide at the microbe - mineral interface: the application of STXM-XMCD. Geobiology 10, 347–354.

-D-

Dakora, F.D., Phillips, D.A., 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. Plant and Soil 245, 35–47.

Darrah, P.R., 1993. The rhizosphere and plant nutrition : a quantitative approach. Plant and Soil 155/156, 1–20.

Delineau, T., 1994. Les argiles kaoliniques du bassin des Charentes (France): analyses typologique, cristallo-chimique, spéciation du fer et applications. Nancy (INPL) 2ième volume. 627 p.

Drever, J.I., Stillings, L.L., 1997. The role of organic acids in mineral weathering. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 120, 167–181.

Dong, H., Kostka, J.E., Kim, J.W., 2003. Microscopic evidence for microbial dissolution of smectite. Clays Clay Miner 51, 502–512.

Duchaufour, P., 1970. Précis de Pédologie, MASSON. 3ème édition

Duchaufour, P., 1997. Abrégé de Pédologie, MASSON. 5ème édition.

-E-

Eberl, L., Schulze, R., Ammendola, A., Geisenberger, O., Erhart, R., Stenberg, C., Molin, S., Amann, R., 1997. Use of green fluorescent protein as a marker for ecological studies of activated sludge communities. FEMS Microbiology Letters 149, 77–83.

Ehrlich, H.L., 1981. Geomicrobiology, 393 p. Marcel Dekker, New York.

Emmerling, A., Petricevic, R., Beck, A., Wang, P., Scheller, H., Fricke, J., 1995. Relationship between optical transparency and nanostructural features of silica aerogels. Journal Of Non-Crystalline Solids 185: 3, 240-248.

Esnault, L., 2010. Réactivité geomicrobiologique des matériaux et minéraux ferrifères: conséquences sur l'évolution à long terme des matériaux d'un stockage de déchets radioactifs en milieu argileux. Thèse de Doctorat de l'université Henri Poincaré (Nancy 1) 258p.

-F-

Felske, A., Akkermans, A.D.L., De Vos, W.M., 1998. Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. Applied And Environmental Microbiology 64: 11, 4581-4587.

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

Ferris, F.G., Schultze, S., Witten, T.C., Fyfe, W.S., 1989. Metal Interactions with Microbial Biofilms in Acidic and Neutral pH Environments. Applied and environmental microbiology 55, 1249-1257.

Freltoft, T., Kjems, J. K., Sinha, S. K., 1986. Power-law correlations and finite-size effects in silica particle aggregates studied by small-angle neutron scattering. Physical review B 33, 269–275.

Frey-Klett, P., Chavatte, M., Clausse, M.-L., Courrier, S., Le Roux, C., Raaijmakers, J., Martinotti, M.G., Pierrat, J.-C., Garbaye, J., 2005. Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. The New phytologist 165, 317–28.

-G-

Gardner, W.K., Barber, D.A., Parbery, D.G., Lupins, C.I., Polymers, L.P., 1983. The acquisition of phosphorus by Lupinus albus L. III. The probable mechanism by which phosphorus movement in the soil / root interface is enhanced. Plant and Soil 124, 107–124.

Gates, W. P., Slade, P. G., Manceau, A., Lanson, B., 2002. Clays Clay Miner. Site occupancies by iron in nontronites 50, 223-239.

Gates, W.P., Bouazza, a., 2010. Bentonite transformations in strongly alkaline solutions. Geotextiles and Geomembranes 28, 219–225.

Gobat, J.M., Aragnon, M., Mattey, W., 2010. Le sol vivant: Bases de pédologie-biologie des sols., 3rd ed.

Goldstein, A., Braverman, K., Osorio, N., 1999. Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) rhizobacterium. FEMS Microbiology Ecology 30, 295–300.

Golubev, S. V., Bauer, A., Pokrovsky, O.S., 2006. Effect of pH and organic ligands on the kinetics of smectite dissolution at 25°C. Geochimica et Cosmochimica Acta 70, 4436–4451.

Gorbushina, A. a, 2007. Life on the rocks. Environmental microbiology 9, 1613–31.

Gottschalk, G., 1986. Bacterial Fermentation. Springer series in Microbiology 208–282.

Guo, Y., Jiao, Z., Li, L., Wu, D., Crowley, D.E., Wang, Y., Wu, W., 2012. Draft genome sequence of Rahnella aquatilis strain HX2, a plant growth-promoting rhizobacterium isolated from vineyard soil in Beijing, China. Journal of Bacteriology 194 (23), 6646-6647.

Grybos, M., Michot, L.J., Skiba, M., Billard, P., Mustin, C., 2010. Dissolution of anisotropic colloidal mineral particles: evidence for basal surface reactivity of nontronite. Journal of colloid and interface science 343, 433–8.

Grybos, M., Billard, P., Desobry-Banon, S., Michot, L.J., Lenain, J.F., Mustin, C., 2011. Bio-dissolution of colloidal-size clay minerals entrapped in microporous silica gels. Journal of colloid and interface sciences 362, 317–24.

-H-

Haack, E. A., Johnston C.T., Maurice P.A., 2008. Mechanisms of siderophore sorption to smectite and siderophore-enhanced release of structural Fe3+. Geochimica et Cosmochimica Acta 72(14): 3381-3397.

Haynes, R.J., 1990. Active ion uptake and maintenance of cation-anion balance : A critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. Plant and Soil 264, 247–264.

Hense, B.A., Kuttler, C., Müller, J., Rothballer, M., Hartmann, A., Kreft, J.U., 2007. Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? Nature reviews. Microbiology 5, 230–9.

Hernandez, M.E. and Newman, D.K., 2001. Extracellular electron transfer. Cellular and Molecular Life Sciences 58, 1562-1571.

Hersman, L., Lloyd, T., Sposito, G., 1995. Siderophore-promoted dissolution of hematite. Geochimica Cosmochimica Acta 59**,** 3327-3330.

Hider, R.C., Kong, X., 2010. Chemistry and biology of siderophores. Natural product reports 27, 637–57.

-I-

Illmer, P., Schinner, F., 1995. Solubilization of Inorganic Calcium Phosphates- Solubilization Mecanisms. Soil Biology and Biochemistry 27, 257–263.

-J-

Jaisi, D.P., Kukkadapu, R.K., Eberl, D.D., Dong, H., 2005. Control of Fe(III) site occupancy on the rate and extent of microbial reduction of Fe(III) in nontronite. Geochimica et Cosmochimica Acta 69, 5429–5440.

Jaisi, D.P., Dong, H., Kim, J., He, Z., Morton, J.P., 2007. Nontronite particle aggregation induced by microbial Fe(III) reduction and exopolysaccharide production. Clays and Clay Minerals 55, 96–107.

Jaisi, D.P., Dong, H., Liu, C., 2007. Influence of biogenic Fe(II) on the extent of microbial reduction of Fe(III) in clay minerals nontronite, illite, and chlorite. Geochimica et Cosmochimica Acta 71, 1145–1158.

Jeanroy, E., 1983. Diagnostic des formes du fer dans les pédogénèses tempérées: evaluation par les reactifs chimiques d'extraction et apport de la spectrometrie massbauer.

Jones, D.L., 1998. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. Plant and Soil 205, 25–44.

Jones, D.L., Darrah, P.R., 1994. Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. Plant and Soil 166, 247–257.

Jones, D.L., Dennis, P.G., Owen, a. G., Van Hees, P. a. W., 2003. Organic acid behavior in soils – misconceptions and knowledge gaps. Plant and Soil 248, 31–41.

Jones, D.L., Hodge, A., Kuzyakov, Y., 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. New Phytologist 163, 459–480.

-K-

Kalinowski, B.E., Liermann, L.J., Givens, S., Brantley, S.L., 2000. Rates of bacteria-promoted solubilization of Fe from minerals: a review of problems and approaches. Chemical Geology 169, 357–370.

Kalinowski, B.E., Schweda, P., 1996. Kinetics of muscovite, phlogopite, and biotite dissolution and alteration at pH 1–4, room temperature. Geochimica et Cosmochimica Acta 60, 367–385.

Keeling, J.L., Raven, M.D., Gates, W.P., 2000. Geology and characterization of two hydrothermal nontronites from weathered metamorphic rocks at the Uley graphite mine, South Australia. Clays and Clay Minerals 48, 535–548.

Komeili A., 2007. Molecular mechanisms of magnetosome formation, Annual Review of Biochemistry 76, 351–366.

Konhauser, K.O., Schultze, S.L., Ferris, F.G., Fyfe, W.S., Longstaffe, F.J., Beveridge, T.J., 1994. Mineral Precipitation by Epilithic Biofilms in the Mineral Precipitation by Epilithic Biofilms in the Speed River, Ontario, Canada. Applied and environmental microbiology 60, 549–533.

Kostka, J.E., WU, J., Nealson, K.H. and Stucki, J.W., 1999. The impact of structural Fe(III) reduction by bacteria on the surface chemistry of smectite clay minerals. Geochimica Cosmochimica Acta 63(22), 3705-3713.

Kraemer, S.M., 2004. Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. Aquatic Sciences - Research Across Boundaries 66, 3–18.

-L-

Lantenois, S., 2003. Réactivité fer métal/smectites en milieu hydraté à 80°C. Thèse de doctorat de l'Université d'Orléans.188p.

Latour, X., Lemanceau, P., 1998. Métabolisme carboné et énergitique des Pseudomonas spp fluorescents saprophytes à oxydase positive. Agronomie 427–443.

Leyval, C., Berthelin, J., 1991. Weathering of a mica by Roots and Rhizospheric Microorganisms of pine. Soil science society of amecrica journal 55, 1009–1016.

Li, Y.L., Vali, H., Yang, J., Phelps, T.J., Zhang, C.L., 2006. Reduction of Iron Oxides Enhanced by a Sulfate-Reducing Bacterium and Biogenic H 2 S. Geomicrobiology Journal 23, 103–117.

Lovley, D.R., Coates, J.D., 2000. Novel forms of anaerobic respiration of environmental relevance: Current Opinion Microbiology 3, 252-256.

-M-

Martinez, R.J., Bruce, D., Detter, C., Goodwin, L.A., Han, J., Han, C.S., Held, B., Land, M.L., Mikhailova, N., Nolan, M., Pennacchio, L., Pitluck, S., Tapia, R., Woyke, T., Sobecky, P.A., 2012 a. Complete genome sequence of Rahnella sp. strain Y9602, a gammaproteobacterium isolate from metal- and radionuclide-contaminated soil. Journal of Bacteriology 194, 2113-2114.

Martinez, R.J., Bruce, D., Detter, C., Goodwin, L.A., Han, J., Han, C.S., Held, B., Land, M.L., Mikhailova, N., Nolan, M., Pennacchio, L., Pitluck, S., Tapia, R., Woyke, T., Sobecky, P.A., 2012 b. Complete genome sequence of Rahnella aquatilis CIP 78.65 Journal of Bacteriology 194 (11), 3020-3021.

Marschner, H., 1995. Mineral nutrition of higher plants, Academic p. ed.

Merola, R., McGuire, M. M., 2009. Crystallographic site distribution and redox activity of Fe in nontronites determined by optical spectroscopy. Clays and Clay Minerals 57(6), 771-778.

Michaux, F., 2009. Contribution des tensioactifs fluorés à la synthèse de matériaux mésoporeux. Application à la conception d'un bioréacteur. Thèse doctorale de l'Université Henri Poincaré (Nancy 1) 235p.

Milagres, A.M.F., Machuca, A., Napoleao, D., 1999. Methods Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. Journal of microbiological methods 37, 1–6.

Michot, L.J., Bihannic, I., Maddi, S., Baravian, C., Levitz, P., Davidson, P., 2008. Sol/gel and isotropic/nematic transitions in aqueous suspensions of natural nontronite clay. Influence of particle anisotropy. 1. Features of the i/n transition. Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids 24, 3127–39.

Miot, J., Benzerara, K., Morin, G., Kappler, A., Bernard, S., Obst, M., Férard, C., Skouri-Panet, F., Guigner, J.-M., Posth, N., Galvez, M., Brown, G.E., Guyot, F., 2009. Iron biomineralization by anaerobic neutrophilic iron-oxidizing bacteria. Geochimica et Cosmochimica Acta 73, 696–711.

Miot, J., Maclellan, K., Benzerara, K., Boisset, N., 2011. Preservation of protein globules and peptidoglycan in the mineralized cell wall of nitrate-reducing, iron (II)-oxidizing bacteria: a cryo-electron microscopy study Geobiology 9, 459–470.

-N-

Neijssel, O.M., Tempest, D.W., 1975. The regulation of carbohydrate metabolism in Klebsiella aerogenes NCTC 418 organisms, growing in chemostat culture. Archives of Microbiology 106, 251–8.

Newman, D.K., and Kolter, R., 2000. A role for excreted quinones in extracellular electron transfer: Nature 405, 94-7.

Nguyen, C., 2003. Rhizodeposition of Organic C by Plant : Mechanisms. Agronomie 23, 97–123.

-O-

Oulkadi, D., Yemloul, M., Desobry-Banon, S., Canet, D., 2013. Water behavior in hybrid silica gels as studied by ^{1}H Nuclear Magnetic Resonance relaxometry. Evidence of two hydration layers. Microporous and Mesoporous Materials 172, 213-216.

O'Reilly, S. E., Furukawa, Y., Newell, S., 2006. Dissolution and microbial Fe (III) reduction of nontronite (NAu-1). Chemical Geology 235, 1-11.

-P-

Paris, F., Botton, B., Lapeyrie, F., 1996. In vitro weathering of phlogopite by ectomycorrhizal fungi: Effect of K+ and Mg+2 dificiency and N sources on accumulation of oxalate and H+. Plant and Soil 179, 141–150.

Patel, D.K., Murawala, P., Archana, G., Kumar, G.N., 2011. Repression of mineral phosphate solubilizing phenotype in the presence of weak organic acids in plant growth promoting fluorescent pseudomonads. Bioresource Technology 102, 3055–3061.

Payne, S.M., 1994. Detection, isolation, and characterization of siderophores. Methods in enzymology 235, 329–44.

Pelmont, J., 1993. Bactéries et environnement. Adaptations physiologiques. Presses Universitaires de Grenoble.

Perronnet, M., 2004. Réactivité des matériaux argileux dans un contexte de corrosion métallique: Application au stockage des déchets radioactifs en site argileux. Thèse de doctorat de l'Université Henri Poincaré (Nancy 1). 283p.

Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L.S., Fernández, F.J., 2007. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. Journal of microbiological methods 70, 127–31.

Petit, S., Robert, J.-L., Decarreau, A., Besson, G., Grauby, O., Martin, F., 1995. Apport des méthodes spectroscopiques à la caractérisation des phyllosilicates 2:1. Bulletin des Centres de Recherches Exploration-Production Elf Aquitaine 19, 119-147.

Puente, M.E., Bashan, Y., Li, C.Y., Lebsky, V.K., 2004. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. Plant biology 6, 629–42.

Powell, P.E., Cline, G.R., Reid, C.P.P., Szaniszlo, P.J., 1980. Occurrence of hydroxamate siderophore iron chelators in soils. Nature 287, 833-834.

-R-

Ribeiro, F.R., Fabris, J.D., Kostka, J.E., Komadel, P., Stucki, J.W., 2009. Comparisons of structural iron reduction in smectites by bacteria and dithionite: II. A variable-temperature Moüssbauer spectroscopic study of Garfield nontronite. Pure and Applied Chemistry 81, 1499– 1509.

Robert, M., Berthelin, J., 1986. Role of biological et Biochemical factors in soil mineral weathering. Soil science society of America 12, 453-495.

Rodriguez, H., Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances 17(4-5), 319-339.

Rogers, J.R., Bennett, P.C., 2004. Mineral stimulation of subsurface microorganisms: release of limiting nutrients from silicates. Chemical Geology 203, 91–108.

-S-

Sambrook, J., Russell, D.W., 2000. Molecular cloning: A laboratory manual, Third Edit. ed.

Sandy, M., Butler, A., 2009. Microbial iron acquisition: Marine and Terrestrial Siderophores. Chemical reviews 109, 4580–4595.

Schaefer, M., Gorski C., Scherer, M., 2011. Spectroscopic Evidence for Interfacial Fe(II)-Fe(III) Electron Transfer in a Clay Mineral. Environmental Science and Technology 45, 540–545.

Schalk, I.J., Abdallah, M.A., Pattus, F., 2002. Recycling of pyoverdin on the FpvA receptor after ferric pyoverdin uptake and dissociation in Pseudomonas aeruginosa. Biochemistry 41, 1663- 1671.

Schleissner, C., Reglero, A., Luengo, J.M., 1997. Catabolism of D-glucose by Pseudomonas putida U occurs via extracellular transformation into D-gluconic acid and induction of a specific gluconate transport system. Microbiology 143, 1595–1603.

Schröder, I., Johnson, E., Simon de Vries, 2003. Microbial ferric iron reductases. FEMS Microbiology Reviews 27, 427-447.

Schwyn, B., Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore. Analytical Biochemistry 160, 47–56.

Silverman, M.P., Ehrlich, H.L., 1964. Advances In Applied Microbiology 6, 153-206.

Sharma, V., Kumar, V., Archana, G., Kumar, G.N., 2005. Substrate specificity of glucose dehydrogenase (GDH) of Enterobacter asburiae PSI3 and rock phosphate solubilization with GDH substrates as C sources. Canadian Journal of Microbiology 51 (6), 477-482.

Sherman, D.M., Vergo, N., 1988. Optical (diffuse reflectance) and Mössbauer study of nontronite and related Fe-bearing smectites. American Mineralogist 73, 1346-1354.

Sokolova, T.A., 2011. The role of soil biota in the weathering of minerals: A review of literature. Eurasian Soil Science 44, 56–72.

Stillings, L.L., Drever, J.I., Brantley, S.L., Sun, Y., Oxburgh, R., 1996. Rates of feldspar dissolution at pH 3 - 7 with 0 - 8 m M oxalic acid. Ghemical Geology 132, 79–89.

Stucki, J.W., 2011. A review of the effects of iron redox cycles on smectite properties. Comptes Rendus Geoscience 343, 199–209.

Stumm, W., Morgan, J.J., 1981. Aquatic chemistry: an introducing emphasizing. Chemical Equilibria in natural waters 2nd Ed John Wiley & Sons, Inc, USA, 583 pp

Stumm, W., 1992. Solid-water interface. Processes at the mineral-water and particle-water interface in natural systems. John Willey, 427p.

Suarez, A., Güttler, A., Strätz, M., Staendner, L.H., Timmis, K.N., Guzmán, C. a., 1997. Green fluorescent protein-based reporter systems for genetic analysis of bacteria including monocopy applications. Gene 196, 69–74.

Suquet, H., Malard, C., Copin, E., Pézerat, H., 1981. Variation du paramètre b et de la distance basale d001 dans une série de saponites à charge croissante : 1. Etats hydratés. Clay Minerals 16, 53-67.

-T-

Teixeira, J., 1988. Small-angle scattering by fractal systems -Journal of Applied Crystallography 21, 781– 785.

Tempest, D.W., Neijssel, O.M., 1992. Physiological and energetic aspects of bacterial metabolite overproduction. FEMS microbiology letters 79, 169–76.

Toro, M., Azcon, R., Barea, J., 1997. Improvement of Arbuscular Mycorrhiza Development by Inoculation of Soil with Phosphate-Solubilizing Rhizobacteria To Improve Rock Phosphate Bioavailability (32P) and Nutrient Cycling. Applied and environmental microbiology 63, 4408–4412.

-U-

Ullman, W.J., Kirchman, D.L., Welch, S. a., Vandevivere, P., 1996. Laboratory evidence for microbially mediated silicate mineral dissolution in nature. Chemical Geology 132, 11–17.

Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.P., Frey-Klett, P., 2009. Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. Trends in microbiology 17, 378–87.

Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.P., Pierrat, J.C., Mustin, C., Frey-Klett, P., 2007. Effect of the mycorrhizosphere on the genotypic and metabolic diversity of the bacterial communities involved in mineral weathering in a forest soil. Applied and environmental microbiology 73, 3019–27.

Uroz, S., Oger, P., Lepleux, C., Collignon, C., Frey-Klett, P., Turpault, M.-P., 2011. Bacterial weathering and its contribution to nutrient cycling in temperate forest ecosystems. Research in microbiology 162, 820–31.

-V-

Vantelon, D., Montarges-Pelletier, E., Michot, L.J., Pelletier, M., Thomas, F., Briois, V., 2003. Iron distribution in the octahedral sheet of dioctahedral smectites. An Fe K-edge X-ray absorption spectroscopy study. Physics and Chemistry of Minerals 30, 44–53.

Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M.E., Lopez-Cortes, a., Bashan, Y., 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. Biology and Fertility of Soils 30, 460–468.

Visca P., Imperi F., Lamont I., 2007. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. Trends in Microbiology 15, 22-30.

Villieras, F., 1993. Etude des modifications des propriétés du talc et de la chlorite par traitement thermique. Nancy (INPL) 2ième volume, 568 p.

-W-

Welch, S.A., Taunton, A.E., Banfield, J.F., 2002. Effect of Microorganisms and Microbial Metabolites on Apatite Dissolution. Geomicrobiology Journal 19 (25), 343–367.

Welch, S.A., Ullman, W.J., 1999. The effect of microbial glucose metabolism on bytownite feldspar dissolution rates between 5 ° and 35 ° C. Geochimica et Cosmochimica Acta 63, 3247–3259.

Welch, S.A., Ullman, W.J., 2000. The temperature dependence of bytownite feldspar dissolution in neutral aqueous solutions of inorganic and organic ligands at low temperature 5 – 358°C . Chemical Geology 167, 337–354.

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

Wieland, E., Wehrli, B., Stumm, W., 1988. The coordination chemistry of weathering: III. A generalization on the dissolution rates of minerals. Geochimica et Cosmochimica Acta 52, 1969–1981.

-Y-

Yeterian, E., Martin, L.W., Guillon, L., Journet, L., Lamont, I.L., Schalk, I.J., 2009. Synthesis of the siderophore pyoverdine in Pseudomonas aeruginosa involves a periplasmic maturation. Amino acids 38, 1447-1459.

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Liste des figures hors publications

Chapitre I

Figure I.1 : Interaction rhizosphérique entre les microorganismes du sol-les racines des plante et les minéraux associés aux racines

Figure I.2 : Effets des exsudats racinaires sur la disponibilité des nutriments pour les plantes et les microorganismes de la rhizosphère

Figure I.3 : Structure tridimensionnelle d'une smectite potassique (TOT) possédant une distance basale de 10 Å

Figures I.4: Structure de sidérophores de type (a) tris-catécholates, (b) tris-hydroxamates (desferrioxamines) et (c) tris-a-hydroxycarboxylate (achromobactin)

Figure I.5 : Principales réactions d'oxydo-réduction catalysées par les microorganismes du sol

Figure I.6 : Diagramme de Pourbaix (*Eh/*pH) du Fer

Figure I.7 : Illustration du changement de couleur de jaune à bleu-vert par réduction, dans une smectite riche en fer

Figure I.8 : Spectres de réflectance diffuse (convertie en absorbance) d'une smectite riche en fer, inaltérée, réduite et réduite-réoxydée avec utilisation de dithionite comme agent réducteur

Figure I.9 : Illustration des changements de structure et de distribution du Fe dans le feuillet octaédrique d'une nontronite de Garfield

Figure I.10 : Spectres Mössbauer de Nau-2 à 13K avant et après réaction avec une solution de ^{56}Fe (II)

Figure I.11 : Images en cryo-electron microscopie de sections vitreuses (CEMOVIS) de cellules bactériennes BoFeN1 à différents stades de minéralisation.

Figure I.12: Schéma de l'activité microbienne

Chapitre II

Figure II.1 : Variation du temps de gélification et de stabilité des sols
Figures II.2 : Valeurs de pH (A) et de temps (B) pour la phase d'hydrolyse ; valeurs de pH (C) et de temps (D) pour la phase de condensation des sols en gels
Figures II.3 : Préparation de GSH dopés en NAu-2

Figure II.4 : Schéma d'un tube RX et d'un montage SAXS

Figure II.5 : Instrument SAXSess mc² (Anton Paar) pour l'analyse de la structure des GSH par SAXS

Figure II.6 : Facteurs de forme P(q) de Debye-Bueche et Emmerling, et facteur de forme d'une Sphère

Figure II.7 : Instrument DVS pour l'analyse de la sorption et désorption d'eau par les GSH

Figure II.8 : Schéma de principe de la mesure du coefficient d'auto-diffusion par RMN

Figure II.9 : Exemple de courbe de diffusion I=f (g)

Figure II.10 : Aimantation nucléaire à l'équilibre et après basculement de l'aimantation nucléaire par un angle a

Figure II.11 : Schéma représentatif de l'expérience en SECM
Figure II.12: Représentation schématique de l'expérience de microscopie à sonde électrochimique

Figure II.13 : Variation du pH en fonction de la distance pour le traitement avec *Burkholderia sp*. (G5)

Chapitre III

Figure III.1 : Représentation log-log de l'intensité diffusée en cm^{-1} par les GSH en fonction du vecteur d'onde q

Figures III.2 : Représentation log-log de l'intensité diffusée en fonction du vecteur d'onde q et indication des droites des deux domaines de loi en puissance pour les différents temps de vieillissement des gels

Figure III.3 : Représentation schématique des unités de base la matrice siliceuse des GSH. Réseau fractal de particules primaires de silice de taille nanométrique

Figure III.4: Représentation log-log de I vs q des valeurs expérimentales et modélisées selon la combinaison facteur de structure de Teixeira (FS) et facteur de forme Sphère (FF) en fonction du temps de vieillissement des gels

Figures III.5 : Représentation log-log de I vs q des valeurs expérimentales et modélisées selon la combinaison facteur de structure de Teixeira (FS) et facteur de forme Sphère (FF) avant (a) et après traitement par autoclave des gels (b et c)

Figure III.6 : Représentation des couches de molécules d'eau en interaction avec la matrice de silice des GSH mises en évidence par relaxométrie en RMN du proton (^{1}H)

Figure III.7 : Mise en évidence des interactions bactéries/particules minérales colloïdales au sein du réseau de silice micro et mésoporeux via la diffusion de métabolites

Figure III.8 : Position des sites d'insertion de Tn5-gfp chez les mutants RA1 affectés dans la production de sidérophores sur une carte du génome de *Rahnella sp*. Y9602

Figures III.9 : Quantité de sidérophores produits par *Rahnella aquatilis* RA1 et les clones C7, B8, B12, F9 et A6

Figures III.10 : Fer total dissocié de GSH dopés en particules NAu-2 de taille 4 et de taille 1
Figure III.11 : GSH à 100% TEOS après 1 semaine d'équilibre dans une solution contenant soit du Bleu Dextran (MW 2 000 000) soit du cytochrome C (MW 12 400)

Figure III.12 : Fer total dissocié en fonction de la concentration en particules de NAu-2 dans des GSH à taux variables de MTMS

Figures III.13 : Spectres UV-Vis par transmittance de gels de silice hybrides dopés en nontronite (GIH NAu-2 et GIH NAu-1) et d'un gel de silice sans particules (GIH)

Figures III.14 : Spectres UV-Vis par transmittance de μGSH dopés en NAu-2 de taille 4 à 100% TEOS et 5% MTMS (A), à 10% et 20% MTMS (B)

Figures III.15 : Spectres UV-Vis par transmittance de μGSH dopés en NAu-2 de taille 4 à 100% TEOS (A) et 5% MTMS (B) altérés par *Rahnella aquatilis* RA1 (...) ou *Burkholderia sp.* G5 (−−) avec le témoin (—)

Chapitre IV

Figure IV.1 : Représentation multi-échelle des GSH. Echelle macroscopique, échelle mésoscopique et l'échelle nanoscopique

Liste des tableaux hors publications

Chapitre I

Tableau I.1 : Classification des phyllosilicates en fonction du type de feuillet, du déficit de charge du feuillet (X) et de sa localisation (Tétraédrique ou octaédrique) ainsi que du taux d'occupation des sites octaédriques

Chapitre II

Tableau II.1: Récapitulatif des volumes (en ml) de chaque solution et suspension minérale utilisées pour la préparation des gels de silice hybrides

Tableau II.2 : Paramètres morphométriques des fractions minérales NAu-2 analysées par MET

Tableau II.3 : Caractéristiques d'identification des 3 souches bactériennes utilisées dans les expérimentations biotiques de la thèse

Chapitre III

Tableau III.1 : Indication du domaine en q de pente égale à 2.25 et valeur en q du cross-over des deux domaines de loi en puissance

Tableau III.2 : Valeurs calculées d'après les 6 modèles de Teixeira et de Freltoft appliqués aux courbes expérimentales préalablement lissées

Tableau III.3 : Comparaison dans la base de données GenBank (programme BlastN) des séquences bordant les sites d'insertion de Tn5-gfp des mutants affectés dans la production de sidérophores

Tableau III.4 : Formules structurales des nontronites NAu-2 et NAu-1

Résumé :

Ce travail concerne l'étude des interactions bactéries /silicates grâce à de nouveaux matériaux ou gels de silice hybrides dopés en particules colloïdales de smectites (GSH). Les deux objectifs principaux sont la caractérisation physicochimique des GSH et l'amélioration des connaissances sur les mécanismes de l'altération minérale grâce aux GSH. Dans le premier volet de la thèse, nous avons ainsi pu mettre en évidence que le gel est constitué d'une matrice siliceuse particulaire de nature fractale dans laquelle les particules minérales sont dispersées. La structure des GSH est stabilisée par le traitement hydrothermal choisi (type autoclave). Selon la composition en précurseurs de silice, les GSH présentent des isothermes de sorption et de désorption d'eau distincts. La relaxométrie RMN a démontré également les variations d'interaction de l'eau avec la matrice siliceuse des gels en fonction de leur teneur en précurseurs hydrophobes. Dans le second volet de la thèse, l'altération minérale est étudiée pour des GSH à concentration variable en particules minérales, à teneur élevée (NAu-2) ou basse (SWy-2) en fer. Il est ainsi montré que la diffusion des acides organiques et des sidérophores dans le GSH, hors adhésion ou formation d'un biofilm en surface des minéraux, est suffisante pour altérer efficacement les particules minérales. La mise en évidence de gradients de protons locaux produits par la bactérie en interaction avec les GSH peut également expliquer l'efficacité biotique de la dissolution minérale par rapport à des conditions abiotiques. En conclusion, les points forts et les limites de l'utilisation d'un matériau hybride type GSH pour cibler les interactions minéral/microorganismes sont discutés.

Mots clés : matériau hybride, gel de silice, altération minérale, sol, phyllosilicate, bactérie

Summary:

This work deals with the study of bacteria/silicate interactions by using new hybrid materials, i.e. hybrid silica gel dopped with colloidal smectite particles (HSG). The aims are (1) to characterize HSG physicochemical properties and (2) to get a better knowledge about mineral/bacteria interactions. In a first part of the thesis, it is shown that HSG is a fractal silica network containing well-dispersed mineral particles. Hydrothermal treatment is necessary to stabilize the HSG structure. In the second part, it is shown that diffusion of organic acids and siderophores is sufficient to explain the high efficiency of bacterial action compared to abiotic tretments. Preventing bacterial adhesion or biofilm formation at the mineral surface permits to enhance the influence of metabolites diffusion. To conclude, the advantages and limits of using HSG in environmental studies are discussed.

Key words: hybrid material, silica gel, mineral dissolution, soil, phyllosilicate, bacteria