



HAL
open science

Rôle des bactéries du sol dans l'accès aux nutriments par la végétation : approche isotopique

Nicolas Nuvoli

► **To cite this version:**

Nicolas Nuvoli. Rôle des bactéries du sol dans l'accès aux nutriments par la végétation : approche isotopique. Sciences de la Terre. Université de Strasbourg, 2024. Français. NNT : 2024STRAH002 . tel-04677558

HAL Id: tel-04677558

<https://theses.hal.science/tel-04677558v1>

Submitted on 26 Aug 2024

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

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

Université de Strasbourg

Ecole doctorale de sciences de la Terre et de l'Environnement

Laboratoire Institut Terre & Environnement de Strasbourg – UMR 7063

THÈSE

présentée par :

Nicolas NUVOLI

soutenue le : **23 janvier 2024**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline : Sciences de la Terre, de l'Univers et de l'Environnement

Spécialité : Biogéochimie isotopique

Rôle des bactéries du sol dans l'accès aux nutriments par la végétation : approche isotopique

THÈSE dirigée par :

Anne-Désirée Schmitt

Valérie Geoffroy

Professeure des universités, Strasbourg

Professeure des universités, Strasbourg

RAPPORTEURS :

Frédéric Jorand

Nadine Mattielli

Professeur des Universités, LCPME, Nancy

Professeure des Universités, GEOL, Bruxelles

EXAMINATEURS :

Thierry Lebeau

Gwenaël Imfeld

Sophie Gangloff*

Emmanuel Tertre

Professeur des Universités, LPG, Nantes

Directeur de recherche CNRS, ITES, Strasbourg

Ingénieure de recherche, ITES, Strasbourg

Professeur des Universités, IC2MP, Poitiers

*co-encadrante

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier mes encadrantes Anne-Désirée, Valérie et Sophie, pour leur accompagnement dans la réalisation de ce travail tout au long de ces trois années de thèse. Un grand merci pour la transmission de connaissances et de compétences ainsi que pour les conseils nécessaires à l'accomplissement de ce travail.

Je souhaite aussi remercier toutes les personnes m'ayant aidé d'une manière ou d'une autre dans la réalisation de ces travaux. Notamment Éric qui a du remédier à de multiples pannes du Triton, et qui m'a apporté son aide quand cela s'avérait nécessaire. Merci aussi à Colin et René de m'avoir permis de me former à l'utilisation de l'ICP-AES et pour leur aide. Merci à Thierry pour son assistance pour le travail en salle blanche. Merci à Sophie pour son aide précieuse lors de la synthèse de la birnessite. Merci à Amélie pour la réalisation des analyses DRX ainsi que pour son aide apportée pour les protocoles de centrifugation.

Je souhaite ensuite remercier les autres membres du laboratoire de l'ITES pour leur soutien, ou leurs conseils, et plus particulièrement François et Gwenaël. De la même manière, je remercie l'ensemble des membres de l'équipe Schalk du laboratoire du BSC et notamment Oliver et Gaëtan, pour leurs remarques et conseils lors des différentes présentations de mes travaux.

Je souhaite aussi remercier Emmanuel pour toute l'aide qu'il a pu apporter dans les questionnements scientifiques liés aux oxydes de manganèse et à la vermiculite.

Je souhaite également remercier les membres du jury de cette thèse : Frédéric Jorand, Nadine Mattielli, Thierry Lebeau, Gwenaël Imfeld, Sophie Gangloff et Emmanuel Tertre d'avoir accepté de participer à l'évaluation de ce travail de thèse.

Un merci particulier à mes collègues de bureau Céline et Adrien, mais aussi Véronique, sans qui ces années de thèse n'auraient pas été les mêmes.

Table des matières

Introduction générale.....	17
Chapitre 1 : Etat de l'art et introduction des notions	23
1.1. Fractionnement isotopique.....	25
1.1.1. Introduction	25
1.1.2. Naissance et développement de la méthode	26
1.1.3. Notion de fractionnement isotopique	26
1.1.4. Expression du fractionnement isotopique.....	27
1.1.5. Différents types de fractionnement isotopique.....	28
1.1.6. Les isotopes stables du calcium.....	30
1.1.7. Standards utilisés pour le calcium	30
1.2. Outils d'étude du cycle biogéochimique du Ca	30
1.3. Réservoirs du calcium dans les sols.....	32
1.3.1. Le sol et la pédogenèse	32
1.3.2. Réservoirs abiotiques.....	35
1.3.2.a. Les minéraux primaires :.....	35
1.3.2.b. Les minéraux secondaires :.....	37
1.3.2.c. Apports atmosphériques.....	38
1.3.2.d. Solutions de sol.....	38
1.3.3. Réservoirs biotiques	38
1.3.4. Interactions à l'interface eau-sol-organismes.....	39
1.4. Mécanismes d'interactions du calcium avec les réservoirs du sol.....	42
1.4.1. Les mécanismes d'adsorption/désorption et de complexation	42
1.4.1.a. Influence du pH de la solution	44
1.4.1.b. Influence de la taille des éléments adsorbés	44
1.4.1.c. Influence de la concentration des cations en solution et en phase solide... 45	
1.4.1.d. Influence de la texture du sol, de la granulométrie, de la surface spécifique et de la CEC	46
1.4.2. Précipitation, solubilisation et spéciation	48
1.4.3. Prélèvement par les organismes vivants.....	48
1.4.4. Recyclage de la végétation	50
1.5. Cycle biogéochimique du calcium.....	50
1.6. Verrous scientifiques à lever.....	52
1.7. Objectifs de la thèse	54

Chapitre 2 : Matériel et méthode	57
2.1. Matériel biologique	59
2.1.1. Introduction sur les bactéries	59
2.1.2. Bactéries utilisées pour ces travaux	60
2.1.2.a. Bacillus subtilis	60
2.1.2.b. Pseudomonas aeruginosa	61
2.1.2.c. Pseudomonas putida GB-1	61
2.1.3. Cultures bactériennes	61
2.1.3.a. Production de cellules végétatives de Bacillus subtilis et Pseudomonas aeruginosa	61
2.1.3.b. Production et purification des spores de Bacillus subtilis.	62
2.2. Matériel minéral	63
2.2.1. Oxydes de manganèse	63
2.2.1.a. Introduction	63
2.2.1.b. Birnessite.....	65
2.2.1.c. δ -MnO ₂ et vernadite	67
2.2.1.d. Synthèses des oxydes de manganèse	71
2.2.1.d.1. Synthèse des minéraux de δ -MnO ₂	71
2.2.1.d.2. Synthèse de la birnessite acide	71
2.2.1.d.3. Synthèse des birnessites stabilisées à pH 4 et 10	72
2.2.1.d.4. Préparation de l'oxyde de manganèse bactériogénique	73
2.2.1.e. Tri granulométrique et saturation en Na des solides	73
2.2.2. Vermiculite	74
2.2.2.a. Introduction sur les phyllosilicates.....	74
2.2.2.b. Description de l'échantillon de vermiculite étudié	76
2.2.3. Solution de calcium	76
2.3. Protocoles expérimentaux	77
2.3.1. Principe du tri granulométrique (isolation de la fraction 0,1-1 μ m).....	77
2.3.2. Dialyse	77
2.3.3. Protocoles d'adsorption et de désorption.....	78
2.3.1. Fractionnement cellulaire	79
2.3.1.a. Pseudomonas aeruginosa	79
2.3.1.a.1. Informations préalables	79
2.3.1.a.2. Protocole.....	79
2.3.1.b. Bacillus subtilis.....	80

2.3.1.b.1.	Informations préalables	80
2.3.1.b.2.	Protocole.....	81
2.3.1.	Minéralisation/dissolution des culots bactériens/minéraux	82
2.4.	Méthodes d'analyses et de caractérisations	82
2.4.1.	Caractérisations minéralogiques.....	82
2.4.1.a.	Mesure de la surface spécifique (BET N ₂)	82
2.4.1.b.	Diffraction des rayons X.....	83
2.4.1.b.1.	Principe.....	83
2.4.1.b.2.	Matériel utilisé.....	84
2.4.1.b.3.	Préparation des échantillons et conditions expérimentales	85
2.4.1.c.	Microscopie à balayage électronique	85
2.4.2.	Caractérisations géochimiques	86
2.4.2.a.	La mesure de la capacité d'échange cationique (CEC).....	86
2.4.2.b.	Analyses des concentrations élémentaires (ICP-AES)	87
2.4.2.b.1.	Présentation générale de la méthode	87
2.4.2.b.2.	Purification des échantillons	88
2.4.2.b.3.	Résine échangeuse d'ion TODGA	89
2.4.2.a.	Analyses des rapports isotopiques (TIMS)	90
2.4.2.a.1.	Présentation générale de la méthode	90
2.4.2.a.2.	Utilisation du double traceur 42-43Ca	92
2.4.2.a.3.	Expression des résultats.....	94
2.4.2.a.4.	Expression de l'incertitude sur les résultats	95

Chapitre 3 : Caractérisation élémentaire et isotopique de la sorption du Ca sur des bactéries végétatives et sporulées ubiquistes des sols. 97

3.1.	Introduction.....	99
3.2.	Elemental and isotopic characterization of Ca sorption on ubiquitous vegetative and spore-forming soil bacteria.	100
3.2.1.	INTRODUCTION	101
3.2.2.	MATERIAL AND METHODS.....	102
3.2.2.a.	Preparation of solutions and culture medium.....	103
3.2.2.b.	Bacterial culture conditions	103
3.2.2.c.	Sorption experiments and samples digestion	104
3.2.2.d.	Cell fractionation experiments	105
3.2.2.d.1.	<i>P. aeruginosa</i>	106
3.2.2.d.2.	<i>B. subtilis</i>	107

3.2.2.e. Analytical procedures.....	108
3.3. RESULTS	109
3.3.1. Sorption experiments on vegetative bacteria.....	109
3.3.1.a. Variation of Ca concentration of the initial solution.....	109
3.3.1.a. Kinetics	111
3.3.1.b. Effect of the transfer processes inhibition.....	113
3.3.1.c. pH variation.....	113
3.3.2. Cell fractionation experiments for vegetative bacteria.....	114
3.3.2.a. <i>P. aeruginosa</i>	114
3.3.2.b. <i>B. subtilis</i>	116
3.3.3. Experiments on sporulated bacteria.....	117
3.4. DISCUSSION.....	119
3.4.1. Absence of fractionation during the sorption of Ca onto/in vegetative bacteri.....	119
3.4.2. Distribution of calcium in bacteria and highlighting the proportions of adsorbed and incorporated Ca	120
3.4.3. Isotopic fractionation during sporulation	122
3.4.4. Implication for the environment	125
3.5. CONCLUSION.....	127

Chapitre 4 : Caractérisation élémentaire et isotopique de l'adsorption et de la désorption du Ca sur des oxydes de manganèses abiotiques et bactériogénique..... 129

4.1. Introduction.....	131
4.2. Matériel et méthodes.....	133
4.2.1. Préparation des oxydes de manganèse.....	133
4.2.1.a. Synthèse des minéraux de δ -MnO ₂	134
4.2.1.b. Synthèse de la birnessite acide.....	134
4.2.1.c. Synthèse des birnessites stabilisées à pH 4 et 10	134
4.2.1.d. Préparation de l'oxyde de manganèse bactériogénique	135
4.2.1.e. Tri granulométrique et saturation en Na des solides	136
4.2.2. Caractérisation des oxydes de manganèse.....	137
4.2.1. Protocoles expérimentaux d'adsorption et de désorption du Ca	138
4.2.2. Protocoles analytiques	139
4.3. Résultats.....	141
4.3.1. Caractérisation des échantillons d'oxyde de manganèse.....	141
4.3.1.a. Composition élémentaire	141

4.3.1.b.	Degré d'oxydation	142
4.3.1.c.	Formules structurales des minéraux synthétisés	142
4.3.1.d.	Capacité d'échange cationique.....	143
4.3.1.e.	Surface spécifique externe	144
4.3.1.f.	Microscopie électronique à balayage	145
4.3.1.g.	Analyses DRX	148
4.3.2.	Caractérisation de l'adsorption et de la désorption du Ca	150
4.3.2.a.	Expérimentations d'adsorption en fonction de la concentration en Ca de la solution initiale (pH = 7 et temps d'interaction de 125 minutes)	150
4.3.2.b.	Cinétiques d'adsorptions et de désorptions (pH = 7 et $C_{a_{ini}}/MnO_2$ fixées pour les différents solides)	155
4.3.2.c.	Expérimentations d'adsorption en fonction du pH de la solution initiale ($C_{a_{ini}}/MnO_2$ fixées pour les différents solides et temps d'interaction de 125 minutes).....	162
4.4.	Discussion	165
4.4.1.	Distinctions structurales des échantillons étudiés	165
4.4.2.	Caractérisation élémentaire	168
4.4.3.	Caractérisation isotopique	171
4.4.4.	Conséquences pour le milieu naturel	175
4.5.	Conclusion	176
	Conclusion générale	179
	Références bibliographiques	187
	Annexes.....	209

Liste des tableaux

Chapitre 1 : Etat de l'art et introduction des notions

Tableau 1.1 : Abondances et masses atomiques des six isotopes stables du Ca (d'après Coplen et al., 2002 et Meija et al., 2016). Les chiffres entre parenthèse représentent les erreurs (SD) de mesures associées aux valeurs d'abondance et réfèrent aux derniers chiffres de la valeur indiquée. 30

Tableau 1.2 : Exemples de constituants des sols et de leur capacité d'échange cationique correspondante. (Dejou et al., 1977, Denise Blanc, 1987, Deniz Baize, 2000) 37

Chapitre 3 : Caractérisation élémentaire et isotopique de l'adsorption du Ca sur des bactéries végétatives et sporulées ubiquistes des sols.

Table 3.1: Amount of residual Ca in the supernatant and Ca apparent isotopic fractionation between the initial solution and the supernatant or the bacteria measured after adsorption experiments in various conditions. LAA, liquid after adsorption; BAA, bacteria after adsorption; IS, the initial solution. 112

Table 3.2 : Amount of Ca present in the different cell-compartments of *B. subtilis* and *P. aeruginosa*, and Ca apparent isotopic fractionation between the initial solution and the cell-compartments measured after adsorption experiments at pH 5.6 and in two different conditions of total Ca amount for each bacterium. BAA, bacteria after adsorption. The *P. aeruginosa* samples were pooled before analysis, which do not allow the determination of a 2SD value. 115

Table 3.3 : Amount of residual Ca in the supernatant and Ca apparent isotopic fractionation between the initial solution and the supernatant or the spores measured after adsorption experiments in various OD_{600nm} conditions. LAA liquid after adsorption; BAA, bacteria after adsorption; IS, initial solution. 117

Table 3.4 : Characteristics of vegetative and sporulated bacteria, and maximum amount of adsorbed Ca and associated ^{44/40}Ca isotopic fractionation of the supernatant measured in this study. Comparison of the data with those previously obtained in Brazier et al. (2019) for clay minerals and Schmitt et al. (2023) for δ-MnO₂. 125

Chapitre 4 : Caractérisation élémentaire et isotopique de l'adsorption et de la désorption du Ca sur des oxydes de manganèses abiotiques et bactériogénique.

Tableau 4.1 : liste des échantillons synthétisés durant cette étude avec les différents composés nécessaires à cette synthèse ainsi que les références bibliographiques associées..... 133

Tableau 4.2 : Compositions élémentaires des oxydes de manganèses exprimées en proportions par rapport à la quantité de Mn. σ représente l'incertitude de l'instrument de mesure. 141

Tableau 4.3 : Degré d'oxydations déterminés pour les différents échantillons. SD représente l'écart type et N le nombre de mesures par échantillons..... 142

Tableau 4.4 : Résultats des analyses de la CEC pour l'ensemble des oxydes de manganèses de l'étude. La CEC représente la somme des cations mesurés dans le surnageant en méq, rapportée à 100g d'échantillon..... 144

Tableau 4.5 : comparaison des principales caractéristiques des échantillons synthétisés dans cette étude avec le δ-MnO₂ étudié dans Schmitt et al. (2023) et divers phyllosilicates étudiés dans Brazier et al. (2019)..... 145

Tableau 4.6 : concentrations élémentaires et fractionnements isotopiques mesurées pour les expérimentations d'adsorptions en fonction de la concentration initiale en Ca dans la solution. LAA = liquide après adsorption et SAA = solide après adsorption. 151

Tableau 4.7 : concentrations élémentaires et fractionnements isotopiques mesurées pour les cinétiques d'adsorptions. LAA = liquide après adsorption..... 156

Tableau 4.8 : concentrations élémentaires et fractionnements isotopiques mesurées pour les expérimentations de désorption. LAD = liquide après désorption. 157

Tableau 4.9 : concentrations élémentaires et fractionnements isotopiques mesurées pour les expérimentations en fonction du ph initial de la solution . LAA = liquide après adsorption..... 163

Liste des figures

Chapitre 1 : Etat de l'art et introduction des notions

Figure 1-1 : Carte des nucléides. Les ordonnées représentant le nombre de protons et les abscisses le nombre de neutrons des isotopes, chaque ligne correspond à l'ensemble des isotopes d'un même élément du tableau périodique de Mendeleïev. La vallée de stabilité isotopique est indiquée en noir. (Source : <https://www-nds.iaea.org/relnsd/vcharthtml/VChartHTML.html>)..... 25

Figure 1-2 : La zone critique représente une enveloppe externe fragile de la planète, correspondant à la zone comprise entre la partie supérieure de la végétation et la limite inférieure des eaux de nappe (Brantley et al., 2006). Elle correspond à la zone où les réactions chimiques ont lieu à la fois par l'intermédiaire de processus biotiques via la catalyse d'organismes vivants, et de processus eau-roche abiotiques apportant les nutriments et l'énergie nécessaires à la subsistance des écosystèmes terrestres (Brantley et al., 2007). (Source figure : www.ozcar-ri.org)..... 33

Figure 1-3 : Schéma simplifié des relations entre les sols et les différents facteurs de pédogenèse. Les sols sont la résultante de nombreuses interactions et de nombreux paramètres influençant leur pédogenèse. (Source : Denis Baize, <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/ecologie/les-sols-et-leur-formation-sous-climats-temperes>, dernière visite le 25/10/2022)..... 34

Figure 1-4 : Ensemble des réservoirs impliqués dans le cycle biogéochimique du calcium à l'interface eau-sol-plantes-organismes. Les sols sont constitués de matière minérale et organique, de solutions de sol et de phases gazeuses qui sont la résultante des processus d'altération de la matière minérale ainsi que de l'activité biologique des sols. La partie de droite représente un focus sur la rhizosphère (Tipper et al. 2016). 35

Figure 1-5 : Gammes de composition de la série des feldspaths, à 900 °C. Dans la zone marquée Immiscibilité on n'observe pas à l'équilibre un minéral homogène, mais la coexistence d'un plagioclase et d'un feldspath alcalin. (credits image : Ariel Provost, 2016)..... 36

Figure 1-6 : Arrangement des ions à proximité d'une surface adsorbante électroniquement chargée (Nature Education, 2012, d'après Maurice (2009) et Chorover & Brusseau (2009))..... 44

Figure 1-7 : Exemples d'isothermes d'adsorption présentant la quantité d'élément adsorbé en mg par kg de sorbant (surface adsorbante), en fonction de la concentration de l'élément dans la solution à l'équilibre, en mg/L. 46

Figure 1-8 : Série de stabilité des principaux minéraux primaires et de verres volcaniques (Churchman et Lowe, 2012)..... 47

Figure 1-9 : Compositions élémentaires et isotopiques du Ca dans les différents réservoirs constituant le cycle biogéochimique du calcium à l'échelle globale. (Tipper et al., 2016). 51

Figure 1-10 : Schéma conceptuel synthétisant la problématique et les objectifs des travaux de cette thèse, visant à préciser le rôle potentiel des minéraux secondaires et des microorganismes dans le cycle biogéochimique du calcium, ce rôle étant encore peu étudié à ce jour. Les travaux de cette thèse se focaliseront sur l'étude des bactéries, de la vermiculite et d'un ensemble d'oxydes de manganèses dont un biogénique et divers abiotiques synthétisés selon des protocoles différents. 55

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Figure 2-1 : Représentation schématique d'un octaèdre de coordination du manganèse. On y retrouve l'atome de manganèse au centre (sphère blanche), coordonné à six atomes d'oxygène (sphères vertes) qui forment les sommets d'un octaèdre (en bleu). (Grangeon, 2008)..... 63

Figure 2-2 : Représentation schématique d'un tectomanganate. La taille des tunnels est de $n \times m$ octaèdres. Les « tunnels » sont susceptibles de contenir des cations (non visibles ici). (Grangeon, 2008).	64
Figure 2-3 : Représentation schématique des deux grandes familles de phyllo-manganates : (a) les structures lamellaires et (b) les structures sandwichs. Ces deux structures sont caractérisées par la présence de cations et de molécules d'eau entre deux feuillets de MnO_2 . Elles sont en revanche différenciables par le fait que dans les structures lamellaires, les cations sont soit hydratés (comme représenté sur ce schéma avec les sphères violettes) soit en sphère interne au niveau des lacunes des feuillets de MnO_2 (non visible sur ce schéma), tandis que dans les structures sandwichs les cations forment des « îlots » de cations, soit discontinus (structures vertes en (b) et avec la présence de molécule de molécule d'eau (en orange), soit continus, formant ainsi un feuillet (non présenté ici). Ces îlots peuvent être composés de différents oxydes de type MO_2 où M peut être Li, Al, Ni, Mg, Co, Zn (Grangeon, 2008).	64
Figure 2-4 : Exemples de positions de liaisons en sphère interne et dans le feuillet de MnO_2 . Me correspond à tout cation susceptible d'occuper ces positions. E, pour « edge sharing » réfère à la position cristallographique dans le plan du feuillet. TE (triple edge sharing), TC (triple corner sharing) et DC (double corner sharing) correspondent aux positions de liaisons en sphère interne.	67
Figure 2-5 : Représentation schématique idéalisée de l'oxyde type vernadite précipité dans les racines de <i>Festuca Rubra</i> . Le déficit de charge du aux lacunes dans le feuillet est compensé par des atomes de Zn ou de Mn en sphère interne ou à la place des lacunes, et du Ca en sphère externe dans l'interfoliaire.	69
Figure 2-6 : Exemples d'empilements de couches tétraédriques et octaédriques dans les feuillets des minéraux argileux. (A) Feuillet de type 1:1 (TO) ; (B) Feuillet de type 2:1 (TOT) ; (C) Feuillet de type 2:1:1. (Brazier, 2019)	76
Figure 2-7: exemple de dispositif d'adsorption en réacteur batch sur des bactéries.	79
Figure 2-8: Représentation graphique de la diffraction traduite par la loi de Bragg.	84
Figure 2-9 : a) Représentation de la structure des polymères composant de résine TODGA et b) représentation graphique de l'affinité de quatre éléments avec la résine en fonction du conditionnement de la colonne (nature et concentration de l'acide) (Brazier, 2019).	89
Figure 2-10 : Schéma d'un dispositif de mesure par spectrométrie de masse à thermo-ionisation. (Gauld et al., 2023).	91
Figure 2-11 : Diagramme schématique du principe de l'utilisation d'un double traceur (Brazier, 2019). T : double traceur provenant d'un mélange des traceurs $S1$ et $S2$ dans les proportions respectives q et $1-q$. T est ajouté à l'échantillon naturel N selon les proportions respectives p et $1-p$, formant le mélange échantillon-double traceur M . α et β sont des fractionnements inhérents aux mesures n et m respectivement.	93

Chapitre 3 : Caractérisation élémentaire et isotopique de l'adsorption du Ca sur des bactéries végétatives et sporulées ubiquistes des sols.

Figure 3-1 : The simplified schematic of the cellular fractionation protocol for <i>B. subtilis</i> and <i>P. aeruginosa</i> shows the different solutions used for each separation step.	105
Figure 3-2 : Elemental and isotopic measurements of Ca adsorption experiments on vegetative bacteria. (a) and (b) The residual Ca in the supernatant, expressed as a percentage of the initial Ca in the solution, as a function of the initial solution concentration, and the values of $\Delta^{44/40}Ca$ for the different conditions, respectively. (c) and (d) The residual Ca in the supernatant, expressed as a percentage of the initial Ca in the solution, as a function of the interaction time, and the values of $\Delta^{44/40}Ca$ for the different conditions, respectively. (e) and (f) The residual Ca in the supernatant, expressed as a percentage of the initial Ca in the solution, as a function of the initial pH of the solution, and the values of $\Delta^{44/40}Ca$ for the different conditions. Experiments varying $[Ca^{2+}]_{IS}$ were conducted at pH 5.6 with a 2-h interaction duration. Experiments varying interaction time were conducted at pH 5.6 and $[Ca^{2+}]_{IS}$ equal to 1.6 $\mu g/mL$. Experiments varying initial pH were conducted at $[Ca^{2+}]_{IS}$ equal to 1.6 $\mu g/mL$ at pH 5.6, and $[Ca^{2+}]_{IS}$ equal to 1.5 $\mu g/mL$ at pHs 5 and 7, with a 2-h interaction duration.	110

Figure 3-3: Distribution of Ca in the different cellular compartments during cell fractionation experiments (a) and (b) for *P. aeruginosa*, and (c) and (d) for *B. subtilis*..... 116

Figure 3-4: Elemental and isotopic measurements of Ca adsorption experiments on *B. subtilis* spores. (a) The residual Ca in the supernatant, expressed as a percentage of the initial Ca in the solution, as a function of the OD_{600nm} of the bacterial suspension. Experiments were conducted at pH 5.6 with a 2-h interaction duration, and $[Ca^{2+}]_S$ equal to 1.6 $\mu g/mL$. (b) The values of $\Delta^{44/40}Ca$ as a function of the percentage of residual calcium in the supernatant. The values of spore controls (spore pellets without Ca adsorption) and the sporulation medium used for spore culture are also presented. 118

Figure 3-5 : Mother cell lysis following the sporulation process and representation of the different layers of a spore (Adapted from McKenney et al., 2013). 124

Chapitre 4 : Caractérisation élémentaire et isotopique de l'adsorption et de la désorption du Ca sur des oxydes de manganèses abiotiques et bactériogénique.

Figure 4-1 : Images obtenues au MEB pour $\delta-MnO_2$ A (a et b) et B (c), et la birnessite acide (1) (d)..... 146

Figure 4-2 : Images obtenues au MEB pour la birnessite (2) pH10 (a et b), la birnessite (3) pH4 (c et d), et le MnO_2 bactériogénique (e et f)..... 147

Figure 4-3 : Profils DRX des différents échantillons synthétisés lors de cette étude avec en a) les quatre échantillons « mal cristallisés » ($\delta-MnO_2$ A en rouge, $\delta-MnO_2$ B en bleu, birnessite acide (1) en vert et MnO_2 bactériogénique en noir) et en b) les birnessites (2) pH10 en rouge et (3) pH4 en noir..... 149

Figure 4-4 : Quantités de Ca adsorbé et Na ou H désorbés et fractionnements isotopiques en Ca associés lors des expérimentations d'adsorption en fonction de la concentration en Ca de la solution initiale à pH 7 et pour 125 min de temps de contact avec a) $\delta-MnO_2$ A, b) $\delta-MnO_2$ B, c) birnessite acide (1), d) birnessite (2) pH10, e) birnessite (3) pH4, f) MnO_2 bactériogénique..... 154

Figure 4-5 : Fractionnements isotopiques du Ca dans les surnageants et les solides, associés aux expérimentations d'adsorption en fonction de la concentration initiale en Ca de la solution. 155

Figure 4-6 : Quantité de Ca adsorbée et de Na désorbée en $mmol/mmol_{MnO_2}$ pour les expérimentations de cinétiques pour a) la birnessite (2) pH10, b) la birnessite (3) pH4 et c) le MnO_2 bactériogénique. 159

Figure 4-7 : (a) Fractionnements isotopiques lors des cinétiques d'adsorption et de désorption (2h de contact avec le désorbant) et (b) quantités de Ca dans le surnageant des échantillons correspondants. 160

Figure 4-8 : Désorption cumulée du Ca pour (a) la birnessite (2) pH10 et (b) la birnessite (3) pH4. Les désorptions sont effectuées à partir des culots issus des expérimentations de cinétiques d'adsorption..... 162

Figure 4-9 : Quantité de Ca^{2+} adsorbée et de Na^+ ou H^+ désorbée en $mmol/mmol_{MnO_2}$ pour les expérimentations en fonction du pH initial pour a) la birnessite (2) pH10, b) la birnessite (3) pH4 et c) le MnO_2 bactériogénique et fractionnement isotopique associé (d)..... 165

Introduction générale

Les sols représentent la partie superficielle de la croûte continentale, à l'intersection entre biosphère, lithosphère, hydrosphère et atmosphère. Il s'agit d'une interface majeure située au cœur de la « zone critique », s'étendant du sommet de la végétation jusqu'au point le plus bas des eaux de nappes souterraines et où ont lieu un ensemble d'interactions liés à des processus aussi bien biotiques qu'abiotiques, fournissant les nutriments et l'énergie nécessaires à la subsistance des écosystèmes terrestres (Brantley et al., 2007). Les sols sont en effet le résultat de l'altération d'un socle rocheux via des processus physicochimiques et biologiques, rendant ainsi disponibles les nutriments nécessaires à la vie animale et végétale, les sols abritant par ailleurs 25% de la biodiversité mondiale. Toutefois, à l'échelle mondiale, plus d'un tiers des surfaces de sol sont déjà dégradées du fait des activités anthropiques, ayant des conséquences tels que l'érosion, l'appauvrissement des sols, la pollution ou la salinisation. D'ici 2050 l'érosion pourrait causer une perte de 10% de la production agricole (données FAO) alors même que 95% de la production alimentaire mondiale dépend des sols et que la population mondiale devrait croître de plusieurs milliards de personnes d'ici la fin du siècle. De plus, la dégradation des sols a déjà causé la libération de plus de 78 gigatonnes de carbone dans l'atmosphère dans un contexte de réchauffement global. Pourtant, une meilleure gestion des sols permettrait de faire valoir leur rôle en tant que puits de carbone, car d'après les données de la FAO, les sols pourraient stocker jusqu'à 2,05 pétagrammes de CO₂ équivalent par an, ce qui compenserait jusqu'à 34% des émissions de gaz à effet de Serre provenant des terres agricoles.

Les sols se situent donc au cœur de nombreux enjeux sociétaux et environnementaux et dans un tel contexte il est essentiel d'en prendre soin pour préserver l'avenir. Cela doit évidemment passer par une refonte des modes de consommation et de production. Notamment en repensant les modèles agricoles ou de gestion et d'exploitation des forêts en tendant vers des pratiques non intensives soutenables pour les sols, en tenant compte de la biodiversité et en permettant la reconstitution du réservoir de nutriments des sols.

Cependant, de nombreux travaux restent à réaliser pour établir une meilleure compréhension des sols intégrant les différents mécanismes physicochimiques et les interactions avec les organismes vivants. Ces connaissances permettraient d'améliorer la gestion de leur fertilité, notamment dans des contextes de sols dégradés et appauvris. Celle-ci dépend de la minéralisation de la matière organique, de l'altération des minéraux du sol et de leur transfert du sol à la plante. Outre les racines des plantes, les organismes du sol contrôlent la disponibilité des nutriments, en particulier dans les sols pauvres en nutriments en conditions tempérées ou tropicales humides (Bormann et al., 1998 ; Turpault et al., 2009 ; Givaudan et al.,

2014). Ces processus se déroulent principalement dans la rhizosphère, à l'interface entre les particules du sol, les solutions du sol et le système racinaire, et sont régis par des réactions intenses telles que l'échange d'ions, l'extraction d'eau et l'exsudation racinaire (Darrah, 1993 ; Marschner, 1995 ; Hinsinger et al., 2005). La respiration et l'activité des micro-organismes produisent également du CO₂ qui contrôle le potentiel redox et le pH de la rhizosphère (Marschner et al., 1986 ; Drever, 1994).

Néanmoins, les rôles respectifs des différents agents biologiques dans l'établissement des équilibres d'altération ou dans l'absorption des nutriments sont actuellement peu connus. Contrairement à d'autres macronutriments, tels que l'azote (N) ou le phosphore (P), les études sur le calcium (Ca), sa dynamique dans les sols et sa disponibilité pour les plantes ont été peu développées. Pourtant, il est désormais bien connu qu'un lessivage intense des nutriments alcalino-terreux des sols peut avoir un impact sur la croissance des plantes (Wallander, 2006).

Le Ca est un nutriment essentiel qui a des fonctions physiologiques et structurales clés dans le métabolisme des plantes (Marschner, 1995). C'est également le cation prédominant que l'on trouve sous forme hydratée dans les sols. Il forme des liaisons électrostatiques faibles et non spécifiques sur les sites négatifs des minéraux argileux et de la matière organique car il est retenu plus fortement que les autres cations échangeables (Likens et al., 1998). De plus, à l'échelle mondiale, le Ca est un cation résultant de l'altération des continents et, en tant que tel, il est impliqué dans le cycle du carbone (Berner et al., 1983). Ces dernières années, les isotopes stables du Ca ont démontré leur potentiel pour identifier les processus se déroulant à l'interface sol-eau des plantes, ainsi que lors des transferts vers et au sein des océans.

Ainsi, l'étude du cycle biogéochimique du Ca dans la zone critique à l'aide des isotopes du Ca a révélé des fractionnements isotopiques associés à des processus biotiques (absorption par les racines et translocation au sein d'un arbre, recyclage par la végétation) ou abiotiques (précipitation via les minéraux secondaires, adsorption sur les minéraux argileux et les oxydes de manganèse, adsorption/complexation sur les acides humiques) (Cenki-Tok et al, 2009 ; Cobert et al., 2011 ; Bagard et al., 2013 ; Schmitt et al., 2013 ; Gangloff et al., 2014 ; Schmitt, 2016 ; Schmitt et al., 2017 ; 2018 ; Brazier et al., 2019 ; Schmitt et al., 2023). Le rôle des microorganismes est essentiel dans le flux de nutriments dans le sol. Néanmoins, les implications des processus biotiques liés à leur activité sont insuffisamment documentées, en particulier dans les cycles biogéochimiques globaux d'éléments tels que le calcium.

L'objectif général de cette thèse est d'approfondir la compréhension des mécanismes biotiques et abiotiques d'interaction avec le Ca et les fractionnements isotopiques qui y sont liés, en étudiant dans un premier temps ces mécanismes de façon distincte. Dans un second temps, l'objectif secondaire de cette thèse est d'amorcer la création de ponts entre l'étude des mécanismes biotiques et l'étude des mécanismes abiotiques, de manière à poser les bases pour une modélisation plus précise du cycle biogéochimique du calcium dans les sols. Ainsi, cette thèse est divisée en quatre chapitres :

Le chapitre 1 qui présente un état de l'art concernant les méthodes isotopiques, les réservoirs de Ca dans les sols, ainsi que le cycle biogéochimique du Ca dans les sols, tout en introduisant les notions nécessaires à la bonne compréhension de la problématique. Il présente aussi plus en détails les verrous scientifiques à lever et rappelle la problématique et les objectifs de cette thèse.

Le chapitre 2 qui présente plus en détails le matériaux étudiés (bactéries et minéraux) ainsi que les méthodes de préparation et d'analyse mises en œuvre pour la réalisation de cette thèse.

Le chapitre 3 est consacré à l'étude élémentaire et isotopique de l'adsorption du Ca sur des bactéries végétatives et sporulées ubiquistes des sols et vise à améliorer la compréhension du rôle direct des bactéries dans le cycle biogéochimique du Ca dans les sols. Une attention particulière a été portée à la compréhension des mécanismes impliqués dans les interactions entre le Ca et les bactéries afin d'expliquer nos résultats analytiques isotopiques. Cela a nécessité l'adaptation et la mise en œuvre de méthodes expérimentales d'extraction cellulaire afin de séparer les différents compartiments cellulaires des bactéries étudiés et de déterminer comment se stocker le Ca au contact des bactéries.

Le chapitre 4 est quant à lui consacré à l'étude élémentaire et isotopique de l'adsorption du Ca sur cinq oxydes de manganèse synthétiques d'origine abiotique et un oxyde de manganèse d'origine bactériogénique. L'objectif de ce chapitre est de préciser les différents mécanismes d'interaction entre le Ca et les oxydes de manganèse tout en déterminant l'importance des différents paramètres minéralogiques et physicochimiques dans l'adsorption du Ca et son fractionnement isotopique, afin de mieux comprendre le rôle de ces oxydes dans le cycle biogéochimique du Ca dans les sols. Ce chapitre cherche aussi à poser les bases d'une compréhension du rôle des mécanismes biotiques liés à l'activité des microorganismes en comparant.

Enfin, un chapitre annexe présente les premiers résultats d'une étude élémentaire et isotopique de l'adsorption du Ca sur de la vermiculite au travers d'expérimentations en batch ainsi qu'en dynamique. L'objectif est d'améliorer la connaissance concernant les mécanismes d'interaction du Ca avec des argiles, tout en intégrant une dimension dynamique afin de se rapprocher des conditions environnementales naturelles. La compréhension de ces mécanismes permettrait aussi de passer à un niveau expérimental supérieur, en étudiant l'interaction du Ca avec des argiles, en présence de bactéries, notamment sous forme de biofilms, afin de se rapprocher du niveau de complexité existant dans les sols, où se mêlent matière minérale et matière organique.

Chapitre 1 :

Etat de l'art et introduction des notions

1.1. Fractionnement isotopique

1.1.1. Introduction

On désigne par « isotopes » des nucléides possédant un même nombre de protons et d'électrons mais un nombre différent de neutrons. Cette différence a pour origine la nucléosynthèse, pendant laquelle se forment les noyaux atomiques avec diverses configurations. On retrouve ainsi un certain nombre d'isotopes naturels, parmi lesquels certains sont dit « stables » car leur noyau ne se désintègre pas avec le temps, et ceux dits « radioactifs » car ils possèdent un noyau instable susceptibles de se décomposer spontanément au cours du temps selon une loi de désintégration radioactive caractérisée par un temps de demi-vie correspondant au temps nécessaire pour que la moitié des noyaux initialement présents dans un échantillon soit désintégrée. Graphiquement, il est possible de représenter au travers de la carte des nucléides l'ensemble des plus de 3000 isotopes naturels et synthétiques (dont 254 stables) (Thoennessen, 2013)(Figure 1.1). Au cœur de cette carte des nucléides apparaît la « vallée de stabilité isotopique », correspondant à l'ensemble des isotopes stables existant.

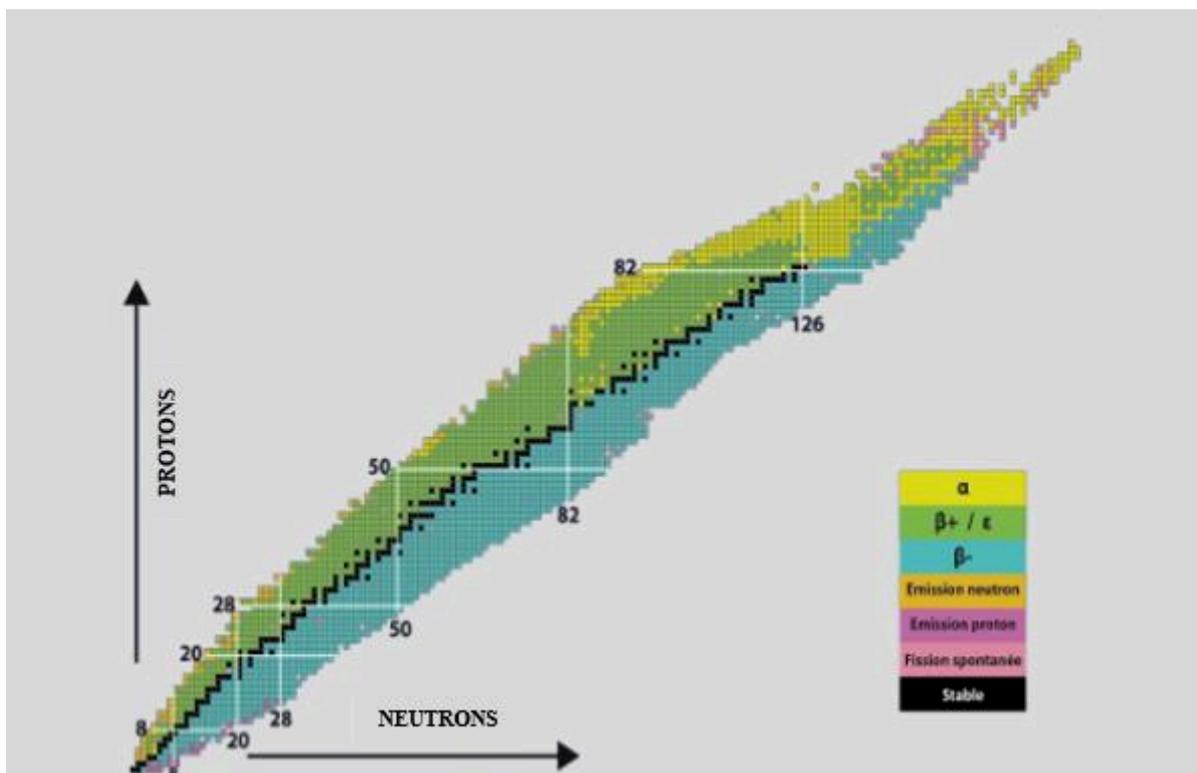


Figure 1-1 : Carte des nucléides. Les ordonnées représentant le nombre de protons et les abscisses le nombre de neutrons des isotopes, chaque ligne correspond à l'ensemble des isotopes d'un même élément du tableau périodique de Mendeleïev. La vallée de stabilité isotopique est indiquée en noir. (Source : <https://www-nds.iaea.org/relnsd/vcharthtml/VChartHTML.html>)

1.1.2. Naissance et développement de la méthode

Les isotopes radiogéniques (e.g. le strontium) étaient déjà étudiés avant les isotopes stables et notamment en tant que traceurs de sources d'un matériau. De grandes avancées ont été effectuées dans les années 1950, avec notamment la détermination de l'âge de la Terre à environ 4,55 Ga années par Clair Patterson en 1956, et ce grâce à l'étude isotopique des météorites.

La géochimie des isotopes stables a émergé dans le début des années 1960 avec la volonté d'étudier les paléoclimats (e.g. Dansgaard, 1964). Dans les premiers temps, seuls les isotopes d'un certain nombre d'éléments comme le carbone, l'oxygène, l'hydrogène, le soufre et l'azote ont été étudiés, sous forme gazeuse, et sont aujourd'hui communément désignés comme « isotopes stables traditionnels ».

Cependant, la charte des nucléides met bien en évidence la grande diversité d'éléments possédant au moins deux isotopes stables. Depuis un peu plus de vingt ans, grâce à l'avènement des spectromètres de masse nouvelle génération (les spectromètres de masse à multi-collection et à plasma à couplage inductif (MC-ICP-MS) ou bien à thermo-ionisation (TIMS)), les isotopes stables dits « non traditionnels » de nombreux autres éléments (Ca, Sr, Mg, Fe, B, Cu, Zn, Si...) font l'objet de recherches, notamment dans de nombreux domaines associés aux géosciences pour lesquels ils s'avèrent désormais incontournables (Beard et al., 2004, Teng et al., 2017 et références associées, Griffith et al., 2020), mais aussi dans d'autres disciplines telles que la biologie, la médecine, la paléontologie, l'agriculture etc.

1.1.3. Notion de fractionnement isotopique

Bien que le nombre identique de protons et d'électrons des isotopes leur confère des caractéristiques communes, un nombre variable de neutrons implique une différence de masse entre les différents isotopes. Par conséquent, bien que leurs caractéristiques physico-chimiques soient très similaires, les isotopes d'un même élément possèdent des propriétés cinétiques et thermodynamiques suffisamment différentes pour que cela implique une modification des proportions des différents isotopes présents dans des réservoirs naturels lors de processus ou mécanismes d'interactions. Ainsi, les rapports d'abondance naturelle isotopique, qui expriment la proportion de chaque isotope par rapport à un autre isotope, s'en retrouvent aussi modifiés. On parle ainsi de fractionnement isotopique. Lorsque l'on exprime un rapport entre deux

isotopes, il est d'usage de qualifier d'isotope « lourd » et d'isotope « léger » respectivement l'isotope ayant le plus grand nombre et le plus petit nombre de neutron.

1.1.4. Expression du fractionnement isotopique

Afin de permettre la compréhension et l'utilisation du concept de fractionnement isotopique et de ses spécificités, il est utile, voire primordial, de se référer à des conventions de notation, qui permettent d'homogénéiser l'expression et - de facto - la compréhension de l'information géochimique.

Pour rappel, on peut exprimer un rapport d'abondance isotopique entre un isotope lourd et un isotope léger d'un même élément. Ce rapport entre deux isotopes s'exprime de la manière suivante :

$$R = \frac{a_X}{b_X} \quad (1.1)$$

Où aX et bX représentent respectivement le nombre d'atomes des isotopes a (lourd) et b (léger) de l'élément X dans l'échantillon étudié.

Dans une volonté de normalisation et de comparabilité des expressions de l'information géochimique, la notion de delta « δ » a été introduite par McKinney et al. (1950). Dans le cas des isotopes stables, ce δ permet de normaliser le rapport d'abondance (R) des deux isotopes (aX et bX) d'un échantillon à celui d'un standard, correspondant à un matériel spécifique bien défini, permettant ainsi d'exprimer l'écart relatif entre l'échantillon et le standard. Afin de faciliter l'expression de cet écart relatif, celle-ci est multipliée par 1000 et peut ainsi s'exprimer de la manière suivante :

$$\delta^aX = \left(\frac{\frac{a_X}{b_X}^{\text{échantillon}}}{\frac{a_X}{b_X}^{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000 \quad (1.2)$$

Du fait de la multiplication par 1000, les valeurs sont exprimées en pour mille (‰) par rapport au standard choisi. Un $\delta > 0$ traduit une plus grande abondance en isotope lourd ou une plus faible abondance en isotope léger dans l'échantillon par rapport au standard, et inversement, un $\delta < 0$ traduit une abondance plus importante en isotope léger ou une abondance moins importante en isotope lourd dans l'échantillon par rapport au standard.

Dans la littérature, le fractionnement isotopique du calcium est exprimé sous deux formes différentes : $\delta^{44/40}\text{Ca}$ et $\delta^{44/42}\text{Ca}$. En effet, selon les appareils de mesures utilisés, il n'est pas possible de mesurer le ^{40}Ca du fait d'une trop grande interférence liée au ^{40}Ar du plasma (avec les MC-ICP-MS). C'est pour cette raison que dans le cas spécifique du fractionnement isotopique du calcium, la notation est explicitée en indiquant à la fois le numérateur et le dénominateur, de manière à éviter toute ambiguïté ou tout risque de mauvaise interprétation. Dans notre cas ($\delta^{44/40}\text{Ca}$), on obtient :

$$\delta^{44/40}\text{Ca} = \left(\frac{\frac{^{44}\text{Ca}}{^{40}\text{Ca}}_{\text{échantillon}}}{\frac{^{44}\text{Ca}}{^{40}\text{Ca}}_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000 \quad (1.3)$$

Il est aussi courant d'exprimer le fractionnement isotopique observé entre deux phases reliées par un processus naturel. On note ainsi « α » (sans unité) le rapport entre un même rapport isotopique dans les deux phases :

$$\alpha_{(\text{phase 1} - \text{phase 2})} = \frac{\frac{a_X}{b_X}_{\text{phase 1}}}{\frac{a_X}{b_X}_{\text{phase 2}}} \quad (1.4)$$

Les notations « α » et « δ » peuvent être reliées de la manière suivante :

$$\alpha_{(\text{phase 1} - \text{phase 2})} = \frac{\delta^a X_{\text{phase 1}} + 1000}{\delta^a X_{\text{phase 2}} + 1000} \quad (1.5)$$

Enfin, le delta majuscule « Δ » est une autre notation qui permet d'exprimer l'écart (en ‰) entre le δ mesuré dans deux phases différentes :

$$\Delta_{(\text{phase 1} - \text{phase 2})} = \delta^a X_{\text{phase 1}} - \delta^a X_{\text{phase 2}} \quad (1.6)$$

ou bien

$$\Delta_{(\text{phase 1} - \text{phase 2})} \approx 1000 \times \ln \alpha_{(\text{phase 1} - \text{phase 2})} \approx 1000 \times (\alpha_{(\text{phase 1} - \text{phase 2})} - 1) \quad (1.7)$$

1.1.5. Différents types de fractionnement isotopique

Les fractionnements isotopiques que l'on observe sont dépendants de la masse. En effet l'amplitude du fractionnement isotopique est inversement corrélée à la masse atomique de l'élément observé. De plus, le fractionnement est aussi dépendant de la différence de masses

entre les deux isotopes considérés (Russel et al., 1978). De ce fait, plus l'élément étudié est léger et plus la différence de masse entre les isotopes considérés est élevée, plus l'amplitude du fractionnement sera élevée. Par exemple, pour l'hydrogène, l'amplitude maximale de fractionnement isotopique entre l'isotope léger et l'isotope lourd (deutérium) est de l'ordre de plusieurs dizaines de pour mille (e.g. Mancini et al., 2003), tandis que pour le strontium les variations sont plutôt de l'ordre de l'unité.

On distingue deux origines possibles aux fractionnements isotopiques dépendant de la masse : les processus d'origine thermodynamique et les processus d'origine cinétique.

- Les fractionnements isotopiques d'origine thermodynamique impliquent des transferts d'isotopes entre deux ou plusieurs substances à l'équilibre chimique (Urey, 1947, Schauble, 2004). La répartition des isotopes, dans l'une ou l'autre des phases impliquées dans un processus d'interaction, dépend à la fois des propriétés mécaniques de ces phases, mais aussi des propriétés intrinsèques des éléments considérés. En effet, à l'équilibre, les isotopes lourds se retrouvent préférentiellement dans les phases permettant la formation des liaisons les plus stables. Différents paramètres sont susceptibles d'impacter la formation des liaisons chimiques « fortes », notamment : la température, l'état d'oxydation plus ou moins élevé de l'élément considéré, la tendance des éléments à former des liaisons avec les autres éléments proches de sa position dans le tableau périodique, du faible nombre de coordination de l'élément considéré etc. (Schauble, 2004).
- Les fractionnements isotopiques d'origine cinétique, impliquent quant à eux des mécanismes unidirectionnels et incomplets, qui n'atteignent jamais l'équilibre et pour lesquels les produits de la réaction sont isolés des réactifs. Les fractionnements isotopiques sont dus à une différence de vitesse de réactions induite par la différence de masse entre isotopes. En effet, les isotopes légers se déplacent et réagissent plus rapidement que les isotopes lourds. En conséquence, les isotopes légers se retrouvent préférentiellement dans les produits d'une réaction tandis que les réactifs résiduels s'enrichissent en isotopes lourds. Il existe toutefois des cas inverses, notamment dans les réactions impliquant des atomes d'hydrogène (Bigeleisen et Wolfsberg, 1958).

1.1.6. Les isotopes stables du calcium

Au total, le calcium possède 24 isotopes connus, de masses atomiques allant de 34 à 57, dont six sont naturels et considérés comme stables dans le temps. Le tableau 1.1 présente ces isotopes ainsi que leur abondance relative respective. Le ^{40}Ca est de loin le plus abondant tandis que le ^{46}Ca est le plus rare.

Tableau 1.1 : Abondances et masses atomiques des six isotopes stables du Ca (d'après Coplen et al., 2002 et Meija et al., 2016). Les chiffres entre parenthèse représentent les erreurs (SD) de mesures associées aux valeurs d'abondance et réfèrent aux derniers chiffres de la valeur indiquée.

Isotopes	^{40}Ca	^{42}Ca	^{43}Ca	^{44}Ca	^{46}Ca	^{48}Ca
Abondance (%)	96,941(156)	0,647(23)	0,135(10)	2,086(110)	0,004(3)	0,187(21)
Masse Atomique (u)	39,9625912(3)	41,9586183(4)	42,9587668(5)	43,9554811(9)	45,9536927(25)	47,95253(4)

1.1.7. Standards utilisés pour le calcium

Pour l'ensemble des expérimentations de cette thèse, les rapports isotopiques seront exprimés en $\delta^{44/40}\text{Ca}$ (‰) par rapport au SRM915a (standard certifié NIST). Bien qu'il n'existe pas vraiment de standard international, celui-ci a été utilisé afin de comparer les résultats de diverses études (Heuser et al, 2016). Afin de s'assurer de la justesse des résultats, unne eau de mer interne a été utilisée En effet, l'eau de mer est un standard communément admis, avec un écart au SRM915a de 1,89‰ (Schmitt et al., 2001, Hippler et al., 2003, Heuser et al., 2016) :

$$\delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{SRM915a}} = \delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{SW}} + 1,89 \quad (1.8)$$

1.2. Outils d'étude du cycle biogéochimique du Ca

Pendant longtemps, les sources du Ca ont été estimées grâce aux rapports isotopiques du strontium, connus pour être des traceurs de sources fiables du strontium. (Graustein and Armstrong 1983, Åberg et al. 1990, Miller et al. 1993, Capo et al. 1998, Bullen and Bailey 2005, Bélanger and Holmden 2010). Le strontium et le calcium appartiennent en effet tous les deux à la famille des alcalino-terreux et possèdent un rayon ionique, ainsi qu'une charge similaire, ce qui se traduit par un comportement comparable de ces deux éléments dans

l'environnement. Pour cette raison, le strontium a été considéré comme un proxy pour l'étude du comportement du calcium dans l'environnement (e.g. Elias et al. 1982, Åberg et al. 1989, Åberg 1995, Bailey et al. 1996, Drouet et al. 2005, Wiegand and Schwendenmann 2013, Bedel et al. 2016). Si cette méthode permet de distinguer deux sources de calcium (p.ex. le calcium issu des précipitations atmosphériques et celui issu de l'altération minérale) et de quantifier leurs apports relatifs pour la nutrition de la végétation (e.g., Åberg et al. 1990, Miller et al. 1993, Bailey et al. 1996, Blum et al. 2002, Drouet et al. 2005a), elle ne permet en revanche pas de tracer le calcium dans des systèmes plus complexes considérant plus de deux sources de calcium (Drouet et Herbauts, 2008). Ainsi, le développement d'une méthode consistant en un couplage de divers rapports d'éléments alcalino-terreux (Sr/Ca, Ba/Ca, Sr/Ba) avec les rapports isotopiques du strontium radiogénique, a permis dans certains cas de résoudre mathématiquement ces systèmes complexes (Blum et al. 2002, Drouet et Herbauts, 2008).

Toutefois, des études ont mis en évidence le fractionnement potentiel du rapport Sr/Ca lors de certains processus biologiques, notamment lors du processus de transpiration dans les arbres (Baes and Bloom 1988, Poszwa et al. 2000, Bullen and Bailey 2005, Drouet et al. 2005, Fink et al., 2010). Ainsi, les valeurs mesurées dans les différents compartiments des plantes ne sont pas forcément comparables, à moins de connaître le facteur de discrimination entre les compartiments et d'appliquer une correction (Drouet et Herbauts, 2008).

En parallèle, l'isotope radioactif du ^{45}Ca a pu être utilisé comme traceur des modifications biogéochimiques dans les sols (Drouet et al., 2005, Bedel et al., 2016) et dans le cas du prélèvement de calcium par la végétation (van der Heijden et al., 2013), ou bien même dans le cadre d'études entomologiques (Wanner et al., 2006). Sa grande efficacité a été démontrée lors de son utilisation pour le traçage du calcium lors de sa migration dans les plantes, notamment dans des pommiers (Shear and Faust, 1970). En revanche, l'utilisation de radioisotopes est préférable en laboratoire ou sous serre pour des raisons de sécurité. Par ailleurs, le ^{45}Ca ajouté au milieu naturel en tant que traceur est susceptible de perturber le cycle naturel du calcium. De plus, le temps de transit du ^{45}Ca peut s'avérer être très long, impliquant la nécessité d'effectuer des expérimentations sur de longues années. Il s'agit par conséquent d'une méthode à l'efficacité prouvée mais présentant d'éventuelles contraintes pratiques.

Comme évoqué précédemment (cf. A.3), des avancées technologiques successives ont permis de repousser les limites de l'analyse isotopique et l'émergence de spectromètres de masse à thermo-ionisation nouvelle génération a notamment permis de mesurer des variations isotopiques avec une très grande précision. De ce fait, il est désormais possible de s'affranchir

des contraintes des diverses méthodes évoquées précédemment et de directement mesurer les isotopes stables du Ca pour préciser son cycle biogéochimique en quantifiant le fractionnement isotopique ayant lieu lors des mécanismes d'interactions.

1.3. Réservoirs du calcium dans les sols

1.3.1. Le sol et la pédogenèse

Le sol est un élément particulièrement complexe et les questionnements sur sa nature ne sont pas nouveaux. La manière de le définir ou de le percevoir a évolué au cours du temps et de l'amélioration de notre compréhension des phénomènes naturels impliqués dans leur formation. Ainsi, vers 400 av J.C., un anonyme - potentiel élève d'Hippocrate - écrivait que « la terre est l'estomac des plantes, qui en reçoivent la nourriture sous forme prête à la digestion » (J. Boulaine, 1988). Il aurait aussi observé l'importance des paramètres hydrologiques pour la fertilité des sols et la répartition géographique de la végétation, mais aussi la facilité avec laquelle les caractéristiques conditionnant la fertilité des sols varient d'un endroit à l'autre. Cette manière d'appréhender le sol, comme étant la source de la fertilité des plantes, partageait donc déjà à cette époque beaucoup en commun avec notre vision plus moderne. C'est plus récemment, à la fin du XIX^{ème} siècle, que la pédologie se développe en tant que science, avec notamment Vassili Dokuchaev, considéré comme le père de la pédologie, qui publie le premier ouvrage d'étude des sols, mettant en place les règles de leur classification. On peut aussi citer le forestier P.E. Muller, qui via ses travaux sur l'humus, apporte une approche pédogénétique de la formation des sols et des relations sol-végétation (Feller et al., 2007).

En 2001, le concept de « zone critique » a émergé (Figure 1.2). Le sol se situe au cœur de cette zone critique, à l'interface entre la lithosphère, la biosphère, l'hydrosphère et l'atmosphère. Ainsi, sa pédogenèse, c'est-à-dire sa formation, mais aussi son existence, sont le résultat de multiples interactions dans l'espace et dans le temps. Il est donc possible de définir un sol comme étant « une structure quadridimensionnelle » (une surface et un volume évoluant dans le temps) dans laquelle persistent ou transitent : **(1)** les résidus et les produits de l'altération de la couche minérale superficielle du globe, **(2)** les matières organiques mortes ou vivantes de la biomasse, **(3)** les éléments provenant de l'atmosphère, soit de façon accidentelle, soit de façon cyclique. » (J. Boulaine, 1975).

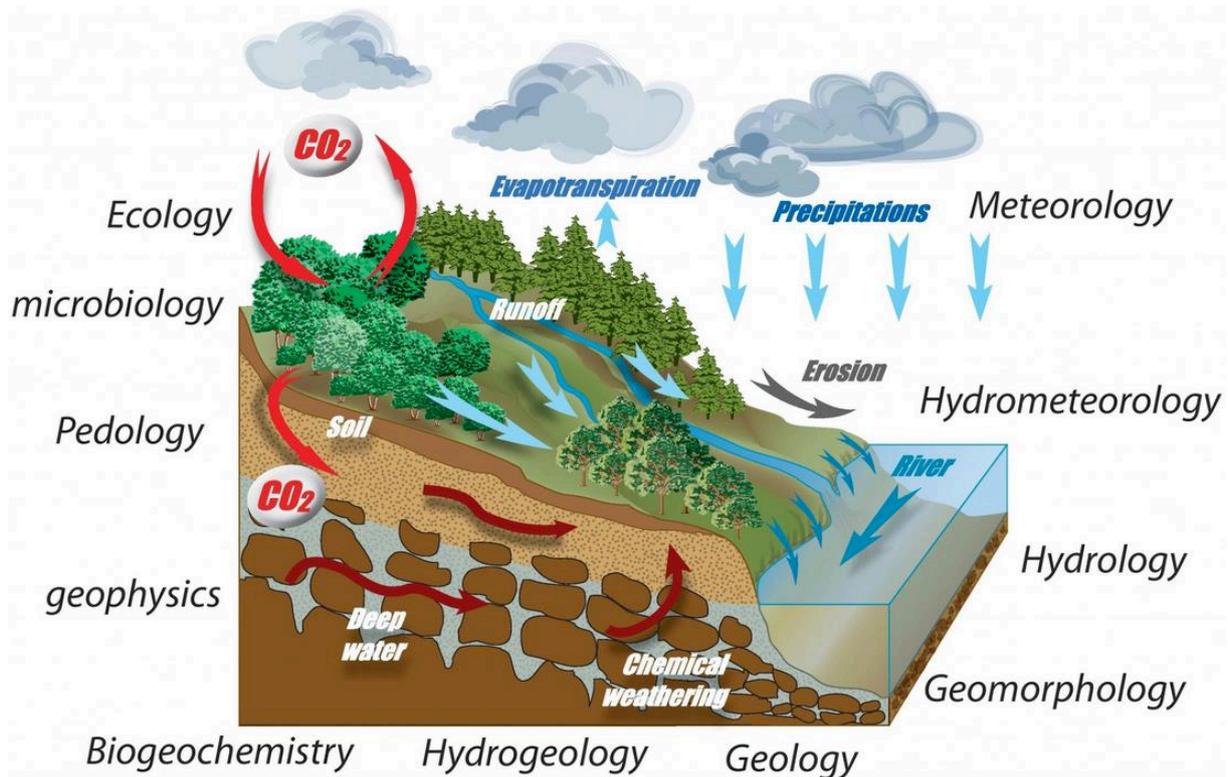


Figure 1-2 : La zone critique représente une enveloppe externe fragile de la planète, correspondant à la zone comprise entre la partie supérieure de la végétation et la limite inférieure des eaux de nappe (Brantley et al., 2006). Elle correspond à la zone où les réactions chimiques ont lieu à la fois par l'intermédiaire de processus biotiques via la catalyse d'organismes vivants, et de processus eau-roche abiotiques apportant les nutriments et l'énergie nécessaires à la subsistance des écosystèmes terrestres (Brantley et al., 2007). (Source figure : www.ozcar-ri.org)

La formation d'un sol est donc dépendante d'un grand nombre de paramètres, susceptibles de s'influencer les uns les autres. Les paramètres climatiques, la nature de la roche mère, la topographie, la présence d'organismes vivants etc. sont autant de paramètres susceptibles d'influencer la vitesse d'altération d'une roche mère, la nature des minéraux primaires et secondaires, le ruissellement, l'érosion et l'infiltration, ou bien encore la nature du couvert végétal, qui va lui-même exercer une influence sur certains des paramètres évoqués, e.g. le ruissellement et l'infiltration (Descroix et al., 2001).

En somme, un sol donné peut être présenté comme le résultat d'une équation complexe, évoluant dans le temps et faisant jouer un ensemble de paramètres physico-chimiques, biologiques, climatiques et topographiques, mais aussi l'intervention humaine (procédés agricoles etc.) (Figure 1.3). Cette grande complexité mène ainsi à une infinité de sols tous

différents les uns des autres, même s'ils peuvent partager des traits caractéristiques communs permettant leur classification.

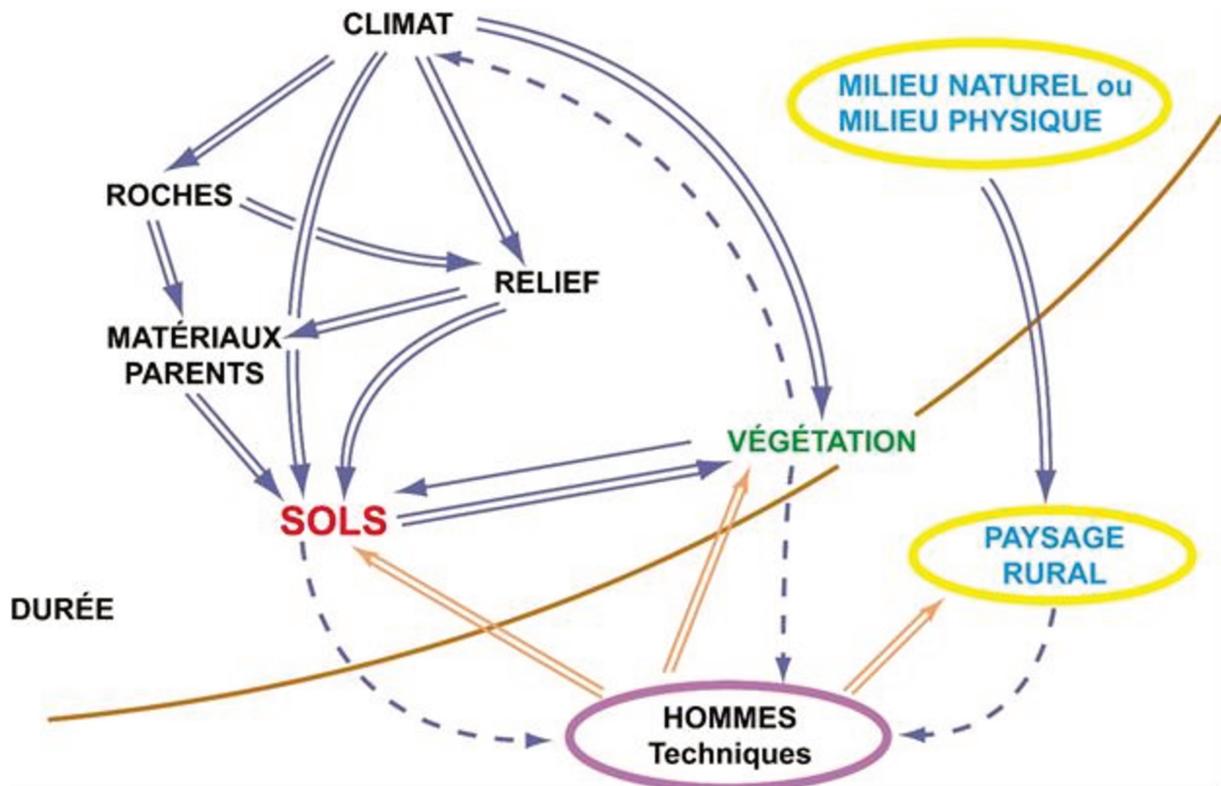


Figure 1-3 : Schéma simplifié des relations entre les sols et les différents facteurs de pédogenèse. Les sols sont la résultante de nombreuses interactions et de nombreux paramètres influençant leur pédogenèse. (Source : Denis Baize, <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/ecologie/les-sols-et-leur-formation-sous-climats-temperes>, dernière visite le 25/10/2022)

Au cœur de toutes ces interactions et de cette complexité, on retrouve les éléments constitutifs des sols, qu'ils soient de nature organique ou abiotique, et qui représentent des réservoirs naturels des différents nutriments nécessaires au développement de la végétation (Figure 1.4).

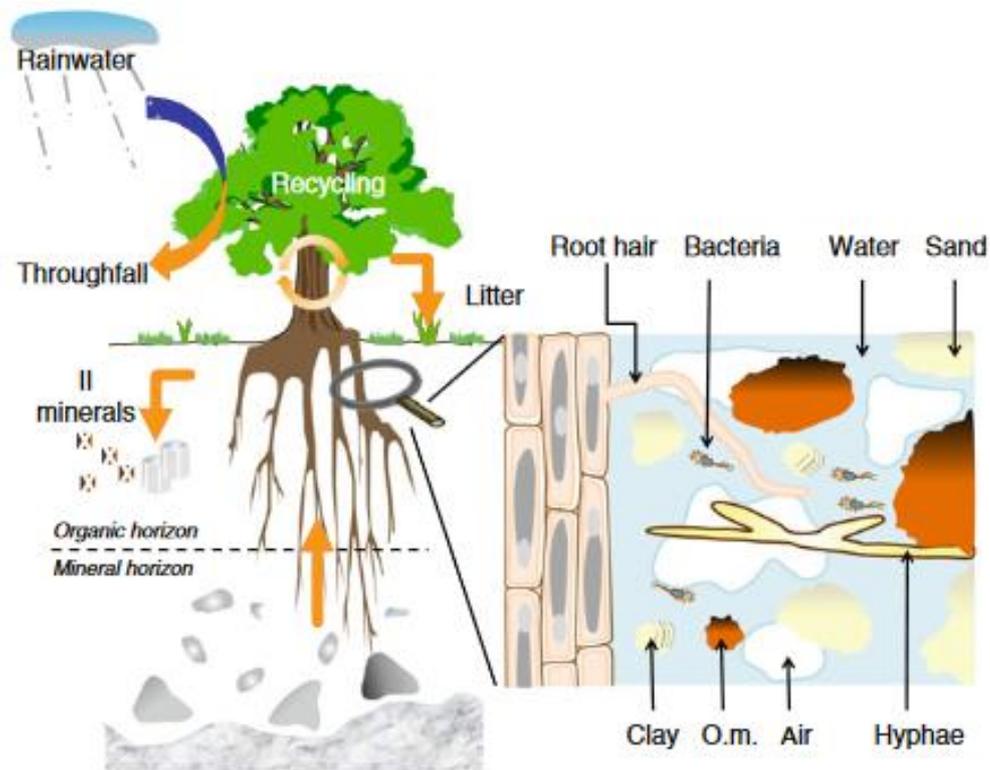


Figure 1-4 : Ensemble des réservoirs impliqués dans le cycle biogéochimique du calcium à l’interface eau-sol-plantes-organismes. Les sols sont constitués de matière minérale et organique, de solutions de sol et de phases gazeuses qui sont la résultante des processus d’altération de la matière minérale ainsi que de l’activité biologique des sols. La partie de droite représente un focus sur la rhizosphère (Tipper et al. 2016).

1.3.2. Réservoirs abiotiques

Premièrement, on peut évoquer les réservoirs abiotiques, c’est-à-dire les réservoirs qui ne sont pas des organismes biologiques ou qui ne sont pas issus de l’activité métabolique de ces organismes. On y retrouve ainsi :

1.3.2.a. *Les minéraux primaires :*

Ce sont les minéraux formés dans des conditions de température élevée à partir des magmas se refroidissant lors de la formation initiale de la roche, ou bien durant un épisode de métamorphisme. La nature des minéraux primaires présents dans les sols est directement dépendante de la nature de la roche mère, qui peut être d’origine magmatique, métamorphique ou sédimentaire. Il s’agit principalement de roches silicatées ou carbonatées. Les premières contiennent de nombreux minéraux silicatés (quartz, feldspaths, micas, etc.), plus ou moins résistants à l’altération et donc plus ou moins réactifs, tandis que les secondes contiennent

principalement de la calcite et de la dolomite, facilement altérables et solubles (Tipper et al., 2006a).

En plus de la calcite, les principaux minéraux primaires contenant du Ca sont les plagioclases (anorthite) et les apatites (Probst et al., 2000, Blum et al., 2002). Les plagioclases ($\text{Na}_x\text{Ca}_{1-x}\text{Al}_{2-x}\text{Si}_{2+x}\text{O}_8$) forment plus généralement une série continue entre anorthite (pôle Ca) et albite (pôle Na) et contiennent ainsi du calcium dans des proportions variables, mais sont aussi des sources significatives de Na et Si, tandis que les feldspaths alcalins ($\text{Na}_x\text{K}_{1-x}\text{AlSi}_3\text{O}_8$) sont aussi source de K (Figure 1.5). Les micas, ainsi que les illites qui découlent de leur altération sont quant à eux une source majeure de K mais contiennent aussi du Mg, Fe, Ca, Na, Si et autres micronutriments.

De tout cela découle une formule générale conventionnelle des minéraux argileux, du type :

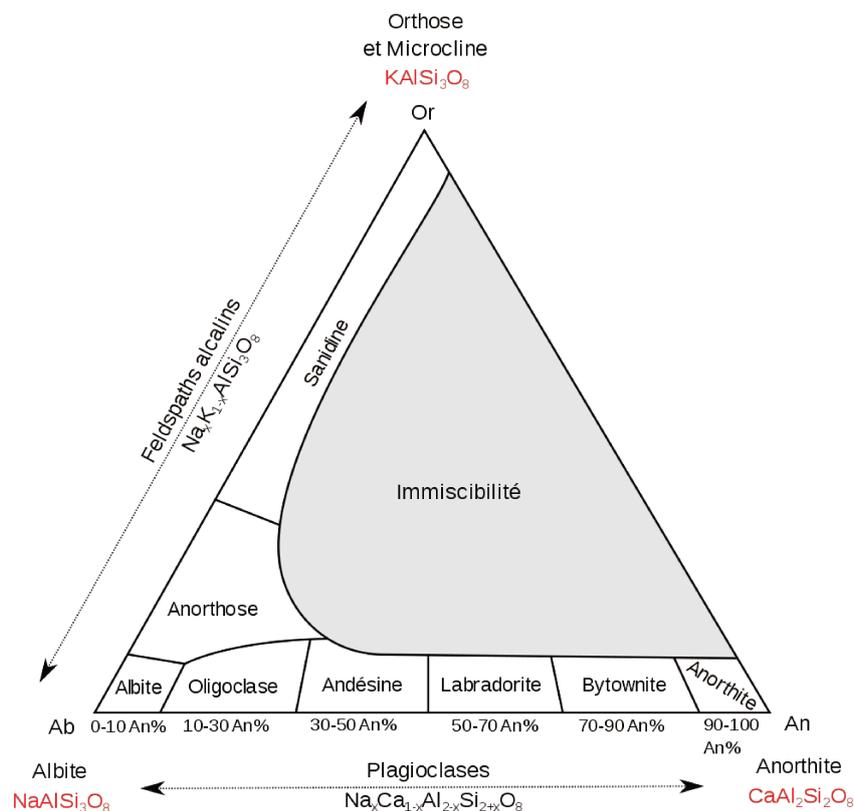
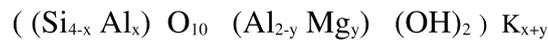


Figure 1-5 : Gammes de composition de la série des feldspaths, à 900 °C. Dans la zone marquée *Immiscibilité* on n'observe pas à l'équilibre un minéral homogène, mais la coexistence d'un plagioclase et d'un feldspath alcalin. (credits image : Ariel Provost, 2016).

1.3.2.b. Les minéraux secondaires :

Dans les sols, certains minéraux se forment à basse température principalement grâce à l'altération des minéraux primaires : on parle de **minéraux hérités** lorsque l'altération (e.g. hydrolyse) est partielle (e.g. vermiculite), ou bien de minéraux néoformés dans le cas de minéraux précipités à partir des ions en solution. Parmi les minéraux secondaires, on retrouve notamment **les minéraux argileux** (e.g. kaolinite, vermiculite ou smectite) et **les oxy-hydroxydes** (de fer, de manganèse, d'aluminium etc.), plus ou moins bien cristallisés (e.g. Jackson et al., 1959, Nagy, 1995, Sposito, 2008). Les minéraux argileux et les oxy-hydroxydes sont des minéraux dont la capacité d'échange cationique (CEC) est généralement très importante, c'est-à-dire qu'il s'agit de minéraux avec une forte capacité de rétention des cations, et qu'ils sont par conséquent des réservoirs par excellence du calcium dans les sols.

Tableau 1.2 : Exemples de constituants des sols et de leur capacité d'échange cationique correspondante. (Dejou et al., 1977, Denise Blanc, 1987, Deniz Baize, 2000)

Constituants des sols	CEC (meq/100g)
Laine de roche	0
Kaolinite	3 à 15
Chlorite	10 à 40
fibre de coco	25 à 90
Smectite	80 à 150
Vermiculite	100 à 150
Zéolithe	120 à 250
Matière organique	150 à 300
Tourbe blonde	100 à 150
Tourbe noire	50 à 250

Des minéraux peuvent aussi être formés par précipitation d'éléments dissous dans les solutions de sols (**e.g. carbonates, oxalates de calcium**) en cas de sursaturation des solutions de sol. Les carbonates et les oxalates de calcium comportent du Ca directement dans leur structure, ce qui en fait d'office des réservoirs de Ca dans les sols. Les oxalates de calcium restent cependant un cas particulier, ils sont issus de la réaction du calcium avec de l'acide oxalique synthétisé par certains microorganismes et ils peuvent aussi se retrouver stockés dans la végétation. (Franceschi & Horner, 1980).

1.3.2.c. *Apports atmosphériques*

Les apports atmosphériques sont de plusieurs origines : **(1) la pluie**, qui contient des éléments sous forme ionique (dont le Ca) depuis son évaporation à partir du réservoir océanique, **(2) les poussières continentales**, dont la nature chimique dépend du matériel parental. Les poussières peuvent parcourir de très grandes distances lorsqu'elles empruntent certains courants aériens (e.g. le sable du Sahara qui joue un rôle dans la fertilité des sols d'Amérique du Sud en survolant l'océan Atlantique) (Prospero et al., 2013), et enfin **(3) les pluviollessivats**, i.e. les gouttes de pluie ruisselant le long des feuilles, des branches et des troncs des arbres et entraînant ainsi vers le sol les substances minérales et organiques qu'elles y captent (e.g. dépôts atmosphérique et exsudats des feuilles. (Gauquelin et al., 1992)).

1.3.2.d. *Solutions de sol*

Les solutions de sol comme leur nom l'indique, contiennent des éléments en solution, sous forme ionique. Comme évoqué dans le paragraphe sur les minéraux primaires, le calcium contenu dans les minéraux carbonatés est largement susceptible de se retrouver solubilisé dans les solutions de sol, faisant ainsi de celles-ci un réservoir potentiellement non négligeable de Ca et autres nutriments.

On y retrouve aussi les colloïdes : de fines particules d'argiles ou d'humus, dont la surface est chargée négativement. Lorsque la solution contient certains cations tels que Ca^{2+} , Mg^{2+} ou Al^{3+} , les charges de surface de ces micelles colloïdales sont compensées, entraînant leur floculation, c'est-à-dire la formation d'agrégats de particules. Le Ca^{2+} et le Mg^{2+} sont les principaux floculants en milieu neutre ou basique, tandis que les ions Al^{3+} sont majoritaires en milieu plus acide (Soltner, 1992).

1.3.3. Réservoirs biotiques

A moins que les conditions soient défavorables (e.g. climat, sol appauvri etc.), un sol abrite énormément de vie, que ce soit à l'échelle macro- ou microbiologique.

- Au niveau **macro**, on retrouve la faune, composée de l'ensemble des animaux fouisseurs (e.g. vers de terre, insectes, divers mammifères etc.), mais aussi la flore, que ce soit en surface, ou en profondeur avec les racines.

- Au niveau **micro**, on retrouve notamment les bactéries et les champignons, qui jouent un rôle essentiel dans les sols.

On y retrouve aussi l'ensemble de la matière organique non vivante, (e.g. organismes en décomposition, acides humiques et fulviques etc.) (Figure 1.4).

1.3.4. Interactions à l'interface eau-sol-organismes.

L'activité de la faune permet de remuer la terre, favorisant ainsi son aération et sa porosité macroscopique connectée (volume vide du sol permettant les transferts de matière), en opposition avec la porosité non connectée définie par des volumes de vide totalement isolés (e.g. porosité interne des argiles).

De la même manière, le développement d'une végétation implique le développement d'un système racinaire. Ce développement racinaire permet de former des axes de circulation pour l'eau, en favorisant là aussi l'augmentation de la porosité macroscopique connectée. Les racines ainsi que l'apport de matière organique améliorent la structure du sol en augmentant la stabilité des agrégats et favorisent l'activité de la faune, ce qui favorise d'autant plus la macroporosité (Kodešová et al., 2006, Ellison et al., 2017).

De plus, lorsque les racines s'infiltrant dans des fissures, elles peuvent aisément s'immiscer dans des fractures ou fracturer elles-mêmes des matériaux très solides, incluant les roches. Elles sont donc un excellent facteur d'altération mécanique et favorisent même l'altération chimique en permettant à l'eau de s'infiltrer dans les fissures, augmentant ainsi la surface de contact entre les solutions de sol et les minéraux des roches. Tout cela permet à l'eau s'infiltrant dans le sol d'atteindre des horizons plus profonds plus facilement et par conséquent de favoriser la pédogenèse du sol via l'altération de la roche mère. Mais l'eau n'est pas le seul facteur impactant l'altération des minéraux du sol. En effet, l'augmentation de la quantité de matière organique et la décomposition de celle-ci mènent à une diminution du pH, favorisant l'altération des minéraux.

La croissance de la végétation est justement corrélée avec la diminution du pH au niveau de la rhizosphère (Hinsinger, 2001). En effet, le prélèvement d'ions au niveau des racines induit directement des variations du pH de la rhizosphère (Marschner, 1995, Hinsinger, 1998). Cela est dû au déséquilibre entre cations et anions qui peut en découler, impliquant une sécrétion de protons de la part des plantes afin de conserver leur neutralité électrique (Haynes, 1990). Il a

d'ailleurs été montré que cette acidification induite par les racines était responsable d'une dissolution significative de carbonates de calcium (Jaillard et al., 1991), de phosphates (Aguilar and van Diest, 1981, Hinsinger and Gilkes, 1996, Hinsinger and Gilkes, 1997), mais aussi de phyllosilicates (Hinsinger et al., 1993).

D'après Drever et Vance (1994), la formation de complexes ioniques à la surface des minéraux grâce à des acides organiques résulterait en une diminution du pH dans la solution et favoriserait la dissolution des minéraux primaires silicatés. De plus, divers acides organiques joueraient un rôle dans la minéralogie des sols grâce à leur capacité à complexer et transporter des éléments comme notamment le fer et l'aluminium (Bruckert, S., et F. Jacquin, 1969). L'altération des minéraux est donc aussi le fruit de mécanismes induits par l'activité des plantes afin d'augmenter la biodisponibilité des éléments nutritifs. Il est effectivement connu que les plantes libèrent des exsudats dont la composition varie en fonction des plantes (Marschner, 1986). La concentration en acides organiques est plus élevée dans les premiers horizons du sol et diminue avec la profondeur. Les acides organiques solubles se trouvent principalement sous la forme de mélanges complexes de composés polymériques, d'acides fulviques et humiques (Drever et Vance, 1994). Leur concentration est la plus importante là où il y a une décomposition rapide de biomasse ainsi que dans les microenvironnements à proximité des racines et des hyphes de champignons ; contrairement aux autres parties du sol où leur concentration est généralement en dessous de 1 mmol/L.

L'activité biologique permettant l'altération de minéraux dans le but de rendre certains éléments nutritifs biodisponible pourrait être régulée par la quantité biodisponible de ces éléments dans le milieu. Ainsi, lorsqu'il y a une grande quantité disponible d'un élément dans le milieu, l'altération des minéraux contenant cet élément serait réduite. C'est ce qui a pu être observé sur un site en Suède (Gobran et al., 2005) ou dans la forêt de Fougères en France (Bretagne) (Turpault et al., 2009) avec une diminution de l'altération des minéraux contenant du calcium dans les parcelles plus riches en calcium. Cette activité d'altération due à l'activité des plantes est maximale dans la région entourant les racines, que l'on qualifie de rhizosphère. En effet, le compartiment rhizosphérique résulte d'un processus dynamique déterminé par des caractéristiques physico-chimiques et biologiques du milieu (Duponnois et al., 2013).

Les processus dans la rhizosphère sont à l'origine de l'hétérogénéité spatiale dans le sol et de son évolution dans le temps (Hinsinger et al., 2005). Ces processus sont complexes et dépendent des paramètres du milieu tels que les plantes, les microorganismes, les composants du sol et les interactions entre eux. Un processus majeur dans cette région est le dépôt de

composés carbonés par les racines. La teneur en composés organiques étant plus élevée dans la région de la rhizosphère par rapport au reste du sol et ces composés étant un substrat pour la microflore, celle-ci est particulièrement active dans cette partie du sol. L'activité des microorganismes est essentielle pour favoriser la croissance végétale, notamment en augmentant la biodisponibilité de certains éléments ou en réduisant certains éléments toxiques via leurs métabolismes. Par ailleurs, à la surface des racines d'une partie des plantes, on trouve des champignons mycorhiziens dont les filaments (le mycélium) entourent les racines. Les ectomycorhizes se développent à la surface des racines tandis que les endomycorhizes pénètrent à l'intérieur des cellules de la racine.

Les plantes et ces champignons sont en symbiose et s'échangent des nutriments. En effet, les arbres fournissent des polysaccharides aux champignons mycorhiziens tandis que ces derniers leur transmettent de l'azote ou du phosphate ainsi que l'eau qu'ils captent dans le sol, dans une zone bien plus importante que celle occupée par les racines, grâce à leurs hyphes qui se développent dans les pores du sol (Brunner et Frey, 2000). En plus d'apporter des nutriments aux plantes, certains champignons peuvent fixer des métaux lourds et ainsi diminuer la toxicité dans le sol et préserver les arbres (Brunner, 2001). La flore fongique associée aux sols forestiers est donc essentielle à la bonne santé des écosystèmes forestiers, en favorisant les transferts hydrique et d'éléments nutritifs tout en étendant la zone d'action des racines, en comparaison à des plantes non mycorhizées.

Les champignons participent en effet activement à la minéralisation de la matière organique évoquée plus tôt. La vitesse de dégradation de la matière organique dépend à la fois de la communauté microbienne du sol mais aussi des différents paramètres environnementaux, qui influent aussi sur l'activité microbienne (Conant et al., 2011, Schmidt et al., 2011). Les matières organiques relativement riches en azote (rapport C/N inférieur à 25) permettent une activité de décomposition plus importante car l'azote devient moins limitant pour l'activité de la flore microbienne, qui n'a pas besoin de consommer les réserves d'azote du sol, et n'entre donc pas en compétition avec la végétation, qui nécessite aussi de l'azote pour sa croissance. Toutefois, en cas de manque d'azote, certaines bactéries : les azotobacters, ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique, qu'elles finissent par relarguer dans le sol lors de leur mort survenant lorsqu'elles n'ont plus de matière organique à décomposer. Les microorganismes du sol participent donc activement au cycle du carbone et de l'azote et sont l'un des moteurs du recyclage de la matière et des nutriments dans les sols.

L'apport de matière organique peut être dû aux déjections de la faune, ou aux excréments d'acides organiques par la végétation. De plus, les organismes morts (ou nécromasse) sont eux-mêmes décomposés en matière organique grâce à l'activité microbienne, notamment en surface où la litière est formée à partir de la matière organique en décomposition progressivement minéralisée et/ou transformée en humus. L'humus est un ensemble de composés organiques stables, notamment des acides fulviques et humiques. La matière organique possédant une CEC supérieure à quasiment tous les autres éléments du sol (150 à 300 meq.100g⁻¹), elle joue un rôle majeur dans la fixation des nutriments du sol. Elle représente par ailleurs le principal réservoir de carbone et de bien d'autres nutriments dans les sols (Schimel, 1995, Rousk et Bengston, 2014).

1.4. Mécanismes d'interactions du calcium avec les réservoirs du sol

Les parties précédentes ayant permis d'exposer la diversité de compartiments dans les sols ainsi que leurs spécificités, il est désormais possible de présenter les différents types de mécanismes régissant les interactions du calcium avec ces compartiments :

1.4.1. Les mécanismes d'adsorption/désorption et de complexation

Le calcium fait partie des cations les plus retenus par la matière organique, et notamment par les acides fulviques et humiques. Cette matière organique se présente sous la forme d'agrégats supramoléculaires, faits de liaisons faibles non covalentes, et dont la charge de surface est négative, d'autant plus avec l'augmentation du pH. En effet les groupements fonctionnels présents dans la matière organique (notamment des groupements carboxyles) sont déprotonés lorsque le pH augmente. Le calcium, qui est chargé positivement, est complexé au contact de ces composés organiques et permet des liaisons entre les groupements organiques fonctionnels, aidant ainsi à la stabilité des agrégats et évitant leur dégradation (Simpson et al., 2002). Plus la concentration de Ca sous forme hydratée va être importante dans les sols et plus il va être lié aux molécules organiques (Clarholm et Skjellberg, 2013). De plus, le calcium joue un rôle majeur dans la stabilité des sols en se liant à la fois à la matière organique et à la matière minérale argileuse (aussi chargée négativement) et en permettant ainsi la formation du complexe argilo-humique (ou organo-minéral) via des « ponts calciques ».

De la même manière que la matière organique, bon nombre de minéraux secondaires (minéraux argileux silicatés et oxy-hydroxydes) comportent des charges négatives. Celles-ci sont (i) soit permanentes (liées à des lacunes dans la structure du minéral ou bien à des

substitutions isomorphiques, comme par exemple un Si^{4+} remplacé par un Al^{3+} , ce qui induit un déficit de charge), (ii) soit variables et pH-dépendantes (dues aux liaisons en bordure des minéraux, où l'on trouve des groupements fonctionnels OH dont la réactivité dépend de leur niveau de protonation, et donc du pH du milieu). Ces charges leur permettent ainsi de complexer le calcium et autres cations par compensation de charge via des liaisons faibles électrostatiques et réversibles la plupart du temps (Moore and Reynolds 1989, Mermut and Lagaly, 2001, Bergaya and Lagaly, 2006). Les cations adsorbés à l'intérieur ou à la surface de ces minéraux peuvent être mis en compétition avec d'autres cations lorsque la solution environnante en contient en quantité ou si d'autres cations possèdent une meilleure affinité avec les sites d'adsorptions des minéraux. De manière plus générale, de multiples études ont permis de caractériser l'adsorption et la désorption du calcium sur ces minéraux secondaires comme étant dépendants du pH, de la normalité cationique du milieu, mais aussi du rapport solide/solution (Levy and Shainberg, 1972, McBride, 1994, Liu et al., 1995, Hakem et al., 2000, Missana et al., 2008, Tertre et al., 2011a and b, Lu et al., 2014, Brazier et al., 2019).

On peut distinguer trois types d'adsorption des ions hydratés (Figure 1.6) :

- La complexation en **sphère interne** : les ions perdent en partie ou totalement leurs sphères d'hydratation et se lient fortement à la surface des minéraux via des liaisons ioniques ou covalentes, dans une zone qu'on nomme « couche de Stern » (Sposito, 2004) ;
- La complexation en **sphère externe** : les ions et les contre-ions conservent leur sphère d'hydratation, sont moins directement liés à la surface, via des liaisons électrostatiques et se situent à la limite extérieure de la couche de Stern (Sposito, 2004) ;
- Le « **nuage** » d'**ions diffus** : des ions et des contre-ions sont situés dans une « zone d'influence » de la surface des minéraux dans laquelle on observe un gradient de la distribution ionique, qui décroît exponentiellement à mesure que l'on s'éloigne de la surface, et tend vers la concentration globale de la solution environnante, avec laquelle des échanges diffus ont lieu. (Thompson and Goynes, 2012).

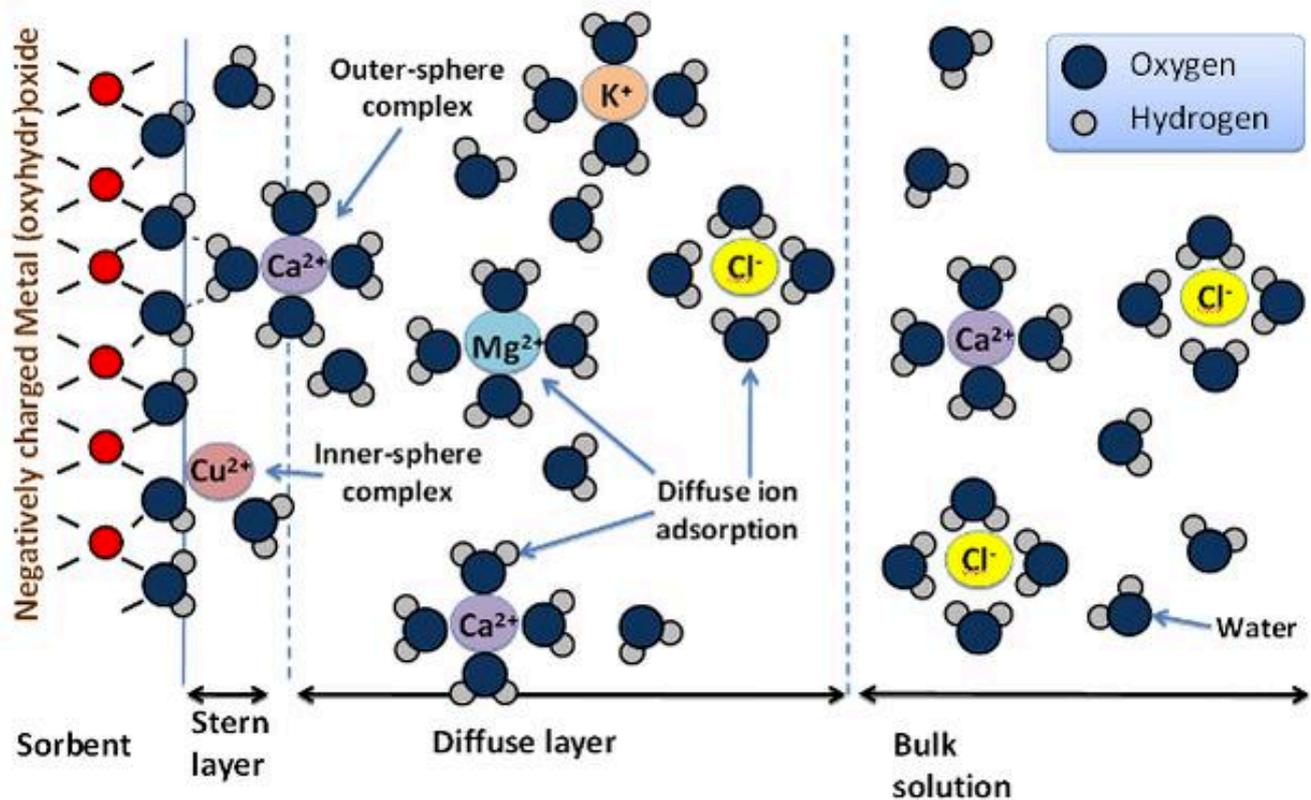


Figure 1-6 : Arrangement des ions à proximité d'une surface adsorbante électroniquement chargée (Nature Education, 2012, d'après Maurice (2009) et Chorover & Brusseau (2009)).

1.4.1.a. Influence du pH de la solution

Comme évoqué précédemment, les composés principalement impliqués dans l'adsorption des cations du sol sont d'autant plus réactifs que le pH est élevé, du fait de la déprotonation des groupements fonctionnels. Les protons présentant une charge positive, cela a pour effet de diminuer la charge à la surface des minéraux secondaires et de la matière organique. Ainsi, la charge variable des minéraux argileux et des oxy-hydroxydes peut être négative, positive, ou même neutre selon le pH de la solution. On parle alors de « point de charge nulle » (« point of zero charge » ou « PZC ») pour un pH auquel la charge de surface est égale à zéro (Kosmulski, 2001).

1.4.1.b. Influence de la taille des éléments adsorbés

Dans des conditions de concentrations et de charges similaires, le rôle de la taille des ions devient un paramètre déterminant le comportement d'absorption des ions et leur compétition. La taille des ions et leurs charges sont liées par le concept de potentiel ionique, qui correspond au rapport entre la charge et le rayon de l'ion.

De manière générale, pour une même charge, un rayon plus important favorise la formation d'une liaison en sphère interne entre un ion et une surface. En effet, le retrait d'une molécule d'eau de la sphère d'hydratation d'un ion nécessite moins d'énergie pour un ion de plus grande taille et un rayon ionique plus important augmente la portée du nuage d'électrons de l'ion et donc la probabilité de formation d'une liaison covalente (Thompson and Goyne, 2012).

1.4.1.c. Influence de la concentration des cations en solution et en phase solide

La concentration élémentaire est naturellement l'un des paramètres majeurs exerçant une influence directe sur l'adsorption. Lorsque les concentrations élémentaires sont faibles, le principe de Le Chatelier prédit qu'une augmentation de la concentration, qui induit une augmentation de l'adsorption, et vice-versa pour une diminution de la concentration (Thompson & Goyne, 2012)

Il est possible de caractériser l'adsorption en mesurant la concentration des cations dans la solution (C_{eq} en mol/L) et la concentration des cations sur/dans le sorbant (matériau pouvant fixer des ions) (Γ_{ads} en mol/kg) (Thompson & Goyne, 2012). La mesure de ces deux paramètres pour une gamme de concentrations, dans des conditions physico-chimiques similaires, permet d'obtenir un isotherme d'adsorption (Figure 1.7).

Pour de nombreux composés organiques et ions en solution à faible concentration (Chiou 2002), cette relation est linéaire et donne le coefficient de partage (K_D en L/kg).0

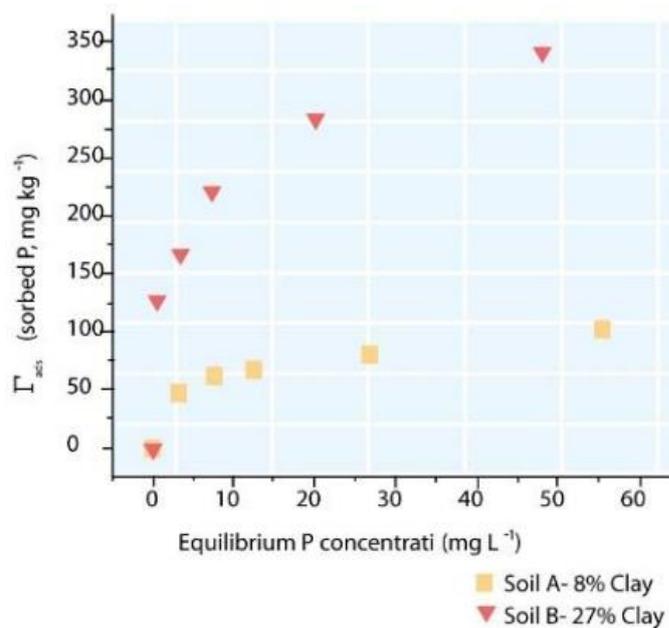


Figure 1-7 : Exemples d'isothermes d'adsorption présentant la quantité d'élément adsorbé en mg par kg de sorbant (surface adsorbante), en fonction de la concentration de l'élément dans la solution à l'équilibre, en mg/L.

1.4.1.d. Influence de la texture du sol, de la granulométrie, de la surface spécifique et de la CEC

Le comportement physico-chimique d'un horizon de sol dépend en partie de sa texture *i.e.*, sa granulométrie. On définit différentes catégories en fonction de la granulométrie, du plus grossier au plus fin : les sables (gros et fins), les limons, et les argiles. Le terme « argile » est utilisé à la fois d'un point de vue minéralogique et granulométrique. Toutefois, il est possible de lier la composition minéralogique des particules avec leur taille. En effet, comme énoncé précédemment, les minéraux s'altèrent plus ou moins rapidement en fonction de leur nature. Par exemple, le quartz qui présente une bien meilleure résistance à la météorisation (altération chimique et mécanique) voit la taille de ses particules diminuer de manière moins importante au cours du temps en comparaison avec les autres minéraux. Il existe en effet une disparité de la stabilité des liaisons établies entre les différents atomes. Par exemple, le K⁺ est faiblement lié à l'oxygène, le Fe²⁺ et le Mg²⁺ le sont moyennement tandis que le Si⁴⁺ établit des liaisons fortes avec l'oxygène. Il en découle que le quartz, ne présentant que des liaisons fortes entre silicium et oxygène, résiste beaucoup mieux à l'altération que les autres minéraux primaires. Goldich (1938) a d'ailleurs établi l'ordre de résistance des minéraux à l'altération (Figure 1.8).

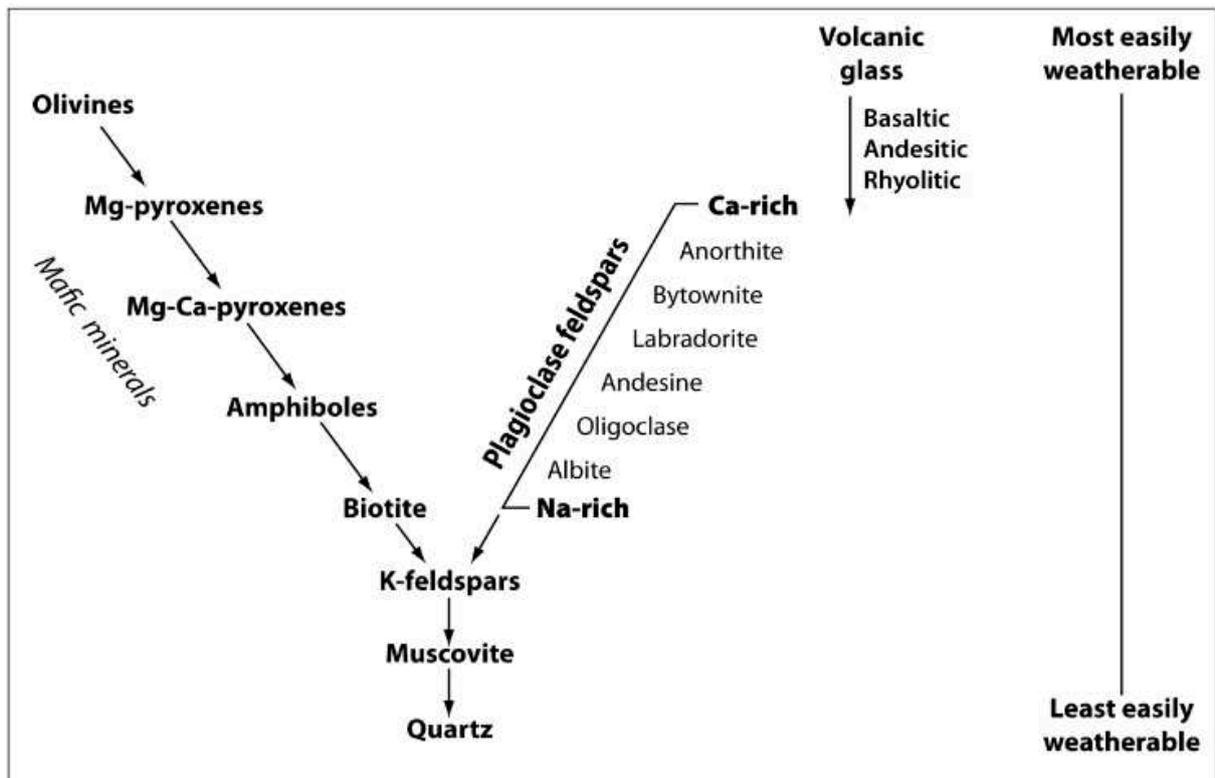


Figure 1-8 : Série de stabilité des principaux minéraux primaires et de verres volcaniques (Churchman et Lowe, 2012)

Cette série coïncide avec la suite des cristallisations des minéraux lors du refroidissement d'un magma (suites de Bowen). Par exemple, l'olivine cristallise à haute température dans un magma. Elle est donc beaucoup moins stable dans des conditions de température et de pression de surface, contrairement au quartz qui cristallise quant à lui à une température moins élevée et présente ainsi une plus grande stabilité. La nature du réseau cristallin intervient aussi dans la stabilité des minéraux, et les phyllosilicates (e.g. muscovite) présentent de ce fait une bonne résistance à l'altération, quoiqu'inférieure à celle du quartz.

On retrouve ainsi beaucoup plus de quartz parmi les particules grossières tandis que les plus fines sont principalement constituées de phyllosilicates i.e., des minéraux argileux. Ce qui explique pourquoi les particules à granulométrie argileuse possèdent généralement une CEC relativement importante (Table 1.2). Un horizon argileux aura ainsi plus d'affinité pour l'adsorption et une plus grande énergie de liaison qu'un sol sableux (Shuman, 1975).

Un autre point à préciser concerne la « surface spécifique ». Il s'agit de la surface de contact d'un minéral avec son environnement extérieur, rapporté à sa quantité (i.e., m^2/g). Plus la granulométrie d'un minéral est faible, plus sa surface spécifique est élevée, ce qui augmente sa capacité d'interaction avec les cations et donc l'adsorption.

1.4.2. Précipitation, solubilisation et spéciation

La précipitation consiste en la transformation d'une substance soluble en solide via notamment la réaction de différents ions entre eux (e.g. : $\text{Ca}^{2+} + \text{CO}_3^{2-}$). La solubilisation, est le processus inverse par lequel des substances solides se dissolvent dans l'eau du sol. Des processus de précipitation et de dissolution peuvent s'enchaîner ou se produire en même temps, jouant ainsi un rôle dans le stockage et la libération des nutriments. Ces processus sont notamment conditionnés par des équilibres chimiques, le pH, les concentrations ioniques dans les solutions de sol, mais aussi par l'activité biologique, pouvant favoriser l'altération des minéraux (Hinsinger et al., 2005). Dans le cas de certains éléments, et notamment les métaux, on parle de « spéciation » pour représenter les différentes formes existantes de ces éléments et leurs proportions, en fonction des conditions physico-chimiques de leur environnement. Par ailleurs, l'altération des silicates et des carbonates contenant du calcium consomme du CO_2 et mène à la libération de calcium dans les solutions de sol (Berner et al., 1983). On le retrouve soit sous forme libre entouré de molécule d'eau, soit sous la forme d'hydrates.

1.4.3. Prélèvement par les organismes vivants

Les transferts de Ca à l'interface eau-sol-plantes/organismes impliquent un certain nombre de processus physico-chimique et biologiques. Pour être prélevés et incorporés par la végétation ou les microorganismes, les nutriments doivent être présents sous une forme mobile et biodisponible. Pour cela les nutriments doivent être présents en solution. Il existe donc un lien étroit entre le prélèvement des nutriments par la végétation et les processus de précipitation/solubilisation et d'adsorption/désorption évoqués plus tôt (Street et al., 1977, van Leeuwen et al., 2005).

Lorsque les éléments nutritifs sont présents sous forme disponible dans les solutions de sols, ils peuvent être prélevés ou incorporés par la végétation au niveau de la rhizosphère, ou bien par les microorganismes. Ils sont transférés dans le sol par diffusion et par flux de masse, ou bien aussi via les hyphes des champignons mycorhiziens (Brunner et Frey, 2000). Par ailleurs, les différents facteurs jouant un rôle sur le comportement des nutriments dans la rhizosphère (i.e. pH, matière organique) varient longitudinalement et radialement le long d'une racine individuelle, à la fois en fonction des propriétés physico-chimiques du sol, de l'espèce et du statut nutritionnel de la plante, mais aussi en fonction de l'activité des microorganismes dans la rhizosphère (Marschner, 1995).

Lorsque les éléments ne sont pas présents sous une forme biodisponible pour les organismes, ceux-ci peuvent y remédier en synthétisant des métabolites interagissant avec les nutriments. C'est le cas notamment des sidérophores synthétisés par presque tous les microorganismes étudiés (Miethke and Marahiel, 2007, Aznar, 2014), qui chélatent le fer avant d'être recaptés par les microorganismes. Inversement, certains organismes semblent capables de réguler (négativement et positivement) l'altération des minéraux selon la quantité de calcium biodisponibles dans leur environnement (Gobran et al., 2005, Turpault et al., 2009). Le calcium est impliqué dans de nombreux processus bactériens tels que la maintenance de la structure cellulaire, la division cellulaire, ou bien le processus de sporulation etc. (Smith, 1995, Norris *et al.*, 1996). En revanche, il a été démontré que les bactéries exerçaient un contrôle précis de la quantité de Ca qu'elles contenaient (100-300 nM) (Gangola and Rosen, 1987, Knight *et al.*, 1991, Futsaether and Johnsson, 1994, Herbaud *et al.*, 1998, Jones *et al.*, 1999, Torrecilla *et al.*, 2000) et qu'elles possèdent divers moyens de contrôle tels que des transporteurs primaires et secondaires, des protéines de liaison du Ca etc. pouvant impliquer l'homéostasie du Ca (Norris *et al.*, 1996, Paulsen *et al.*, 2000, Waditee *et al.*, 2004). Du côté des champignons mycorhiziens, les hyphes colonisent de préférence les minéraux sources de nutriments inorganiques facteurs limitant de la croissance des plantes et notamment l'apatite, source de phosphore. L'altération de l'apatite libère par ailleurs du calcium et d'autres bases (Blum et al. 2002, Hoffland et al. 2003, Smits et al. 2012). Par exemple, dans le bassin versant de la forêt de Hubbard Brook, lors d'une étude Blum et al., (2002) l'altération de l'apatite présente dans le sol s'est avérée être une source importante d'alcalinité et d'ions calcium.

Concernant la végétation, le calcium est absorbé au niveau des racines latérales grâce au flux de masse induit par la transpiration à travers la végétation. Une fois à l'intérieur des plantes, le calcium est principalement transporté via la sève circulant dans le xylème (tissu vasculaire ligneux servant de conduit pour le transport de l'eau et de la sève brute dans un seul sens de manière passive jusqu'aux extrémités des branches). En revanche, il n'y a pas de translocation du calcium à travers le phloème (tissu conducteur permettant la circulation de la sève élaborée dans les deux sens) (Clarkson 1984, Barber 1995, Marschner 1995, McLaughlin and Wimmer 1999, Taiz and Zeiger 2010).

En tant que nutriment essentiel à la végétation, le calcium possède plusieurs fonctions spécifiques une fois à l'intérieur des plantes. Il est notamment impliqué dans la stabilisation des membranes et des parois cellulaires (Marschner 1995, Taiz and Zeiger 2010). Il se comporte comme un contre-ion pour les anions organiques et inorganiques contenus dans la vacuole

(organite). De plus, une des fonctions principales du calcium consiste en sa capacité à servir de messenger dans un ensemble de processus lié à la croissance végétale et à la fertilisation (Michard et al., 2011, Monshausen et al., 2011, Ortiz-Ramírez et al., 2017, Zhang et al., 2017) ainsi qu'aux réponses aux stress environnementaux (Marschner 1995) abiotiques comme biotiques (Knight et al., 1997) ainsi que biotiques (Blume et al., 2000, Lecourieux et al., 2002, 2005, Thor, 2019).

1.4.4. Recyclage de la végétation

Le calcium prélevé par la végétation est ensuite en grande partie restitué au sol via la chute des aiguilles et des feuilles mortes, qui sont décomposées et minéralisées, ce qui rend les minéraux à nouveau disponibles pour la végétation. Ce recyclage du calcium est d'autant plus important dans les contextes où les apports de calcium sont limités ou que le sol est sensible au lessivage des cations, notamment lorsque les apports atmosphériques sont faibles, en cas de pluies acides, ou avec un matériau parental pauvre en cations (Hedin et al. 1994, Lesack and Melack 1996, Likens et al. 1998, Aubert et al. 2001, Schmitt, 2016).

1.5. Cycle biogéochimique du calcium

Les différents réservoirs existants dans les sols ainsi que la nature de leurs interactions étant définies, il est désormais possible d'évoquer avec plus de précision la place que prend le calcium au milieu de la zone critique.

Durant la dernière décennie, plusieurs études ont montré l'implication du calcium dans les nombreux processus biogéochimiques ayant cours dans la zone critique (e.g. prélèvement par les racines et translocation au sein des arbres, recyclage par la végétation, adsorption, dissolution et précipitation de minéraux secondaires, activité des microorganismes) ainsi que le potentiel de ses isotopes stables dans l'identification et la quantification de ces processus (Cenki-Tok et al., 2009, Cobert et al., 2011, Schmitt et al., 2012, Bagard et al., 2013, Schmitt et al., 2013, Gangloff et al., 2014, Schmitt, 2016, Schmitt et al., 2017, 2018, Brazier et al., 2019, Schmitt et al., 2019). Il a notamment été mis en évidence que le calcium est un macronutriment essentiel à la végétation, dans laquelle il se retrouve dans des proportions non négligeables (0,5% de la masse sèche de la biomasse) (Taiz et Zeiger, 2010).

Les connaissances actuelles permettent d'attribuer des valeurs de $\delta^{44/40}\text{Ca}$ aux différents réservoirs continentaux de Ca, présentés dans la figure 1.9. On a ainsi à l'interface eau-sol-plante :

- Le calcium issu de **l'altération de la roche mère**, provenant principalement des roches carbonatées (en moyenne $0,64 \pm 0,09\%$) et des roches silicatées (en moyenne $0,80 \pm 0,20\%$) (Tipper et al., 2016).
- Le calcium issu des **apports atmosphériques**, avec d'une part les apports humides : pluie (en moyenne $0,70 \pm 0,16\%$) et neige (en moyenne $0,76 \pm 0,18\%$) (Tipper et al., 2016), et d'autre part les poussières ($0,69 \pm 0,15\%$), ainsi que les évaporats dont la signature isotopique est censée être similaire à leur source.
- Le calcium stocké dans la **biomasse végétale** (en moyenne $0,01 \pm 0,10\%$) (Tipper et al., 2016 et références associées)
- Le calcium impliqué dans les **processus secondaires** ayant lieu dans les sols, e.g. adsorption et désorption sur différents matériaux, précipitations de minéraux secondaires, complexations (en moyenne $0,90 \pm 0,05\%$) (Wiegand et al., 2005, Tipper et al., 2006b, Farkas et al., 2011, Bagard et al., 2013)

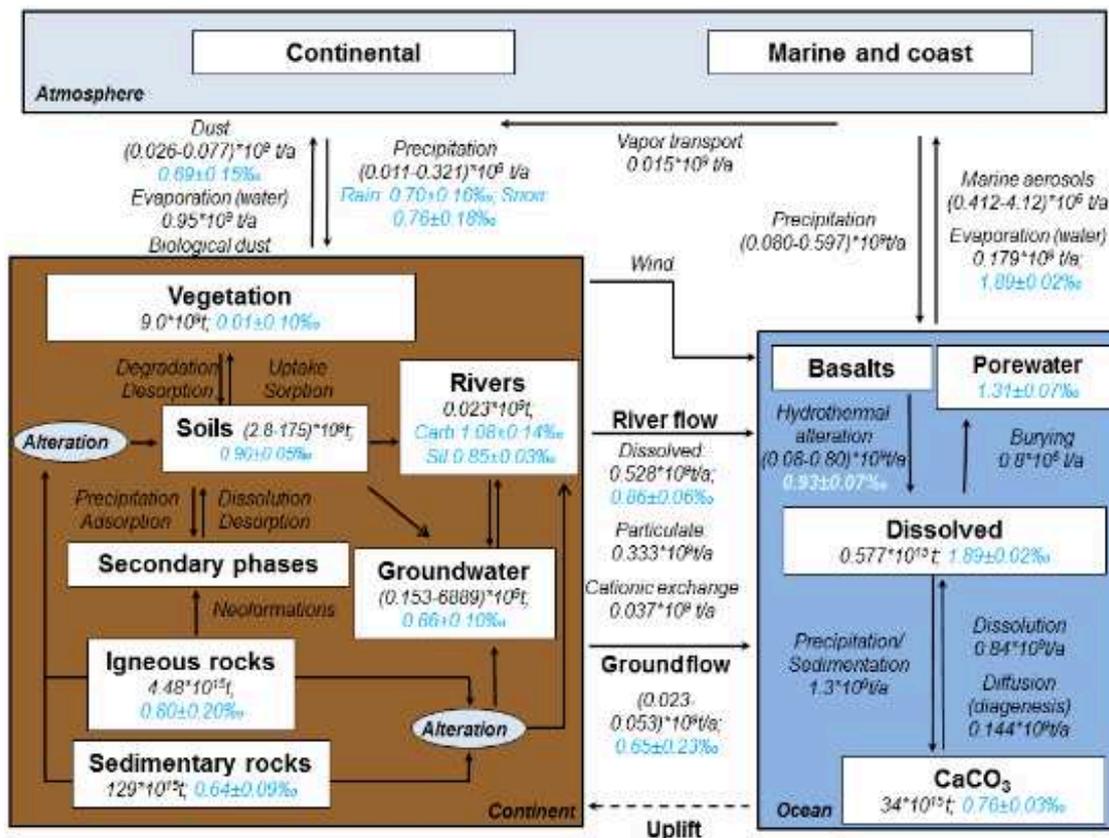


Figure 1-9 : Compositions élémentaires et isotopiques du Ca dans les différents réservoirs constituant le cycle biogéochimique du calcium à l'échelle globale. (Tipper et al., 2016).

Par ailleurs, les isotopes du calcium ont montré leur potentiel pour le traçage du calcium dans le cycle de vie de la végétation, depuis le prélèvement racinaire jusqu'à son recyclage à partir de la dégradation de la matière organique. En effet, les plantes jouent un rôle important dans le cycle biogéochimique du calcium (Berner and Berner 1996, Poszwa et al. 2000, Schmitt et al. 2003, Schmitt and Stille 2005, Wiegand et al. 2005, Perakis et al. 2006, Page et al. 2008, Cenki-Tok et al. 2009, Holmden and Bélanger 2010, Farkaš et al. 2011, Hindshaw et al. 2011, Bagard et al. 2013, Schmitt, 2016).

D'autres études ont quant à elles mis en avant l'influence potentielle d'autres réservoirs du calcium (e.g. minéraux argileux, oxy-hydroxydes, matière organique) sur la signature isotopique du calcium (Fantle et Tipper, 2014, Tipper et al., 2016). Elles suggèrent que ces composants des sols peuvent avoir une importance significative dans le cycle biogéochimique du calcium au niveau des sols et notamment sur le contrôle de sa biodisponibilité pour la végétation, ce qui rend la caractérisation de l'adsorption du calcium sur ces éléments d'autant plus intéressante.

1.6. Verrous scientifiques à lever

Une étude de Brazier et al. (2019) a montré que l'isotope léger du calcium (^{40}Ca) est préférentiellement adsorbé et désorbé sur des phyllosilicates courants des sols (kaolinite KGa-2, montmorillonite Swy2, muscovite de Tuftane triée en taille) et que l'amplitude du fractionnement était fonction de différents paramètres dont : **(1)** la fraction granulométrique i.e., influence de la surface spécifique externe, **(2)** la charge de surface (induite notamment par la charge structurale due aux défauts dans les structures cristallines choisies), et enfin **(3)** la présence ou non d'un espace interfoliaire ouvert aux cations. Cette étude met plus spécifiquement en avant le fait que le fractionnement isotopique mesuré est plus important dans le cas de la plus petite fraction granulométrique (0,1 – 1 μm) de la muscovite (+ 0,25 ‰, fractionnement apparent), suggérant ainsi que la charge structurale devait être le principal moteur du fractionnement isotopique. Ces résultats viennent renforcer les résultats d'Ockert et al. (2013) qui mettaient déjà en lumière une adsorption privilégiée du ^{40}Ca sur des minéraux argileux, mais cette fois ci en milieu marin. Afin de vérifier quels sont les paramètres contrôlant le fractionnement isotopique du Ca dans les phyllosilicates, nous allons tester dans ce travail de thèse l'adsorption du Ca sur de la vermiculite, qui à la différence de la muscovite présente un interfoliaire ouvert. Les expérimentations seront réalisées en mode statique (en batch) ainsi

qu'en mode dynamique (avec diffusion d'une solution contenant du Ca au travers d'un échantillon de vermiculite.

Une autre étude de Schmitt et al. (2023) suggère quant à elle un fractionnement isotopique encore plus important lors de l'adsorption du calcium sur un phyllomanganate (+1,22%, vernadite synthétique, ou δ -MnO₂), ce qui pourrait s'expliquer par la présence d'un interfoliaire ouvert, pouvant accueillir les cations aqueux, dont le calcium, les sites de bordure, ainsi que par la forte charge structurale de ce minéral. La structure du δ -MnO₂ varie en fonction des conditions physico-chimiques de sa synthèse (Marafatto et al., 2018). De plus, le δ -MnO₂ est la version synthétique de la vernadite qui est précipitée naturellement par oxydation du manganèse par certains microorganismes et qui présente une structure très désordonnée, favorisant l'existence de lacunes et affectant ainsi fortement la charge structurale du minéral. Ainsi, dans cette thèse, nous allons étudier l'influence des différences structurales de différents oxydes de manganèse abiotiques synthétisés en laboratoire, sur l'adsorption du calcium et son fractionnement isotopique, et comparer ces résultats avec ceux d'une vernadite d'origine biogénique, puisque dans le milieu naturel la majorité des vernadites sont synthétisées sous contrôle biotique.

Ce dernier point nous amène aussi à nous poser la question du rôle des microorganismes dans le cycle biogéochimique du calcium. Des études récentes ont justement montré l'influence de la présence de bactéries sur l'empreinte isotopique du Ca dans les solutions du sol. En effet, la présence de bactéries favoriserait l'altération des minéraux, ce qui rendrait le Ca plus disponible pour la végétation, et non limitant dans le réservoir naturel. Par conséquent, les eaux du réservoir de nutriments ne présentent pas de fractionnement isotopique du Ca, alors qu'en l'absence de bactéries, le fractionnement est observable. (Cobert et al., 2011a, Gangloff et al., 2014). Afin de proposer les isotopes du Ca comme traceurs de l'activité bactérienne dans les sols, il faut dans un premier temps s'assurer s'il existe ou non un fractionnement associé à l'adsorption/désorption du Ca sur des bactéries du sol. Aucune étude n'existe actuellement sur le fractionnement du calcium au contact de bactéries mais il existe en revanche des études portant sur l'existence d'un fractionnement isotopique significatif du cuivre et du zinc dû à l'adsorption et à l'incorporation de ces deux éléments par des bactéries (Navarette et al., 2011, Kafantaris and Borrock, 2014). Cela signifie que les bactéries peuvent jouer un rôle plus direct dans le cycle biogéochimique des éléments et qu'il serait donc intéressant de caractériser l'adsorption et l'incorporation du calcium directement sur des bactéries. Toutefois, tous les éléments ne se comportent pas de la même manière et les différences entre le calcium et ces

éléments pourrait induire un résultat différent. C'est pourquoi nous allons au cours de ce travail de doctorat tester les potentiels fractionnements isotopiques du Ca lors de l'adsorption /absorption de cet élément dans/sur des bactéries ubiquistes du sol.

1.7. Objectifs de la thèse

Tous les questionnements se trouvent au cœur de la problématique et des objectifs de cette thèse de doctorat qui comporte trois axes de recherche :

- (1) Etude de l'intensité de fractionnement isotopique en Ca lors de l'adsorption/absorption du Ca sur des bactéries ubiquistes du sol
- (2) Etude de l'intensité de fractionnement isotopique en Ca lors de l'adsorption du Ca sur des oxydes de Mn précipités biotiquement et abiotiquement
- (3) Etude de l'intensité de fractionnement isotopique en Ca lors de l'adsorption du Ca sur la vermiculite en mode statique et dynamique

L'objectif général de cette thèse est d'approfondir l'ensemble de ces problématiques, non seulement de façon distincte, mais aussi en créant des ponts entre elles, de manière à amorcer une modélisation plus précise du cycle biogéochimique du calcium dans les sols, grâce à une compréhension plus fine des mécanismes d'interaction du calcium avec les différents constituants du sol, et du fractionnement isotopique induit par ces interactions. Ces trois objectifs sont synthétisés dans un schéma conceptuel présenté en figure 1.10.

Processus secondaires des sols : $\delta^{44/40}\text{Ca} \approx 0,90 \pm 0,5 \text{ ‰}$
 (Wiegand et al., 2005 ; Tipper et al., 2006b ; Farkas et al., 2011 ; Bagard et al., 2013)

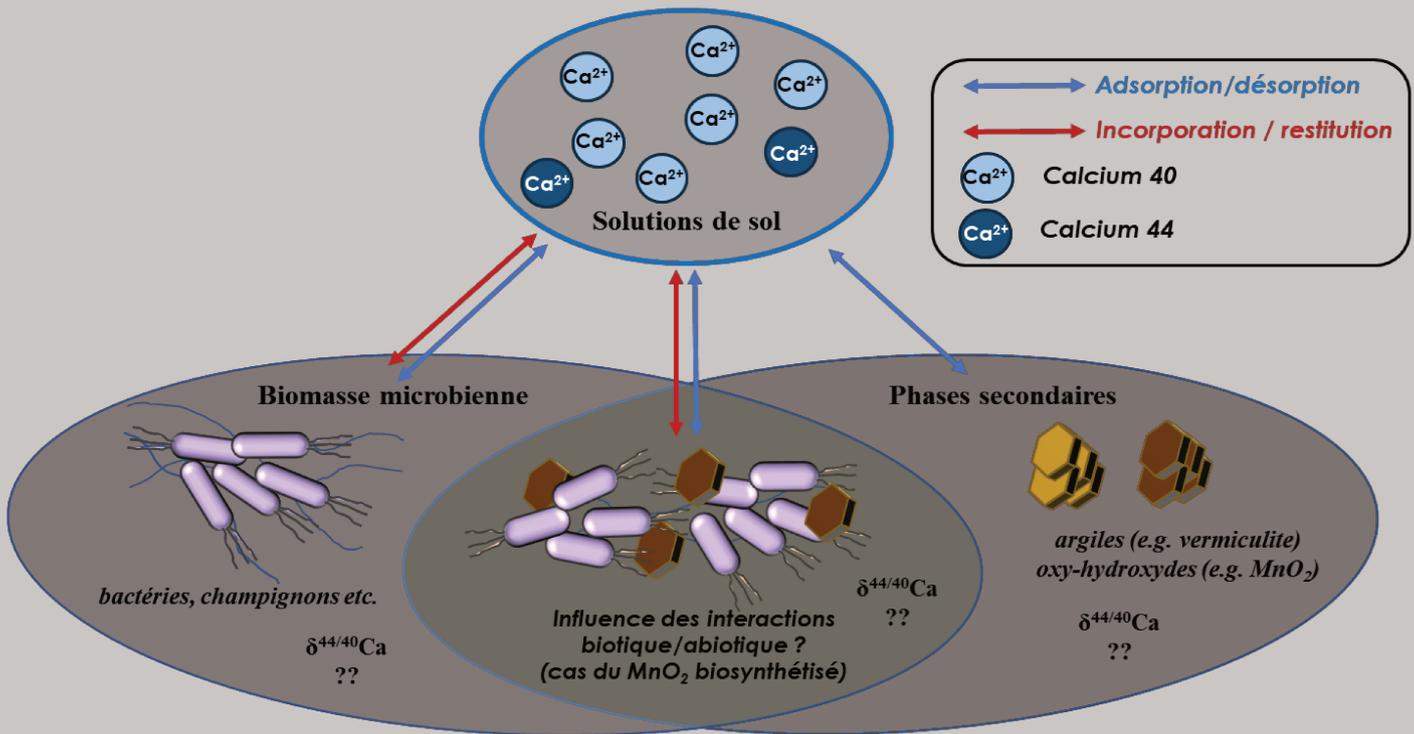


Figure 1-10 : Schéma conceptuel synthétisant la problématique et les objectifs des travaux de cette thèse, visant à préciser le rôle potentiel des minéraux secondaires et des microorganismes dans le cycle biogéochimique du calcium, ce rôle étant encore peu étudié à ce jour. Les travaux de cette thèse se focaliseront sur l'étude des bactéries, de la vermiculite et d'un ensemble d'oxydes de manganèses dont un biogénique et divers abiotiques synthétisés selon des protocoles différents.

Chapitre 2 : Matériel et méthode

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Introduction sur les bactéries

Les bactéries sont des organismes omniprésents à la surface de la Terre. On les retrouve dans l'eau, l'air, les sols, mais aussi dans les organismes vivants. Elles jouent notamment un rôle important dans l'écologie en participant à la décomposition des matières organiques et par conséquent au recyclage des nutriments, qui peuvent être utilisés par d'autres organismes. Par ailleurs, sur les 550 gigatonnes de carbone représentés par la biomasse (masse des êtres vivants dans les écosystèmes), les bactéries représentent 70 gigatonnes de carbone (Bar-On et al., 2018) et plus de 10000 espèces ont déjà été décrites (Mora et al., 2011).

Il s'agit d'êtres unicellulaires composés d'une cellule dite « procaryote ». Les cellules procaryotes sont caractérisées par l'absence de noyau délimité, comme on en retrouve dans les cellules eucaryotes, qui constituent notamment les êtres pluricellulaires. Les cellules bactériennes sont de manière générale plus petites que les cellules eucaryotes. La taille des bactéries se situent ainsi entre 0,5 et 10 μm de diamètre ou de longueur, selon la forme des bactéries. Le cœur de la cellule bactérienne est séparé de son environnement par une membrane cytoplasmique composée d'une double couche de phospholipides. Cette membrane est essentielle du fait de son rôle dans la sélectivité de la perméabilité de la cellule, c'est-à-dire qu'elle contrôle ce qui peut entrer et sortir de la cellule. Elle joue aussi un rôle dans la régulation de la croissance et de la division cellulaire. L'intérieur de la cellule contient quant à lui le cytoplasme, où se déroulent l'ensemble des réactions métaboliques. Il s'agit d'un milieu aqueux contenant diverses enzymes, coenzymes, pigments etc. mais aussi le ribosome, impliqué dans la synthèse protéique.

Les bactéries peuvent être classées en différents groupes selon les spécificités de leurs membranes ou leur capacité à se développer en absence d'oxygène ou non. Les bactéries étudiées dans ces travaux nécessitent de l'oxygène pour se développer et appartiennent aux groupes des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Ces deux types de bactéries ont des structures cellulaires qui leur sont propres :

- Les **bactéries à Gram positif** ont une paroi cellulaire épaisse. Cette paroi est composée principalement de peptidoglycane. La paroi cellulaire des bactéries à Gram positif leur donne une forte résistance aux agents antimicrobiens et leur permet notamment de survivre dans des environnements difficiles.

- Les **bactéries à Gram négatif** possèdent quant à elle une paroi cellulaire plus mince qui est composée de peptidoglycane, mais en moins grande quantité que celle des bactéries à Gram positif. Cette paroi est complétée par une double couche de phospholipides appelée membrane externe. Cette membrane externe est composée de phospholipides et de protéines et leur donne une forme allongée. Du côté extérieur de la membrane externe se trouve une couche de lipopolysaccharides qui offre aux bactéries une résistance supplémentaire aux agents antimicrobiens.

Le fait d'étudier des bactéries appartenant à ces deux grands groupes permet d'avoir une vision plus représentative du milieu naturel, en prenant en compte les spécificités de chaque type de bactéries.

Nous avons choisi deux espèces de bactéries : *Bacillus subtilis* (souche ATCC 6633), une bactérie à Gram positif, et *Pseudomonas aeruginosa* (souche ATCC 15692), une bactérie à Gram négatif. Ces deux espèces spécifiques ont été sélectionnées car ce sont deux espèces ubiquistes dans les sols, facilement cultivables, dans un milieu de culture aux caractéristiques similaires (e.g. température, durée et vitesse d'agitation).

2.1.2. Bactéries utilisées pour ces travaux

2.1.2.a. Bacillus subtilis

B. subtilis est la bactérie à Gram positif la plus étudiée. Son génome a d'ailleurs été l'un des premiers à être complètement séquencé (Kunst et al., 1997). Il s'agit d'une bactérie aérobie capable de se développer dans une large gamme de températures (4 à 45°C) et de pHs et est habituellement présente dans les sols. De plus, elle est chimio-hétérotrophe, se forme en bâtonnet de 1,2 à 10 µm de long et possède des flagelles lui octroyant la capacité de se mouvoir. Elle possède aussi la capacité de produire des spores et plus spécifiquement des endospores, qui concernent principalement les bactéries à Gram positif, notamment les genres *Bacillus* et *Clostridium* et qui sont largement répandus dans l'environnement (Carlin, 2011). La spécificité des endospores relève du fait que la spore se forme à l'intérieur de la cellule mère. Ces spores se forment lorsque les conditions environnementales de la bactérie sont défavorables. Elles sont métaboliquement inactives et peuvent subsister sous cette forme pendant plusieurs millions d'années (Nicholson et al., 2000).

2.1.2.b. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est quant à elle une des bactéries Gram négatif les plus étudiées avec plus de cinq mille génomes séquencés (Winsor et al., 2016). C'est une bactérie elle aussi présente dans de nombreux environnements et elle est réputée pour sa grande adaptabilité (Moradali et al. 2017, Diggle et Whiteley, 2020). Elle est notamment capable d'utiliser de nombreuses sources de carbone et englobe de nombreuses voies pour les métabolites secondaires et les polymères (Mathee et al., 2008, Frimmersdorf et al., 2010). Elle est considérée comme un pathogène opportuniste susceptible de causer diverses pathologies et notamment des infections pulmonaires. Sa culture est aisée sur une gamme de températures allant de 10°C à 42°C. C'est une bactérie aérobic stricte non fermentante, mobile grâce à des cils à leur surface, et n'ayant pas la possibilité de sporuler.

2.1.2.c. *Pseudomonas putida GB-1*

Pour les expérimentations de synthèse biogénic d'oxyde de manganèse, une souche bactérienne supplémentaire a été sélectionnée : *Pseudomonas putida* GB-1, une bactérie à Gram négatif isolée depuis de l'eau fraîche (Green Bay, WI) (Nealson et Ford, 1980). Deux souches ont été testées : *P. putida* GB-1 et *P. putida* MnB-1 mais lors des tests de culture, la croissance bactérienne et la formation d'oxyde de manganèse semblaient être favorisées dans nos conditions pour la souche GB-1. Tout comme *P. aeruginosa*, c'est une bactérie aérobic stricte en forme de bâtonnet. Elle ne forme pas de spore et est mobile grâce à un ou plusieurs flagelles polaires. Sa taille se situe entre 0,5 à 1 µm de large pour 1,5 à 5 µm de longueur.

2.1.3. Cultures bactériennes

2.1.3.a. *Production de cellules végétatives de Bacillus subtilis et Pseudomonas aeruginosa*

Les cultures de bactéries ont été réalisées au laboratoire de Biotechnologie et Signalisation Cellulaire à l'Université de Strasbourg (BSC – UMR 7242). Les manipulations ont été effectuées sous un poste de sécurité microbiologique (PSM), afin de prévenir toute contamination des cultures bactériennes. Les cultures sont réalisées dans des tubes à centrifuger stérile de 50 mL de marque Falcon™.

Pour chaque bactérie, des tubes FalconTM de 50 mL contenant 10 mL de milieu LB ont été inoculés en conditions stériles et placés à 30°C dans un incubateur-agitateur en conditions aérobies pendant 18-24 h. Le milieu LB est un milieu de culture standard riche en nutriment, favorisant une croissance bactérienne rapide. Après la croissance en milieu LB, deux cycles de lavage ont été réalisés par centrifugation des tubes FalconTM (8500 tr.min⁻¹ pendant 5 min), élimination du surnageant et remplacement dans 7 mL de solution de lavage fraîche (milieu succinate ½). Le milieu de culture « succinate ½ » est un milieu synthétique minimum pauvre en fer modifié à partir du milieu succinate original. (Composition en g/L : 3,72g K₂HPO₄·3H₂O, 1,50g KH₂PO₄, 0,10g MgSO₄·7H₂O, 0,50g (NH₄)₂SO₄, 2,00g acide succinique, 1,55g NaOH, [Ca]_{succinate ½} < 2,5×10⁻² µg/mL). Les bactéries sont ensuite remises en suspension dans 8 mL de succinate ½, puis réparties dans des tubes FalconTM de 50 mL contenant du succinate ½ (1 mL de suspension bactérienne dans 25 mL au total). Les tubes sont placés à 30°C dans un incubateur-agitateur en conditions aérobies pendant 24 h. Le but de cette croissance dans le succinate ½ est de réduire le plus possible la quantité de nutriments et surtout la quantité de calcium dans les bactéries pendant la croissance avant les expérimentations d'adsorption afin de favoriser la caractérisation de 'l'adsorption du calcium/incorporation. Après la croissance en milieu succinate ½, deux cycles de lavage ont été réalisés par centrifugation des tubes FalconTM (8500 tr.min⁻¹ pendant 5 minutes), élimination du surnageant, et remplacement dans 7 mL de solution de lavage fraîche (milieu succinate ½). Les bactéries ont été remises en suspension dans 8-10 mL de succinate ½ et regroupées, puis leur densité optique à 600 nm (DO_{600nm}) a été mesurée et ajustée à 0,5 ou 1 en fonction des expériences.

2.1.3.b. *Production et purification des spores de Bacillus subtilis.*

Les spores ont été préparées à partir d'une préculture de *B. subtilis* en milieu LB (18-24h). Un milieu de sporulation a été préparé et autoclavé dans des flacons de sporulation, puisensemencé avec la préculture de *B. subtilis*. Les bouteilles ont été placées à 37°C pendant au moins une semaine. La récolte a été réalisée en lavant la surface du milieu avec quelques gouttes d'eau physiologique stérile et en pipettant la suspension de spores obtenue. Cette suspension a été conservée au froid (4°C). Pour les différentes expérimentations, les spores ont été diluées dans de l'eau ultrapure avec ajustement à la DO_{600nm} souhaitée (entre 0,5 et 4,5).

2.2. Matériel minéral

2.2.1. Oxydes de manganèse

2.2.1.a. *Introduction*

Le manganèse est présent dans les sols aussi bien sous forme d'oxydes individualisés ou d'encroûtement sur d'autres particules minérales (Post, 1999) mais aussi sous forme de nodules de manganèse ou ferro-manganifères de forme sphérique et très résistants, présents dans une grande variété de sols de natures diverses (Gasparatos et al., 2005, Manceau et al., 2003, Neaman et al., 2004, Palumbo et al., 2001, Tan et al., 2006). La précipitation de ces nodules a lieu lorsque les conditions environnementales du sol passent d'un état réducteur dans lequel le fer et le manganèse sont solubles et mobiles à un état oxydant dans lequel ils précipitent sous forme d'oxydes. Par ailleurs, c'est l'enchaînement des cycles de conditions oxydantes et réductrices qui permettent la croissance des nodules (Palumbo et al., 2001, Liu et al., 2002).

Les oxydes de manganèses sont de manière générale formés par des octaèdres au centre desquels on trouve des ions Mn^{2+} , Mn^{3+} ou Mn^{4+} (Figure 2.1). De manière générale, les oxydes de manganèses possèdent une PZC inférieure à pH 4 (voir 1.4.1.a pour la définition de la PZC), une charge structurale fortement négative ainsi qu'une large gamme de surface spécifique (de 5 à $360 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$). De plus, ils témoignent d'une forte capacité d'adsorption des cations métalliques alcalins et de transitions (Murray, 1975).

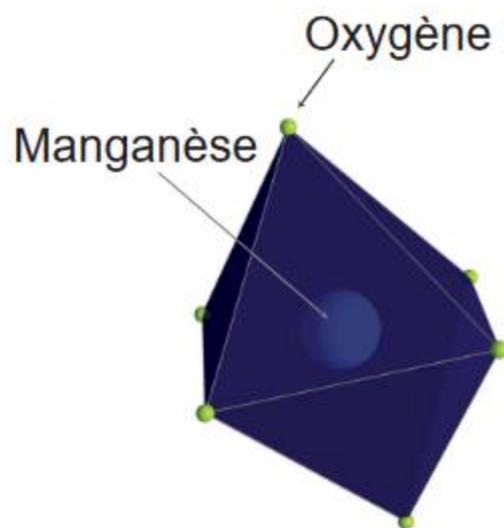


Figure 2-1 : Représentation schématique d'un octaèdre de coordination du manganèse. On y retrouve l'atome de manganèse au centre (sphère blanche), coordonné à six atomes d'oxygène (sphères vertes) qui forment les sommets d'un octaèdre (en bleu). (Grangeon, 2008)

Ils sont classés en trois groupes, selon la nature des liens existants entre les octaèdres ainsi que les arrangements entre les différentes couches : (1) les tectomanganates qui ont une structure dite « en tunnel » (Figure 2.2) (Shen et al., 1993), (2) les phylломanganates qui ont une structure en couche proche de celle des phyllosilicates (Figure 2.3) et enfin (3) les structures compactes. Pour de plus amples détails sur les oxy-hydroxydes de manganèses, leurs structures, leurs formations et leur classification, se référer à Gaillot (2002) et Grangeon (2008).

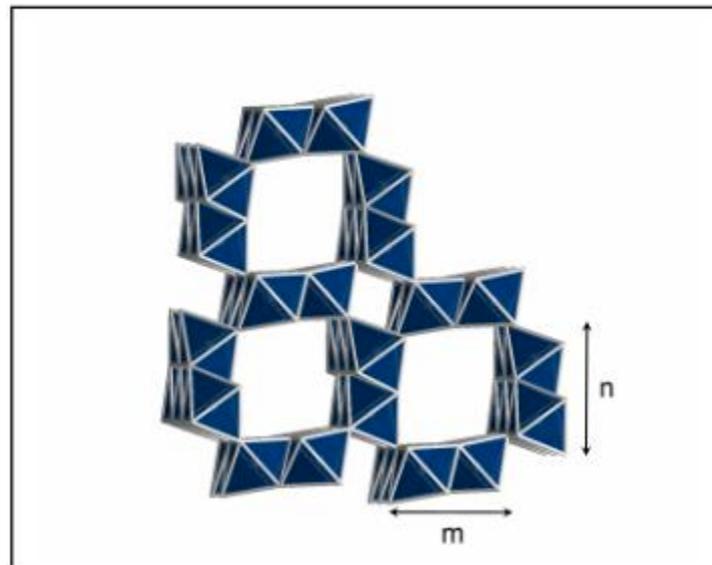


Figure 2-2 : Représentation schématique d'un tectomanganate. La taille des tunnels est de $n \times m$ octaèdres. Les « tunnels » sont susceptibles de contenir des cations (non visibles ici). (Grangeon, 2008).

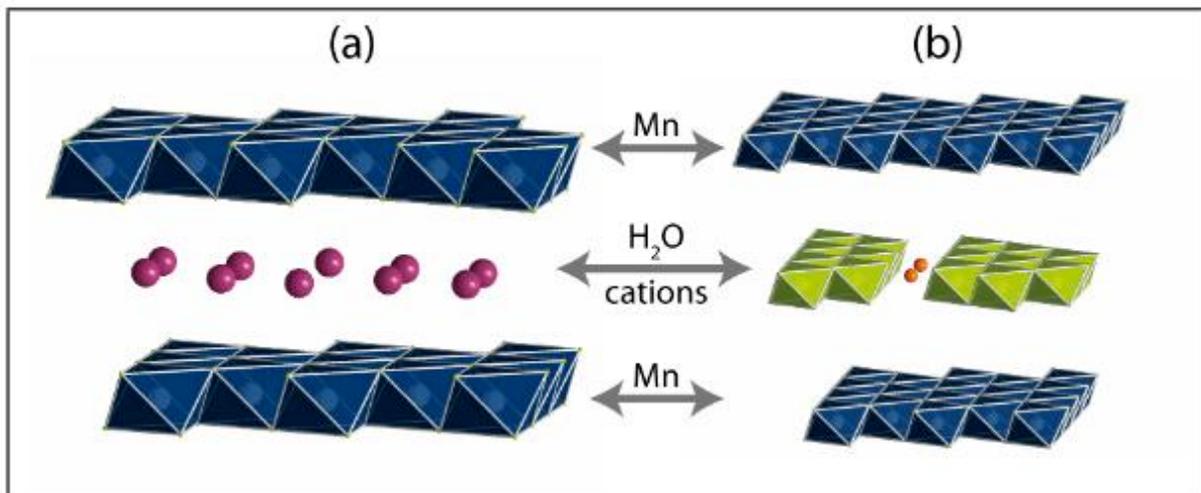


Figure 2-3 : Représentation schématique des deux grandes familles de phylломanganates : (a) les structures lamellaires et (b) les structures sandwichs. Ces deux structures sont caractérisées par la présence de cations et de molécules d'eau entre deux feuillets de MnO_2 . Elles sont en revanche différenciables par le fait que dans les structures lamellaires, les cations sont soit hydratés (comme représenté sur ce schéma avec les sphères violettes) soit en sphère interne au niveau des lacunes des feuillets de MnO_2 (non visible sur ce schéma), tandis que dans les structures sandwichs les cations forment des « ilots » de cations, soit discontinus (structures vertes en (b) et avec la présence de molécule de molécule d'eau (en orange), soit continus,

formant ainsi un feuillet (non présenté ici). Ces ilots peuvent être composés de différents oxydes de type MO_2 où M peut être Li, Al, Ni, Mg, Co, Zn (Grangeon, 2008).

Au cours de ces travaux de thèse nous nous sommes exclusivement intéressés à des phyllomanganates car (1) leur structure est proche des phyllosilicates, sur lesquels des études antérieures (Brazier et al., 2019) ont déjà été réalisées, (2) un δ - MnO_2 a de plus déjà été étudié par Schmitt et al. (2023) et (3) il est connu que des phyllomanganates peuvent être synthétisés par des microorganismes (Tebo et al., 2004, Droz et al., 2015). Il est donc intéressant de pouvoir comparer les résultats obtenus pour différents minéraux structurellement proches et d'observer l'influence des conditions de synthèse et des légères variations structurelles de ces minéraux sur l'adsorption du Ca ainsi que sur son fractionnement isotopique. Ainsi, nous nous sommes intéressés à des échantillons de birnessites (phyllomanganates synthétiques bien cristallisés) ainsi qu'à des échantillons de δ - MnO_2 (formes mal cristallisées et désordonnées de la birnessite (voir 2.2.1.c), dont les différences structurales impliquent notamment une variabilité de la quantité de lacunes (atomes de Mn manquant) dans les feuillets des solides. De plus, il est intéressant de pouvoir comparer ces résultats avec les résultats obtenus pour un MnO_2 biogénique lui aussi très mal cristallisé (ici la vernadite qui est l'équivalent naturel du δ - MnO_2), sachant que dans l'environnement, la formation biotique des oxydes de manganèse se fait à des vitesses de production significativement plus rapides que la formation abiotique (Tebo et al., 2004).

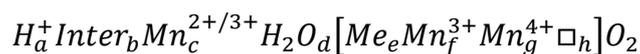
2.2.1.b. *Birnessite*

La birnessite a été décrite pour la première fois par Jones et Milne (1956) dans des dépôts fluvio-glaciaires. Il s'agit d'un minéral omniprésent dans l'environnement, aussi bien dans des nodules en milieu océanique (Burns et Burns, 1977, Glover, 1977), que dans les sols et les sédiments (Cornell et Giovanoli, 1988, Finkelman et al., 1974, Golden et al., 1986).

L'étude structurale des minéraux naturels pouvant s'avérer délicate du fait de la faible cristallinité de ceux-ci ainsi que de leur potentiel manque de pureté (mélange avec d'autres phases et minéraux), de nombreuses études ont été réalisées sur des minéraux analogues synthétiques (Drits et al., 1997, 1998, 2002, Gaillot et al., 2003, 2004, 2005, 2007, Lanson et al., 2000, 2002a,b, Manceau et al., 2002, Post et Veblen, 1990, Post et al., 2002)

Il est important de noter que dans la littérature le terme birnessite ne réfère pas à une seule et unique structure mais représente un ensemble diffus englobant des variations concernant aussi

bien les cations interfoliaires et les molécules d'eau que la structure et la manière de s'empiler des feuillets de MnO₂ (Gaillot, 2002, Grangeon, 2008). En effet, la birnessite présente une structure variable en fonction des conditions de formation du minéral, avec notamment des variations de la quantité de lacunes ou de la proportion de substitutions du Mn^{IV} par du Mn^{III} (Gaillot et al., 2005) ou par des cations de taille proche au Mn^{III} et Mn^{IV} comme du Ni²⁺ (Peacock et Sherman, 2007b) ou du cobalt (Manceau et al., 1997). L'interfoliaire peut lui aussi présenter une variabilité de sa composition selon que les cations soient complexés en sphère interne ou en sphère externe. En sphère, externe les cations (Ca²⁺, K⁺ et Na⁺ sont hydratés et présent entre les feuillets, tandis qu'en sphère interne, ceux-ci sont liés à des atomes d'oxygène à l'endroit des lacunes ou des substitutions dans la structure des feuillets de MnO₂ (voir Figure phyllomanganates). D'un point de vue théorique, la formule stœchiométrique d'un feuillet de phyllomanganate tel que la birnessite (ainsi que ses analogues synthétiques) est MnO₂. Dans les faits, sa composition est :



Où les espèces comprises entre les crochets représentent le feuillet tandis que les espèces en dehors correspondent à l'interfoliaire. Inter représente tout cation de l'interfoliaire, Me représente tout cation autre que Mn lié en sphère interne au feuillet et \square représente les lacunes. C'est la somme de tous ces paramètres qui va déterminer le déficit de charge du minéral et par conséquent sa réactivité avec les cations. Les lacunes étant à l'origine d'un déficit de charge local plus important que les substitutions (4 charges contre 1 charge respectivement), leur rôle dans la réactivité du minéral est d'autant plus important. De plus, les lacunes et substitutions ne permettent pas les mêmes types de liaisons entre les cations et les feuillets, là aussi du fait de la différence de déficit de charges qu'elles impliquent. Ainsi une lacune permettra à un cation de se lier directement au feuillet en sphère interne, tandis qu'une substitution, qui induira un déficit de charge plus faible, ne permettra aux cations que de se lier de façon plus distante, c'est à dire en sphère externe. En cas de liaison en sphère interne, on peut distinguer différents types de liaisons selon le nombre d'atomes d'oxygènes partagés entre le feuillet et le cation. Ce nombre d'atomes d'oxygène partagés varie en fonction de la position du cation par rapport aux lacunes et au feuillet. On peut notamment parler des positions (1) TE pour « triple edge sharing » dans le cas où le cation partage trois arêtes avec le feuillet en surplomb d'une lacune, (2) TC pour « triple corner sharing » dans le cas où le cation est situé à l'aplomb d'une lacune et partage trois atomes d'oxygènes avec le feuillet, (3) DC pour « double corner sharing » lorsque le cation partage deux atomes d'oxygènes avec le feuillet, ce qui arrive lorsqu'il se situe

en bordure du feuillet, (4) E pour « edge sharing » dans le cas où le cation prend place en bordure du feuillet de MnO₂ tout en étant dans le plan du feuillet, c'est-à-dire à une place pouvant être occupé par un octaèdre de Mn (Figure 2.4). Pour plus de détails sur la birnessite, se référer à Grangeon (2008).

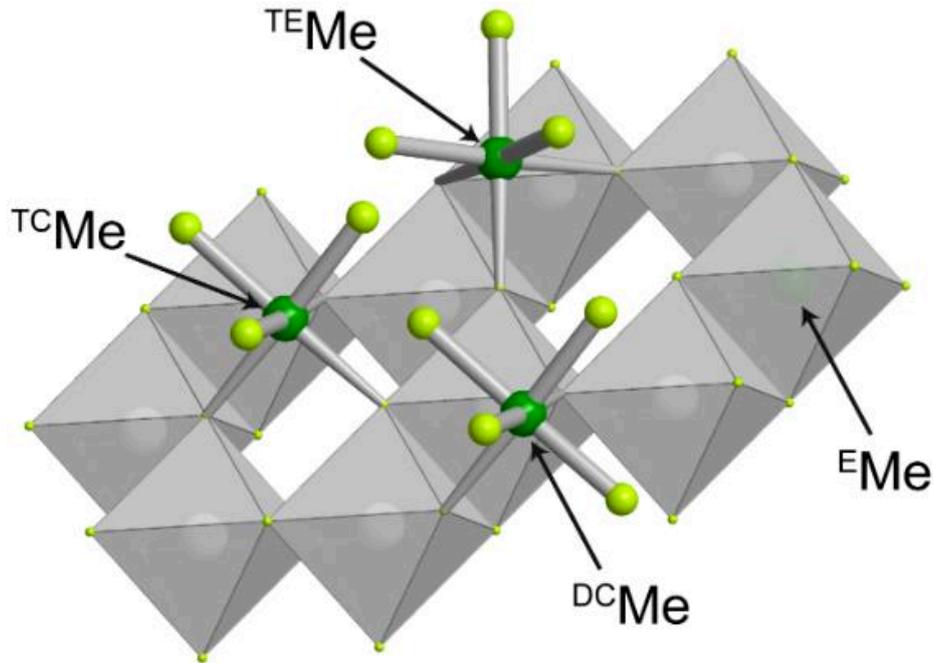


Figure 2-4 : Exemples de positions de liaisons en sphère interne et dans le feuillet de MnO₂. Me correspond à tout cation susceptible d'occuper ces positions. E, pour « edge sharing » réfère à la position cristallographique dans le plan du feuillet. TE (triple edge sharing), TC (triple corner sharing) et DC (double corner sharing) correspondent aux positions de liaisons en sphère interne.

2.2.1.c. δ -MnO₂ et vernadite

La vernadite et le δ -MnO₂ qui en est l'analogue synthétique sont des formes turbostratiques de la birnessite (Giovanoli, 1980), c'est-à-dire que contrairement à la birnessite, la vernadite et le δ -MnO₂ ne présentent pas d'ordre tridimensionnel mais plutôt des translations et/ou des rotations entre chaque empilement de feuillets (Huang et al, 2012). Son empilement de couches se fait généralement de façon hexagonale (hexagonal close-packing, hcp) dans lequel moins de la moitié des octaèdres sont occupés par des ions manganèse. Cependant une structure de type orthogonale a déjà été observée (Webb et al., 2005b).

La vernadite peut tout aussi bien être produite de manière abiotique que biotique. La production abiotique se fait par altération de minéraux préexistants, pouvant être d'autres oxydes de manganèse, ou potentiellement des silicates et carbonates (Anthony et al., 1997).

La production biotique peut être effectuée par de nombreux organismes tels que des microorganismes (bactéries ou champignons) ou bien même des plantes. Cette production biotique peut se faire à des vitesses significativement plus rapides que la production abiotique (Tebo et al., 2004).

Dans les sols, *Pseudomonas putida* a été identifiée comme capable de produire de la vernadite à partir de Mn^{II} (Villalobos et al., 2003, 2006, Tebo et al., 2004, Droz et al., 2015). Mais d'autres bactéries ont montré leur capacité à en faire de même dans d'autres environnements tels que les eaux douces (*Leptothrix discophora*, Jurgensen et al., 2004, Saratovsky et al., 2006) ou les eaux salées (*Bacillus* SP-1, Bargar et al., 2005, Webb et al., 2005b). Il est aussi connu que certains champignons possèdent la capacité d'oxyder le Mn^{II} pour former de la vernadite (Miyata et al., 2004, 2006, 2007a,b, Droz et al., 2015). C'est le cas notamment de *Coprinellus* sp. Cette capacité à oxyder le Mn^{II} chez ces microorganismes est généralement due à des enzymes de types oxydases ou peroxydases permettant de passer de Mn^{II} à Mn^{IV} directement via une double oxydation d'un coup (cas de *P. putida* GB-1, Geszvain et al., 2013) ou bien via deux oxydations successives (cas de *Coprinellus* sp., Wariishi et al., 1992, Glenn et al., 1986)

En plus des microorganismes, les plantes ont aussi la capacité de produire des oxydes de manganèse de type vernadite. C'est le cas par exemple de la plante graminée *Festuca Rubra* (fétuque rouge) qui lorsqu'elle se développe dans un sol contaminé en zinc est capable de produire des cristaux de vernadite incluant une grande quantité de zinc dans sa structure et de Ca interfoliaire ($Zn:Mn = 0,46$ et $Ca:Mn = 0,38$) (Figure 2.5) (Lanson et al., 2008).

Les spécificités structurales de la vernadite présentent tout comme la birnessite une certaine variabilité selon les conditions dans lesquelles elle se forme. Dans la littérature, la proportion de Mn^{III} varie de quasiment 0% (Villalobos et al., 2006, Marafatto et al., 2018) à environ 10% (Grangeon, 2008). Afin de déterminer la proportion de Mn^{III} dans la structure des feuillettes, il est nécessaire de coupler des analyses de la DRX et des analyses du degré d'oxydation moyen du manganèse. Tout comme la birnessite, des substitutions du Mn par d'autres cations (de degré d'oxydation potentiellement inférieur à 4) comme du Ni (Peacock et Sherman, 2007a) ou la présence de lacunes sont aussi possibles.

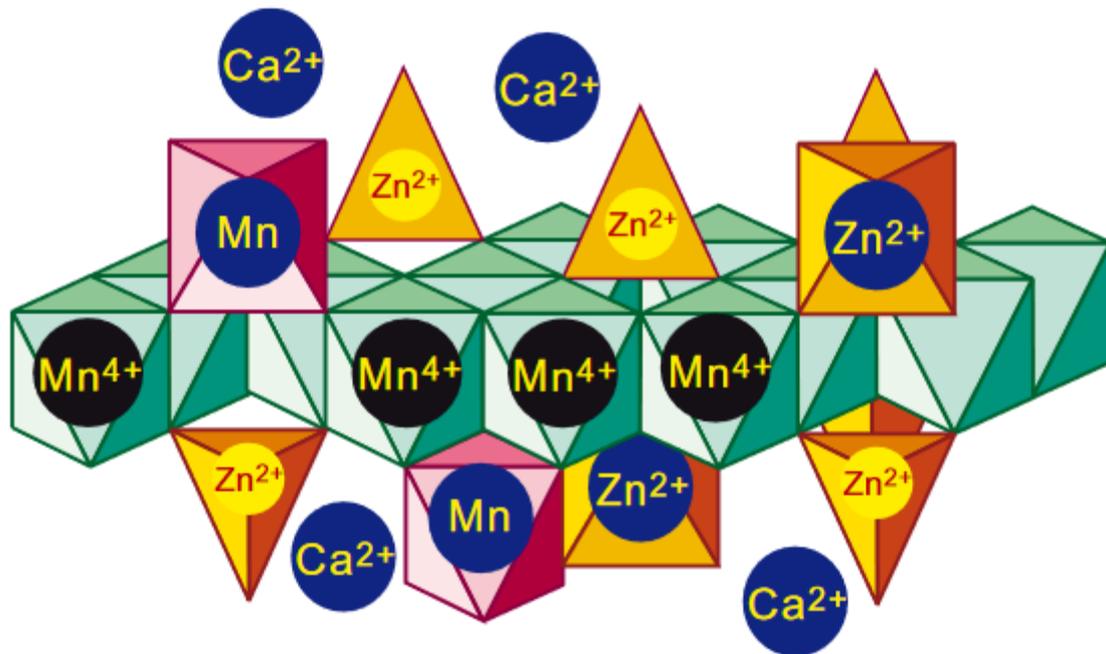


Figure 2-5 : Représentation schématique idéalisée de l'oxyde type vernadite précipité dans les racines de *Festuca Rubra*. Le déficit de charge du aux lacunes dans le feuillet est compensé par des atomes de Zn ou de Mn en sphère interne ou à la place des lacunes, et du Ca en sphère externe dans l'interfoliaire.

Ces paramètres influent là aussi sur la charge des feuillets et par conséquent sur la réactivité avec les cations. Il a été montré que les proportions de lacunes dans la structure des feuillets de δ -MnO₂ variaient en fonction du pH de formation du minéral (0,17 par couche d'octaèdre à pH 3 contre 0,14 à pH 10) (Grangeon et al., 2014). En revanche, l'état d'oxydation du Mn ne semble pas être significativement impacté par les variations de pH (Marafatto et al., 2018).

Concernant l'interfoliaire, sa composition peut être extrêmement variable et les mêmes observations que pour la birnessite peuvent être faites. On peut ainsi retrouver en sphère externe, du Na, du K ou du Ca (Villalobos et al., 2006, Lanson et al., 2008) ou en sphère interne du Zn, Ni, U, Pb ou bien du Mn^{II} et du Mn^{III} (Jurgensen et al., 2004, Marcus et al., 2004, Webb et al., 2005b, Saratovsky et al., 2006, Manceau et al., 2007a, Peacock et Sherman, 2007a Villalobos et al., 2005, 2006, Lanson et al., 2008). Une autre particularité de la vernadite favorisant sa réactivité est la taille nanométrique de ses cristaux, ce qui implique une grande proportion d'atome d'oxygène en bordure de feuillets, accessibles pour des interactions avec les cations environnants. Toutefois, un pH faible favorise la présence d'ions H⁺ sur les bords des cristaux, favorisant ainsi les ponts H⁺ entre les cristaux, et donc une augmentation de la taille des particules, ce qui influe indirectement sur la surface spécifique du minéral (Marafatto et al., 2018). Par ailleurs, l'augmentation de la taille des particules grâce à ces ponts H⁺ serait

un phénomène de croissance cristalline irréversible. En effet, Marafatto et al. (2018) a constaté que la taille des particules de δ -MnO₂ synthétisé à pH 10 puis stabilisé à pH 4 augmentait tandis que celle de particules de δ -MnO₂ synthétisé à pH 4 puis stabilisé à pH 10 restait identique et ne diminuait pas.

Il a aussi été constaté que la surface spécifique (BET-SSA) du δ -MnO₂ n'est pas directement liée à la taille des cristaux et peut être influencée par des variations de la quantité de protons ou d'ions adsorbés (pH de la solution, et/ou quantité de Na par exemple), vraisemblablement via une influence de ces paramètres sur la structure des agrégats/agglomérats. La présence de Na pourrait en effet favoriser l'agrégation des cristallites primaires et/ou des agrégats humides en structures à faible surface spécifique. Ce n'est pas un paramètre fixe et sa variation dans un sens comme dans l'autre est réversible. En somme, un protocole de synthèse donné va induire une surface spécifique donnée mais le conditionnement de l'échantillon post-synthèse (acidification, basification) est le paramètre déterminant pour la surface spécifique (Marafatto et al., 2018).

Dans la littérature, la surface spécifique des échantillons de vernadites et de δ -MnO₂ varient globalement entre 15 et environ 300 m².g⁻¹ (Grangeon, 2008, van Genuchten et Peña, 2016, Marafatto et al., 2018, Wang et al., 2018). Enfin, il découle de ces spécificités que si lors de la synthèse ou du conditionnement de δ -MnO₂ l'idée était d'obtenir un solide dont la taille des cristaux serait plus importante, il faudrait diminuer la quantité de NaOH lors de la synthèse, mais paradoxalement, bien que les cristaux obtenus seraient effectivement plus grands, on obtiendrait aussi des agrégats plus petits et donc une surface spécifique encore plus élevée.

Pour conclure, les termes de vernadite, birnessite et δ -MnO₂ ne réfèrent pas à des structures uniques mais à un « spectre structural » regroupant un ensemble de paramètres variables, ce qui est susceptible de prêter à confusion et ne favorise pas la comparabilité des résultats. Il apparaît ainsi essentiel de caractériser précisément chaque minéral étudié, afin d'être en mesure de déceler l'importance de chaque paramètre dans les interactions de ces minéraux avec les cations tels que le Ca, et d'apporter une compréhension précise des différents mécanismes structuraux impliqués dans la réactivité de ces minéraux avec leur environnement.

2.2.1.d. *Synthèses des oxydes de manganèse*

Au cours de ces travaux de thèse, six oxydes de manganèse ont été préparés :

- Deux δ -MnO₂ d'après Marafatto et al. (2018)
- Une birnessite « acide » d'après Villalobos et al. (2003)
- Une birnessite d'après Giovaloni et al. (1970) stabilisée à pH 10
- Une birnessite stabilisée à pH 4 obtenue à partir de la birnessite stabilisée à pH 10 de Giovaloni et al. (1970)
- Un oxyde de manganèse bactériogénique obtenu à partir d'une culture de *Pseudomonas putida* GB1, d'après Tebo et al. (2007)

2.2.1.d.1. *Synthèse des minéraux de δ -MnO₂*

Deux δ -MnO₂ ont été synthétisées d'après le protocole de Marafatto et al. (2018), en faisant varier la quantité de NaOH ajoutée, ce qui par modification du pH du milieu de synthèse est susceptible d'influencer des paramètres structuraux du solide. Cela a notamment pour effet d'influer sur la surface spécifique du minéral en agissant sur la protonation des sites de bordures du minéral, et de ce fait sur l'agrégation des particules (Marafatto et al., 2018).

Le protocole de synthèse suivant a ainsi été mis en œuvre :

Pour préparer un total de 5 L de liquide pour la synthèse de δ -MnO₂ : 1,6 L de solution de KMnO₄ à 0,3 mol.L⁻¹ ont été placés dans un bécher de 5 L, auxquels ont été ajoutés 1,81 L de NaOH (à 0,6 M pour δ -MnO₂ a et 0,6 M pour δ -MnO₂ b) avec un débit de 256 ml.min⁻¹ avant d'y ajouter 1,6 L d'une solution de MnCl₂ à 0,2 M avec un débit de 72 mL.min⁻¹. Le mélange a été agité à l'aide d'un agitateur magnétique tout au long de l'ajout des solutions et encore 15 minutes après la fin de l'ajout des solutions. Le mélange a ensuite été laissé à décanter pendant 1 h de manière à laisser le solide sédimenter afin d'éliminer un maximum de liquide surnageant, suite à quoi les suspensions de solide ont été transvasées dans des tubes à centrifuger de 50 mL afin de poursuivre avec les étapes de lavage, tri granulométrique et de saturation en Na.

2.2.1.d.2. *Synthèse de la birnessite acide*

La birnessite acide a été synthétisée en suivant le protocole de Villalobos et al. (2003). Ainsi, 2,5L d'une solution de KMnO₄ à 0,4 M ont été portés à ébullition avant d'y ajouter 165 mL de

HCl concentré au goutte à goutte avec une agitation constante à l'agitateur magnétique. Le tout a été laissé à ébullition jusqu'à ce que la solution ait totalement virée au noir.

2.2.1.d.3. Synthèse des birnessites stabilisées à pH 4 et 10

La birnessite (Giovaloni et al., 1970) a été préparée à partir de 200 mL d'une solution de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ à 0,5 M et de 250 mL d'une solution de NaOH à 5.5 M toutes deux préparées à partir d'eau ultrapure portée à ébullition pendant environ 1h et dégazée à l'aide d'une bouteille d'argon 4.8 (1^{ère} qualité 99.998%). Le mélange des deux solutions a lui-même été dégazé à l'aide de l'argon jusqu'à ce que le solide soit totalement noir. Celui-ci a ensuite été placé à l'étuve à 60°C quelques jours, avant de subir une succession de lavages à l'eau ultrapure. Dans un premier temps, les lavages s'effectuent rapidement, avec centrifugations (20 min à 4700 tr.min⁻¹) sans agitation préalable. Ensuite, il s'est avéré nécessaire d'agiter le solide au tourniquet pendant au moins 20 minutes avant chaque nouvelle centrifugation et d'augmenter la durée des centrifugations afin que l'ensemble du solide se retrouve dans le culot (1 h à 4700 tr.min⁻¹). Le solide ainsi synthétisé et lavé présentait un pH proche de 10. Une partie de ce solide a été stabilisée à pH 4 afin d'en modifier les caractéristiques minéralogiques. Pour ce faire, le solide en suspension dans de l'eau ultra pure a été placé dans un réacteur hermétique comportant :

- Une entrée pour une arrivée d'oxygène, afin de faire buller la suspension.
- Une sortie d'air à laquelle était reliée un tuyau dont l'extrémité était plongée dans l'eau afin d'éviter tout échange avec l'atmosphère.
- Une entrée pour la sonde pH.
- Une entrée pour la sonde de température.
- Une entrée pour l'arrivée d' HNO_3 0,1 M.

La suspension a été placée sous agitation constante à l'aide d'un barreau aimanté. L'ajout d'acide a été réalisé de manière itérative de façon à tendre dans un premiers temps vers pH 4, et finalement de stabiliser le pH à cette valeur. Les volumes d' HNO_3 ajoutés et la durée entre chaque ajout ont ainsi été ajustées en fonction des besoins tout au long de l'ajustement du pH.

2.2.1.d.4. Préparation de l'oxyde de manganèse bactériogénique

Afin d'obtenir le MnO₂ bactériogénique, des cultures de *P. putida* GB1 ont été réalisées au laboratoire du BSC à Illkirch. Pour ce faire, des tubes contenant 10 mL de milieu LB ont été inoculés et incubés à 30°C et à 220 tr.min⁻¹ en condition aérobie et pendant 18 - 24 h. Les tubes ont ensuite été centrifugés et les culots bactériens ont subi deux cycles de rinçages à l'aide du milieu Leptotrix (milieu utilisé pour la suite des cultures, voir ANNEXE pour la fiche de préparation du milieu). Ainsi, après ajout de 7 ml de milieu Leptotrix, les tubes ont été vortexés puis centrifugés (8500 tr.min⁻¹, 5 min), le surnageant ont été jetés, puis ces étapes ont été répétées une fois supplémentaire. Après les deux cycles de rinçages, les culots bactériens ont été resuspendus dans 8 mL de milieu Leptotrix. Après homogénéisation au vortex, les suspensions bactériennes sont réparties dans du milieu Leptotrix dans divers contenants avec un ratio de 20 mL de suspension bactérienne par litre. Les cultures ont ensuite été incubées à 30°C, 220 tr.min⁻¹ en conditions aérobies pendant environ une semaine. En temps normal, l'oxyde de manganèse commençait à devenir visible dans la suspension après 24 - 48 h de culture, mais il est intéressant de noter que les résultats de ces cultures pouvaient s'avérer hétérogènes. En effet, l'apparition de MnO₂ n'était pas systématique dans tous les contenants et ne se faisait pas forcément à la même vitesse. Après culture et précipitation du MnO₂, les suspensions ont été centrifugés de manière à séparer au maximum le MnO₂ des bactéries et la plus grosse proportion de bactéries à été retirée manuellement. Des lavages à l'eau et à la javel faiblement concentrée (0,18%) ont ensuite été effectués pour éliminer et oxyder la matière organique résiduel. Environ cinq lavages de chaque ont été réalisés, par agitation sur un agitateur rotatif SB3 StuartTM à 40 tr.min⁻¹ pendant des durées allant de 1h à 24h.

2.2.1.e. *Tri granulométrique et saturation en Na des solides*

Après synthèse, les solides ont été rincés par agitation d'une heure sur un tourniquet dans des tubes à centrifuger de 50 mL avec 45 mL d'eau ultrapure avant d'être centrifugés à 4700 tr.min⁻¹ pendant une heure dans une centrifugeuse ThermoScientific Heraus Megafuge 40RTM. Les surnageants ont ensuite été jeté.

Suite au rinçage, un tri granulométrique a été réalisé **uniquement pour les deux δ-MnO₂ et la birnessite acide** en appliquant la loi de Stokes afin de conserver uniquement la fraction granulométrique comprise en 0,1 et 1 µm de diamètre (voir Reinholdt et al. 2013). Pour ce faire, de nombreux cycles de centrifugation ont été réalisés dans une centrifugeuse ThermoScientific

Heraus Megafuge 40R™. Dans un premier temps : **(i)** des cycles de centrifugation à 2000 tr.min⁻¹ pendant 3 minutes afin d'extraire la partie grossière (> 1 µm dans le culot des tubes à centrifuger, qui ne sont pas conservés) **(ii)** ainsi que des cycles de centrifugation à 4700 tr.min⁻¹ pendant 1h afin d'extraire la partie très fine à partir des surnageants issus des cycles de centrifugation de l'étape **(i)** (< 0,1 µm dans le surnageant, qui ne sont pas conservés). Seuls les culots issus de l'étape **(ii)** sont finalement conservés. Le protocole de tri granulométrique a nécessité de nombreuses itérations afin d'éliminer efficacement les parties grossières et très fines des trois solides. Entre chaque cycle, les culots étaient remis en suspension dans 45 mL d'eau ultrapure, mélangés et agités avant chaque nouveau cycle.

Les trois autres oxydes de manganèses n'ont pas été triés granulométriquement du fait de leur granulométrie globalement supérieure à 1 µm de diamètre, et de l'homogénéité relative de leur granulométrie d'après la bibliographie. Afin de vérifier que la réalité était bien en accord avec les informations issues de la bibliographie, des tests de centrifugation ont été effectués pour confirmer que la granulométrie de ces trois solides était bel et bien supérieure à 1 µm.

Une fois les solides lavés et triés granulométriquement (δ -MnO₂ et birnessite acide), ceux-ci ont été saturés en Na via trois cycles de mise en contact avec 45 mL d'une solution de NaCl 1 M avec agitation pendant une heure et centrifugation à 4700 tr.min⁻¹ pendant 15 minutes de manière que l'ensemble du solide tombe au fond du tube et que les surnageants soient limpides. Les solides ont ensuite été dialysés à l'aide de sac de dialyses en membrane à porosité moléculaire Spectra/Por® de la marque Spectrum laboratories. Les sacs ont été baignés dans des bouteilles d'eau ultrapure dont l'eau a régulièrement été remplacée jusqu'à ce que la conductivité de celle-ci atteigne 30 µS.cm⁻¹ et ne varie plus, indiquant que la dialyse était terminée. Après dialyses, les solides ont été séchés à 60°C à l'étuve et broyés le plus finement possible à l'aide d'un mortier et d'un pilon en agate.

2.2.2. Vermiculite

2.2.2.a. Introduction sur les phyllosilicates

Les minéraux argileux appartiennent à la famille des phyllosilicates. Du fait de leur petite taille, leurs structures en feuillet et leur charge négative, les minéraux argileux présentent des caractéristiques physico-chimiques particulières pouvant jouer un rôle important dans les sols. Ils jouent notamment un rôle important dans l'adsorption/désorption de cations du fait de leurs CEC relativement élevées. Ils ont aussi tendance à s'agréger lors de la floculation de colloïdes

lorsque les charges de surface de ces derniers sont neutralisées. Les minéraux argileux sont aussi connus pour leur capacité à fixer une grande quantité d'eau et à gonfler en augmentant leur volume. Ils confèrent ainsi au sol sa structure et des propriétés mécaniques, notamment en formant le complexe organo-humique. Les argiles présentes sous forme flocculée confèrent de bonnes propriétés au sol : aération du sol, perméabilité, tandis que les argiles dispersées (non flocculées) sont susceptibles de limiter la circulation de l'air et de l'eau dans le sol.

Les minéraux argileux d'un sol proviennent soit de l'altération des minéraux primaires, soit par néoformation, soit via la transformation d'autres minéraux argileux. La nature des minéraux argileux d'un sol varie donc en fonction de la nature de la roche mère mais aussi du climat.

Ils sont composés de couches d'octaèdres $\text{Al}(\text{OH})_6$ et de couches de tétraèdres SiO_4 . La liaison entre les feuillets s'effectue via le partage des atomes d' O^{2-} et les OH^- . De la même manière que pour les phyllo-manganates avec qui ils partagent de nombreuses caractéristiques structurales, les phyllosilicates peuvent être plus ou moins bien cristallisés ou au contraire désorganisés. Il existe ainsi une grande variété de structures cristallines, de capacité d'adsorption et de rétention des cations, ou de la taille granulométrique (Drits et Tchoubar, 1990, Meunier, 2005, Guggenheim et al., 2006).

Il existe notamment différents types d'empilements de couches tétraédriques (T) et octaédriques (O). Premièrement, les feuillets de type 1:1 (TO) qui sont constitués d'une couche tétraédrique liée à une couche octaédrique. La majeure partie de ces minéraux appartient à la famille des kaolinites. Les feuillets de type 2:1 (TOT) qui sont constitués de deux couches tétraédriques autour d'une couche octaédrique. Parmi les minéraux dont les feuillets sont de type 2:1 on retrouve par exemple les smectites, l'illite, les micas, ou bien la vermiculite, qui sera le seul minéral argileux étudié durant cette thèse. Il existe aussi des feuillets de type 2:1:1 (TOT O) pour lesquels on retrouve une couche octaédrique interfoliaire entre deux feuillets de type 2:1. Ces minéraux argileux correspondent à la famille des chlorites. Ces trois types de feuillets sont visibles dans la figure 2.6. Tout comme pour les phyllo-manganates, la présence de lacunes ou de substitutions d'atomes dans les feuillets induit des déficits de charges, compensés par l'adsorption de cations en sphère interne et dans l'espace interfoliaire.

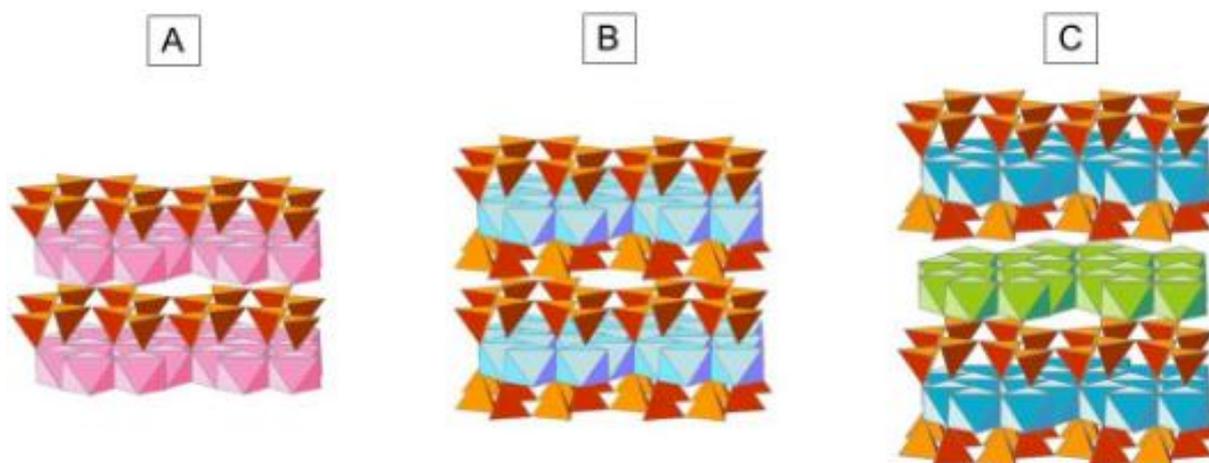


Figure 2-6 : Exemples d'empilements de couches tétraédriques et octaédriques dans les feuillets des minéraux argileux. (A) Feuille de type 1:1 (TO) ; (B) Feuille de type 2:1 (TOT) ; (C) Feuille de type 2:1:1. (Brazier, 2019)

2.2.2.b. Description de l'échantillon de vermiculite étudié

Le minéral argileux étudié durant cette étude est une vermiculite, une argile gonflante naturelle provenant de Santa Olalla (Huelva, Espagne) résultant de l'altération d'une phlogopite bien cristallisée (de la Calle et al., 1977, González García and García Ramos, 1960). Il s'agit d'une argile possédant une charge permanente, présentant ainsi des sites d'échanges susceptibles de retenir des nutriments tels que le Ca, notamment en sphère externe, les rendant ainsi facilement libérables et disponibles pour les racines des plantes (Singh et al., 2015). La formule structurale de ce minéral a été déterminé par Argüelles et al. (2010) comme étant $[(Mg_{4.92}Fe_{0.44}Al_{0.60}Ti_{0.04})(Si_{5.66}Al_{2.34})O_{20}(OH)_4] (Mg_{0.76}Ca_{0.06}Na_{0.04})_{7.63} H_2O$.

2.2.3. Solution de calcium

Les solutions de calcium utilisée lors des expérimentations ont été préparées par dissolution dans de l'eau ultra-pure d'une poudre de nitrate de calcium tétrahydraté ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$) de la marque Alfa Aesar Puratronic.

2.3. Protocoles expérimentaux

2.3.1. Principe du tri granulométrique (isolation de la fraction 0,1-1 µm)

Dans un souci de comparabilité et de reproductibilité des résultats produits au cours de cette thèse et de l'étude antérieure de Brazier et al., (2019), les minéraux abiotiques utilisés ont été trié granulométriquement de manière à ne conserver que la fraction comprise entre 0,1 et 1 µm de diamètre. Par ailleurs, cette fraction granulométrique a pour intérêt nous permet d'obtenir une proportion fixe de surfaces externes et de sites de bordures.

Ce tri granulométrique est réalisé par centrifugation pour éliminer successivement les fractions > à 1 µm et < 0,1 µm. La centrifugeuse utilisée pour ces tri granulométriques est une Heraus Megafuge 40RTM de Thermo Scientific, permettant la centrifugation simultanée de vingt-huit tubes de 50mL à une vitesse maximale de 4700 tr.min⁻¹. Les vitesses et les durées de centrifugation nécessaires varient d'un minéral à l'autre et sont déterminées par un dérivé de la loi de Stokes :

$$t = \frac{63 \times 108 \times \eta \times \log\left(\frac{R}{S}\right)}{N^2 \times D^2 \times \Delta d} \quad (2.1)$$

Avec **t** le temps de centrifugation (en min), **η** la viscosité dynamique du liquide (en poises), **R** le rayon de rotation de la centrifugeuse jusqu'à la surface du culot (en cm), **S** la distance de rotation à la surface du liquide (en cm), **N** la vitesse de rotation (en trs.min⁻¹), **D** le diamètre des particules (en µm) et **Δd** la différence de densité entre le liquide et les particules.

Avec le matériel à disposition, il a été nécessaire d'effectuer un très grand nombre de cycles de centrifugation afin de pouvoir séparer chaque fraction granulométrique. La séparation était estimée suffisante lorsque le surnageant après centrifugation était suffisamment transparent, sans pour autant être totalement limpide. En effet, même après des dizaines de cycles, les surnageants n'étaient jamais limpides, sauf dans le cas de la birnessite, pour laquelle la répartition granulométrique doit être significativement différente.

2.3.2. Dialyse

Une fois le tri granulométrique terminé, les solides sont saturés en Na⁺, c'est-à-dire que l'ensemble des sites d'adsorption ou presque des minéraux sont occupés par des ions Na⁺. Etant donné la moins bonne affinité du sodium en comparaison avec le calcium, ce dernier le remplacera lors des expérimentations d'adsorption. Etant donné la faible affinité du sodium,

lors de la saturation, on utilise une solution de NaCl à 1 mol.L^{-1} (pH = 5,6 c'ad pH de l'eau distillé) afin de s'assurer que le sodium soit largement excédentaire et qu'il puisse remplacer les potentiels cations adsorbés par le solide. La saturation est effectuée dans des tubes à centrifuger de 50 mL avec 45 mL de solution de NaCl par tubes. On effectue ainsi trois cycles d'agitation (au moins 1h) et de centrifugation ($15 \text{ min à } 4700 \text{ tr.min}^{-1}$) en jetant le surnageant et en renouvelant la solution de NaCl entre chaque cycle. Les culots sont finalement remis en suspension dans de l'eau ultra pure en attendant d'être dialysés.

Les dialyses ont été réalisées à l'aide de sacs à dialyse de la marque Spectrum Laboratories IncTM et dont la porosité est certifiée entre 6 et 8 kDa. La dialyse consiste en un équilibrage entre une solution fortement chargée ioniquement et une solution très faiblement chargée ioniquement. En effet, les ions de la solution la plus chargée vont avoir tendance à migrer vers la solution faiblement chargée. De cette manière on élimine les éléments excédentaires et non souhaités présents dans la solution. Ainsi, les sacs de dialyses sont remplis avec les suspensions de minéraux et les sacs sont placés dans des bouteilles d'1,5 L d'eau ultra pure. La conductivité est mesurée chaque jour et l'eau des bouteilles est remplacée jusqu'à ce que la conductivité soit suffisamment proche de 0 ($\sim 30 \mu\text{S.cm}^{-1}$) et ne varie plus d'un jour à l'autre, signifiant ainsi que les échantillons n'échangent quasiment plus de cations avec l'eau.

Après la dialyse, les échantillons sont transvasés dans des cristallisoirs et placés à l'étuve à 60°C afin de les sécher. Ils sont ensuite broyés le plus finement possible à l'aide d'un mortier et d'un pilon en agate, avant d'être stockés dans des tubes à centrifuger de 50 mL.

2.3.3. Protocoles d'adsorption et de désorption

Hormis les expérimentations en dynamique sur de la vermiculite, l'ensemble des protocoles d'adsorptions du Ca sur du matériel minéral ou bactérien a été réalisé en « batch ». C'est-à-dire en réacteur fermé avec une concentration initiale en Ca fixée. De cette manière, le milieu est homogénéisé (par agitation) et la concentration en Ca dans la solution diminue au contact du matériel adsorbant (bactérien ou minéral). Les expérimentations d'adsorption sont réalisées en fonctions de variables telles que la concentration initiale en Ca ou le pH initial de la solution, le temps de contact, mais aussi dans le cas spécifique du matériel biologique : bactéries mortes ou vivantes, quantité de bactérie. Toutefois, le rapport matériel/solution est toujours constant. Concernant les protocoles de désorptions, ceux-ci n'ont pu être appliqués qu'au matériel minéral. Pour cela une solution de cobalt-hexamine à 0,2 M a été utilisée. Les détails concernant

ces protocoles sont présentés dans les chapitres correspondants. Un schéma présente en figure 2.7 un exemple de l'ensemble des conditions de ce dispositif pour les expérimentations sur des bactéries.

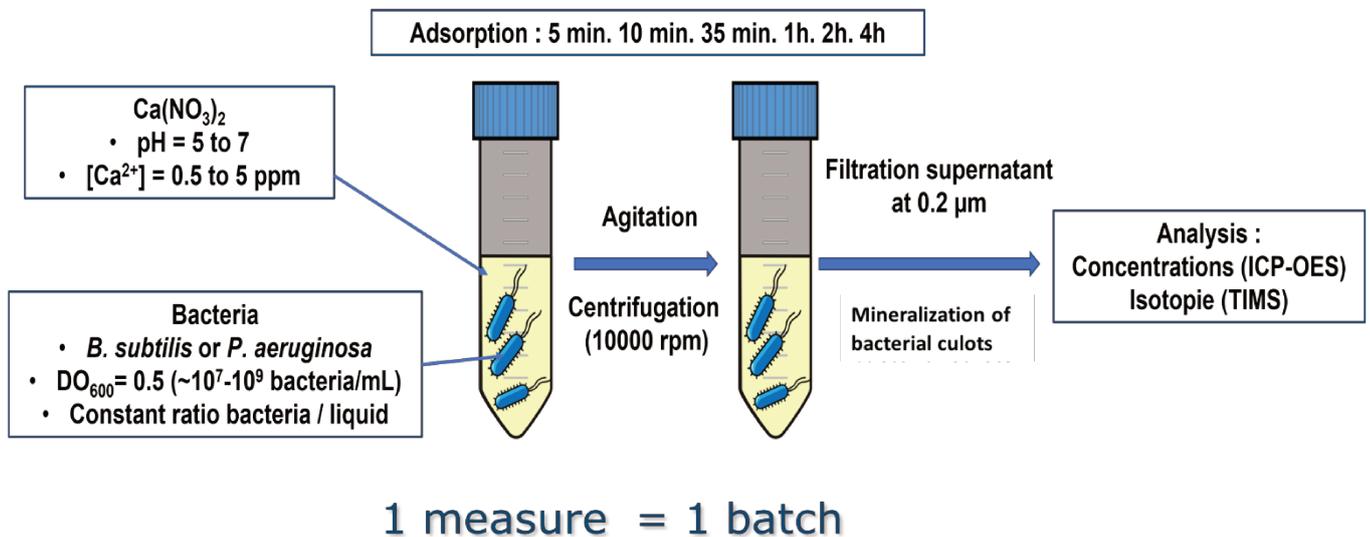


Figure 2-7: exemple de dispositif d'adsorption en réacteur batch sur des bactéries.

2.3.1. Fractionnement cellulaire

2.3.1.a. *Pseudomonas aeruginosa*

2.3.1.a.1. Informations préalables

Le protocole de fractionnement cellulaire ci-dessous est issu d'un protocole utilisé au sein du laboratoire du BSC qui a été adapté pour correspondre à nos besoins ainsi qu'à nos enjeux expérimentaux (quantité importante de bactéries cultivées, suppression d'étapes pas nécessaires ou pouvant induire des biais etc.).

2.3.1.a.2. Protocole

Après culture et rinçage des bactéries, trois tubes à centrifuger Falcon™ de 50 mL contenant 40 mL de suspension bactérienne à DO_{600nm} = 0,5 ont été préparés et centrifugés afin de ne garder que les culots bactériens (selon un protocole identique à celui des cultures bactériennes présenté plus tôt). Après une phase de contact avec 40 mL de solution de calcium dans ces tubes (220 tr.min⁻¹ pendant 2 h à 30 °C), suivie d'une centrifugation (8500 tr.min⁻¹ pendant 5 min),

les surnageants ont été recueillis et les culots bactériens ont été **(a)** remis en suspension dans 1 mL d'une solution de Tris 200 mN - 1 mN EDTA- 20% sucrose (Tris-EDTA-sucrose) avec un ajout de 2 μL d'une solution de lysozyme dissous à 0,1 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans du glycérol 55% (200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de lysozyme dans la solution finale) puis agités au vortex et incubés dans de la glace pendant 1 h.

Après incubation, les tubes ont été centrifugés (6700 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 10 min à 4 °C). Après centrifugation, les surnageants correspondent au liquide périplasmique + peptidoglycane et les culots correspondent au sphéroplaste (cellules sans peptidoglycane). Les culots ont été lavés avec 3 x 500 μL de Tris-EDTA-sucrose et **(b)** remis en suspension dans 1 mL d'eau froide, agités au vortex et homogénéisés par aspirations successives à la pipette. Ensuite, 1 μL de benzonase® nucléase (permet la dégradation de l'ADN et de l'ARN) a été ajouté aux échantillons, qui ont été agités au vortex une fois de plus, avant d'être incubés (220 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 1 h à 37 °C sous agitation). Pendant ce temps, les surnageants de **l'étape (a)** ont été transférés dans des micro tubes et centrifugés (40000 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 40 min à 4 °C). Après centrifugation, les culots correspondent à la phase peptidoglycane et les surnageants correspondent au liquide périplasmique. Après incubation, les sphéroplastes de **l'étape (b)** ont été transférés dans des micro tubes puis centrifugés (40000 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 40 min à 4 °C). Les surnageants correspondent au cytoplasme. Les culots ont été lavés avec 3 x 500 μl d'eau fraîche et froide et (c) remis en suspension avec 1 mL d'une solution de Tris 200 mN à pH8 - 1% sarkosyl, par aspirations successives pour casser les culots puis homogénéisés par vortex avant agitation sur un agitateur rotatif pendant 1 h. Après agitation, les échantillons ont été centrifugés (40000 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 40 min à 4 °C). Les surnageants correspondent à la membrane interne et les culots à la membrane externe. Les culots ont été lavés avec 3 x 500 μl d'eau froide. A chaque étape, les eaux de lavage ont été collectées pour une analyse ICP-AES afin d'évaluer les pertes entre chaque étape. Les triplicatas ont été poolés avant analyses à l'ICP.

2.3.1.b. *Bacillus subtilis*

2.3.1.b.1. Informations préalables

En complément des expérimentations de fractionnement cellulaire de *P. aeruginosa*, nous avons adapté le protocole pour *B. subtilis*. Toutefois, les parois de *B. subtilis* et de *P. aeruginosa* sont différentes l'une de l'autre. En effet, lors des premières tentatives de fractionnement cellulaire de *B. subtilis* (mêmes conditions expérimentales que pour *P. aeruginosa*), les cellules

de *B. subtilis* n'étaient pas transformées en protoplastes (cellules sans peptidoglycane) sous l'action du lysozyme (enzyme déstructurant le peptidoglycane). Diverses approches ont donc été réalisées en faisant varier le temps de contact, les proportions de bactéries et de lysozyme. Finalement, une très grande augmentation de la quantité de lysozyme et une diminution de la quantité de bactéries par tube ont permis la mise en solution du peptidoglycane de l'ensemble des cellules en 1h de contact. La transformation des bactéries en protoplastes a pu être observée au microscope avant de poursuivre la suite de l'expérimentation.

De plus, la paroi de *B. subtilis* ne comportant pas de membrane externe, un nombre inférieur d'étape a été nécessaire. En conséquence, le protocole de fractionnement cellulaire de *B. subtilis* s'est déroulé comme indiqué dans le protocole ci-dessous.

2.3.1.b.2. Protocole

Après une phase de contact avec la solution de calcium dans les tubes à centrifuger Falcon™ de 50 mL (220 tr.min⁻¹ pendant 2 h à 30 °C), suivie d'une centrifugation (8500 tr.min⁻¹ pendant 5 min), les surnageants ont été recueillis et les culots bactériens ont été **(a)** remis en suspension dans 1 mL d'une solution de Tris 200 mN - 1 mN EDTA- 20% sucrose (Tris-EDTA-sucrose) avec un ajout de 2 µL d'une solution de lysozyme dissous à 0.1 g.mL⁻¹ dans du glycérol 55% (200 µg.mL⁻¹ de lysozyme dans la solution finale) puis agités au vortex et incubés dans de la glace pendant 1 h. Après incubation, les tubes ont été centrifugés (6700 tr.min⁻¹ pendant 10 min à 4 °C). Après centrifugation, les surnageants correspondent au liquide périplasmique + peptidoglycane et les culots au sphéroplaste. Les culots ont été lavés avec 3 x 500 µL de Tris-EDTA-sucrose et **(b)** remis en suspension dans 1 mL d'eau froide, agités au vortex et homogénéisés par aspirations successives à la pipette. Ensuite, 1 µL de benzonase® nucléase (permet la dégradation de l'ADN et de l'ARN) a été ajouté aux échantillons, qui ont été agités au vortex une fois de plus, avant d'être incubés (220 tr.min⁻¹ pendant 1 h à 37 °C sous agitation). Pendant ce temps, les surnageants de **l'étape (a)** ont été transférés dans des micro tubes et centrifugés (40000 tr.min⁻¹ pendant 40 min à 4 °C). Après centrifugation, les culots correspondent à la phase peptidoglycane et les surnageants correspondent au liquide périplasmique. Après incubation, les sphéroplastes de **l'étape (b)** ont été transférés dans des micro tubes puis centrifugés (40000 tr.min⁻¹ pendant 40 min à 4 °C). Les surnageants correspondent au cytoplasme et les culots à la membrane cytoplasmique.

Dans le cas de *B. subtilis*, les triplicatas ont été analysés séparément à l'ICP.

2.3.1. Minéralisation/dissolution des culots bactériens/minéraux

Pour dissoudre les culots bactériens, les culots de MnO₂ ou de vermiculite, 5 mL de HCl 6N ont été ajoutés dans les tubes, qui ont été placés sur l'agitateur rotatif pour agitation à 220 rpm. Après cette étape, le contenu de ces tubes a été transféré dans des béchers Savillex™, et deux lavages des ont été effectués, en utilisant 3-5 mL de HCl 6N, pour transférer le matériel restant dans les béchers Savillex™. Les échantillons ont été chauffés à 70 °C jusqu'à dissolution totale du matériel, puis évaporés. Après évaporation, 1 ml de HNO₃ distillé et 0,2 ml de H₂O₂ pur ont été ajoutés aux échantillons, qui ont été chauffés au moins 1 h à 70°C avant d'être évaporés. Ensuite, 10 ml de HNO₃ 0,25 N ont été ajoutés aux béchers Savillex™, chauffés à 70 °C pendant 1 h, puis transférés dans des tubes Falcon™ de 15 ml pour être conservés avant les analyses élémentaires et isotopiques.

2.4. Méthodes d'analyses et de caractérisations

2.4.1. Caractérisations minéralogiques

2.4.1.a. Mesure de la surface spécifique (BET N₂)

Pour une masse donnée, les minéraux ne possèdent pas la même surface accessible aux atomes ou aux molécules. On parle de « surface spécifique », exprimée en m².g⁻¹, pour désigner cette surface « totale ».

Diverses méthodes existent pour mesurer cette surface spécifique, mais dans le cas présent la méthode utilisée est la méthode BET N₂, tirant son nom des initiales des chercheurs à son origine : Brunauer, Emmett et Teller (Brunauer et al., 1938). Cette méthode consiste en l'adsorption de diazote (N₂) à la surface des minéraux, via des liaisons de type Van der Waals, c'est-à-dire des liaisons électriques de faibles intensités.

Pour ce qui est du principe de cette méthode : une masse donnée de minéral sous forme de poudre est mise en contact avec un volume d'azote donné, afin de réaliser des isothermes d'adsorption permettant de déterminer la quantité de gaz nécessaire pour totalement recouvrir la surface du minéral d'une monocouche de diazote à partir des équations suivantes :

$$\frac{p}{[V \times (p_0 - p)]} = \frac{1}{V_{MC}} + \frac{C-1}{V_{MC}} \times \frac{p}{p_0} \quad (2.2)$$

Avec **p** la pression partielle de l'adsorbat à l'équilibre (en kPa), **p₀** la pression de vapeur saturante de l'adsorbat à la température de la mesure (en kPa), **V** le volume de vapeur adsorbée

par gramme de solide à la pression p (en L), V_M le volume de vapeur nécessaire pour recouvrir toute la surface du minéral d'une monocouche d'adsorbat (en L), C la constante BET caractéristique du système solide-gaz étudié.

Une fois le volume V_M déterminé, la surface spécifique de l'échantillon peut être calculée à partir de l'équation suivante :

$$SSA_{BET} = \frac{\left(\frac{V_M \times N_a \times \sigma}{V_g}\right)}{m} \quad (2.3)$$

Avec N_a le nombre d'Avogadro en mol^{-1} , σ la surface occupée par une molécule d'adsorbat à une température donnée (en m^2), V_g le volume occupé par une mole de gaz utilisé pour la mesure de la surface spécifique ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$) et m la masse d'échantillon solide (en g).

Les mesures de surfaces spécifiques des minéraux utilisées pour ces travaux ont été réalisées sur les matériaux ayant subi un tri granulométrique, une saturation en sodium et enfin une étape de dialyse avant d'être séchés à l'étuve à 60°C puis broyés manuellement au pilon dans un mortier. ces mesures ont été effectuées par Emmanuel Tertre à l'Institut de Chimie des Milieux et Matériaux de Poitiers (IC2MP) sur un appareil automatisé d'adsorption d'azote Micrometrics TristarTM.

Cette méthode permet de quantifier uniquement les sites extérieurs. Pour obtenir une information complémentaire concernant la « surface spécifique interne » (sites interfoliaires), il est nécessaire de coupler le diazote avec une autre substance, comme par exemple « azote+eau », « azote+bromure de N-cetylpyridinium (PCB) », du bleu de méthylène, de l'alcool polyvinylique ou encore des éthers monoéthyl d'éthylène glycol (EMGE) (Hang et Brindley, 1970, Blum et Eberl, 2004, Meunier, 2002; Pennell, 2016). En effet, les molécules de diazote sont trop larges pour pouvoir accéder aux espaces interfoliaires.

2.4.1.b. *Diffraction des rayons X*

2.4.1.b.1. Principe

Les rayons X sont des rayons électromagnétiques dont la longueur d'onde est comprise entre 0,01 et 10 nm, soit le même ordre de grandeur que les distances entre atomes dans la matière. Lorsque ces rayons interagissent avec la matière, ils sont diffusés par les atomes rencontrés. Une fois diffusés, ces rayons peuvent interférer entre eux. Si les atomes rencontrés sont bien

ordonnés ou disposés de manière régulière, ces interférences sont constructives dans certaines directions et destructives dans d'autres directions. Il s'agit du phénomène de diffraction. Les directions dans lesquelles les interférences sont constructives (pics de diffraction) peuvent être déterminées grâce à la loi de Bragg :

$$n\lambda = 2D\sin\theta \quad (2.4)$$

avec n l'ordre de la diffraction, λ la longueur d'onde du rayonnement diffracté, D la distance inter-réticulaire de deux plans parallèles de diffraction, θ l'angle entre faisceau incident et plan de diffraction ou des distances inter-réticulaires (Figure 2.8). L'analyse par diffraction des rayons X peut être effectuée pour tout échantillon cristallisé. Chaque phase cristalline correspond à un ensemble unique de pics de diffractions, qui se traduit par un diffractogramme. Concrètement, un diffractogramme représente l'intensité du rayonnement diffracté en fonction de l'angle de diffraction. Le diffractogramme d'un mélange de phases est le résultat de la superposition des diffractogrammes de chacune des phases en présence. La comparaison d'un diffractogramme obtenu expérimentalement, avec les diffractogrammes des matériaux de références répertoriés dans des bases de données cristallographiques, permet d'identifier chaque constituant cristallisé du mélange.

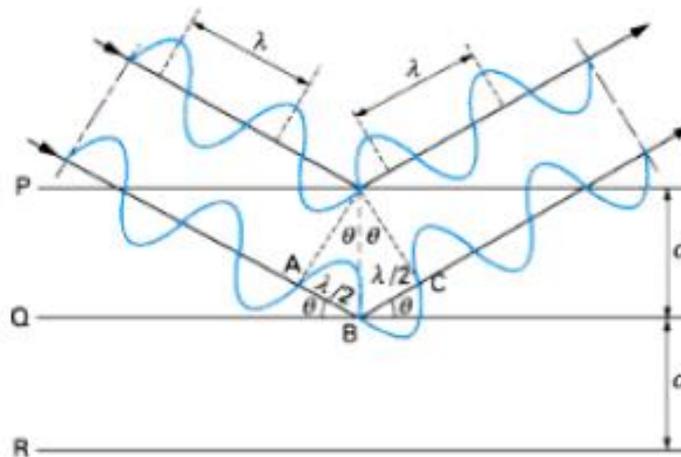


Figure 2-8: Représentation graphique de la diffraction traduite par la loi de Bragg.

2.4.1.b.2. Matériel utilisé

Les analyses ont été effectuées par la plateforme Pemci de l'ITES en cours de labellisation par le réseau Cortecs de l'Unistra, avec un diffractomètre à rayons X de la société Bruker, modèle

D8 Advance Eco pour analyse de poudres. L'appareil est composé d'une source de rayons X, d'un goniomètre, au centre duquel est placé l'échantillon à analyser, d'un système de fentes (dont une variable à la sortie du tube à rayons X) et d'un détecteur. La source de rayons X, l'échantillon et le détecteur sont placés sur un cercle de focalisation afin de satisfaire la loi de Bragg. Le système est équipé d'un couteau d'antidiffusion qui permet de s'affranchir de la diffusion des rayons X dans l'air (surtout aux bas angles). Le montage utilisé est en géométrie Bragg-Brentano θ / θ . Dans cette configuration l'échantillon placé au centre du cercle goniométrique est fixe et c'est le tube à rayons X qui bouge d'un angle θ grâce à un moteur pas à pas, tandis que le détecteur bouge lui aussi d'un angle θ mais dans le sens contraire. On dénombre les impacts du rayonnement diffracté pour chaque position angulaire pour une même durée.

2.4.1.b.3. Préparation des échantillons et conditions expérimentales

Après un broyage dans un mortier en agate, les échantillons réduits en poudre ont été préparés et analysés à l'ITES par Amélie AUBERT. Pour ce faire ils ont chacun été déposés sur une lame de verre avec de l'éthanol puis séchés rapidement. On obtient de cette manière une préparation désorientée et plane dans le but de sonder tous les plans cristallographiques de l'échantillon. Les échantillons ont été analysés à l'aide de l'appareil Bruker - D8 Advance Eco avec un tube à rayons X (anticathode cuivre) à 40 kV et 25 mA. Le balayage angulaire en mode θ / θ a été effectué de 3 à 80°/2 θ avec un pas de 0,014° sur une durée de 0,8 sec. Lors de l'analyse, la rotation de l'échantillon était enclenchée afin de limiter les effets d'orientation préférentielle et la fente variable a été réglée de sorte que l'illumination de l'échantillon soit fixe tout au long de la mesure (cercle de diamètre 14 mm). Le couteau d'antidiffusion étant quant à lui réglé en mode automatique.

2.4.1.c. *Microscopie à balayage électronique*

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique permettant d'obtenir des images à haute résolution de la surface d'un échantillon via l'utilisation d'un faisceau d'électron, le pouvoir de résolution de l'électron étant plus de 600 fois supérieur à celui du photon. En effet, le principe de la MEB repose sur la projection d'un faisceau d'électron qui balaie la surface de l'échantillon point par point, permettant d'obtenir une image en trois

dimensions. Un détecteur permet ensuite la mesure des électrons réfléchis, émis ou secondaires et le signal est ensuite transmis à un écran cathodique dont le balayage est synchronisé avec celui de rayon incident.

Cette méthode a été utilisée pour observer les grains d'oxydes de manganèse afin de vérifier leur granulométrie et la forme de leurs cristaux.

2.4.2. Caractérisations géochimiques

2.4.2.a. La mesure de la capacité d'échange cationique (CEC)

La capacité d'échange cationique (CEC) représente le nombre de cations monovalents qu'un minéral est capable d'adsorber afin de compenser l'ensemble de ses charges négatives et s'exprime généralement en méq.100g⁻¹. Les CEC respectives des différents oxydes de manganèse ont été déterminées à l'ITES selon le protocole de Brazier (2018) élaboré d'après Ciesielski et al. (1997).

Pour ce faire, on ajoute une masse m de minéral et un volume V d'une solution de cobalt-hexamine (qui est un puissant désorbant) dans un tube à centrifuger de 50 mL et on agite. L'objectif est que les molécules de cobalt-hexamine remplacent les cations déjà présents à la surface du minéral. Il est préconisé par Ciesielski (1997) d'effectuer ces mesures avec un ratio solide/solution allant de 25 à 100g.L⁻¹ avec une solution de cobalt-hexamine de concentration 10⁻² mol.L⁻¹. D'après Brazier (2018), ces mesures de CEC sur des phyllosilicates ou des phyllomanganates présentant un espace interfoliaire ouvert à l'adsorption de cations hydratés nécessitent un ratio solide/liquide moins important, et dans certains cas une concentration moins importante pour la solution de cobalt-hexamine. Pour nos mesures, nous avons repris les préconisations de Brazier (2018), avec un ratio minéral / liquide de 100 mg pour 45 mL (soit 2,22 g.L⁻¹) et une concentration de 10⁻² mol.L⁻¹ pour la solution de cobalt-hexamine. L'agitation est réalisée à température ambiante sur un tourniquet pendant à 40tr.min⁻¹ pendant au moins 2h afin de maximiser les échanges entre la solution désorbante et les sites d'adsorptions du minéral. Après agitation, les surnageants sont filtrés à 0,45µm à l'aide d'une combinaison seringue + filtres contenant de la cellulose régénérée. Une fois filtrés, les surnageants peuvent être analysés élémentairement à l'ICP-AES.

2.4.2.b. Analyses des concentrations élémentaires (ICP-AES)

2.4.2.b.1. Présentation générale de la méthode

Les mesures élémentaires effectuées dans le cadre de cette thèse ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre à émission optique ICP-AES ((inductively coupled plasma atomic emission spectrometer de type iCAP 6000 series™ de ThermoScientific™. Ce type de spectromètre utilise un plasma à couplage inductif pour exciter les atomes et les ions d'un échantillon qui émettent ainsi un rayonnement électromagnétique dont la longueur d'onde est caractéristique de chaque élément. En effet, lors de leur retour à un état normal, les ions excités émettent un photon en dégageant une quantité d'énergie spécifique à chaque élément.

Les analyses sont effectuées à partir d'échantillons dissous en phase liquide et dilués dans de l'acide nitrique (HNO₃ 0,25N). L'échantillon est prélevé sous forme liquide et se retrouve aspiré passivement par effet Venturi avant d'être transformé en aérosol au niveau du nébuliseur. Il est ensuite injecté au travers d'un plasma d'argon. Seules les gouttelettes d'une certaine taille (~10 µm) sont capables de transiter du nébuliseur vers le plasma. Les gouttelettes trop grandes retombent sous l'effet de la gravité puis sont redirigées vers l'entrée de la chambre du nébuliseur pour leur permettre d'être retransformées en aérosols. Cela permet par ailleurs d'homogénéiser la taille des gouttelettes en sortie du nébuliseur. Les gouttelettes sont entraînées par un flux de gaz inerte (argon) vers la torche, où se trouve le plasma dont la chaleur (~6000 à 10000 °C) permet l'ionisation de l'échantillon.

Le rayonnement électromagnétique issu de l'émission de photons lors du retour à l'état fondamental des ions précédemment excités est analysé en sortie du plasma à l'aide d'un polychromateur qui reconnaît les longueurs d'ondes du rayonnement. Cela permet ainsi de déduire la concentration des différents éléments dans l'échantillon avec une bonne précision, en se basant sur les mesures d'une gamme d'étalonnage mesurée au cours de la séquence d'analyse. La constance et/ou la dérive des mesures au cours d'une séquence est vérifiée en effectuant des mesures de solutions contrôles de manière régulière au cours de la séquence. Le signal est mesuré en coups par secondes avant d'être converti en concentration (mg.L⁻¹ (ou ppm) ou µg.L⁻¹ (ou ppb) selon les éléments).

2.4.2.b.2. Purification des échantillons

L'analyse isotopique d'un échantillon nécessite une purification de celui-ci afin d'éliminer tout élément pouvant causer des interférences ou altérer la mesure isotopique de l'élément ciblé.

Pour procéder à cette purification, on peut recourir à une méthode chromatographique basée sur les affinités de certains éléments avec une phase mobile ou une phase stationnaire. On peut ainsi effectuer une chromatographie sur résine changeuse d'ions. La résine, qui sert de phase stationnaire, est située dans une colonne, traversée par le liquide contenant l'échantillon et donc les éléments à séparer. La taille de la colonne varie en fonction de la nature de la chimie séparatrice. De plus, selon les éléments que l'on souhaite séparer ou purifier, deux paramètres vont présenter des variations :

- Le volume de liquide (éluant) traversant la résine. En effet, pour une condition chimique similaire (nature et concentration d'un acide etc.) les différents éléments ont des coefficients de partage différents entre la résine et l'éluant. C'est à dire que les éléments migrent à travers la colonne à des vitesses différentes, en fonction de leur coefficient de partage. Un élément ayant une meilleure affinité avec la résine dans une condition donnée, mettra plus de temps à migrer à travers la colonne. Un plus grand volume d'éluant sera donc nécessaire pour compléter sa migration.
- La condition chimique. En effet, une modification de l'éluant ou de sa concentration peut affecter le coefficient de partage d'un élément entre l'éluant et la résine. Par exemple en diminuant l'affinité de l'élément avec la résine et en favorisant ainsi sa migration à travers la colonne. Il est ainsi possible de séparer ou purifier des éléments d'un échantillon en jouant sur ces paramètres.

Avant leur première utilisation, les résines sont préalablement lavées en batch. Le lavage consiste en un conditionnement de la résine avec les différents acides qui seront utilisés pour la réalisation des chimies séparatrices. Après chaque étape de conditionnement, une étape de centrifugation est réalisée pour effectuer une analyse granulométrique de la résine et s'assurer que la taille des particules est homogène et corresponde à la valeur annoncée par le fabricant.

Les résines sont en effet constituées de billes de très faible diamètre (entre 10 et 100 μm), afin de maximiser la surface de contact entre l'éluant et la résine. Cela permet de minimiser la durée des chimies séparatrices. La plupart du temps, les billes sont constituées de polymères organiques synthétiques présentant des charges de surfaces, permettant ainsi l'adsorption de cations, ou d'anions, ou des contre-ions selon le type de résine. Au cours des

chimies séparatrices, ces cations, anions, ou contre-ions sont remplacés par d'autres ions de même charge provenant de l'échantillon contenu dans l'éluant traversant la résine.

2.4.2.b.3. Résine échangeuse d'ion TODGA

La résine utilisée spécifiquement pour les travaux de cette thèse est une résine DGA normale (TODGA) de TriskemTM et de référence DN RESIN-B DS-B25-S. La résine a pour formule chimique : N,N,N',N'-tétra-n-octyldiglycolamide et le diamètre des billes de cette résine est compris entre 50 et 100 μm . L'objectif de ces travaux étant d'isoler le calcium, cette résine présente une affinité pour le calcium et le strontium en milieu nitrique faiblement concentré (Figure 2.9) (Horwitz et al., 2005). Cependant, les coefficients de partage du calcium et du strontium sont suffisamment différents pour rendre possible leur séparation au cours de la chimie en faisant varier la concentration de l'acide nitrique.

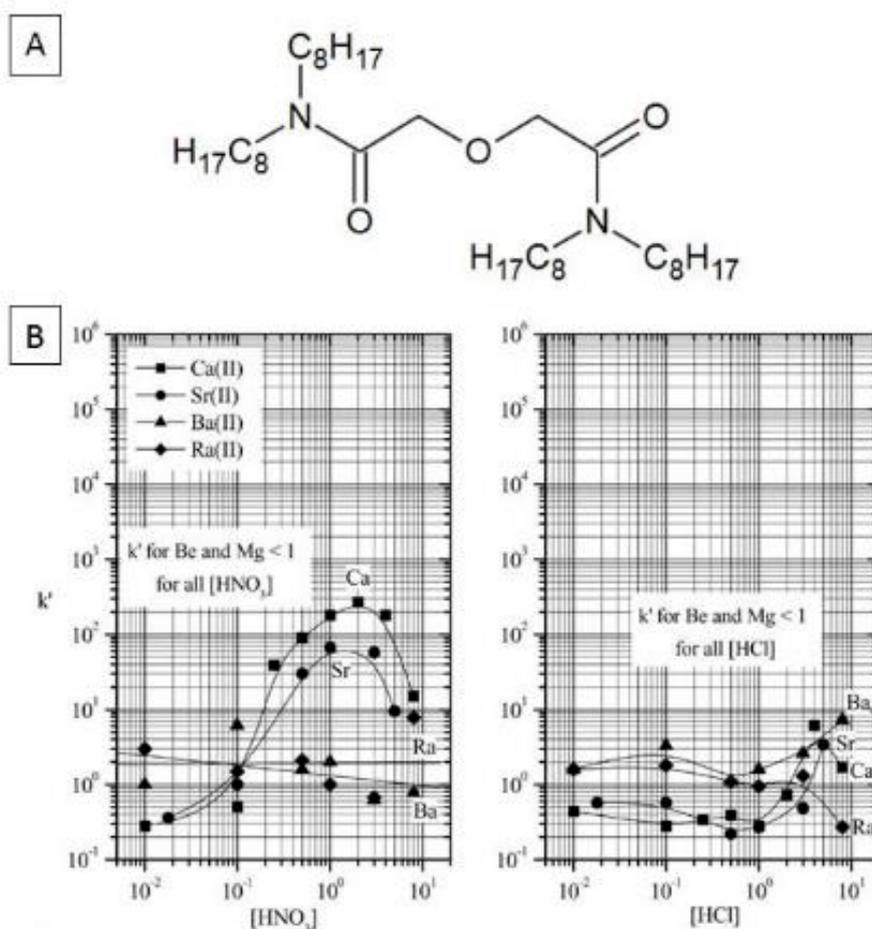


Figure 2-9 : a) Représentation de la structure des polymères composant de résine TODGA et b) représentation graphique de l'affinité de quatre éléments avec la résine en fonction du conditionnement de la colonne (nature et concentration de l'acide) (Brazier, 2019).

En revanche, l'affinité de cette résine avec les autres éléments, et notamment avec le potassium ^{40}K qui cause des interférences durant les mesures, est nettement inférieure, ce qui favorise leur élimination en début d'éluion.

L'ensemble de ces caractéristiques font de cette résine un excellent choix pour la séparation du calcium. De plus, celle-ci est réutilisable jusqu'à plus de 200 fois sans perte de ses capacités de rétentions ou d'éluions (Romaniello et al., 2015) en ne nécessitant que des lavages à l'eau de manière générale, et des lavages à l'acide fluorhydrique en cas de présence de métaux lourds à éliminer.

2.4.2.a. *Analyses des rapports isotopiques (TIMS)*

2.4.2.a.1. *Présentation générale de la méthode*

Les mesures isotopiques effectuées dans le cadre de cette thèse ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre de masse à thermo-ionisation TIMS (thermo-ionization mass spectrometer) de type TritonTM de ThermoScientificTM. Les analyses sont effectuées à partir d'échantillons introduits en phase solide. Les échantillons purifiés une fois évaporés sont repris dans de l'acide nitrique - afin d'éliminer les ions chlorures issus du protocole de chimie séparatrice - avant d'être évaporés. Ils sont ensuite repris dans une faible quantité de HNO_3 1 N (entre 1 à 3 μL) pour être déposés sur des filaments de tantale, dégazés et oxydés, sur lesquels ils sont évaporés afin de ne laisser qu'un dépôt solide. En effet, le principe de la thermo-ionisation consiste en un dépôt d'un sel cationique sur un filament métallique qui sera traversé par un courant électrique permettant de chauffer l'échantillon afin d'ioniser celui-ci. Les échantillons sont placés dans un ultra vide (pression inférieure à 10^{-8} mbar), ce qui permet d'effectuer cette thermo-ionisation à une température comprise entre 1200 et 1500°C. De ce fait un faisceau d'ion est repoussé vers le collimateur du spectromètre (Figure 2.10).

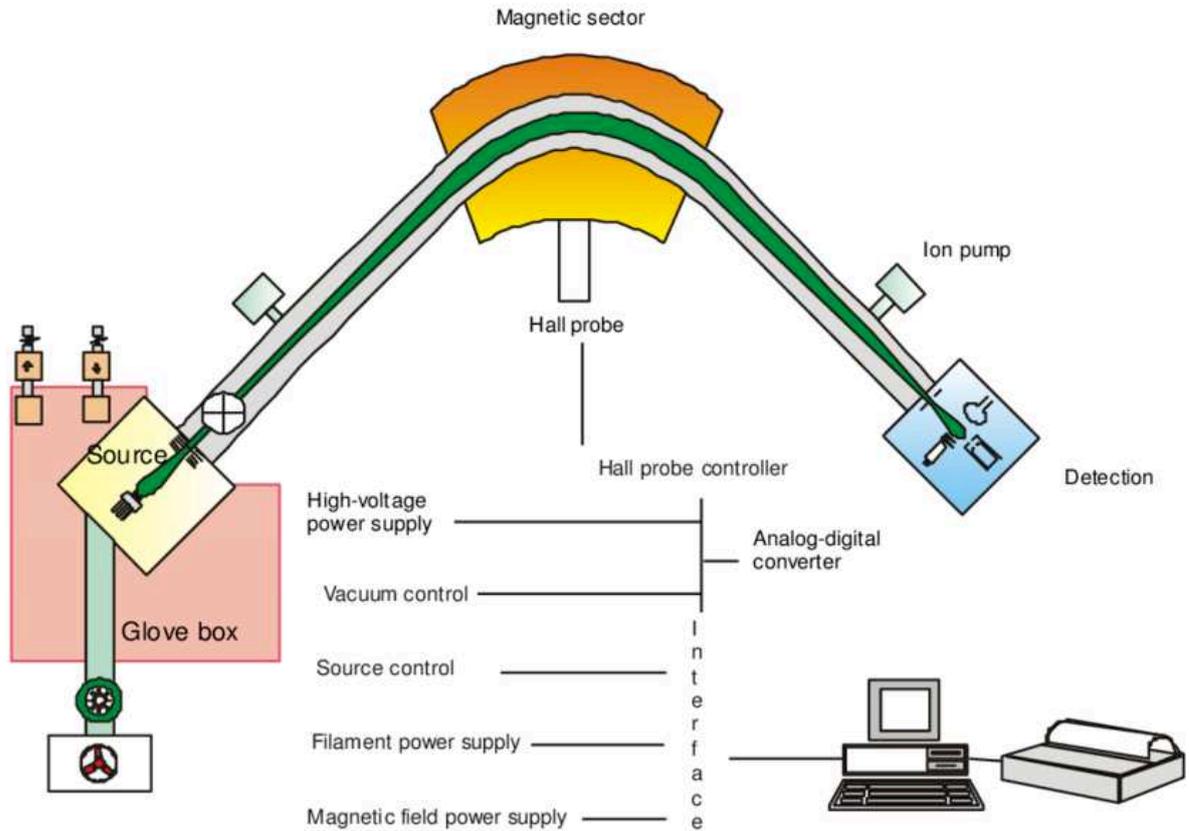


Figure 2-10 : Schéma d'un dispositif de mesure par spectrométrie de masse à thermo-ionisation. (Gauld et al., 2023).

Le collimateur est constitué d'une succession de plaques présentant des fentes. Ces plaques sont traversées par un courant dont la tension décroît à mesure que l'on s'éloigne de la source du faisceau d'ions, permettant ainsi l'accélération et la focalisation des ions. En effet, une fois un échantillon ionisé, celui-ci est accéléré afin d'atteindre une vitesse suffisante permettant au faisceau d'ions d'atteindre l'analyseur sans être repoussé par le champ magnétique induit par l'appareil. Il est aussi nécessaire de focaliser le signal afin d'éliminer les éléments non souhaités résiduels pouvant interférer avec les mesures (e.g. potassium 39 et 41). La dernière plaque possède une fente particulièrement étroite (200 μm) afin d'éliminer ces éléments interférents en ne laissant passer que la partie centrale du faisceau. Le tri des différents ions s'effectue au cœur du champ magnétique grâce à leurs différences massiques et sont quantifiés à l'aide de cages de Faraday jouant le rôle de détecteurs. Le signal correspondant à la quantité d'ions est mesuré en coups par seconde et est converti en Volts.

Lors de la mesure d'un échantillon, trois configurations de positionnement des cages de collecte s'enchaînent (Holmden et Bélanger, 2010 ; Lehn et al. 2013). La première

configuration permet de collecter les isotopes ^{40}Ca et ^{42}Ca dans les cages L3 et H3. La deuxième configuration permet de collecter les isotopes ^{42}Ca et ^{43}Ca dans les cages L1 et H1. La dernière configuration permet de collecter les isotopes ^{43}Ca et ^{44}Ca dans les cages L1 et H1. Ainsi, les premières et deuxièmes configurations permettent de déterminer directement les rapports $^{40}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$ et $^{43}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$ tandis que le rapport $^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$ est construit à partir des deuxièmes et troisièmes configurations. Finalement, chaque cycle de ces trois configurations permet de déterminer un rapport $^{40}\text{Ca}/^{44}\text{Ca}$ et l'analyse d'un échantillon nécessite 200 cycles de mesures, ce qui revient à environ trois heures de mesure par échantillon. L'ensemble de ces mesures permettent de déterminer la précision intrinsèque de la machine. En effet, les mesures sont sujettes à des incertitudes incluant notamment l'erreur statistique du comptage d'ions et le bruit Johnson. Les détails du calcul de l'erreur sur la mesure peuvent être trouvés dans Lehn et al. (2013).

2.4.2.a.2. Utilisation du double traceur 42-43Ca

Il existe des biais potentiels de fractionnement isotopique inhérents à la méthode analytique. De tels biais peuvent notamment survenir au cours de la chimie séparatrice mais aussi lors des mesures au spectromètre. Un bon moyen de s'affranchir de ces contraintes est d'utiliser un double traceur. Il s'agit d'une méthode développée depuis plusieurs décennies et pouvant s'appliquer à n'importe quel élément possédant au moins quatre isotopes (Dodson, 1963, 1970 ; Compston et Oversby, 1969 ; Hofmann, 1971 ; Hamelin et al., 1985 ; Galer, 1999 ; Albarède et Beard, 2004 ; Fantle et Bullen, 2009 ; Rudge et al ; 2009).

La méthode consiste en l'ajout d'une quantité connue de deux isotopes de l'élément d'intérêt dans un échantillon. Pour ce faire on utilise une solution enrichie artificiellement dans les isotopes souhaités. De ce fait, on connaît les quantités relatives de quatre isotopes de l'élément d'intérêt et il est possible d'observer leurs éventuelles variations relatives. Toutefois, malgré la puissance de cette méthode, celle-ci reste difficile à mettre en œuvre du fait que son efficacité relève d'un certain nombre de critères :

- La pureté des traceurs qui doit être optimale ;
- La calibration correcte du double traceur ;
- Le choix des isotopes du double traceur lorsque l'élément possède quatre isotopes ou plus ;
- La détermination du mélange optimal des deux traceurs pour former le double traceur ;

- La détermination du mélange optimal entre échantillon naturel et double traceur.

Pour ces trois derniers critères, Rudge et al. (2009) présentent justement les différentes possibilités présentant les meilleurs résultats, comme notamment une incertitude moindre lors des mesures.

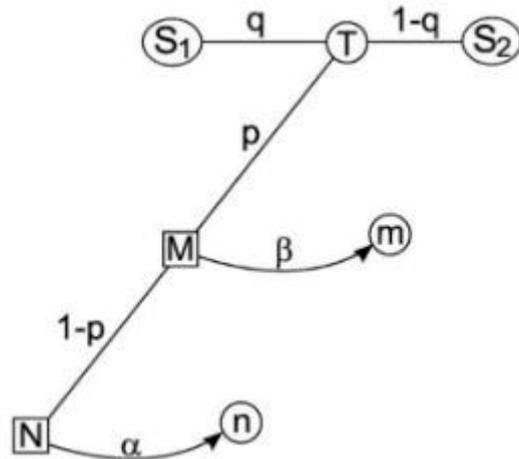


Figure 2-11 : Diagramme schématisant le principe de l'utilisation d'un double traceur (Brazier, 2019). **T** : double traceur provenant d'un mélange des traceurs **S1** et **S2** dans les proportions respectives **q** et **1-q**. **T** est ajouté à l'échantillon naturel **N** selon les proportions respectives **p** et **1-p**, formant le mélange échantillon-double traceur **M**. α et β sont des fractionnements inhérents aux mesures **n** et **m** respectivement.

Par ailleurs, Rudge et al. (2009) ont proposé un diagramme schématisant le principe du double traceur (Figure 2.11). Celui-ci présente le double traceur **T** issu d'un assemblage de deux traceurs dans des proportions **q** et **1-q**. Ce double traceur est ajouté à l'échantillon **N** dans des proportions respectives **p** et **1-p**, de manière à former un mélange **M**. Les rapports isotopiques **m** du mélange **M** sont mesurés par le spectromètre mais ces mesures **m** incluent un facteur de fractionnement β inhérent à la mesure. De même, la composition **n** d'un matériau standard sans double traceur peut être reliée à la composition de l'échantillon **N** via le facteur α qui reflète un fractionnement de masse naturel. La méthode du double traceur permet ainsi de déterminer par inversion la valeur des inconnues α , β , **p**, **N** et **M** en ayant connaissance des paramètres **n**, **m** et **T**.

Les facteurs de fractionnement α et β suivent les mêmes lois exponentielles de discrimination de masse (Russel et al., 1978). En appliquant la schématisation de Rudge et al. (2009) à ces lois, on obtient :

$$\left(\frac{a_X}{b_X}\right)_{m \text{ ou } n} = \left(\frac{a_X}{b_X}\right)_{M \text{ ou } N} \times \left(\frac{m_{a_X}}{m_{b_X}}\right)^{-\alpha \text{ ou } -\beta} \quad (2.5)$$

Avec respectivement, **a** et **b** les isotopes lourds et légers de l'élément **X**, **m_{a_X}** et **m_{b_X}** les masses atomiques des isotopes lourds et légers de l'élément **X**, et **α** et **β** les fractionnements de masses se produisant dans le spectromètre de masse et dans la nature, et **m**, **n**, **M**, **m** les paramètres décrits dans le schéma de Rudge et al. (2009).

Ensuite, il est possible d'exprimer la proportion molaire dans laquelle un isotope du double traceur est présent dans le mélange échantillon - double traceur. Pour ce faire on utilise l'équation suivante :

$$({}^cX)_M = p \times ({}^cX)_T + (1 - p) \times ({}^cX)_N \quad (2.6)$$

Avec ({}^cX) la proportion molaire de l'isotope c de l'élément X considéré et p la proportion de traceur dans le mélange.

A partir de ces équations, il est possible de déterminer les inconnues **α**, **β**, **p**, **N** et **M** au travers de la résolution d'un système d'équations par méthode inverse. Lorsque l'on prend en compte quatre isotopes d'un élément d'intérêt (comme dans le cas présent), il s'agit de résoudre trois équations non-linéaires (on détermine ainsi trois rapports isotopiques).

2.4.2.a.3. Expression des résultats

Les valeurs isotopiques mesurées ont été exprimées en δ^{44/40Ca} en pour mille par rapport à l'étalon NIST SRM915a (Hippler et al., 2003 ; Eisenhauer et al., 2004), à l'aide de la formule suivante :

$$\delta^{44/40}Ca = \left(\frac{\frac{44Ca}{40Ca_{sample}}}{\frac{44Ca}{40Ca_{SRM915a}}} - 1 \right) \times 1000 \quad (2.7)$$

Pour évaluer directement le fractionnement isotopique apparent, nos résultats seront exprimés comme une différence (Δ^{44/40}Ca_i) entre la composition isotopique de Ca mesurée dans la phase aqueuse ou solide finale (δ^{44/40}Ca_i) et celle de la solution initiale (δ^{44/40}Ca_{ini}):

$$\Delta^{44/40}Ca_i (\text{‰}) = \delta^{44/40}Ca_i - \delta^{44/40}Ca_{ini} \quad (2.8)$$

où "i" représente le liquide après adsorption, ou bien les culots bactériens ou minéraux après adsorption.

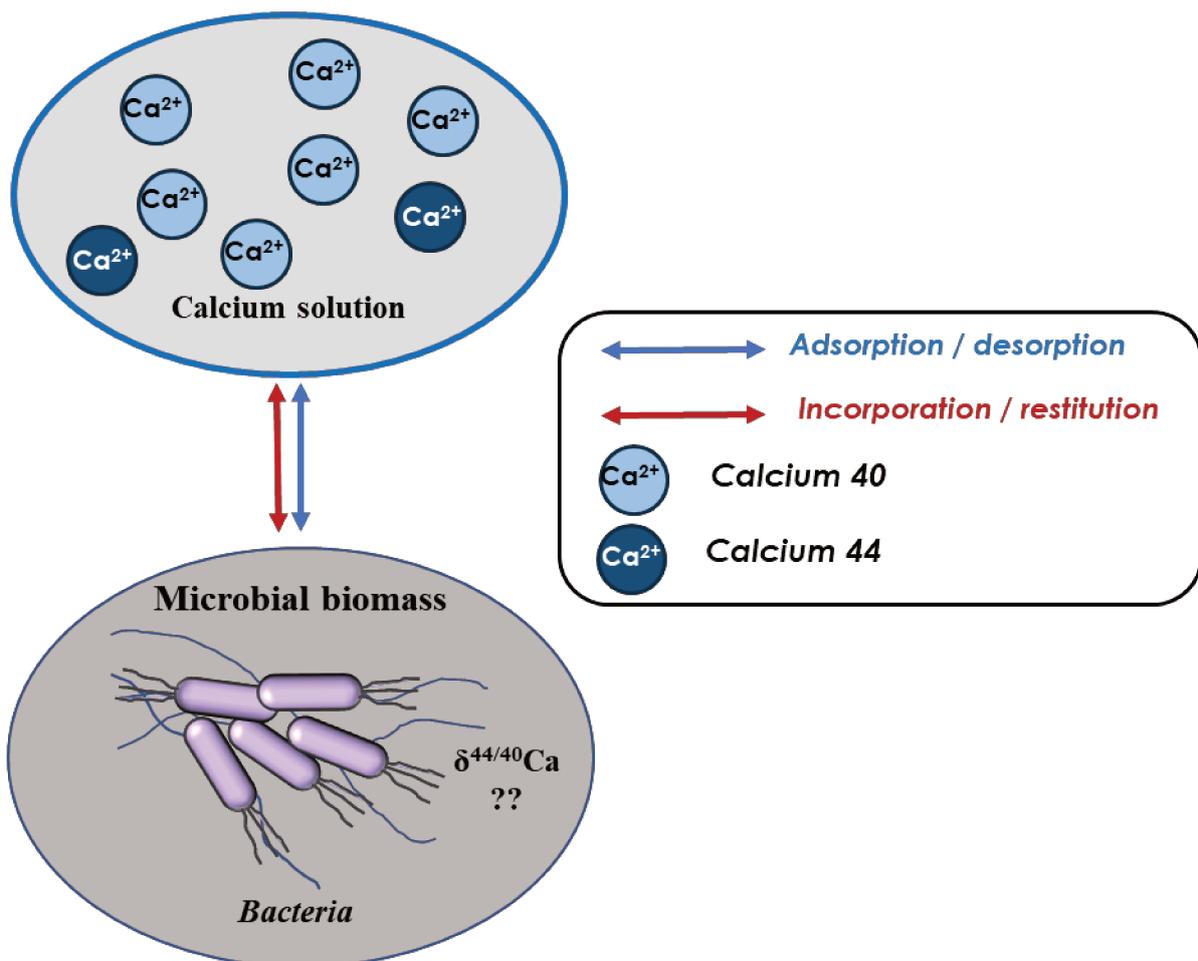
2.4.2.a.4. Expression de l'incertitude sur les résultats

L'incertitude propagée associée (Δ_{error} , in ‰) peut être exprimée comme suit

$$\Delta_{\text{error}}(\Delta^{44/40}\text{Ca}_i) = \sqrt{\left(\Delta_{\delta^{44/40}\text{Ca}_i}\right)^2 + \left(\Delta_{\delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{ini}}}\right)^2} \quad (2.8)$$

La répétabilité interne moyenne obtenue au cours de l'étude était de 0,07 ‰ sur la base de mesures répétées du NIST SRM 915a (2SD, N=124). Dans le cas des expérimentations sur *la vermiculite et sur les bactéries*, les mesures répétées de la solution initiale de Ca ont donné une valeur égale à $0,89 \pm 0,11$ ‰ (2SD, N= 6). Dans le cas des expérimentations sur *les oxydes de manganèse*, les mesures répétées de la solution initiale de Ca ont donné une valeur égale à $1,09 \pm 0,14$ ‰ (2SD, N= 5). L'incertitude externe calculée à partir des échantillons répétés à long terme était égale à 0,10 ‰ (2SD, N=14) pour les valeurs de $\Delta^{44/40}\text{Ca}$. En utilisant ces valeurs et selon l'équation (3), l'erreur propagée associée à $\Delta^{44/40}\text{Ca}$ est égale à 0,15 ‰ pour les expérimentations sur *la vermiculite et sur les bactéries* et 0,18‰ pour les expérimentations sur *les oxydes de manganèse*.

Chapitre 3 : Caractérisation élémentaire et isotopique de la sorption du Ca sur des bactéries végétatives et sporulées ubiquistes des sols.



3.1. Introduction

Les bactéries sont un élément clé de la zone critique, notamment du fait de leur rôle dans le cycle des nutriments et leur biodisponibilité pour la végétation. Des études préliminaires ont mis en évidence qu'en présence de bactéries du sol, l'absorption des nutriments par les plantes est accrue en raison de l'amélioration de la dissolution minérale. De plus, les signatures isotopiques du calcium ont également montré des différences lors d'expériences en laboratoire en présence et en absence de bactéries. En effet, en l'absence de bactéries, les solutions de sol étaient limitantes en Ca et celui-ci présentait un fractionnement isotopique significatif, tandis qu'en présence de bactérie, le Ca n'était pas limitant et ne présentait aucun fractionnement visible (Gangloff et al., 2014).

L'objectif de ce chapitre de thèse est de caractériser l'interaction directe du calcium avec des bactéries et de vérifier si cette interaction engendre un fractionnement isotopique du Ca. Pour ce faire, deux bactéries ont été étudiées : *Bacillus subtilis*, une bactérie à Gram-positif, et *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie à Gram-négatif.

Ce chapitre explore dans un premier temps les interactions du Ca avec les formes végétatives des bactéries (*Bacillus subtilis* pouvant aussi exister sous forme sporulée). Différents paramètres ont été pris en compte (concentration initiale en Ca et pH de la solution initiale, bactéries vivantes ou mortes, durée de contact entre la solution et les bactéries etc.).

Dans un second temps, les résultats des interactions du Ca avec les bactéries végétatives apportant de nouvelles interrogations, ce chapitre vise à mieux comprendre les mécanismes impliqués lors de ces interactions. Des fractionnements cellulaires visant à séparer chaque compartiment des bactéries ont été mis en œuvre pour mieux comprendre comment le Ca se répartie à la surface ou à l'intérieur de celles-ci.

Dans un troisième temps, les expérimentations ont porté sur l'interaction du Ca avec des spores de *Bacillus subtilis* en jouant cette fois sur la quantité de cellules pour une même concentration en Ca, de manière à trouver les meilleures conditions pour que le Ca soit limitant et maximiser les chances d'observer un fractionnement isotopique.

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article, soumis le 19 septembre 2023 pour publication dans Biogeochemistry et est actuellement en cours de révision.

3.2. Elemental and isotopic characterization of Ca sorption on ubiquitous vegetative and spore-forming soil bacteria.

N. Nuvoli¹, A.D. Schmitt¹, S. Gangloff¹, V. A. Geoffroy²

¹ ITES, UMR 7063, University of Strasbourg, CNRS and ENGEES, France

² BSC, UMR 7242, University of Strasbourg, CNRS, France

n.nuvoli@unistra.fr ; adschmitt@unistra.fr ; sgangloff@unistra.fr ; valerie.geoffroy@unistra.fr

Abstract

Bacteria are a key component of the critical zone, because of their role in the nutrient availability for the vegetation. There is still little knowledge on the direct role of bacteria on Ca storage/leaching in soils while it is an essential macronutrient for vegetation growth. In recent years, Ca stable isotopes have shown their potential in understanding the Ca biogeochemical cycle. Preliminary studies highlighted that in the presence of soil bacteria, the plant uptake of nutrients is increased due to the improvement of mineral dissolution. Moreover, Ca isotope signatures of nutrient media also showed differences between growth experiments in the laboratory in the presence and absence of bacteria. The focus is to verify if Ca adsorption and incorporation into/onto soil bacteria induce such isotopic fractionation. In-lab experimentations were carried out on *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negative bacterium) and on the vegetative and sporulated forms of *Bacillus subtilis* (Gram-positive bacterium). These experimentations showed that: i) no observable isotopic fractionations were induced during calcium/bacteria contact for all experimental parameters (pH, kinetic, optical density of bacteria, interaction time, dead/alive bacteria); ii) Ca was mainly stored in the bacterial wall compartments. On the other hand, there were significant Ca isotopic differences between the spore and the sporulation medium ($\Delta^{44/40}\text{C}_{\text{spores-sporulation medium}}$ ranging from -0.53‰ to -1.15‰) which implied an isotopic fractionation during the sporulation process. These results suggest that Ca storage in soil bacteria, such as at least for *B. subtilis*, is likely to impact the Ca biogeochemical cycle when they sporulate.

Keywords

Ca isotopes, adsorption, incorporation, bacteria, sporulation

Aknowledgements

Colin Fourtet, Eric Pelt and René Boutin (ITES, Strasbourg) are acknowledged for their technical assistance in the laboratory.

3.2.1. INTRODUCTION

Unlike other macronutrients, such as nitrogen (N) or phosphorus (P), studies concerning calcium (Ca), its dynamics in soils, and its availability to plants remain underdeveloped. Calcium is an essential nutrient with significant physiological and structural functions in plant metabolism (Marschner, 1999). Additionally, it predominates as a cation in a hydrated form within soils. Due to its divalent charge, limited abundance, and reduced hydration, it exhibits strong adsorption onto clay minerals and humic acids compared to other metal cations (Likens et al., 1998).

Moreover, on a global scale, calcium emerges as a cation resulting from continental weathering and plays a role in the carbon cycle (Berner et al., 1983; Thorley et al., 2015). Passive sorption enables its bioaccumulation, independent of metabolism, onto bacterial membranes. Furthermore, it can passively diffuse into cells or be transported within cells, dependent on metabolism (Haferburg and Kothe, 2007). This element also assumes significance in sporulated bacteria, where the spore imparts heightened resistance to thermal, radiation, or pH-related environmental stresses. Notably, calcium forms a complex with dipicolinic acid, ensuring DNA stabilization and maintaining the dehydrated state of spores (Paidhungat et al., 2000; Setlow et al., 2006). The ubiquity of microorganisms in substantial quantities – bacterial or fungal – in natural environments gives rise to diverse metabolites. These metabolites possess properties that influence nutrient availability (Barnes and Nierzwicki-Bauer, 1997). Furthermore, the presence of microorganisms fosters the bioweathering of minerals, thus enhancing nutrient bioavailability (Blum et al., 2003; Matlakowska et al., 2012; Ortega-Morales et al., 2016).

Nevertheless, the implications of these biotic processes are inadequately documented, particularly within the global biogeochemical cycles of elements such as calcium. It is crucial to consider the processes occurring at the cell wall/medium interface and the roles of highly reactive extracellular polymeric substances (EPS) and metabolism (efflux, internalization). The distinct roles of various biological agents and their metabolites in establishing biogeochemical alteration balances, including removing nutrients by living organisms, remain poorly understood (e.g., Blum et al., 2002).

In recent years, stable calcium isotopes have demonstrated their potential in elucidating processes at the soil-water-plant interface. For instance, the utilization of calcium isotopes to study biogeochemical calcium cycling in the critical zone has unveiled isotopic fractionations linked to both biotic factors (such as root uptake, intra-plant translocation, and vegetation

recycling) and abiotic factors (including precipitation through secondary minerals, adsorption onto clay minerals, and manganese oxides) (Cobert et al., 2011a; Schmitt et al., 2013; Gussone et al., 2016; Schmitt et al., 2017; Brazier et al., 2019; Schmitt et al., 2019; Brazier et al., 2020; Griffith et al., 2020; Schmitt et al., 2023 and references therein). Nevertheless, limited research has explored the impact of the organic fraction of soils on potential isotopic fractionations of calcium within these environments.

A preliminary microcosm study has indicated that bacteria enhance plant nutrient uptake, leading to isotopically unfractionated nutrient pool waters. Conversely, these fractionations persist without bacteria (Cobert et al., 2011b). A study conducted in natural settings proposes that bacteria, depending on hydro-climatic conditions, can degrade either apatite or litter, resulting in distinct calcium isotope signatures (Gangloff et al., 2014).

The current study aims to assess calcium adsorption onto two terrestrial bacteria: a spore-forming Gram-positive bacterium, *Bacillus subtilis*, and a siderophore-producing Gram-negative bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. The objectives are as follows:

(1) Gain insights into the interaction between calcium and bacteria and delineate the extent of adsorption (on solid surfaces) and absorption (active or passive incorporation into cells) in calcium storage.

(2) Investigate the presence of calcium isotopic fractionation associated with adsorption/incorporation onto/in cells and spores, along with potential controlling parameters (such as available calcium quantity, pH, contact duration, bacterial biomass, or membrane surface characteristics – Gram-positive, Gram-negative, spore).

(3) Specify the storage compartments of calcium during adsorption/incorporation into bacterial cells and identify the pertinent functional groups involved.

(4) Discuss the implications for the natural environment.

3.2.2. MATERIAL AND METHODS

The microbiological aspects of the following experiments were conducted at the Biotechnology and cell signalling (BSC) laboratory, University of Strasbourg, located in Illkirch, France. Meanwhile, the geochemical aspects were undertaken at the Cortecs-Pacite platform of the University of Strasbourg, situated at Institut Terre Environnement Strasbourg (ITES) in Strasbourg, France.

3.2.2.a. Preparation of solutions and culture medium

The Ca solutions utilized for the experiments were derived from hydrated calcium nitrate powder ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) sourced from Alfa Aesar Puratronic® with a purity level of 99.9995%. The powder was dissolved in ultra-pure water, and the pH of the resulting solutions was subsequently adjusted as needed, employing 0.025 N HNO_3 and 0.1 N NaOH solutions.

The succinate culture medium is an iron-poor minimum synthetic medium modified from the original succinate. (Composition in g/L 3.72g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1.50g KH_2PO_4 , 0.10g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.50g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.00g succinic acid, 1.55g NaOH , $[\text{Ca}]_{\text{succinate}} < 2.5 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$). The medium was filter sterilized to avoid contaminants.

The sporulation medium was prepared using (for 1L): 2.4 g meat extract, 2.4 g peptone, 1.2 g NaCl , 0.03 g KH_2PO_4 , 13 g agar, and water. The medium was sterilized by autoclave.

3.2.2.b. Bacterial culture conditions

B. subtilis (ATCC 6633), a Gram-positive bacterium, and *P. aeruginosa* (ATCC 15692), a Gram-negative bacterium, were selected for this study due to their soil prevalence and ease of cultivation. These two species share similar culture mediums and physicochemical growth conditions, including temperature, duration, and agitation speed. For each bacterium, sterile conditions were maintained as 50 mL Falcon™ tubes containing 10 mL of lysogeny broth (LB) medium were inoculated. Incubation was carried out under aerobic conditions at 30 °C and 220 rpm for 18–24 h. Following the overnight LB culture, cells were centrifuged at $9,871 \times g$ for 5 min and washed twice with 7 ml of sterile modified succinate medium. Subsequently, the pellets were re-suspended in 8 mL of modified succinate medium, and 1 ml of this bacterial suspension was introduced into 50 mL Falcon™ tubes containing 24 ml of culture medium. Incubation at 30°C with shaking at 220 rpm was sustained for 24 h. This protocol induces nutrient deprivation, particularly a calcium deficiency in the bacteria, setting the ideal conditions for characterizing calcium sorption.

Post-culture, the cells were pelleted by centrifugation at $9,871 \times g$ for 5 min, washed twice with sterile modified succinate medium, and adjusted to an $\text{OD}_{600\text{nm}}$ of 0.5 or 1 according to the experiment. An $\text{OD}_{600\text{nm}}$ equal to 0.5 corresponds to $\sim 2 \times 10^9$ CFU/mL for *P. aeruginosa*, $\sim 5 \times 10^7$ CFU/mL for vegetative *B. subtilis* and 2×10^7 CFU/mL for *B. subtilis* spores. In this study, we decided to set the $\text{OD}_{600\text{nm}}$ value rather than the number of CFU (colony forming

units) in order to obtain similar microbial biomass from one bacterium to another since the size of the bacteria is not the same (respectively 2–4 μm by 0.5–2 μm , 1.5–3 μm by 0.3–0.8 μm and $\text{\O}1$ μm , for *B. subtilis*, *P. aeruginosa* and *B. subtilis* spore respectively).

B. subtilis was routinely cultivated for 24 h at 30°C with continuous shaking at 220 rpm in LB medium. The sporulation agar medium contained within Roux bottles was inoculated with the *B. subtilis* pre-culture. These bottles were then incubated at 37°C for at least one week. The medium surface was washed off to harvest the cultures using sterile physiological water. The resulting suspension was stored in a cold environment at 4°C. Before usage, the spores were subjected to a water bath at 80°C for 20 min to eliminate potential vegetative cells. Subsequently, the spores underwent two cycles of washing with filter-sterilized pure water and were subjected to centrifugation at $9,871 \times g$ for 5 min. Cell suspensions were adjusted to $\text{OD}_{600\text{nm}}$ values ranging from 0.5 to 4.5 in preparation for the experiments.

3.2.2.c. Sorption experiments and samples digestion

Batch sorption experiments were conducted as a function of Ca concentration (0.5 to 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), pH (5 to 7, adjusted by the addition of 5×10^{-2} N HNO_3 or 5×10^{-3} N NaOH solutions), bacterial biomass ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.5$ or 1 for experiments with bacteria and $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.5$ to 4.5 for experiments with spores), and as a function of the contact time between the bacteria/spores and the calcium solution (5 min to 4 h for kinetic experiments, 2 h for others experiments), with a constant calcium solution/bacteria suspension ratio equal to 1. The chosen condition for spores experiments (Ca concentration (1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and pH (5.6)) enable comparison with results obtained for vegetative bacteria. The various cell concentrations ranging from $\text{OD}_{600\text{nm}}$ equal to 0.5 to 4.5 allow us to obtain a sufficiently high spore/Ca ratio for maximum Ca sorption. The activity of CCCP (Carbonyl Cyanide *m*-Chlorophenylhydrazone) as a protonophore that reversibly binds protons (H^+) and transports them across the cell membrane, leading to membrane depolarization, eradication of the electrochemical concentration gradient and reduced ATP production by ATP synthase (Ni et al., 2016, Plášek et al., 2017, Ruas et al., 2018), it was used to investigate how protonophores' effect on the cell membrane could affect the Ca absorption. The CCCP experiments were conducted at pH 5.6, with an initial Ca concentration of 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and a contact time of 2 h. Bacteria/spores suspensions were centrifuged in a Beckman Coulter Avanti J-30ITM instrument (10,000 rpm for 10 min), and the supernatants were discarded. Then, calcium solution was added to each centrifugation tube. The

tubes were placed on an SB3 Stuart™ rotator shaker at 40 rpm for agitation. After shaking, the tubes were centrifuged (10,000 rpm for 10 min), and the supernatants were filter sterilized using syringes and 0.22 µm cellulose acetate membrane filters conditioned with 18 mQ ultra-pure water. To mineralize the bacteria, 3-5 mL of 6 N HCl were added to the polypropylene tubes, which were placed on the rotator shaker for agitation (one night at 220 rpm). After this step, the content of these tubes was transferred to Savillex™ beakers, and two washes of the polypropylene tubes were operated, using 3-5 mL of 6N HCl, to transfer the remaining material in the Savillex™ beakers to avoid losses. The samples were heated at 70 °C for 1 h and then evaporated. After evaporation, 1 mL of distilled HNO₃ and 0.2 mL of suprapure H₂O₂ were added to the samples, which were heated for one night and then evaporated. After this, 10 mL of 0.25 N HNO₃ were added to the Savillex™ beakers, heated at 70 °C for 1 h, and then transferred in 15 mL Falcon™ tubes.

3.2.2.d. Cell fractionation experiments

A simplified diagram of the cell fractionation protocols is shown in Figure 3.1.

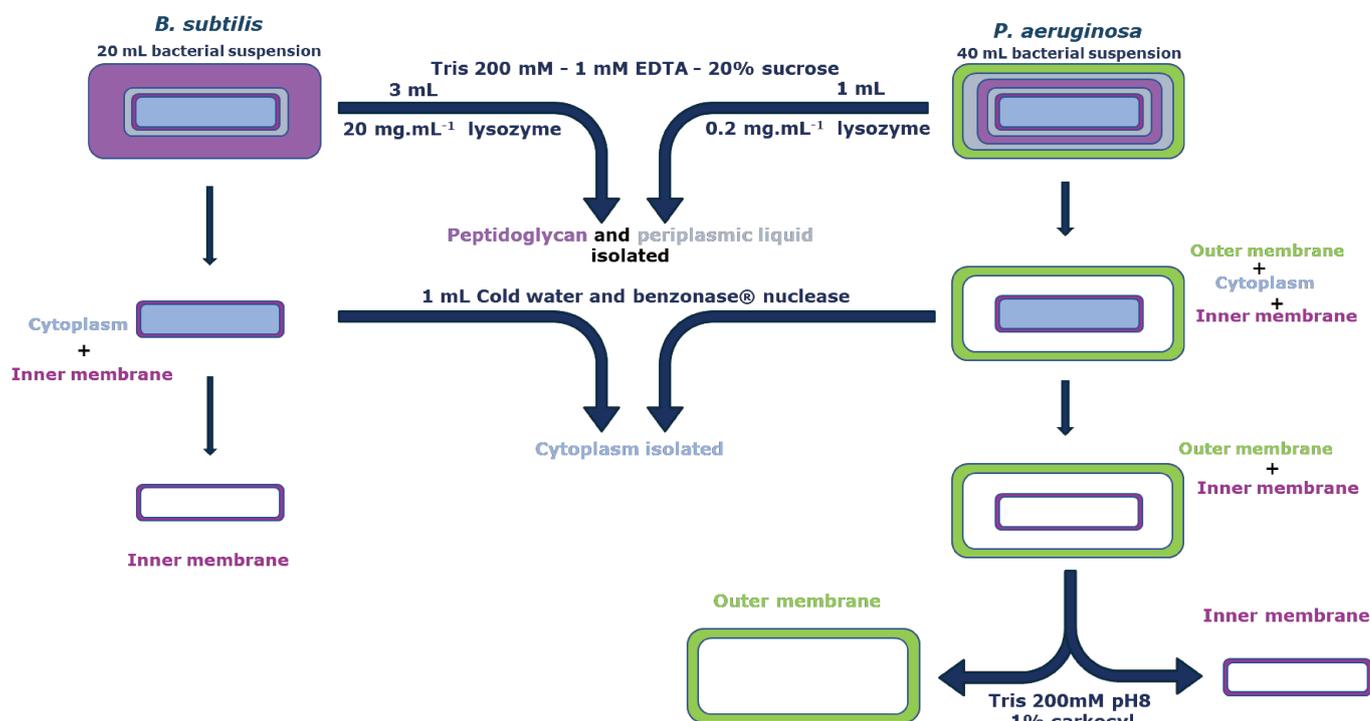


Figure 3-1 : The simplified schematic of the cellular fractionation protocol for *B. subtilis* and *P. aeruginosa* shows the different solutions used for each separation step.

3.2.2.d.1. *P. aeruginosa*

The cell fractionation protocol currently presented (refer to Figure 3.1) is derived from a procedure originally employed in the BSC laboratory (Guillon et al., 2012; Cunrath et al., 2014). It has been modified to align with our specific requirements and experimental constraints. These adaptations include accommodating a substantial bacterial quantity and excluding superfluous steps that might introduce bias.

The triplicates of 40 mL suspension of *P. aeruginosa* at $OD_{600nm} = 0.5$ was incubated with various calcium solutions in 50 mL FalconTM tubes for 2 h at 30°C. After this incubation, the supernatants were obtained through centrifugation ($9,871 \times g$ for 5 min). The bacterial pellets were treated as follows:

(a) Re-suspended in 1 mL of a mixture containing 200 mM Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane, utilized as a buffer solution), 1 mM EDTA, and 584 mM sucrose (referred to hereafter as Tris-EDTA-sucrose). This mixture added 2 μ L of lysozyme dissolved at 0.1 g/mL in 55% glycerol (yielding a final concentration of 200 μ g/mL of lysozyme). The solution was vortexed and then incubated on ice for 1 h. After the incubation, the tubes were centrifuged ($6,134 \times g$ for 10 min at 4°C). The resulting supernatant contained the periplasmic liquid and peptidoglycan, while the pellets represented the spheroplasts (denoting *P. aeruginosa* cells devoid of the outer membrane). The pellets underwent three washes with 500 μ L of Tris-EDTA-sucrose.

(b) Re-suspended in 1 mL of cold filtered water, the pellets were vortexed and homogenized through successive aspirations. Following this, 1 μ L of benzonase® nuclease (used to degrade DNA and RNA) was introduced to each sample. After another round of vortexing, the samples were incubated (220 rpm for 1 h at 37°C). Post-incubation, the solution from step (b) was transferred to microtubes and subjected to ultracentrifugation (40,000 rpm for 40 min at 4°C). The resulting supernatants were indicative of the cytoplasm. The pellets underwent three washes with 500 μ L of freshly prepared cold filter-sterilized pure water.

(c) Re-suspended in 1 mL of a solution comprising 200 mM Tris at pH 8 and 1% sarkosyl (utilized for cell lysis and membrane solubilization). This resuspension was achieved through successive aspirations to disrupt the pellets, followed by vortexing. The mixture was agitated on a rotary shaker for 1 h. After agitation, the samples were centrifuged (40,000 rpm for 40 min at 4°C). The resulting supernatants indicated the presence of the inner membrane, whereas the

pellets represented the outer membrane. The pellets were washed thrice with 500 μ L of cold filter-sterilized pure water. The triplicates of each cellular compartment were pooled before elemental concentration analysis.

3.2.2.d.2. *B. subtilis*

The composition of cell walls in *B. subtilis* and *P. aeruginosa* differs due to their classification as Gram-positive and Gram-negative bacteria, respectively. Consequently, adaptation of the cell fractionation protocol was necessary. Initial attempts at cell fractionation for *B. subtilis*, using the same experimental conditions as those for *P. aeruginosa*, revealed an absence of protoplast transformation following lysozyme treatment. Several approaches were explored to address this by altering factors such as contact time, bacterial concentration, and lysozyme dosage. Ultimately, a significant increase in lysozyme concentration and a reduction in bacterial load per tube led to successful peptidoglycan digestion within a 1-h contact period. This transition of bacteria into protoplasts was confirmed through microscopic examination before progressing with the experiment.

The *B. subtilis* cell fractionation protocol was carried out as described below. The triplicates of 20 mL suspension of *B. subtilis* at $OD_{600nm} = 0.5$ was incubated with various calcium solutions in 50 mL FalconTM tubes for 2 h at 30°C. After this incubation, the supernatants were obtained through centrifugation ($9,871 \times g$ for 5 min). The bacterial pellets were treated as follows:

(a) The pellets were re-suspended in 3 mL of a Tris-EDTA-sucrose mixture containing 20 mg/mL of lysozyme. After vortexing, the mixture was incubated on ice for 1 h.

Following the incubation, the tubes underwent centrifugation ($6,134 \times g$ for 10 min at 4°C). The resulting supernatants contained peptidoglycan, while the pellets represented protoplasts. The pellets were subjected to three washes, each involving 500 μ L of Tris-EDTA-sucrose.

(b) The protoplasts were re-suspended in 1 mL of cold water, followed by vortexing and homogenization via successive pipetting. Then, 1 μ L of benzonase® nuclease was introduced to the samples, which were again vortexed before incubation (220 rpm for 1 h at 37°C). Post-incubation, the protoplasts from step (b) were transferred to microtubes and subjected to centrifugation (40,000 rpm for 40 min at 4°C). The resulting supernatants corresponded to the cytoplasm, while the pellets contained the cytoplasmic membrane. The elemental concentrations of the triplicates were analyzed before pooling the samples for isotopic analysis.

3.2.2.e. Analytical procedures

To assess calcium concentration in both the supernatants and bacterial digests, a portion of each sample was diluted with 0.25 N HNO₃ and subjected to analysis using an ICP-AES (iCAP 6000 series, ThermoFisher Scientific™). This instrument exhibited an accuracy nearing 3% for calcium measurements.

Calcium isotope fractionations were measured on a TIMS (ThermoFisher Scientific Triton™) following the laboratory protocol (Schmitt et al., 2009, 2017; Brazier et al., 2019; 2020). The samples were prepared by adding 0.14 μmol of Ca to 0.01 μmol of a ⁴²Ca-⁴³Ca double spike (i.e., ⁴²Ca/⁴³Ca spike ratio of 5, following Holmden (2005)) and dried down at 70°C on a hotplate. Then, all samples and internal standard (Atlantic seawater, Schmitt et al., 2001; Hippler et al., 2003) solutions were loaded into ion-exchange chromatographic columns (high-density polyethylene) filled with 2 mL of DGA normal resin (TODGA) from Triskem™ (Horwitz et al., 2005; Romaniello et al., 2015). The purified samples were collected in 0.1 N HCl in Savillex™ beakers, with an addition of 0.2 mL of distilled HNO₃ and suprapure H₂O₂ before being heated and dried down at 70°C and then converted into nitric form by dissolution in 0.5 mL of 2 N HNO₃ and dried down one last time. After this, the samples were dissolved in 1.5-3 μL 1 N HNO₃ and loaded on previously outgassed and under primary vacuum oxidized tantalum single filaments (99.995% purity). Note that the total Ca blank for this separation represents less than a 0.2% contribution to the Ca from samples and can be neglected.

Measured values of the isotopic analysis were expressed as δ^{44/40}Ca in per mil relative to the NIST SRM915a standard (Hippler et al., 2003; Eisenhauer et al., 2004), using the following formula:

$$\delta^{44/40}Ca = \left(\frac{\frac{^{44}Ca}{^{40}Ca_{sample}}}{\frac{^{44}Ca}{^{40}Ca_{SRM915a}}} - 1 \right) \times 1000 \quad (1)$$

To directly assess the apparent isotopic fractionation, our results will be expressed as a difference (Δ^{44/40}Ca_i) between the measured Ca isotopic composition in the final aqueous or solid phase (δ^{44/40}Ca_i) and that of the initial solution (δ^{44/40}Ca_{ini}):

$$\Delta_{\delta^{44/40}Ca_i} = \delta^{44/40}Ca_i - \delta^{44/40}Ca_{ini} \quad (2)$$

where “i” represents the liquid after sorption (LAA) or the bacteria after sorption (BAA).

The associated propagated uncertainty (Δ_{error} , in ‰) can be expressed as

$$\Delta_{\text{error}}(\delta^{44/40}\text{Ca}_i) = \sqrt{\left(\Delta_{\delta^{44/40}\text{Ca}_i}\right)^2 + \left(\Delta_{\delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{ini}}}\right)^2} \quad (3)$$

The average internal repeatability achieved throughout the study was 0.07‰, determined from repeated measurements of NIST SRM 915a (2SD, N=124). Likewise, repeated measurements of the initial calcium solution yielded a value of $0.89 \pm 0.11\%$ (2SD, N=6). The external uncertainty, as calculated from external long-term sample replicates, amounted to 0.10‰ (2SD, N=14) for $\delta^{44/40}\text{Ca}$ values. Using these figures and Equation (3), the propagated error associated with $\delta^{44/40}\text{Ca}$ was determined to be 0.15‰. To gauge the accuracy of our measurements, we employed an in-house Atlantic seawater standard ($1.88\% \pm 0.11$, 2SD, N=38) during the same timeframe. The obtained values and references aligned with those reported by Hippler et al. (2003) and Heuser et al. (2016).

3.3. RESULTS

3.3.1. Sorption experiments on vegetative bacteria

3.3.1.a. Variation of Ca concentration of the initial solution

We observed a linear relationship between the residual calcium concentration in the supernatant and the initial calcium concentration in solution for both *B. subtilis* and *P. aeruginosa* ($R^2 > 0.99$) (Fig. 3.2a). However, a slight difference emerged between the two bacteria: *P. aeruginosa* exhibited a more rapid saturation with calcium as the concentration increased. Specifically, at 5.0 $\mu\text{g/mL}$, *P. aeruginosa* retained 60% of the initial calcium concentration in the supernatant, whereas *B. subtilis* retained around 80% (equivalent to approximately 40% and 20% of adsorbed calcium for *P. aeruginosa* and *B. subtilis*, respectively). Conversely, the disparity was less noticeable at concentrations below 1.6 $\mu\text{g/mL}$ (around 20%) (Table 3.1).

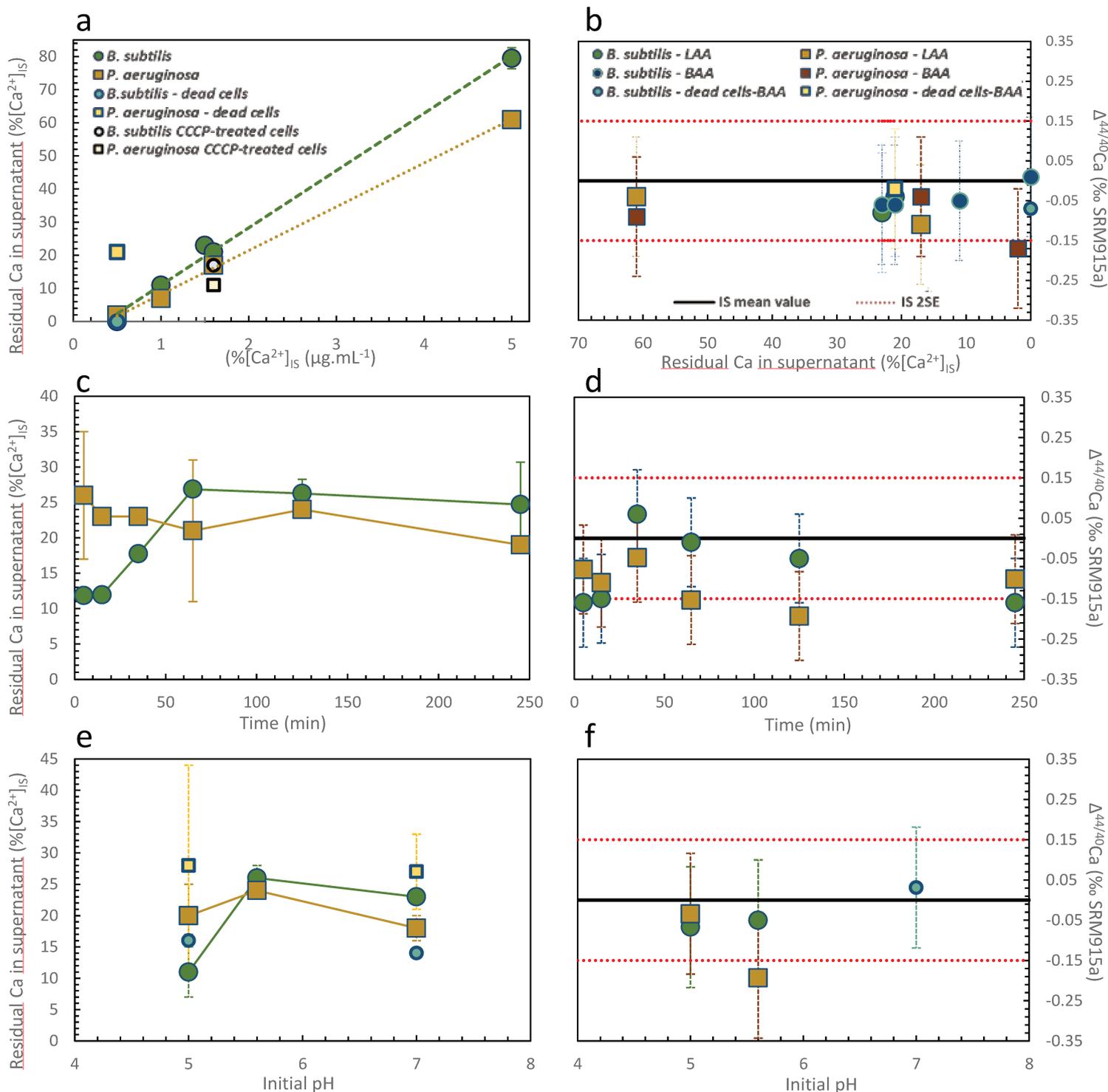


Figure 3-2 : Elemental and isotopic measurements of Ca sorption experiments on vegetative bacteria. (a) and (b) The residual Ca in the supernatant, expressed as a percentage of the initial Ca in the solution, as a function of the initial solution concentration, and the values of $\Delta^{44/40}\text{Ca}$ for the different conditions, respectively. (c) and (d) The residual Ca in the supernatant, expressed as a percentage of the initial Ca in the solution, as a function of the interaction time, and the values of $\Delta^{44/40}\text{Ca}$ for the different conditions, respectively. (e) and (f) The residual Ca in the supernatant, expressed as a percentage of the initial Ca in the solution, as a function of the initial pH of the solution, and the values of $\Delta^{44/40}\text{Ca}$ for the different conditions. Experiments varying $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IS}}$ were conducted at pH 5.6 with a 2-h interaction duration. Experiments varying interaction time were conducted at pH 5.6 and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IS}}$ equal to 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Experiments varying initial pH were conducted at $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IS}}$ equal to 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ at pH 5.6, and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IS}}$ equal to 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ at pHs 5 and 7, with a 2-h interaction duration. LAA refers to the liquid after sorption, while BAA refers to the bacteria after sorption. IS refers to initial solution.

Results obtained with dead bacteria (at 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) indicated discrepancies in sorption compared to live counterparts, particularly for *P. aeruginosa*: residual calcium remained in the solution after sorption with dead bacteria, whereas with live bacteria (at 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), all the calcium in the solution was sequestered within the bacterial cells. No discernible isotopic fractionation is evident in the liquid following sorption, irrespective of the varying conditions (such as the percentage of residual calcium in the supernatant or the state of bacteria being dead or alive). This holds even when the residual calcium in the supernatant is below 10%, which suggests that calcium availability is limited. ($\delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{Liquid after sorption}} = 0.84 \pm 0.05 \text{‰}$ (2SD, N=3) and $\delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{Bacteria after sorption}} = 0.85 \pm 0.06 \text{‰}$ (2SD, N=6), while $\delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{Initial solution}} = 0.89 \pm 0.11 \text{‰}$ (2SD, N= 6)) (Fig. 3.2b). Drawing from the findings of this investigation into the impact of calcium concentration, the concentration of the calcium solution was established at $1.55 \pm 0.14 \mu\text{g}/\text{mL}$ (2SD, N=2) for the kinetic and pH experiments. This choice aimed to strike a balance, ensuring a substantial proportion of calcium sorption while retaining adequate calcium in the supernatant to facilitate isotopic analysis.

3.3.1.a. Kinetics

The kinetic study depicted in Figure 3.2c was conducted at pH 5.6, and our findings revealed an immediate occurrence of sorption for both bacterial strains, albeit in differing proportions (25% residual calcium in solution for *P. aeruginosa* compared to 12% for *B. subtilis*). In contrast, adsorbed calcium slightly decreased during the initial contact hour with *B. subtilis* (resulting in 21% residual calcium in the supernatant). Between the 1 to 4-h interval, the trend appeared stable, although a subtle inclination towards increased adsorbed calcium seemed apparent for both bacteria. Notably, from an isotopic perspective, the recorded values fell within the range of analytical reproducibility (Fig. 3.2d).

Table 3.1: Amount of residual Ca in the supernatant and Ca apparent isotopic fractionation between the initial solution and the supernatant or the bacteria measured after sorption experiments in various conditions. LAA, liquid after sorption; BAA, bacteria after sorption; IS, the initial solution. The 2SD is shown for samples that have been duplicated (n = 2).

Sample	pH	[Ca] _{IS}	State of bacteria	OD _{600nm}	Time	Residuel Ca in supernatent	$\delta^{44/40}\text{Ca}$ LAA	$\delta^{44/40}\text{Ca}$ BAA	$\Delta^{44/40}\text{Ca}$ LAA	$\Delta^{44/40}\text{Ca}$ BAA
		($\mu\text{g.L}^{-1}$)			(min)	(%[Ca] _{IS} \pm 2SD)	(‰)	(‰)	(‰)	(‰)
<i>B. subtilis</i>										
	5.6	0.5	dead	0.5	120	0		0.82		-0.07
	5.6	0.5	alive	0.5	120	0		0.90		0.01
	5.6	1	alive	0.5	120	11		0.84		-0.05
	5.6	1.5	alive	0.5	120	23	0.81	0.83	-0.08	-0.06
	5.6	1.6	alive	0.5	120	21	0.85	0.83	-0.04	-0.06
	5.6	5	alive	0.5	120	66	0.86	0.86	-0.03	-0.03
kinetics										
	5.6	1.6	alive	0.5	5	12 \pm 1	0.73		-0.16	
	5.6	1.6	alive	0.5	15	12 \pm 0	0.74		-0.15	
	5.6	1.6	alive	0.5	35	18 \pm 0	0.95		0.06	
	5.6	1.6	alive	0.5	65	27 \pm 0	0.88		-0.01	
	5.6	1.6	alive	0.5	125	26 \pm 2	0.84		-0.05	
	5.6	1.6	alive	0.5	245	25 \pm 6	0.73		-0.16	
pH experiments										
	5	1.5	alive	0.5	120	11 \pm 4	0.82		-0.07	
	5	1.5	dead	0.5	120	16 \pm 1				
	7	1.6	alive	0.5	120	23 \pm 1				
	7	1.6	dead	0.5	120	14 \pm 0	0.92		0.03	
OD _{600nm} = 1										
	5.6	1.6	alive	1	120	5 \pm 1	0.94		0.05	
CCCP										
	5.6	1.6	alive	0.5	120	17 \pm 7				
<i>P. aeruginosa</i>										
	5.6	0.5	dead	0.5	120	21		0.87		-0.02
	5.6	0.5	alive	0.5	120	2		0.72		-0.17
	5.6	1	alive	0.5	120	7				
	5.6	1.6	alive	0.5	120	17	0.78	0.85	-0.11	-0.04
	5.6	5	alive	0.5	120	61	0.85	0.8	-0.04	-0.09
kinetics										
	5.6	1.6	alive	0.5	5	26 \pm 9	0.81		-0.08	
	5.6	1.6	alive	0.5	15	23	0.78		-0.11	
	5.6	1.6	alive	0.5	35	23 \pm 0	0.84		-0.05	
	5.6	1.6	alive	0.5	65	21 \pm 10	0.74		-0.15	
	5.6	1.6	alive	0.5	125	24 \pm 0	0.70		-0.19	
	5.6	1.6	alive	0.5	245	19	0.79		-0.10	
pH experiments										
	5	1.5	alive	0.5	120	20 \pm 5	0.86		-0.03	

	5	1.5	dead	0.5	120	28 ± 16		
	7	1.6	alive	0.5	120	18 ± 2		
	7	1.6	dead	0.5	120	27 ± 6		
OD _{600nm} = 1								
	5.6	1.6	alive	1	120	4 ± 2	0.88	-0.01
CCCP								
	5.6	1.6	alive	0.5	120	11 ± 1	0.93	0.04

3.3.1.b. Effect of the transfer processes inhibition

To assess the degree of active calcium incorporation in bacteria during our experiments, we employed CCCP. Figure 3.2a portrays the residual calcium in the supernatant of both bacterial strains under various physiological conditions: alive, deceased, or in the presence of the proton-motive force inhibitor CCCP. In the case of *P. aeruginosa*, residual calcium in the supernatant amounted to 17% of the initial calcium concentration when CCCP was present, in contrast to 21% under the same conditions but without CCCP. Similarly, for *B. subtilis*, residual calcium in the supernatant equated to 11% of the initial calcium concentration with CCCP, compared to 17% without its usage. Both *P. aeruginosa* and *B. subtilis* exhibited a reduction in residual calcium in the supernatant, leading to an increase in sorption (a respective increment of +4% and +6%). Importantly, these experiments yielded no observable isotopic fractionation (Figure 3.2b).

3.3.1.c. pH variation

Shen et al. (2013) established that soil pH significantly impacts bacterial diversity. The pH-dependent experiments in our study were carried out within the range of 5 to 7. This pH spectrum aligns with an optimal range for microbial activity and nutrient availability in soil, as Vammechelen et al. (1997) previously identified.

Following a 2-h interaction between the calcium solution and bacteria at pH 5, considerable variation in residual calcium concentration was evident among viable cells of *B. subtilis* (11%) and *P. aeruginosa* (20%) (see Fig. 3.2e). Likewise, at pH 7, substantial divergence was noted between viable cells of *B. subtilis* (23%) and *P. aeruginosa* (18%). However, the discrepancy was less prominent at pH 5.6, with residual calcium levels of 26% in the supernatant for *B. subtilis*, compared to 24% for *P. aeruginosa*.

Another distinction between living and deceased bacteria was also apparent. At pH 5, live bacteria exhibited greater calcium sorption, with *B. subtilis* retaining 11% residual calcium in the supernatant compared to 16% for deceased bacteria. This contrast was even more pronounced in the case of *P. aeruginosa*, where live bacteria retained 20% residual calcium in the supernatant compared to 28% for deceased bacteria. At pH 7, dead *B. subtilis* cells adsorbed/incorporated more calcium than their live counterparts, resulting in 14% and 23% residual calcium in the supernatant, respectively. In contrast, for *P. aeruginosa*, the pattern remained consistent with that observed at pH 5, with 18% and 27% residual calcium in the supernatant for live and dead bacteria, respectively.

Interestingly, the pH variation between 5 and 7 seemed to have a limited impact on sorption for *P. aeruginosa*, with roughly 23% residual calcium at pH 5.6, 20% at pH 5, and 18% at pH 7. Conversely, for *B. subtilis*, the residual calcium level in the solution at pH 5 (~11%) was notably lower than at pH 5.6 and 7 (25% and 23%). This indicated a heightened calcium sorption by *B. subtilis* at pH 5. Absorption/incorporation exhibited relatively similar behaviour for deceased bacteria between pH 5 and 7, although it was more pronounced in *B. subtilis* than in *P. aeruginosa*. Furthermore, a distinction between live and dead bacteria at identical pH values emerged.

As for isotopic values, no substantial isotopic fractionation was observed; the values fell within the range of error bars (Fig. 3.2f).

3.3.2. Cell fractionation experiments for vegetative bacteria

3.3.2.a. P. aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) cell fractionation was conducted using two distinct calcium (Ca) concentrations, representing conditions with limited and non-limiting Ca availability. As a result, two different total Ca amounts were present in the cell fractions: 87 µg Ca in experiment n°1 and 200 µg in experiment n°2. Calcium was primarily sequestered within bacterial wall compartments, albeit in varying proportions contingent upon the initial total Ca content (Table 3.2).

In the first experiment, Ca was predominantly localized in the peptidoglycan + periplasmic space (55%) and the outer membrane (18%) (Fig. 3.3a). Lesser quantities of Ca were found within the cytoplasm (16%) and the inner membrane (11%). Conversely, the second

experiment exhibited an increased allocation of Ca within the peptidoglycan + periplasmic region (64%) (Fig. 3.3b). Within this context, the Ca content of the outer membrane constituted 17% of the overall Ca content, while the cytoplasm and inner membrane contained 10% and 9% of the total Ca, respectively. Notably, no isotopic fractionation was discernible within any of the cellular compartments.

Table 3.2 : Amount of Ca present in the different cell-compartments of *B. subtilis* and *P. aeruginosa*, and Ca apparent isotopic fractionation between the initial solution and the cell-compartments measured after sorption experiments at pH 5.6 and in two different conditions of total Ca amount for each bacterium. BAA, bacteria after sorption. The *P. aeruginosa* samples were pooled before analysis, which do not allow the determination of a 2SD value.

Sample	Average Ca (\pm 2SD)		Total Ca		$\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{BAA}}$
	μg	μg	(%)	(%)	
<i>P. aeruginosa</i>					
Exp.1					
Peptidoglycan and periplasm	15.85	47.54	55%	-0.01	
Cytoplasm	4.67	14.01	16%	0.04	
Inner membrane	3.30	9.89	11%	0.03	
Outer membrane	5.09	15.28	18%	-0.07	
Total Ca in bacteria		86.72			
Exp.2					
Peptidoglycan and periplasm	42.87	128.62	64%	-0.03	
Cytoplasm	6.49	19.47	10%	0.01	
Inner membrane	6.08	18.24	9%	0.04	
Outer membrane	11.36	34.09	17%	-0.02	
Total Ca in bacteria		200.42			
<i>B. subtilis</i>					
Exp.1					
Peptidoglycan and periplasm	13.59 \pm 1.65	40.76	85%	0.03	
Cytoplasm	0.70 \pm 0.42	2.10	4%	-	
Inner membrane	1.79 \pm 2.67	5.37	11%	-	
Total Ca in bacteria		48.23			

Exp.2					
Peptidoglycan periplasm	and	32.53 ± 5.73	97.59	93%	0.02
Cytoplasm		0.88 ± 0.51	2.63	3%	-
Inner membrane		1.56 ± 3.17	4.67	4%	-
Total Ca in bacteria			104.88		

3.3.2.b. *B. subtilis*

Owing to the smaller quantity of bacteria employed in the *B. subtilis* experiments (3 x 20 mL of bacterial suspension), the detected Ca levels within the samples were comparatively reduced compared to those observed in *P. aeruginosa* (Section 3.2.1). In the first experiment, 48 µg Ca was measured, while the second experiment recorded 105 µg of Ca.

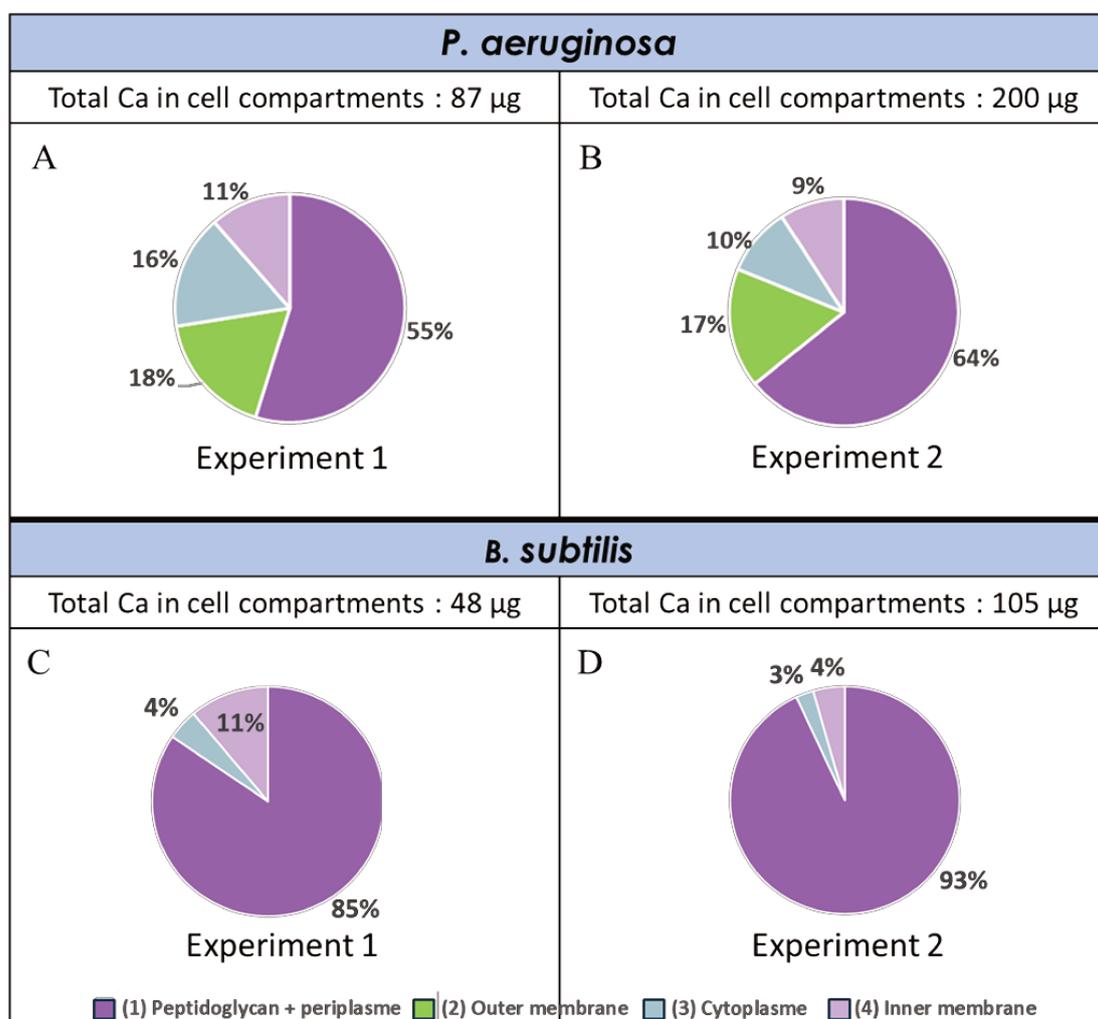


Figure 3-3: Distribution of Ca in the different cellular compartments during cell fractionation experiments (a) and (b) for *P. aeruginosa*, and (c) and (d) for *B. subtilis*.

In a manner akin to *P. aeruginosa*, calcium (Ca) was predominantly sequestered within the cell wall of *B. subtilis*, which, in this case, corresponded exclusively to peptidoglycan. In the first experiment, this encompassed 85% of the total Ca content, with the remaining portion being apportioned between the outer membrane (11%) and the cytoplasm (4%). During the second experiment, the prevalence of Ca within peptidoglycan was even more pronounced (93%), while the inner membrane (4%) and cytoplasm (3%) exhibited diminished proportions of Ca. Notably, isotopic measurements of peptidoglycan (the sole fraction amenable to measurement due to the scant Ca content in the other fractions) exhibited no discernible isotopic fractionation.

3.3.3. Experiments on sporulated bacteria

Figure 3.4a illustrates the residual Ca content present in the supernatant following exposure to *B. subtilis* spore suspensions. Notably, the spores demonstrated a diminished capacity for Ca uptake from the solution compared to their vegetative bacterial counterparts. The extracted Ca content ranged from 10% (resulting in 90% residual Ca within the supernatant at $OD_{600nm} = 0.5$) to 86.5% (leaving 13.5% residual Ca within the supernatant at $OD_{600nm} = 4.5$), diverging from the range of 79–83% observed for vegetative bacteria. Intriguingly, the quantity of Ca extracted from the solution exhibited a linear increase across the range from $OD_{600nm} = 0.5$ to $OD_{600nm} = 4.5$, progressing from 10% to 86.4% (correlation coefficient $R^2 = 0.951$, $N=6$) (Table 3.3).

Table 3.3 : Amount of residual Ca in the supernatant and Ca apparent isotopic fractionation between the initial solution and the supernatant or the spores measured after sorption experiments in various OD_{600nm} conditions. LAA liquid after sorption; BAA, bacteria after sorption; IS, initial solution.

Sample	pH	[Ca] _{IS} ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	State of bacteria	OD_{600nm}	Time (min)	Residual Ca in supernatant ($\pm 2SD$, $n = 3$) (% [Ca] _{IS} $\pm 2SD$)	$\delta^{44/40}\text{Ca}$ LAA (‰)	$\delta^{44/40}\text{Ca}$ BAA (‰)	$\Delta^{44/40}\text{Ca}$ LAA (‰)	$\Delta^{44/40}\text{Ca}$ BAA (‰)
<i>Spores</i>										
	5.6	1.6	spores	0.5	120	90 ± 3	0.76	0.08	-0.13	-0.81
	5.6	1.6	spores	1	120	81 ± 5				
	5.6	1.6	spores	1.5	120	59 ± 2	0.78	0.63	-0.11	-0.26
	5.6	1.6	spores	2.5	120	48 ± 2				
	5.6		spores	3.5	120	16 ± 5	0.75	0.45	-0.14	-0.44
	5.6		spores	4.5	120	14 ± 1	0.85	0.63	-0.04	-0.26
control sample	-	-	spores	0.5	-	-		-0.13		-1.02
control sample	-	-	spores	1.5	-	-		0.49		-0.40

Furthermore, control spore pellets, devoid of exposure to the Ca solution, were generated at OD_{600nm} values of 0.5 and 1.5. These control samples were employed to ascertain the initial presence of Ca within the spores before embarking on the sorption experiments, yielding Ca concentrations of $0.57 \mu\text{g/mL}$ within the spore suspension at $OD_{600nm} = 0.5$ and $1.58 \mu\text{g/mL}$ at $OD_{600nm} = 1.5$, respectively.

Concerning the isotopic measurements (Fig. 3.4b), it was discerned that the isotopic values of the supernatants closely resembled the initial Ca solution values within the uncertainty bounds. This observation suggests the absence of any isotopic fractionation occurring during the sorption experiments.

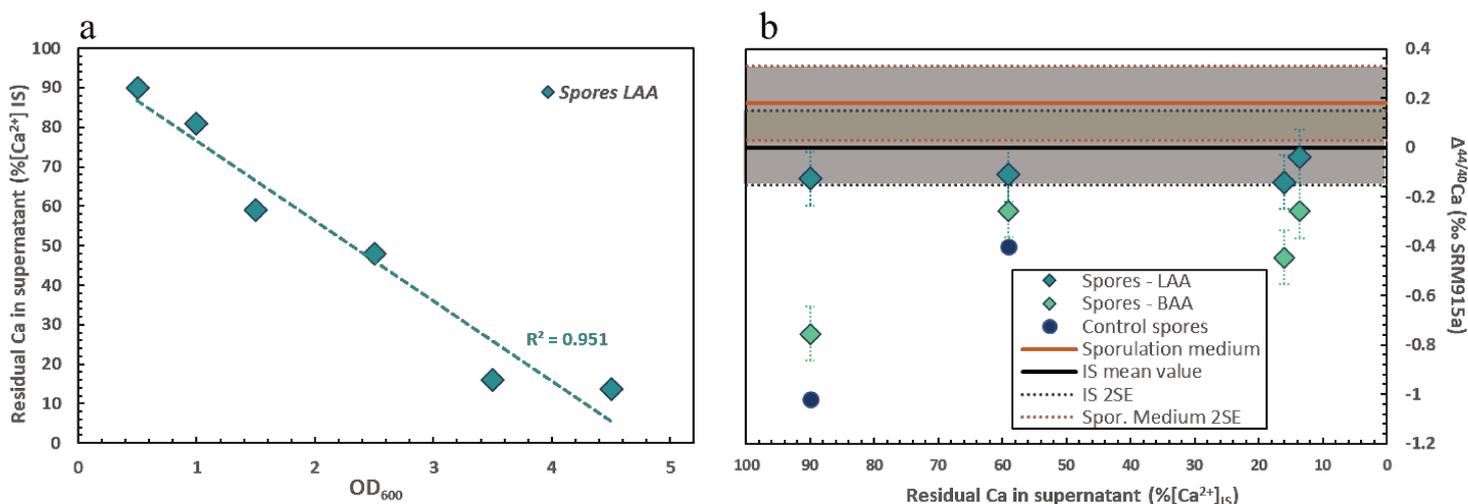


Figure 3-4: Elemental and isotopic measurements of Ca sorption experiments on *B. subtilis* spores. (a) The residual Ca in the supernatant, expressed as a percentage of the initial Ca in the solution, as a function of the OD_{600nm} of the bacterial suspension. Experiments were conducted at pH 5.6 with a 2-h interaction duration, and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IS}}$ equal to $1.6 \mu\text{g/mL}$. (b) The values of $\Delta^{44/40}\text{Ca}$ as a function of the percentage of residual calcium in the supernatant. The values of spore controls (spore pellets without Ca sorption) and the sporulation medium used for spore culture are also presented. LAA, liquid after sorption, BAA, bacteria after sorption, IS, the initial solution.

Conversely, the spore pellets exhibited an enrichment ^{40}Ca relative to the liquid medium following sorption. At $OD_{600nm} = 0.5$, the pellet manifested a 0.72‰ enrichment in ^{40}Ca instead of the initial Ca solution. In contrast, across the three additional conditions, the average extent of fractionation concerning the initial Ca solution amounted to a mere $0.29 \pm 0.12\text{‰}$ (calculated as 2 standard errors, $N=3$).

3.4. DISCUSSION

3.4.1. Absence of fractionation during the sorption of Ca onto/in vegetative bacteria

Regarding elemental sorption, various parameters, such as pH, calcium concentration, and incubation time, showed an evident influence on the quantity of adsorbed calcium. Distinct discrepancies were observed between *B. subtilis* and *P. aeruginosa*. pH appeared to exert a more pronounced influence on *B. subtilis*, displaying enhanced sorption at a pH of 5. In contrast, for *P. aeruginosa*, variations were less significant across different pH values. Similarly, the quantity of adsorbed/incorporated calcium exhibited temporal variations for both bacterial strains, albeit in distinct manners.

Initially, *B. subtilis* exhibited higher calcium uptake, which was subsequently released within 2 h. Consequently, *P. aeruginosa* displayed a slightly higher adsorbed/incorporated calcium level. Notably, the kinetics revealed a marginal increase in adsorbed/incorporated calcium for both bacterial strains after 4 h. Nevertheless, caution is advised when extrapolating this trend to ascertain a longer-term equilibrium due to the limitations in conducting extended sorption experiments with these bacteria.

In contrast, the process of sorption did not exhibit any discernible isotopic fractionation, regardless of the prevailing conditions for either *P. aeruginosa* or *B. subtilis*. Limited knowledge of elemental fractionation associated with the sorption onto/in bacteria is available. Nonetheless, investigations related to the sorption or incorporation of metal ions, such as Zn, Cu, Mo, Fe, or Cr, have been carried out (Wasylenki et al., 2007; Navarette et al., 2011; Kafantaris and Borrock, 2014; Mullholand et al., 2015; Zhang et al., 2018), revealing noticeable isotopic fractionations. These diverse studies have demonstrated that isotopic fractionation of an element in contact with bacteria can be attributed to their complexation with functional groups on the bacteria's surface or active mechanisms that necessitate energy.

Through experiments conducted on both live and deceased bacteria, specifically *Pseudomonas fluorescens* LB 300 and *Shewanella oneidensis* MR 1, to assess the impact of metabolic activity, Zhang et al. (2018) deduced that the reduction of Cr(VI) to Cr(III) primarily results from metabolic activity. In contrast, investigations involving *Azotobacter vinelandii* (Wasylenki et al., 2007) suggested that while Mo undergoes kinetic fractionation during assimilation, complexation with ligands might also partially induce this fractionation.

Moreover, concerning Fe, which does not exhibit a kinetic effect, indications point toward fractionation occurring through complexation processes (Wasylenki et al., 2007).

Given the range of methodologies and variables utilized across these diverse studies and the discrepancies in outcomes for various elements, establishing direct parallels with our findings seems challenging. However, in contrast to the studies above, the absence of isotopic fractionation in our research implies the sorption of ^{40}Ca and ^{44}Ca in equivalent proportions.

The disparity in the impact of various parameters on the interaction between bacteria and calcium can be elucidated by the distinct nature of the cell walls in *B. subtilis* and *P. aeruginosa*.

3.4.2. Distribution of calcium in bacteria and highlighting the proportions of adsorbed and incorporated Ca

To elucidate the absence of isotopic fractionation in our experimental findings, it becomes imperative to precisely ascertain the fate of calcium during our experiments. This entails determining the precise ratios at which calcium becomes adsorbed and/or incorporated by the bacteria while identifying the potential mechanisms at play. Existing knowledge establishes that calcium is pivotal in various bacterial processes, including maintaining cell structure, cell division, and sporulation (Smith, 1995). Furthermore, it has been demonstrated that bacteria exercise precise control over their calcium content, typically within the range of 100–300 nM (Gangola and Rosen, 1987; Knight et al., 1991; Futsaether and Johnsson, 1994; Herbaud et al., 1998; Jones et al., 1999; Torrecilla et al., 2000).

Bacteria also employ various regulatory mechanisms, encompassing primary and secondary transporters and calcium-binding proteins, to maintain calcium homeostasis (Norris et al., 1996; Paulsen et al., 2000; Waditee et al., 2004). These intricate systems further underline the need to unravel the precise interactions and dynamics governing calcium within the context of our experiments.

To explore the impact of metabolic activity on calcium uptake by bacteria, experiments were undertaken to assess the influence of bacterial physiological state – whether the cells were viable or deceased – on the quantity of calcium extracted from the solution (Table 3.1). In the context of *P. aeruginosa*, disparities in sorption between live and deceased bacteria could suggest that viable cells integrate a noteworthy portion of calcium (approximately 8–9% of the

calcium extracted from the solution). Conversely, when examining *B. subtilis*, the observation that deceased bacteria exhibit the highest levels of sorption at pH 7 appears to challenge this hypothesis. Consequently, it is plausible that the observed distinctions are partly attributed to the bacterial incorporation of calcium. However, these variations might also be partially attributed to chemical factors arising from alterations in the bacterial surface, leading to modified interactions with calcium.

As such, it is essential to recognize that conducting experiments solely comparing live and deceased bacteria falls short of comprehensively estimating the fraction of calcium potentially incorporated via bacterial metabolic activity.

An alternative approach to address this inquiry involves employing CCCP to hinder the proton-motive force and impede calcium incorporation at the membrane level. Nevertheless, in the context of our experiments, the utilization of CCCP yielded an unexpected outcome – an augmentation in the quantity of calcium extracted from the solution (a rise of +6% for *P. aeruginosa* and +4% for *B. subtilis*, Table 3.1). Once more, these findings run counter to intuition, rendering them intricate to decipher. Contrary to our observations, a decrease in incorporation could have potentially signalled a reduction in the overall amount of calcium extracted from the solution by the bacteria.

After these findings, the cellular fractionation experiments ultimately answered this inquiry. Our investigations revealed that calcium primarily accumulates within wall compartments and that its intracellular integration – spanning the cytoplasm and internal membranes – constitutes a minority fraction. Remarkably, the Gram-negative bacteria's surface adsorbs less than 20% of calcium, chiefly on the outer membrane. This outer membrane possesses carboxyl groups recognized for inducing plant calcium isotopic fractionation (Cobert et al., 2011b; Schmitt et al., 2013). Notably, most calcium transverses the outer membrane, adhering to the peptidoglycan layer. For *B. subtilis*, the preponderance of calcium is adsorbed onto the peptidoglycan matrix.

Our exploration shows that no detectable isotopic fractionation exists, irrespective of the cellular compartment under consideration (Table 3.2), even within the outer membrane housing carboxyl groups – a context in which fractionation might have been anticipated. One plausible rationale for this outcome could be attributed to the modest quantities and proportions of adsorbed calcium (18% of total calcium in Experiment 1, equivalent to 15.6 μg of calcium,

and 17% of total calcium in Experiment 2, amounting to 34.1 μg of calcium). These quantities might be deemed insufficient to engender conspicuous isotopic fractionation.

Indeed, the solution's calcium concentration in our experiments remains low, and calcium distribution among diverse bacterial compartments transpires without unequivocal adsorption to a specific surface. Consequently, the likelihood of isotopic fractionation manifesting is restrained. Yet, amplifying the concentration of the calcium solution would prove futile, as it would eliminate calcium as a limiting factor, thereby precluding the possibility of observing isotopic fractionation. To attain the maximum manifestation of isotopic fractionation within the solution, a threshold exceeding 90% adsorbed calcium becomes imperative.

This circumstance might instead suggest that calcium experiences passive integration within bacterial cells, void of any marked fractionation – a notion akin to the supposition surrounding calcium entry into roots (Cobert et al., 2011).

conditions of total Ca amount for each bacterium. BAA, bacteria after sorption.

3.4.3. Isotopic fractionation during sporulation

Contrary to vegetative bacteria, the spore samples contain Ca and are enriched in ^{40}Ca compared to the sporulation medium ($\Delta^{44/40}\text{Ca}$ sporulation medium = 0.18‰) in which they were cultured (Table 3.3). It is also observed that the intensity of fractionation in the spores is higher at $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.5$ ($\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{spores-Ca initial solution}} = -1.02\text{‰}$) compared to $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1.5$ ($\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{spores-Ca initial solution}} = -0.40\text{‰}$) (Table 3.1), with a total fractionation amplitude of 1.15‰ and 0.53‰, respectively.

This difference in fractionation was not expected since the adjustment of $\text{OD}_{600\text{nm}}$ involves dilution, which is not supposed to impact isotopic proportions. It is possible that the spores, which have been stored in several centrifuge tubes, exhibit heterogeneity in the isotopic proportions of Ca they contain. This heterogeneity could be because not all bacteria sporulate simultaneously but gradually, implying that the isotopic proportions of Ca in the sporulation medium can vary over time and that the isotopic composition of the spores can also vary depending on when the cells sporulate.

Based on these observations, it is conceivable that isotopic fractionation occurs during the sporulation process. Calcium, as known, forms a 1:1 chelation with dipicolinic acid (DPA) (Setlow, 2006). This acid is synthesized within the mother cell and subsequently diffused in

substantial quantities into the spore core during the final stages of sporulation, coinciding with the dehydration of the spore core (DPA constitutes 5 to 15% of the spore's dry weight) (Setlow, 2005).

Huang et al. (2007) have approximated that the concentrations of Ca-DPA in *Bacillus* species' spores exceed 800 mM, a level significantly surpassing the solubility of Ca-DPA. Notably, this acid contains carboxyl groups recognized for their ability to induce calcium fractionation (Cobert et al., 2011b; Schmitt et al., 2013). Additionally, it is plausible that fractionation occurs during Ca-DPA complex diffusion from the mother cell, its point of origin, to the spore core. Furthermore, Huang et al. (2007) have demonstrated substantial divergence in Ca-DPA levels among individual spores within a population. However, a significant portion of this variation might arise from discrepancies in individual spore sizes. Although this phenomenon likely exerts a limited impact on a substantial majority of spores, it could serve as a conceivable explanation for the divergent intensities of fractionation among the previously discussed spores.

In addition to the initial calcium isotope fractionation during sporulation, we have also observed a subsequent phenomenon wherein the spore pellets experience an enrichment in the isotope ^{44}Ca upon sorption of calcium from the solution, compared to their initial values. Interestingly, in parallel, the supernatants following the sorption process do not exhibit any fractionation (measuring $0.79 \pm 0.09\%$, 2SD, N=4) despite 86% of the calcium being adsorbed.

It can be conjectured that the isotopic values found in the spores after the sorption process arise from a combination of calcium originating from both the spores themselves and the initial solution. However, it appears that the sorption process in and of itself does not trigger significant fractionation.

Utilizing a straightforward mixing equation, the proportion of calcium originating from the calcium solution, denoted as $X(\text{Ca})$, within a mixture (M) derived from two distinct sources—A and B—can be established in the following manner (for instance, as demonstrated in Capo et al. (1998) and Drouet et al. (2005a)):

$$X(\text{Ca})_A = \frac{(\delta^{44/40}\text{Ca})_M - (\delta^{44/40}\text{Ca})_B}{(\delta^{44/40}\text{Ca})_A - (\delta^{44/40}\text{Ca})_B} \quad (4)$$

We exclusively conducted spore control measurements at $\text{OD}_{600\text{nm}}$ values of 0.5 and 1.5. Nevertheless, the isotopic profiles of bacteria post-sorption exhibit similarities within the range of analytical errors for $\text{OD}_{600\text{nm}}$ values of 1.5, 3.5, and 4.5 ($-0.27 \pm 0.22\%$, 2SD, N=3). Thus,

we posit the hypothesis that spore control values remain consistent across OD_{600nm} values of 1.5, 3.5, and 4.5.

The outcome of the mixture calculation reveals that the control primarily influences the isotopic composition of calcium. In this context, a mere 21% and 23% of the composition can be attributed to the initial calcium solution for OD_{600nm} values of 0.5 and OD_{600nm} values of 1.5, 3.5, and 4.5, respectively.

Spores consist of multiple layers providing considerable resistance against environmental stresses, functioning like insulating shields (Figure 3.5). Despite this robust structure, the spore envelope maintains a degree of permeability to facilitate the passage of certain molecules, including germinants, which traverse the various layers before reaching the inner membrane housing receptors (Driks, 1999). Notably, molecules of modest dimensions, like ethanol, NaOH, or HCl, can traverse the spore envelope (Setlow et al., 2002).

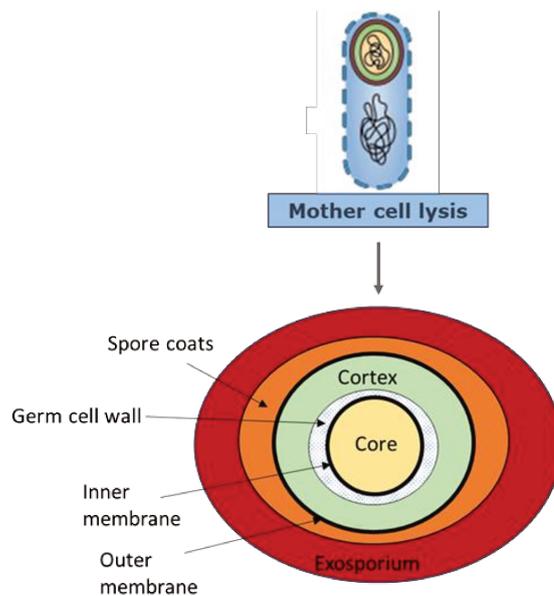


Figure 3-5 : Mother cell lysis following the sporulation process and representation of the different layers of a spore (Adapted from McKenney et al., 2013).

Furthermore, the cortex, one of the deepest layers separated from the core by the inner membrane, displays a honeycomb-like structure characterized by pore sizes spanning 5 to 100 nm (Plomp et al., 2007). The calcium extracted from the solution holds the potential to adsorb at varying depths within the spore, extending beyond the surface of the cortex. It's worth noting that the core of the spore is designed to maintain its dehydrated state, fortified by the

impermeability conferred by the inner membrane, until the point of spore germination (Setlow, 2003; Setlow et al., 2009). Given the spore's inherent nature, designed to isolate itself from the surrounding environment, no indication suggests that calcium from the solution might partially infiltrate the spore core.

We cannot ascertain whether the sorption takes place solely on the surface or if it involves diffusion through the outer envelope to reach deeper layers. Nevertheless, similar to vegetative bacteria, neither the sorption nor the absorption processes give rise to discernible isotopic fractionation.

3.4.4. Implication for the environment

The adsorption of calcium (Ca) from a solution onto various ubiquitous soil mineral fractions, such as phyllosilicates like kaolinite, montmorillonite, muscovite, or phylломanganate like δ -MnO₂, has been extensively studied. These studies have demonstrated an enrichment of the solution in ⁴⁴Ca, with an increase of up to +1.19‰ observed for δ -MnO₂ (as indicated in Table 3.4) (Brazier et al., 2019; Schmitt et al., 2023).

During our investigation, we observed that the sorption of Ca onto vegetative cells or spores did not result in isotopic fractionation of calcium. Nevertheless, the sporulation process in Gram-positive bacteria appears to lead to an enrichment of spores in ⁴⁰Ca, and there is potential for enrichment in ⁴⁴Ca within the spore environment.

Table 3.4 : Characteristics of vegetative and sporulated bacteria, and maximum amount of adsorbed Ca and associated ^{44/40}Ca isotopic fractionation of the supernatant measured in this study. Comparison of the data with those previously obtained in Brazier et al. (2019) for clay minerals and Schmitt et al. (2023) for δ -MnO₂.

Soil component	Grain or bacterium size (μ m)	pH	Ca _{ads_max} (mmol/g)	$\Delta^{44/40}$ Ca (‰)	Reference
δ -MnO ₂	0.1-1	4	1.06	1.15	Schmitt et al. (2023)
"	"	7	1.16	1.19	"
Kaolinite (KGa-2)	0.1-1	4	4.26	0.00	Brazier et al. (2019)
"	"	7	9.66	"	"
Montmorillonite (Swy-2)	0.1-1	4	292.9	0.10	"
"	"	7	293.7	"	"
Tuftane muscovite	0.1-1	4	57.95	0.22	"
"	"	7	63.79	0.27	"
"	50-200	7	0.209	0	"
Vegetative bacteria	2-4	5 to 7	<0.1	0	This study
Sporulated bacteria	1	5.6	<0.1	0	This study

The lack of discernible fractionation during the sorption of calcium onto bacteria does not necessarily imply the absence of any fractionation effects; rather, it may suggest that any such fractionation is too minute to be detected. This could be attributed to the relatively low calcium flux observed during these experiments, especially compared to the amount of calcium absorbed by diverse soil minerals. For instance, the adsorption and incorporation processes result in orders ranging from $\mu\text{mol/g}$ for bacteria to mmol/g for minerals.

Hence, recognizing the significance of bacterial biomass in soils becomes imperative. Our understanding of the microbial composition within soils remains limited. For instance, Grigorova-Peshva et al. (2022) conducted a study on forest soils within Vitosha Natural Park, revealing variations in microorganisms (including bacteria and fungi) ranging between 10^5 and 10^6 CFU/g of soil mass. Notably, microorganisms' quantity, activity, and diversity are contingent on numerous factors such as organic matter content, nitrogen levels, soil acidity and soil moisture (Fierer & Jackson, 2006, Lauber et al., 2009, Romanowicz et al., 2016).

Furthermore, investigations into the distribution balance between fungi and bacteria within soil ecosystems suggest a prevalent dominance of fungi over bacteria in most scenarios (ranging between 35% and 76% across diverse soil groups) (Joergensen & Wichern, 2008). Additionally, evidence suggests that the proportion of fungi tends to be higher in upper soil horizons, gradually declining with depth in favour of bacterial biomass (Ananyeva et al., 2006). Drawing on these insights and an approximate assessment of bacterial cell mass, it is conceivable to estimate a potential bacterial quantity of a few grams per ton of soil. Consequently, bacteria's total extent of calcium sorption will likely remain substantially lower than the amount adsorbed onto secondary minerals or organic matter. As a result, the likelihood of significant calcium fractionation attributed to sorption onto bacteria within the soil context appears to be remote.

The fractionation brought about by the sporulation process, despite the limited calcium quantities involved, implies that soil bacteria's sporulation/germination cycle could contribute to the isotopic signature of soil solutions. Notably, a study conducted by Siala et al. (1974) demonstrated that in coniferous forest soil, *Bacillus subtilis* predominantly existed in vegetative form within acidic horizons, while the sporulated form prevailed in alkaline horizons. The occurrence of bacteria in either vegetative or sporulated states is governed by the prevailing environmental conditions, with multiple factors potentially influencing this phenomenon.

Accurately quantifying the proportion of bacteria existing in sporulated forms in situ might provide insight into the role of spores in shaping the isotopic composition of calcium in soil solutions. Nonetheless, limited data are presently available, and further exploration is essential to assess the potential of these avenues. It's worth noting that the mechanisms underlying sporulation can differ among various bacterial species. Despite these initial findings, the intricate nature of these mechanisms and the scarcity of data hinder a direct extrapolation of results to natural environments.

Importantly, this study concentrates on two extensively researched bacteria within laboratory settings. However, the natural environment encompasses a vast majority – over 99-99.9% – of viable yet non-cultivable bacteria. Consequently, whether the outcomes observed for these bacteria can be extended to other soil-dwelling bacterial species remains to be determined. Additionally, delving into the role of bacterial biofilms, which represent the predominant bacterial form in natural surroundings (Flemming & Wuertz, 2019), as well as fungi, which generally dominate the microorganism landscape within soils (Joergensen & Wichern, 2008), becomes a necessary avenue for exploration.

3.5. CONCLUSION

This study aimed to elucidate the direct impact of bacteria on the calcium (Ca) biogeochemical cycle within soils. The findings underscore that calcium is predominantly sequestered within bacterial cell walls when a Ca solution interacts with bacteria. Specifically, peptidoglycan within *Bacillus subtilis* and the outer membrane in *Pseudomonas aeruginosa* are the main storage sites for calcium. Importantly, this interaction does not induce quantifiable isotopic fractionation in calcium. This observation suggests calcium primarily enters bacteria via passive channels, allowing ^{40}Ca and ^{44}Ca isotopes to permeate.

Given the relatively minor abundance of bacteria compared to the prevalence of minerals and organic matter within soils, the process of calcium adsorption and passive incorporation onto vegetative or sporulated bacteria is unlikely to significantly influence the isotopic composition of soil solutions. However, the sporulation process stands out by inducing a marked enrichment of ^{40}Ca within spores. This enrichment, ranging from 0.53 to 1.15 ‰, is likely attributed to calcium chelation with dipicolinic acid. Consequently, the contribution of soil bacteria to the calcium biogeochemical cycle is not merely indirect; their impact on the

calcium isotopic signature within soil solutions extends beyond their role in mineral bioweathering and the availability of calcium for vegetation.

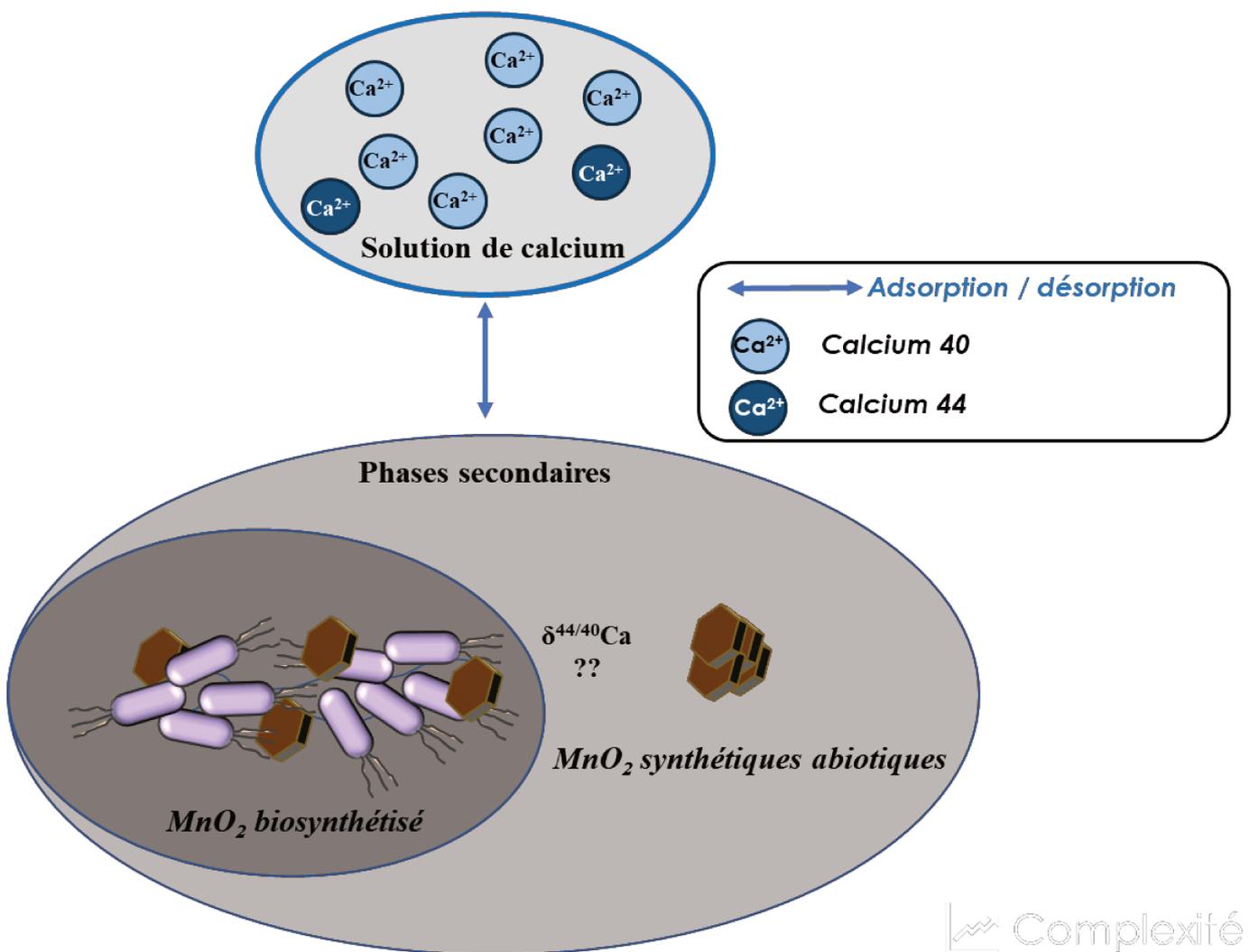
Moreover, parameter variations influencing the sporulation/germination cycle can potentially lead to isotopic fluctuations in calcium within soil solutions. Subsequent investigations in macrocosms, incorporating manipulations of the germination/sporulation cycle, could validate the applicability of our findings to natural environments. It is important to note that this study exclusively focused on planktonic bacteria. Thus, delving into bacterial biofilms, known for their capacity to sequester metals, presents an intriguing avenue to further unveil the role of soil bacteria within the calcium biogeochemical cycle. Furthermore, since fungi constitute the second major group of soil microorganisms, it is imperative to undertake studies to determine their involvement in this complex cycle.

Statements and declarations

This project was financially supported by funding from the French CNRS-INSU programme 'EC2CO-BIOHEFECT'.

The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

Chapitre 4 : Caractérisation élémentaire et isotopique de l'adsorption et de la désorption du Ca sur des oxydes de manganèses abiotiques et bactériogénique.



4.1. Introduction

Dans des contextes où la santé des écosystèmes forestiers peut être compromise, il est utile de mieux comprendre la dynamique des nutriments dans les sols forestiers afin d'en améliorer la gestion à long terme. Le calcium (Ca) est un nutriment vital qui joue un rôle physiologique et structurel essentiel dans le métabolisme des plantes (Marschner, 1999), avec des proportions notables (0,5 % de la biomasse sèche) (Taiz et Zeiger, 2010). C'est également le cation prédominant sous forme hydratée dans les sols. En raison de sa charge divalente, de sa faible abondance et de son faible degré d'hydratation, il s'adsorbe fortement sur les minéraux argileux et les acides humiques par rapport à d'autres cations métalliques (Likens et al., 1998). En outre, à l'échelle mondiale, le Ca est un cation résultant de l'altération continentale et joue un rôle dans le cycle du carbone (Berner et al., 1983, Thorley et al., 2015). Au cours de la dernière décennie, plusieurs études ont démontré l'implication du Ca dans divers processus biogéochimiques au sein de la zone critique (par exemple, l'absorption par les racines et la translocation dans les arbres, le recyclage de la végétation, l'adsorption, la dissolution et la précipitation de minéraux secondaires, l'activité microbienne) ainsi que le potentiel de ses isotopes stables dans l'identification et la quantification de ces processus (Cenki-Tok et al., 2009, Cobert et al., 2011, Schmitt et al., 2012, Bagard et al., 2013, Gangloff et al., 2014, Schmitt, 2016, Schmitt et al., 2017, 2018, Brazier et al., 2019, Schmitt et al., 2019). En outre, les isotopes du Ca ont montré leur potentiel pour tracer le Ca tout au long du cycle de vie de la végétation, depuis l'absorption par les racines jusqu'à son recyclage par la dégradation de la matière organique. Les plantes jouent en effet un rôle important dans le cycle biogéochimique du Ca (Berner et Berner 1996, Poszwa et al. 2000, Schmitt et al. 2003, Schmitt et Stille 2005, Wiegand et al. 2005, Perakis et al. 2006, Page et al. 2008, Cenki-Tok et al. 2009, Holmden et Bélanger 2010, Farkaš et al. 2011, Hindshaw et al. 2011, 2012, Bagard et al. 2013, Schmitt, 2016). D'autres études ont mis en évidence l'influence potentielle d'autres réservoirs de Ca (par exemple, les minéraux argileux, les oxy-hydroxydes, la matière organique) sur la signature isotopique du Ca (Fantle et Tipper, 2014, Tipper et al., 2016, Brazier et al., 2019, Schmitt et al., 2023). Ces études suggèrent que les composants du sol pourraient jouer un rôle important dans le cycle biogéochimique du Ca, en particulier en contrôlant sa disponibilité pour la végétation. Cela souligne l'importance de caractériser l'adsorption du Ca sur ces éléments d'un point de vue élémentaire et isotopique, afin d'approfondir notre compréhension des mécanismes d'interaction liés à la disponibilité du Ca pour la végétation dans les sols. Une étude de Brazier et al. (2019) a spécifiquement démontré que l'isotope léger du Ca (^{40}Ca) est préférentiellement adsorbé et désorbé sur des

phyllosilicates communs du sol (kaolinite KGa-2, montmorillonite Swy2, muscovite triée par taille) et que l'étendue du fractionnement dépendait de divers paramètres, notamment (1) la fraction granulométrique, influençant la surface spécifique externe, (2) la charge de surface (induite notamment par la charge structurale due aux défauts dans les structures cristallines choisies), et (3) la présence ou l'absence d'un espace interfoliaire ouvert aux cations. Cette étude a spécifiquement mis en évidence que le fractionnement isotopique mesuré était plus important dans le cas de la plus petite fraction granulométrique (0,1 - 1 μm) de la muscovite (+0,25 ‰, fractionnement apparent), suggérant que la charge structurale était, au moins à l'ordre zéro, la principale force motrice derrière le fractionnement isotopique pour une fraction granulométrique donnée d'un minéral argileux. Ces résultats confortent ceux d'Ockert et al. (2013), qui avaient déjà mis en évidence une adsorption préférentielle du ^{40}Ca sur les minéraux argileux, mais dans un environnement marin. Outre les minéraux argileux, les oxyhydroxydes, en particulier les oxydes de manganèse, sont omniprésents dans les sols. Ces minéraux sont très réactifs et jouent un rôle important dans les interactions solide-solution, notamment dans le cycle biogéochimique des espèces cationiques (Baize, 1997). Parmi les oxydes de manganèse couramment trouvés dans les sols, on trouve la vernadite ($\text{Na}_{0,24}(\text{H}_2\text{O})_{0,72}[\text{Mn}^{4+}_{0,94}\square_{0,06}]\text{O}_2$, Villalobos et al., 2006), qui est un oxyde de phyllomanganate turbostratique désordonné nanocristallin. Ce minéral peut être trouvé sous forme de nodules et de revêtements dans les minéraux des sols, des sédiments et des roches (par exemple, Burns et Burns, 1977, Dorn et al., 1992, Palumbo et al., 2001). Une autre étude de Schmitt et al. (2023) a démontré un fractionnement isotopique encore plus prononcé (+1,22 ‰) lors de l'adsorption de Ca sur la vernadite synthétique (ou $\delta\text{-MnO}_2$) par rapport aux travaux de Brazier et al. (2019) sur les argiles. Ceci pourrait être attribué à la présence d'un espace interfoliaire ouvert capable de recevoir des cations aqueux, dont le Ca, ainsi qu'à la forte charge structurale de ce minéral. En effet, en raison de l'existence de lacunes ou de substitutions dans la structure du $\delta\text{-MnO}_2$, les cations hydratés tels que Ca^{2+} peuvent se frayer un chemin entre les couches du minéral, compensant ainsi le déficit de charge de la couche, ou ils peuvent s'adsorber sur les sites de bordure lorsqu'ils sont chargés négativement (e.g., Lanson et al., 2000, 2002, Grangeon et al., 2012, Manceau et al., 2013, Peña et al., 2015, Simanova et al., 2015, Grangeon et al., 2017). La structure du $\delta\text{-MnO}_2$ varie en fonction des conditions physico-chimiques de sa synthèse (Grangeon et al., 2017, Marafatto et al., 2018). De plus, le $\delta\text{-MnO}_2$ est l'homologue synthétique de la vernadite, qui est naturellement précipitée par oxydation du manganèse par certains microorganismes et possède une structure fortement désordonnée, favorisant la présence de lacunes et affectant significativement la charge structurale du minéral.

L'objectif principal de cette étude est donc d'examiner l'influence des différences structurales entre divers oxydes de manganèse abiotiques sur l'adsorption et la désorption du Ca, et le fractionnement isotopique correspondant du Ca, et de comparer ces résultats entre eux et avec ceux d'une vernadite biogène. Pour ce faire, six oxydes de manganèse, dont une variété bactériogénique, ont été préparés à l'aide de divers protocoles afin d'obtenir des minéraux présentant divers degrés de cristallinité ainsi qu'une variabilité de leurs caractéristiques (par exemple, CEC, surface spécifique, charge de surface). L'adsorption et la désorption du Ca ont été caractérisées en explorant l'impact de plusieurs paramètres (temps, pH de la solution, concentration de Ca) sur l'ampleur du fractionnement isotopique. Cela a contribué à améliorer notre compréhension des mécanismes sous-jacents au stockage et à la libération du Ca dans les sols, et à fournir une vision plus claire du comportement de certains de ses isotopes naturels (c.-à-d. ^{40}Ca et ^{44}Ca).

4.2. Matériel et méthodes

4.2.1. Préparation des oxydes de manganèse

Au cours de ces travaux, six oxydes de manganèse ont été préparés : (i) Deux δ - MnO_2 d'après Marafatto et al. (2018), (ii) une birnessite « acide » d'après Villalobos et al. (2003), (iii) une birnessite d'après Giovaloni et al. (1970) stabilisée à pH 10 et une birnessite stabilisée à pH 4 obtenue à partir de la birnessite stabilisée à pH 10 de Giovaloni et al. (1970), et enfin (iv) un oxyde de manganèse bactériogénique obtenu à partir d'une culture de *Pseudomonas putida* GB1, d'après Tebo et al. (2007). Ces informations sont résumées dans le Tableau 4.1.

Tableau 4.1 : liste des échantillons synthétisés durant cette étude avec les différents composés nécessaires à cette synthèse ainsi que les références bibliographiques associées.

Echantillon	Préparation	Taille des grains (μm)	Référence
δ - MnO_2 (a)	1/ KMnO_4 0.3M + NaOH 0.6M 2/ MnCl_2 0.2M	0.1-1	Marafatto et al. (2018)
δ - MnO_2 (b)	1/ KMnO_4 0.3M + NaOH 0.4M 2/ MnCl_2 0.2M	0.1-1	"
Acid birnessite (1)	1/ KMnO_4 0.4M 2/ HCl concentré	0.1-1	Villalobos et al. (2003)
Birnessite (2) pH10	MnCl_4 0.5M + NaOH 5.5M	~ 2	Giovanoli et al. (1970)

Birnessite (3) pH4	Birnessite (2) + HNO ₃ 0.1M	~ 2	"
Bacteriogenic MnO ₂	Bacterial culture of <i>Pseudomonas putida</i> GB1 (Leptothrix culture medium including MnCl ₂ , 4H ₂ O 0.2M)	>1	Tebo et al. (2007)

4.2.1.a. Synthèse des minéraux de δ -MnO₂

Deux δ -MnO₂ ont été synthétisés d'après le protocole de Marafatto et al. (2018), en faisant varier la quantité de NaOH ajoutée. Le protocole de synthèse suivant a ainsi été mis en œuvre :

Pour préparer un total de 5L de liquide pour la synthèse de δ -MnO₂ : 1,6L de solution de KMnO₄ à 0.3 mol.L⁻¹ ont été placés dans un bécher de 5L, auxquels ont été ajoutés 1,81L de NaOH (à 0,6 M pour δ -MnO_{2a} et 0,6 M pour δ -MnO_{2b}) avec un débit de 256 ml.min⁻¹ avant d'y ajouter 1,6L d'une solution de MnCl₂ à 0,2 M avec un débit de 72 mL.min⁻¹. Le mélange a été agité à l'aide d'un agitateur magnétique tout au long de l'ajout des solutions. Le mélange a ensuite été décanté pendant 1h de manière à laisser le solide sédimenter afin d'éliminer un maximum de liquide surnageant. Ensuite les suspensions de solide ont été transvasées dans des tubes à centrifuger de 50 mL afin de poursuivre avec les étapes de lavage, tri granulométrique et de saturation en Na.

4.2.1.b. Synthèse de la birnessite acide

La birnessite acide a été synthétisée en suivant le protocole de Villalobos et al. (2003). Ainsi, 2,5L d'une solution de KMnO₄ à 0.4 M ont été portés à ébullition avant d'y ajouter 165 mL de HCl concentré au goutte à goutte avec une agitation constante à l'agitateur magnétique. Le tout a été laissé à ébullition jusqu'à ce que la solution ait totalement virée au noir

4.2.1.c. Synthèse des birnessites stabilisées à pH 4 et 10

La birnessite à pH10a été préparée à partir de 200 mL d'une solution de MnCl₂ 4H₂O à 0.5 M et de 250 mL d'une solution de NaOH à 5.5 M toutes deux préparées à partir d'eau ultrapure portée à ébullition pendant environ 1h et dégazée à l'aide d'une bouteille d'argon 5.0 (1^{ère} qualité 99.998% de marque MESSER)(Giovaloni et al., 1970). Le mélange des deux solutions a lui-même été dégazé à l'aide de l'argon jusqu'à ce que le solide soit totalement noir. Celui-ci a ensuite été placé à l'étuve à 60°C quelques jours, avant de subir une succession de lavages à

l'eau ultrapure. Dans un premier temps, les lavages s'effectuent rapidement, avec centrifugations (20 minutes à 4700 tr.min⁻¹) sans agitation préalable. Ensuite, il s'est avéré nécessaire d'agiter le solide au tourniquet pendant au moins 20 minutes avant chaque nouvelle centrifugation et d'augmenter la durée des centrifugations afin que l'ensemble du solide se retrouve dans le culot (1h à 4700 tr.min⁻¹). Le solide ainsi synthétisé et lavé présentait un pH proche de 10. Une partie de ce solide a été stabilisé à pH = 4 afin d'en modifier les caractéristiques minéralogiques. Pour ce faire, le solide en suspension dans de l'eau ultra pure a été placé dans un réacteur hermétique comportant :

- Une entrée pour une arrivée d'oxygène 5.5 (pureté supérieure à 99,9995% de marque MESSER), afin de faire buller la suspension.
- Une sortie d'air à laquelle était reliée un tuyau dont l'extrémité était plongée dans l'eau afin d'éviter tout échange avec l'atmosphère.
- Une entrée pour la sonde pH.
- Une entrée pour la sonde de température.
- Une entrée pour l'arrivée d'HNO₃ 0.1 M.

La suspension a été placée sous agitation constante à l'aide d'un barreau aimanté. L'ajout d'acide a été réalisé de manière itérative de façon à tendre dans un premiers temps vers pH 4, et finalement de stabiliser le pH à cette valeur. Les volumes d'HNO₃ ajoutés et la durée entre chaque ajout ont ainsi été ajustées en fonction des besoins tout au long de l'ajustement du pH.

4.2.1.d. Préparation de l'oxyde de manganèse bactériogénique

Afin d'obtenir le MnO₂ bactériogénique, des cultures de *P. putida* GB1 ont été réalisées au laboratoire du BSC à Illkirch. Pour ce faire, des tubes contenant 10 mL de milieu LB (milieu de culture standard riche en nutriment) ont été inoculés et incubés à 30°C et à 220 tr.min⁻¹ en condition aérobie et pendant 18 à 24h. Les tubes ont ensuite été centrifugés et les culots bactériens ont subi deux cycles de rinçages à l'aide du milieu Leptotrix (milieu utilisé pour la suite des cultures, voir ANNEXE C pour la fiche de préparation du milieu). Ainsi, après ajout de 7 ml de milieu Leptotrix, les tubes ont été vortexés puis centrifugés (8500 tr.min⁻¹, 5 min), les surnageants ont été jetés, puis ces étapes ont été répétées une fois. Après les deux cycles de rinçages, les culots bactériens ont été resuspendus dans 8 mL de milieu Leptotrix. Après homogénéisation au vortex, les suspensions bactériennes sont réparties dans du milieu Leptotrix dans divers contenants avec un ratio de 20 mL de suspension bactérienne par litre. Les cultures

ont ensuite été incubées à 30°C, 220 tr.min⁻¹ en conditions aérobies pendant environ une semaine. Dans la plupart des cas, l'oxyde de manganèse commençait à devenir visible dans la suspension après 24-48h de culture, mais les résultats de ces cultures se sont avérés inconstants. En effet, l'apparition de MnO₂ n'était pas systématique dans tous les contenants et ne se faisait pas forcément à la même vitesse. Après culture et précipitation du MnO₂, les suspensions ont été centrifugées de manière à séparer au maximum le MnO₂ des bactéries et la majorité des bactéries a été retirée à la spatule. Des lavages à l'eau et à la javel (NaOCl) à 0.18% ont ensuite été effectués pour éliminer et oxyder la matière organique résiduelle. Environ cinq lavages à l'eau et à la javel ont été réalisés, par agitation sur un agitateur rotatif SB3 StuartTM à 40 tr.min⁻¹ pendant des durées d'au moins 1h et allant jusqu'à 24h pour être certain d'éliminer tous les résidus organiques.

4.2.1.e. Tri granulométrique et saturation en Na des solides

Après synthèse, les solides ont été rincés par agitation sur un agitateur rotatif SB3 StuartTM à 40 tr.min⁻¹ pendant 1 heure sur un tourniquet dans des tubes à centrifuger de 50 mL avec 45 mL d'eau ultrapure. Ils ont ensuite été centrifugés à 4700 tr.min⁻¹ pendant une heure dans une centrifugeuse ThermoScientific Heraus Megafuge 40RTM et les surnageants ont ensuite été jetés.

Suite au rinçage, un tri granulométrique a été réalisé **uniquement pour les deux δ-MnO₂ et la birnessite acide** en appliquant la loi de Stokes afin de conserver uniquement la fraction granulométrique comprise entre 0,1 et 1 μm de diamètre (voir **Reinholdt et al. 2013**). Pour ce faire, de nombreux cycles de centrifugation ont été réalisés dans une centrifugeuse ThermoScientific Heraus Megafuge 40RTM. Dans un premier temps : **(i)** des cycles de centrifugation à 2000 tr.min⁻¹ pendant 3 minutes afin d'extraire la partie grossière (> 1 μm dans le culot des tubes à centrifuger, qui ne sont pas conservés) **(ii)** ainsi que des cycles de centrifugation à 4700 tr.min⁻¹ pendant 1h afin d'extraire la partie très fine à partir des surnageants issus des cycles de centrifugation de l'étape **(i)** (< 0,1 μm dans le surnageant, qui ne sont pas conservés). Seuls les culots issus de l'étape **(ii)** sont finalement conservés. Le protocole de tri granulométrique a nécessité de nombreuses itérations afin d'éliminer efficacement les parties grossières et très fines des trois solides. Entre chaque cycle, les culots étaient remis en suspension dans 45 mL d'eau ultrapure, mélangés et agités avant chaque nouveau cycle.

Les trois autres oxydes de manganèses n'ont pas été triés granulométriquement du fait de leur granulométrie globalement supérieure à 1 μm de diamètre (vérifié par centrifugation pour le MnO_2 bactériogénique), et/ou de l'homogénéité relative de leur granulométrie (Giovaloni et al, 1970). Afin de vérifier que la réalité était bien en accord avec les informations issues de la bibliographie, des tests de centrifugation ont été effectués pour confirmer que la granulométrie de ces trois solides était bel et bien supérieure à 1 μm .

Une fois les solides lavés et triés granulométriquement ($\delta\text{-MnO}_2$ et birnessite acide), ceux-ci ont été saturés en Na via trois cycles de mise en contact avec 45 mL d'une solution de NaCl 1M avec agitation pendant une heure et centrifugation à 4700 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 15 minutes de manière que l'ensemble du solide tombe au fond du tube et que les surnageants soient limpides. Les solides ont ensuite été dialysés à l'aide de sac de dialyses en membrane à porosité moléculaire Spectra/Por® de la marque Spectrum laboratories. Les sacs ont été baignés dans des bouteilles d'eau ultrapure dont l'eau a régulièrement été remplacée jusqu'à ce que la conductivité de celle-ci atteigne 30 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ et ne varie plus, indiquant que la dialyse était terminée. Après dialyses, les solides ont été séchés à 60°C à l'étuve et broyés le plus finement possible à l'aide d'un mortier et d'un pilon en agate.

4.2.2. Caractérisation des oxydes de manganèse

La pureté et les caractéristiques minéralogiques des minéraux synthétisés ont été déterminées par six méthodes de caractérisation : (1) L'analyse par diffraction des rayons X (DRX) de la poudre à l'aide d'un diffractomètre Bruker AXS D5000 à l'ITES (Strasbourg, France) a été réalisée en mode θ/θ par balayage entre 3° et 65° avec des pas de 0,04° toutes les 10 secondes. L'acquisition a été réalisée à l'aide d'un tube à rayons X équipé d'une anticathode en cuivre (Cu) fonctionnant à 40 kV et 30 mA. (2) Des observations au microscope électronique à balayage (MEB) ont été effectuées à l'IC2MP (Poitiers, France) pour vérifier la taille et la forme des particules des différents solides. (3) Les mesures de la surface spécifique externe ont été effectuées sur un Micrometrics Tristar™ à l'IC2MP (Poitiers, France) selon la méthode Brunauer-Emmett-Teller (BET) (Brunauer et al., 1938) en utilisant l'isotherme d'adsorption de N_2 . (4) La capacité d'échange cationique (CEC) a été mesurée à l'ITES (Strasbourg, France) en utilisant une solution de cobalthexamine d'après la méthode décrite par Ciesielski et al. (1997) : 100 mg de poudre ont été mélangés à 45 ml de solution de chlorure $10^{-2} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pendant deux heures à 40 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$ sur un rotateur Stuart™ SB3 à température ambiante. Les suspensions ont

ensuite été filtrées à 0,22 μm à l'aide de filtres en cellulose régénérée et analysées élémentairement à l'aide d'un appareil ThermoScientific iCAP 6000 seriesTM ICP-AES à ITES. (5) Les degrés d'oxydation ont été déterminés par titration colorimétrique selon la méthode présentée dans Gaillot (2004). (6) Après les mises en solution acide, les caractérisations chimiques ont été déterminées par analyse élémentaire à l'aide d'un ICP-AES ThermoScientific iCAP -6000 seriesTM à l'ITES. Pour ce faire, 50 mg de MnO_2 initial (après saturation en Na et avant échange de Ca) et des aliquotes de MnO_2 final (après adsorption de Ca) ont été digérés dans des béchers savillexTM avec du HCl 5 N sur une plaque chauffante à 100°C, puis évaporés jusqu'à siccité. Les résidus ont ensuite été convertis en HNO_3 et à nouveau évaporés jusqu'à siccité. Ils ont ensuite été dissous dans 0,25 M HNO_3 pour analyses.

4.2.1. Protocoles expérimentaux d'adsorption et de désorption du Ca

Toutes les expériences d'adsorption et de désorption ont été réalisées dans des réacteurs fermés bien agités (système "batch") permettant l'homogénéité du milieu. La concentration aqueuse de Ca dans la solution initiale a été ajustée de manière à être limitante, c'est-à-dire que plus de 75 % de la quantité initiale de Ca est adsorbée à l'état stationnaire tout en laissant disponible une quantité de Ca suffisante dans la phase aqueuse pour la quantification des fractionnements isotopiques potentiels.

Les expériences d'adsorption ont été réalisées avec une solution initiale préparée à l'aide d'un sel de nitrate de calcium tétra hydraté $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Alfa Aesar 99,99 % de pureté) à température ambiante (20 °C). Nous avons fixé le rapport solide/solution à 2,5 g.L^{-1} et il n'y a aucun sel de fond. La force ionique a ensuite été fixée uniquement par le $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ et le réactif utilisé pour ajuster le pH des solutions initiales (2,5.10⁻¹ et 2,5.10⁻² mol.L⁻¹ HNO_3 ou 10⁻² mol.L⁻¹ NaOH).

Les expériences d'adsorption ont été menées (1) en fonction de la concentration de Ca (de 4,99.10⁻² à 1,50.10¹ mmol.L⁻¹ (c.-à-d., 1,74.10⁻³ à 5,21.10⁻¹ mmol/mmol MnO_2) à pH 7 avec un temps d'adsorption de 2 h, (2) en fonction du pH (avec des pH allant de 2 à 8) avec une concentration initiale de Ca fixée à 0,13 mmol/mmol MnO_2 pour la birnessite (2) pH10, 3,47.10⁻³ mmol/mmol MnO_2 pour la birnessite (3) pH4 et 2,78.10⁻² mmol/mmol MnO_2 pour la MnO_2 bactériogénique et un temps de réaction d'adsorption de 2 h, et (3) en fonction du temps de contact entre le minéral et la solution de Ca, en tenant compte des 5 min de la centrifugation (i.e. : 5 min, 10 min, 15 min, 35 min, 65 min, 125 min, ~24 h) à pH 7 avec une concentration en

Ca de la solution initiale fixée à 3.74 mmol.L^{-1} (i.e., $0,13 \text{ mmol/mmol MnO}_2$) pour la birnessite (2) pH10, $9,98.10^{-2} \text{ mmol.L}^{-1}$ (i.e., $3,47.10^{-3} \text{ mmol/mmol MnO}_2$) pour la birnessite (3) pH4 et $8,11.10^{-1} \text{ mmol.L}^{-1}$ (i.e., $2,82.10^{-2} \text{ mmol/mmol MnO}_2$) pour le MnO_2 bactériogénique.

Chaque expérience consiste à mélanger 20 à 50 mg de minéraux séchés saturés en Na^+ avec respectivement 8 à 20 ml de solution initiale de Ca et chaque lot correspond à un seul point de mesure. La quantité de minéraux séchés et la quantité correspondante de solution de Ca utilisées pour les différentes expériences dépendent de la quantité totale disponible de chaque minéral. Pour l'agitation, les tubes sont placés sur un agitateur rotatif SB3 Stuart™ à 40 tr.min^{-1} . Après agitation, les tubes sont centrifugés pendant 5 minutes à 4000 tr.min^{-1} dans une centrifugeuse Thermo Jouan multifonction B4-I™.

Pour mesurer les compositions aqueuses élémentaires et isotopiques du Ca après les expériences d'adsorption, les surnageants sont filtrés et transférés dans des tubes Falcon™ de 50 mL, à l'aide de seringues et de filtres à membrane en acétate de cellulose de $0,22 \mu\text{m}$ conditionnés avec de l'eau ultra-pure de 18 mQ.

En outre, des expériences d'adsorption cinétique sont utilisées pour les expériences de désorption du Ca. Les résidus (c'est-à-dire la boue restant après l'élimination du surnageant) ont été agités à température ambiante ($20 \text{ }^\circ\text{C}$) avec 8 à 20 ml de chlorure de cobalthexamine 2.10^{-2} M ($\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$, abrégé par la suite en Cohex. L'agitation a été réalisée à 40 tr.min^{-1} sur un rotateur SB3 Stuart™, pendant 2h, et chaque tube a été centrifugé à 4000 tr.min^{-1} pendant 5 min sur une centrifugeuse Thermo Jouan multifonction B4-I™ pour extraire les surnageants avant l'analyse du Ca résiduel en solution. Avant cette analyse, la même procédure de filtration que celle utilisée pour les expériences d'adsorption a été appliquée.

4.2.2. Protocoles analytiques

L'évolution du pH en fonction du temps a été mesurée sur une aliquote de chaque échantillon filtré à l'aide d'un titrateur Metrohm 905 Titrando™ calibré à $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Les analyses élémentaires et isotopiques ont été réalisées sur la plateforme Cortecs-Pacite de l'Université de Strasbourg à l'ITES (Strasbourg, France).

Pour mesurer la concentration en Ca, Na et Mn dans les échantillons, une aliquote de chaque échantillon a été diluée avec $0,25\text{N HNO}_3$ et analysée à l'aide d'un ICP-AES (iCAP 6000 series™ ThermoFisher Scientific) avec une précision proche de 3% pour le Ca.

Les fractionnements isotopiques du Ca ont été mesurés sur un TIMS (ThermoFisher Scientific Triton™) conformément au protocole du laboratoire (Schmitt et al., 2009, 2017, Brazier et al., 2019, 2020). Les échantillons ont été préparés en ajoutant 0,14 µmol de Ca à 0,01 µmol d'un double spike ⁴²Ca-⁴³Ca (i.e. ⁴²Ca/⁴³Ca spike ratio of 5, selon Holmden (2005)) et séchés à 70°C sur une plaque chauffante. Ensuite, tous les échantillons et les solutions de standards internes (eau de mer de l'Atlantique, Schmitt et al., 2001, Hippler et al., 2003) ont été déposés sur des colonnes chromatographiques échangeuses de cations (polyéthylène haute densité) remplies de 2 mL de résine normale DGA (TODGA) de Triskem™ (Horwitz et al., 2005, Romaniello et al., 2015). Les échantillons purifiés ont été recueillis dans du HCl 0,1N dans des béchers Savillex™, avec un ajout de 0,2 mL de HNO₃ distillé et de H₂O₂ pur avant d'être chauffés et séchés à 70 °C, puis convertis sous forme nitrique par dissolution dans 0,5 mL de HNO₃ 2N et séchés une dernière fois. Ensuite, les échantillons ont été dissous dans 1,5-3 µL de HNO₃ 1N et chargés sur des filaments simples de tantale préalablement dégazés et oxydés sous vide primaire (pureté de 99,995 %). Il est à noter que le Ca total mesuré dans les blancs pour cette séparation représente moins de 0,2 % de la contribution au Ca des échantillons et peut être négligé.

Les valeurs mesurées de l'analyse isotopique ont été exprimées en δ^{44/40}Ca en pour mille par rapport à l'étalon NIST SRM915a (Hippler et al., 2003, Eisenhauer et al., 2004), à l'aide de la formule suivante :

$$\delta^{44/40}Ca = \left(\frac{\frac{^{44}Ca}{^{40}Ca_{sample}}}{\frac{^{44}Ca}{^{40}Ca_{SRM915a}}} - 1 \right) \times 1000 \quad (1)$$

Pour évaluer directement le fractionnement isotopique apparent, nos résultats seront exprimés sous la forme d'une différence (Δ^{44/40}Ca_i) entre la composition isotopique du Ca mesurée dans la phase aqueuse ou solide finale (δ^{44/40}Ca_i) et celle de la solution initiale (δ^{44/40}Ca_{ini}):

$$\Delta^{44/40}Ca_i (\text{‰}) = \delta^{44/40}Ca_i - \delta^{44/40}Ca_{ini} \quad (2)$$

où i représente le liquide après adsorption (LAA) ou les bactéries après adsorption (BAA).

L'incertitude propagée associée (Δ_{error}, in ‰) peut être exprimée comme suit

$$\Delta_{error}(\Delta^{44/40}Ca_i) = \sqrt{\left(\Delta_{\delta^{44/40}Ca_i}\right)^2 + \left(\Delta_{\delta^{44/40}Ca_{ini}}\right)^2} \quad (3)$$

La répétabilité interne moyenne obtenue au cours de l'étude était de 0,07 % sur la base des mesures répétées du NIST SRM 915a (2SD, N=124). Les mesures répétées de la solution initiale de Ca ont donné une valeur égale à $1,09 \pm 0,15$ % (2SD, N= 5). L'incertitude externe calculée à partir des échantillons répétés à long terme était égale à 0,10 % (2SD, N=14) pour les valeurs de $\delta^{44/40}Ca$. En utilisant ces valeurs et selon l'équation (3), l'erreur propagée associée à $\Delta^{44/40}Ca$ est égale à 0,18 %. La précision de nos mesures a été explorée par les mesures d'un étalon interne d'eau de mer de l'Atlantique ($1,88\% \pm 0,11$, 2SD, N=38) au cours de la même période, qui a montré des valeurs cohérentes avec celles rapportées par Hippler et al. (2003) et Heuser et al. (2016 et références y figurant).

4.3. Résultats

4.3.1. Caractérisation des échantillons d'oxyde de manganèse

4.3.1.a. Composition élémentaire

Les résultats de la mise en solution acide des solides sont présentés dans le Tableau 4.2.

Tableau 4.2 : Compositions élémentaires des oxydes de manganèses exprimées en proportions par rapport à la quantité de Mn. σ représente l'incertitude de l'instrument de mesure.

	$Ca^{2+}/ Mn_{total} \pm \sigma$	$Na^{+}/ Mn_{total} \pm \sigma$	$K^{+}/ Mn_{total} \pm \sigma$	$Mg^{2+}/ Mn_{total} \pm \sigma$	$\% Mn_{total} \pm \sigma$
δ -MnO2 A	-	0.265 ± 0.011	0.007 ± 0.000	-	39.3 ± 1.6
δ -MnO2 B	0.001 ± 0.000	0.142 ± 0.006	0.003 ± 0.000	-	42.8 ± 1.7
Birnessite acide (1)	0.003 ± 0.000	0.161 ± 0.006	0.039 ± 0.002	-	43.2 ± 1.7
Birnessite (2) pH10	0.001 ± 0.000	0.316 ± 0.013	-	-	50.2 ± 2.0
Birnessite (3) pH4	0.001 ± 0.000	0.071 ± 0.003	-	-	62.8 ± 2.5
MnO2 bactériogénique	0.004 ± 0.000	0.129 ± 0.005	-	0.001 ± 0.000	53.8 ± 2.2

Ces résultats présentent des valeurs rapports de Na^{+}/Mn_{total} de 0,265 et 0,142 respectivement pour les δ -MnO2 A et B, 0,161 pour la *birnessite (1) acide*, 0,316 et 0,071 respectivement pour les *birnessites (2) pH10* et *(3) pH4* et enfin 0,129 pour le *MnO2 bactériogénique*. En plus du Na, les échantillons contiennent d'autres éléments en proportions bien moins importantes tel que du Ca pour tous les échantillons sauf le δ -MnO2 A, avec une valeur de Ca^{2+}/ Mn_{total} allant

de 0,001 pour δ -MnO₂ B, les birnessites (2) pH10 et (3) pH4, à 0,004 pour le MnO₂ bactériogénique. On observe aussi du K dans les échantillons de δ -MnO₂ A et B et la birnessite acide (1) avec une valeur de K⁺/ Mn_{total} allant de 0,003 pour le δ -MnO₂ B à 0,039 pour la birnessite acide (1). Enfin, on observe aussi une très faible quantité de Mg dans le MnO₂ bactériogénique (Mg²⁺/ Mn_{total} = 0,001).

4.3.1.b. Degré d'oxydation

Les résultats de la détermination du degré d'oxydation des solides sont présentés dans le Tableau 4.3.

Tableau 4.3 : Degré d'oxydations déterminés pour les différents échantillons. SD représente l'écart type et N le nombre de mesures par échantillons.

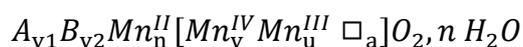
	Degré d'oxydation	SD	N
δ -MnO ₂ A	3.90	0.02	3
δ -MnO ₂ B	3.87	0.04	4
Birnessite acide (1)	3.95	0.04	3
Birnessite (2) pH10	3.55	0.02	3
Birnessite (3) pH4	3.67	0.03	3
MnO ₂ bactériogénique	3.84	-	1

Les degrés d'oxydations des δ -MnO₂ A et B, de la birnessite (1) acide et du MnO₂ bactériogénique sont respectivement de 3,90, 3,87, 3,95 et 3,84. En revanche le degré d'oxydation des birnessites (2) pH10 et (3) pH4 sont un peu plus faibles avec des valeurs respectives de 3,55 et 3,67, indiquant une plus grande proportion de Mn^{III} dans la structure.

4.3.1.c. Formules structurales des minéraux synthétisés

Les différentes caractérisations chimiques ont permis de déterminer les formules structurales des solides synthétisés.

On applique une formule générale modifiée d'après Gaillot (2004) :



Avec A et B des cations compensant les charges négatives des feuillets, € les lacunes et n le nombre de molécules d'eau.

On sait que :

- $n + u + v = 1$ (représente la répartition du Mn total)
- $4a + u = 2n + y_1 + y_2$ (pour respecter l'électro-neutralité, dans le cas où A et B sont des cations monovalents comme Na^+ , K^+ ou H^+)
- $4v + 3u + 2n = \text{d.o.}$ (équation du degré d'oxydation moyen du feuillet)
- On peut déterminer y_1 , y_2 et n grâce aux analyses élémentaires des solides

On obtient en résolvant le système d'équation et en appliquant les données numériques issues de nos analyses :

- $\delta\text{-MnO}_2 \text{ A} : \text{Na}_{0.25}^+ [\text{Mn}_{0.86}^{\text{IV}} \text{Mn}_{0.10}^{\text{III}} \square_{0.04}] \text{O}_2, n \text{ H}_2\text{O}$
- $\delta\text{-MnO}_2 \text{ B} : \text{Na}_{0.14}^+ [\text{Mn}_{0.87}^{\text{IV}} \text{Mn}_{0.13}^{\text{III}}] \text{O}_2, n \text{ H}_2\text{O}$
- Birnessite acide (1) : $\text{Na}_{0.16}^+ \text{K}_{0.04}^+ [\text{Mn}_{0.92}^{\text{IV}} \text{Mn}_{0.05}^{\text{III}} \square_{0.04}] \text{O}_2, n \text{ H}_2\text{O}$
- Birnessite (2) pH10 : $\text{Na}_{0.33}^+ [\text{Mn}_{0.55}^{\text{IV}} \text{Mn}_{0.45}^{\text{III}}] \text{O}_2, n \text{ H}_2\text{O}$
- Birnessite (3) pH4 : $\text{H}_{0.274}^+ \text{Na}_{0.076}^+ [\text{Mn}_{0.67}^{\text{IV}} \text{Mn}_{0.33}^{\text{III}}] \text{O}_2, n \text{ H}_2\text{O}$
- MnO_2 bactériogénique : $\text{H}_{0.05}^+ \text{Na}_{0.13}^+ \text{Mn}_{0.012}^{\text{II}} [\text{Mn}_{0.95}^{\text{IV}} \square_{0.05}] \text{O}_2, n \text{ H}_2\text{O}$

On peut noter que l'électro-neutralité n'est pas toujours respectée dans ces équations structurales. Il s'agit d'un problème toutefois plutôt courant, les incertitudes des données mesurées ne permettant pas de déterminer avec exactitude chaque paramètre. De plus, le MnO_2 bactériogénique contiendrait a priori du phosphore dans sa structure, mais nos données ne nous permettent pas d'établir sous quelle forme ce phosphore est présent. Ce point est discuté dans la partie 4.4.2.

4.3.1.d. Capacité d'échange cationique

Les résultats des analyses de la CEC est présentée dans le tableau 4.4.

Tableau 4.4 : Résultats des analyses de la CEC pour l'ensemble des oxydes de manganèses de l'étude. La CEC représente la somme des cations mesurés dans le surnageant en méq, rapportée à 100g d'échantillon.

méq/100g	Mg	Ca	Mn	Na	K	CEC (méq/100g)
δ -MnO2 A	-	0,87	0,20	199,9	4,20	205,2
δ -MnO2 B	-	3,42	2,44	117,0	0,00	122,8
Birnessite acide (1)	-	1,05	1,61	143,6	25,8	172,1
MnO2 bactériogénique	1,15	4,68	33,5	97,8	-	137,1
Birnessite (3) pH4	-	-	-	34,4	-	34,4
Birnessite (2) pH10	-	-	-	208,7	-	208,7

Les CEC des δ -MnO2 A et B sont respectivement de 205,2 et 123,8 méq/100g. Ces CEC sont représentées par le Na présent dans les solides à hauteur de 97,4 et 95,2%. Le reste de la CEC de ces solides correspond à de faibles proportions de Ca, de Mn ou de K présent dans les solides (Tableau 4.4). La *birnessite acide (1)* présente quant à elle une CEC intermédiaire de 172 méq/100g. Cette CEC est représentée par le Na à hauteur de 83,5%, une bonne partie de la CEC étant représentée par du K (25,8% et le reste par de faibles proportions de Ca et de Mn (Tableau 4.4). Les *birnessites (2) pH10* et *(3) pH4* présentent quant à elles des CEC de 204 et 34 méq/100g et représentent ainsi les deux CEC extrêmes de cette étude. De plus, leurs CEC sont exclusivement dues à la présence de Na. Enfin, le MnO2 bactériogénique présente une CEC de 137 méq/100g, le situant à peu près au même niveau que le δ -MnO2 B. Ce MnO2 se distingue des autres solides par sa CEC qui n'est représentée qu'à hauteur de 71,3% par la présence de Na et à 24,4% par la présence de Mn, le reste étant représenté par de faibles proportions de Mg (0,8%) et de Ca (3,4%) (Tableau 4.4).

4.3.1.e. Surface spécifique externe

Les résultats de mesures de la surface spécifique (BET N2) sont présentés dans le tableau 4.5.

Les surfaces spécifiques des δ -MnO2 A et B sont de 117 et 205 m²/g (Tableau 4.5). Celle de la *birnessite acide (1)* est de 62 m²/g. Les surfaces spécifiques des *birnessites (2) pH10* et *(3) pH4* sont de loin les deux plus faibles de cette étude avec respectivement 16 et 13 m²/g

(Tableau 4.5). Celle du MnO₂ bactériogénique est de 100 m²/g, soit une valeur plus proche de celle du δ -MnO₂ A (117 m²/g) (Tableau 4.5).

Tableau 4.5 : comparaison des principales caractéristiques des échantillons synthétisés dans cette étude avec le δ -MnO₂ étudié dans Schmitt et al. (2023) et divers phyllosilicates étudiés dans Brazier et al. (2019)

Mineral	Grain size (μ m)	CEC (meq/100g)	CEC		Interlayer open	pH	Ca _{ads_max} (mmol/g)	$\Delta^{44/40}$ Ca (‰)	Reference
			represented by Na ⁺ in initial solid (%)	BET (N ₂) (m ² /g)					
Birnessite (2) pH10	1-2	208	100	16.2	yes	7	1.77	0.91	Cette étude
Birnessite (3) pH4	2	34	100	12.8	yes	7	0.07	1.77	"
Bacteriogenic MnO ₂	\geq 1	137	71.3	100.7	yes	7	0.76	1.03	"
δ -MnO ₂ (a)	0.1-1	205	97.4	117	yes	7	1.213	1.06	"
δ -MnO ₂ (b)	0.1-1	123	95.2	205	yes	7	0.831	0.81	"
Acid birnessite (1)	0.1-1	172	83.5	62	yes	7	0.961	1.08	"
δ -MnO ₂	0.1-1	215	99.2	27.6	yes	4	1.06	1.15	Schmitt et al. (2023)
"	"	"	"	"	"	7	1.16	1.19	"
Kaolinite (KGa-2)	0.1-1	3.74	94.5	20.14	no	4	4.26	0.00	Brazier et al. (2019)
"	"	"	"	"	"	7	9.66	"	"
Montmorillonite (Swy-2)	0.1-1	74.6	90.1	28.60	yes	4	292.9	0.10	"
"	"	"	"	"	"	7	293.7	"	"
Tuftane muscovite	0.1-1	46.7	94.2	62.23	no	4	57.95	0.22	"
"	"	"	"	"	"	7	63.79	0.27	"
"	50-200	0.42	92.7	0.07	no	7	0.209	0.00	"

4.3.1.f. Microscopie électronique à balayage

Les images obtenues au MEB sont présentées figures 4.1 et 4.2.

Pour les échantillons de δ -MnO₂ A (Fig. 4.1a et b), et B (Fig. 4.1c), on observe de gros agrégats (provenant du séchage et du broyage manuel) composés de très petites particules dont la taille atteint par ailleurs la limite de résolution du MEB (\sim 0,2 μ m). Pour la *birnessite acide* (1) on observe de gros agrégats (provenant du séchage et du broyage manuel) constitués de

nombreuses petites particules de taille inférieure à 1 μm (fig. 4.1 d) mais visiblement plus grandes que celles des $\delta\text{-MnO}_2$ A et B.

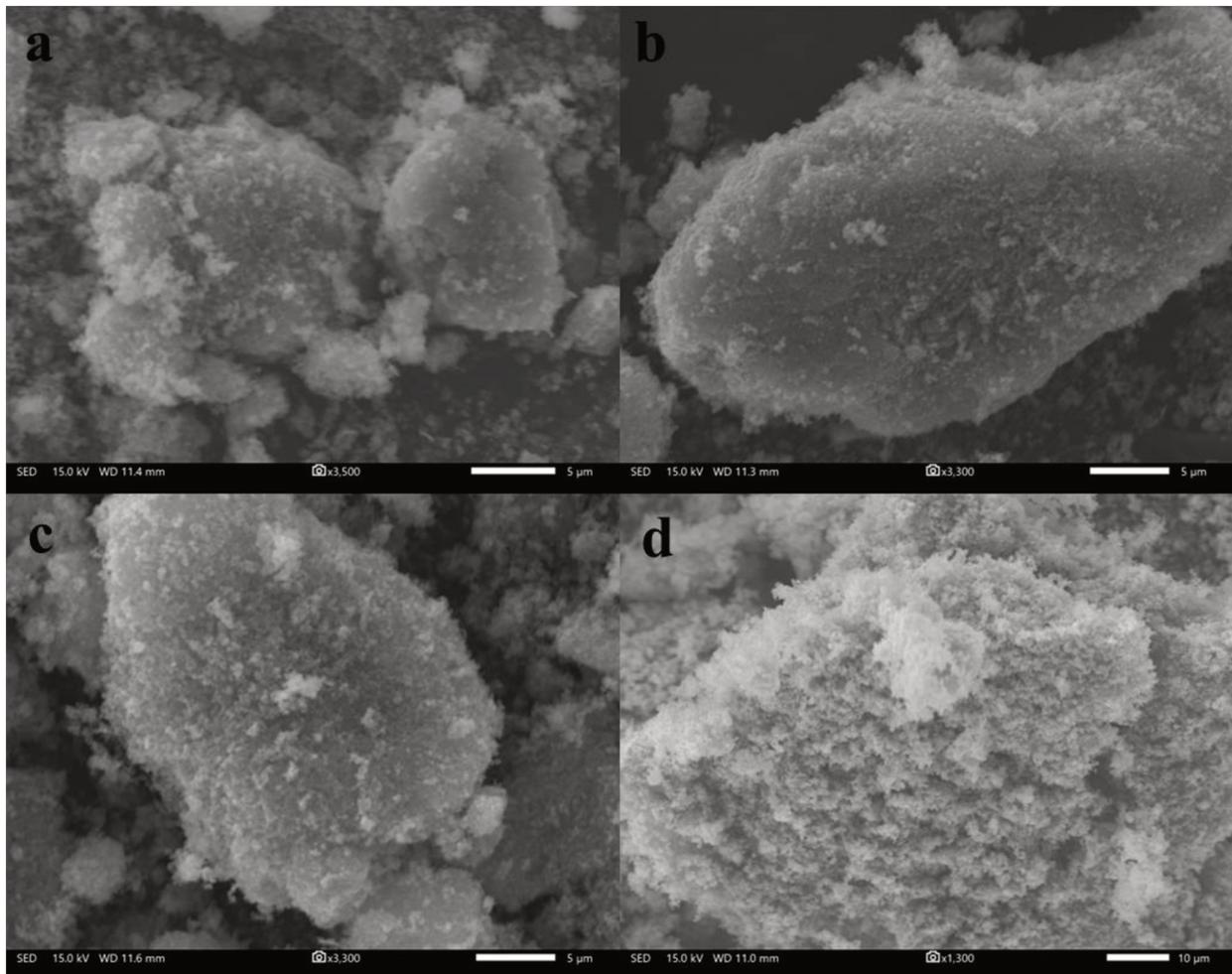


Figure 4-1 : Images obtenues au MEB pour $\delta\text{-MnO}_2$ A (a et b) et B (c), et la *birnessite acide* (1) (d).

Pour la *birnessite* (2) $\text{pH}10$ (Fig. 4.2a et b), les particules observées sont plus grandes que celles des échantillons précédents d'un facteur 10 et présentent de nombreux petits feuillets (entre 1 et 2 μm) mono-dispersés avec une forme parfois bien hexagonale. Pour la *birnessite* (3) $\text{pH}4$ (Fig. 4.2c et d), là encore les particules observées sont plus importantes et mesurent en moyenne 2 μm et semblent aussi plus trapues et plus denses que la *birnessite* (2) $\text{pH}10$, traduisant peut être plusieurs feuillets par particules. Ces observations pour les *birnessites* (2) $\text{pH}10$ et (3) $\text{pH}4$ sont cohérentes avec des valeurs de surfaces spécifiques basses (respectivement 16 et 13 m^2/g). Les particules sont beaucoup plus organisées et beaucoup moins riches en Na que pour la *birnessite* (3) $\text{pH}4$.

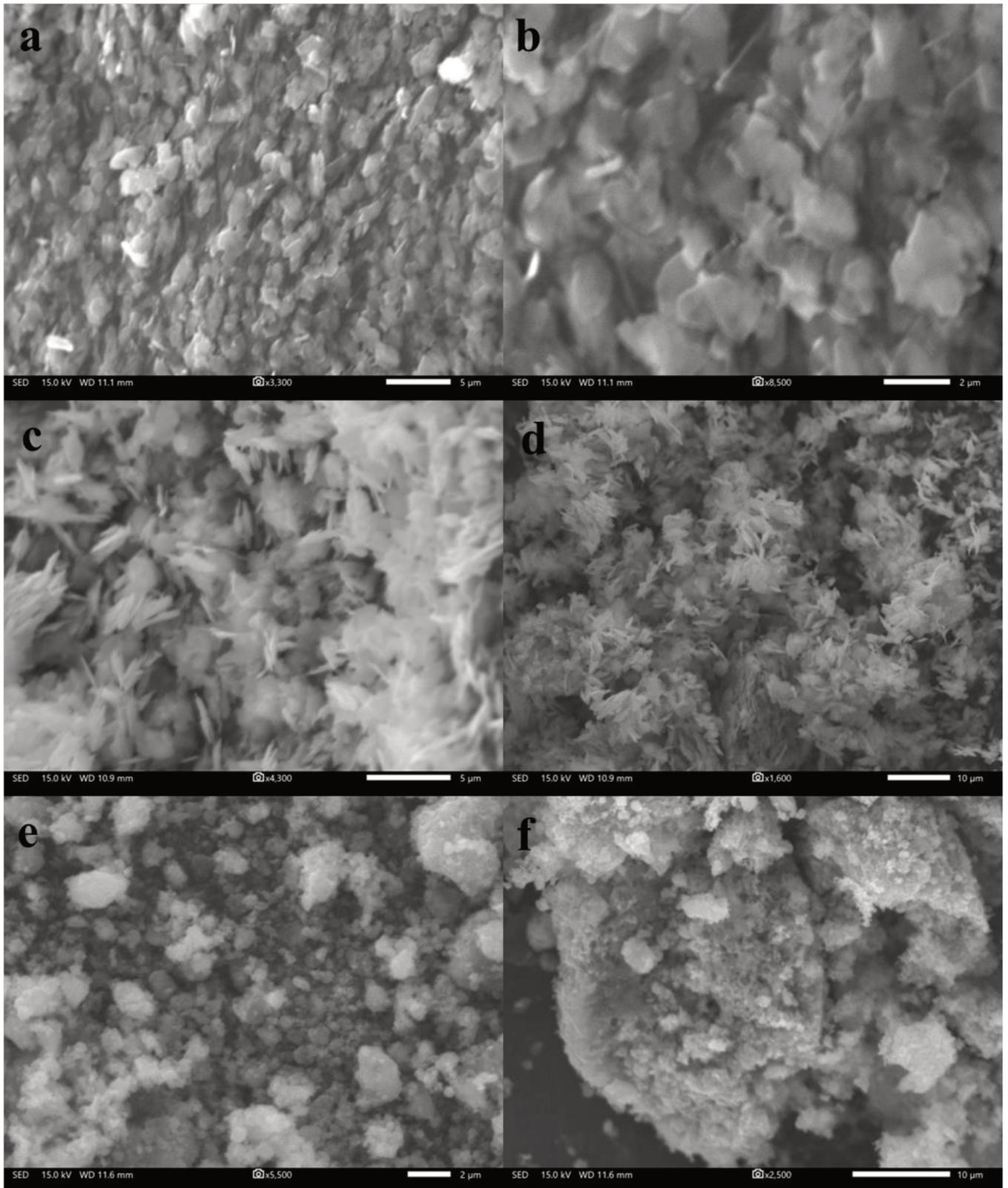


Figure 4-2 : Images obtenues au MEB pour la *birnessite* (2) pH10 (a et b), la *birnessite* (3) pH4 (c et d), et le *MnO₂ bactériogénique* (e et f).

Pour le MnO_2 bactériogénique (Fig. 4.2e et f), comme pour δ - MnO_2 A et B on observe ici aussi de gros agrégats de tailles variables (plusieurs μm) avec de nombreuses particules de taille inférieure à 1 μm . Là aussi, ces observations sont cohérentes avec les surfaces spécifiques mesurées pour ces trois solides, soit respectivement 100, 117 et 205 m^2/g .

4.3.1.g. Analyses DRX

Les résultats des analyses DRX sont présentées en figure 4.3.

Les échantillons de δ - MnO_2 A et B, de *birnessite acide* (1) et de MnO_2 bactériogénique présentent des allures similaires avec des principaux pics, d'intensité variables d'un échantillon à l'autre à environ 7,30, 3,70 et 2,43 Å, pics caractéristiques de la birnessite. L'intensité maximale des pics de ces échantillons se situe en dessous de 1500 coups (Figure 4.3a). De plus, l'allure des spectres DRX indique une faible cristallinité des échantillons avec beaucoup de « bruit » visible.

En comparaison, les échantillons de *birnessites* (2) *pH10* et (3) *pH4* présentent des spectres sans « bruit » avec des pics principaux autour de 7,30 et 3,60 Å, soit deux des principaux pics présents également pour les quatre autres échantillons étudiés (Figure 4.3b). En revanche, l'intensité de ces pics est bien plus importante pour les *birnessites* (2) *pH10* et (3) *pH4* avec une intensité maximale pour le pic à 7,30 Å d'environ 50000 coups pour la *birnessite* (3) *pH4* et 140000 coups pour la *birnessite* (2) *pH10*. L'ensemble de ces caractéristiques des spectres DRX indiquent un bien meilleur niveau de cristallinité de ces échantillons, ce qui est cohérent avec les observations faites au MEB, avec des grains présentant parfois une forme bien hexagonale, indiquant une croissance cristalline.

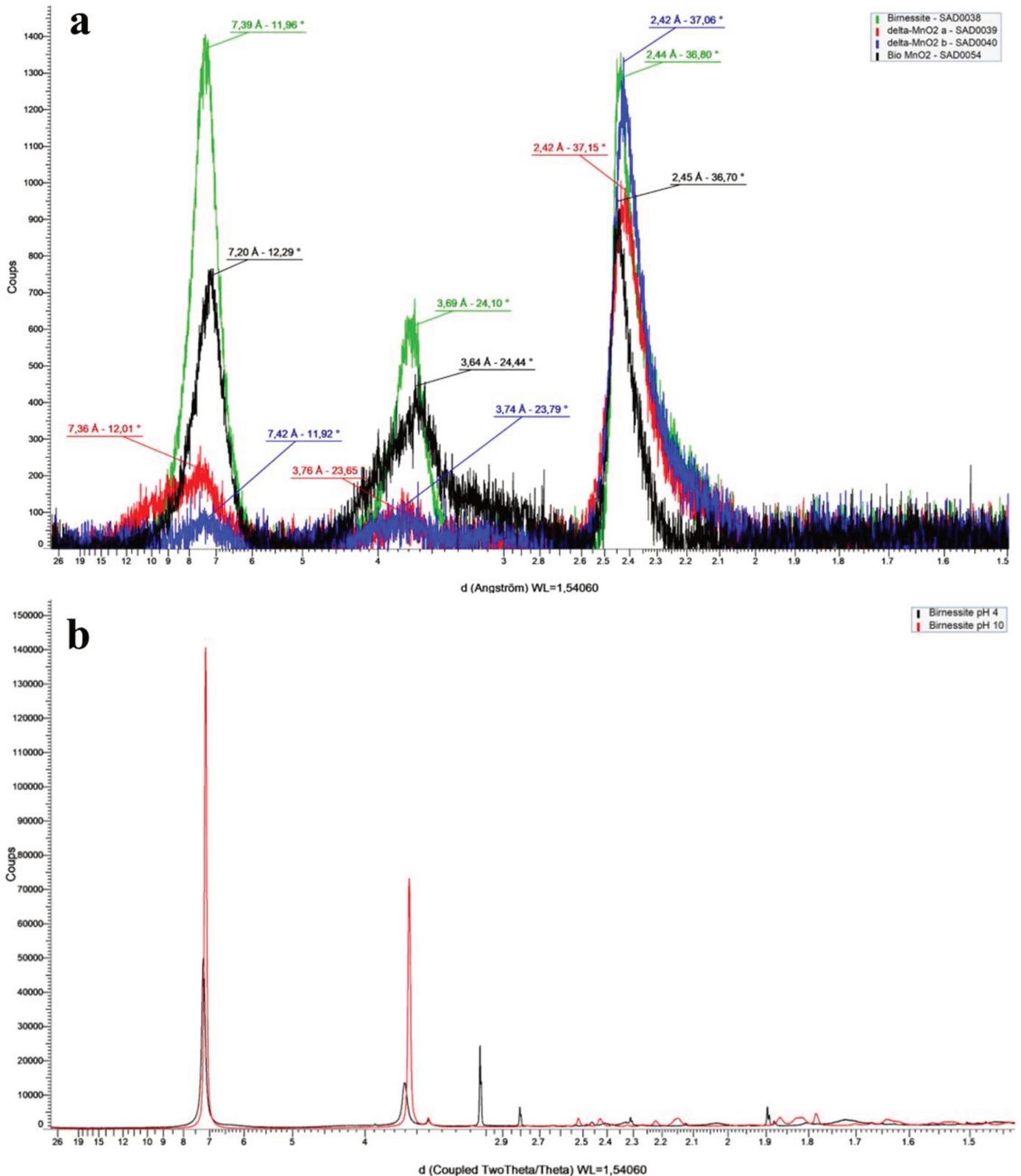


Figure 4-3 : Profils DRX des différents échantillons synthétisés lors de cette étude avec en a) les quatre échantillons « mal cristallisés » (δ -MnO2 A en rouge, δ -MnO2 B en bleu, birnessite acide (1) en vert et MnO₂ bactériogénique en noir) et en b) les birnessites (2) pH10 en rouge et (3) pH4 en noir.

4.3.2. Caractérisation de l'adsorption et de la désorption du Ca

On néglige lors de la désorption ou de l'attaque des solides le Ca apporté par le surnageant résiduel ne pouvant être totalement retiré lors des filtrations. La quantité de Ca adsorbé (et de Na désorbé) est calculée comme la différence entre (i) la quantité initiale de Ca (ou de Na) dans le liquide ($C_{a\text{ini}} = 0,124 \text{ mmol/mmol}_{\text{Mn}}$, $N_{a\text{ini}} = 0,002 \text{ mmol/mmol}_{\text{Mn}}$) et (ii) la quantité de Ca (ou de Na) dans le surnageant après les expériences d'adsorption ($C_{a\text{LAA}}$) (ou de désorption, $N_{a\text{LAA}}$).

4.3.2.a. *Expérimentations d'adsorption en fonction de la concentration en Ca de la solution initiale (pH = 7 et temps d'interaction de 125 minutes)*

Les résultats des expérimentations d'adsorption en fonction de la concentration en Ca de la solution initiale sont présentées dans le Tableau 4.6 et dans la figure 4.4.

Dans le cas de $\delta\text{-MnO}_2$ A, pour une variation de la quantité initiale en Ca ($C_{a\text{ini}}/\text{MnO}_2$) de 0,0434 à 0,5206 $\text{mmol}_{\text{Ca}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$, la quantité de Ca adsorbée varie de 0,0434 à 0,1054 $\text{mmol}_{\text{Ca}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$. En parallèle, le pH final varie de 6,80 à 4,65 et la quantité de Na désorbée augmente de 0,0854 à 0,1811 $\text{mmol}_{\text{Na}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$ (Figure 4.4a). D'un point de vue isotopique, la valeur de fractionnement isotopique dans le surnageant après adsorption $\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{LAA}}$ diminue de 1,06‰ ($C_{a\text{ini}}/\text{MnO}_2 = 0,0911 \text{ mmol}_{\text{Ca}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$) à -0,19‰ ($C_{a\text{ini}}/\text{MnO}_2 = 0,2603 \text{ mmol}_{\text{Ca}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$) (Figures 4.4a et 4.5).

Dans le cas de $\delta\text{-MnO}_2$ B, pour une variation de la quantité initiale en Ca de 0,0434 à 0,5206 $\text{mmol}_{\text{Ca}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$, la quantité de Ca adsorbée varie de 0,0419 à 0,0722 $\text{mmol}_{\text{Ca}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$. En parallèle, le pH final varie de 5,50 à 4,95 et la quantité de Na désorbée est de 0,0850 $\text{mmol}_{\text{Na}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$ à $C_{a\text{ini}}/\text{MnO}_2 = 0,0434 \text{ mmol}_{\text{Ca}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$ et se stabilise à $0,0928 \pm 0,0014 \text{ mmol}_{\text{Na}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$ (2SE, N = 9) à partir de $C_{a\text{ini}}/\text{MnO}_2 = 0,0651 \text{ mmol}_{\text{Ca}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$ (Figure 4.4b). D'un point de vue isotopique, la valeur de $\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{LAA}}$ diminue de 0,81‰ ($C_{a\text{ini}}/\text{MnO}_2 = 0,0521 \text{ mmol}_{\text{Ca}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$) à 0,41‰ ($C_{a\text{ini}}/\text{MnO}_2 = 0,1605 \text{ mmol}_{\text{Ca}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$) (Figures 4.4b et 4.5).

Dans le cas de la *birnessite acide (1)*, pour une variation de la quantité initiale en Ca de 0,0434 à 0,5206 $\text{mmol}_{\text{Ca}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$, la quantité de Ca adsorbé varie de 0,0430 à 0,0836 $\text{mmol}_{\text{Ca}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$.

Tableau 4.6 : concentrations élémentaires et fractionnements isotopiques mesurées pour les expérimentations d'adsorptions en fonction de la concentration initiale en Ca dans la solution. LAA = liquide après adsorption et SAA = solide après adsorption.

Référence	Durée de contact	pH initial	pH final	$\Delta H^+/MnO_2$	Ca_{ini}/MnO_2	Ca_{ads}/MnO_2	Ca_{ads}/MnO_2	Na^{+des}/MnO_2	K^{+des}/MnO_2	Mn_{des}/MnO_2	Mg_{des}/MnO_2	$\Delta^{44/40}Ca_{LAA}$	$\Delta^{44/40}Ca_{SAA}$
	(min)			(mmol/mmol)	(mmol/mmol)	(%)		(mmol/mmol)				(‰)	
<i>Variation [Ca] initiale</i>													
<i>$\delta-MnO_2$</i>													
A50	125	7.00	6.80	2.03E-06	4.34E-02	100%	4.34E-02	8.54E-02	4.56E-04	3.41E-04	9.99E-06		
A60	125	7.00	6.55	6.32E-06	5.21E-02	100%	5.21E-02	1.03E-01	5.95E-04	1.88E-04	1.09E-05		
A70	125	7.00	6.57	5.88E-06	6.07E-02	100%	6.07E-02	1.18E-01	5.97E-04	1.08E-04	1.12E-05		
A75	125	7.00	6.37	1.14E-05	6.51E-02	100%	6.51E-02	1.25E-01	4.12E-04	6.38E-05	2.32E-05		
A85	125	7.00	6.13	2.23E-05	7.38E-02	99%	7.27E-02	1.39E-01	4.56E-04	1.97E-05	1.51E-05		
A95	125	7.00	6.59	5.46E-06	8.24E-02	95%	7.85E-02	1.50E-01	1.17E-03	3.58E-05	2.00E-05		
A105	125	7.00	5.59	8.59E-05	9.11E-02	92%	8.36E-02	1.57E-01	9.45E-04	6.62E-05	2.42E-05	1.06	
A115	125	7.00	5.24	1.97E-04	9.98E-02	86%	8.61E-02	1.59E-01	9.55E-04	1.37E-05	3.84E-05		
A135	125	7.00	4.96	3.78E-04	1.17E-01	76%	8.93E-02	1.67E-01	2.40E-03	1.06E-05	5.36E-05	0.68	
A185	125	7.00	4.71	6.75E-04	1.61E-01	59%	9.41E-02	1.69E-01	1.31E-03	6.88E-06	4.92E-05		
A300	125	7.00	4.68	7.23E-04	2.60E-01	39%	1.01E-01	1.78E-01	1.37E-03	4.26E-07	6.84E-05		
A400	125	7.00	4.78	5.74E-04	3.47E-01	30%	1.04E-01	1.77E-01	2.50E-03	7.71E-07	8.11E-05		
A600	125	7.00	4.65	7.75E-04	5.21E-01	20%	1.05E-01	1.81E-01	1.93E-03	0.00E+00	8.45E-05		
B50	125	7.00	4.50	1.10E-03	4.34E-02	96%	4.19E-02	8.50E-02	4.32E-04	4.86E-07	1.67E-05		
B60	125	7.00	4.25	1.95E-03	5.21E-02	88%	4.56E-02	8.77E-02	2.17E-04	2.50E-06	3.74E-05	0.81	
B70	125	7.00	4.17	2.35E-03	6.07E-02	79%	4.80E-02	8.95E-02	4.80E-04	1.71E-06	5.29E-05		
B75	125	7.00	4.08	2.89E-03	6.51E-02	74%	4.83E-02	9.14E-02	3.03E-04	3.35E-06	6.03E-05	0.79	
B85	125	7.00	4.07	2.96E-03	7.38E-02	67%	4.92E-02	9.02E-02	2.87E-04	1.04E-05	9.05E-05		
B95	125	7.00	4.11	2.70E-03	8.24E-02	61%	5.04E-02	9.22E-02	1.63E-04	1.05E-05	9.20E-05	0.66	
B105	125	7.00	4.30	1.74E-03	9.11E-02	56%	5.13E-02	9.07E-02	4.19E-04	4.19E-06	8.44E-05		
B115	125	7.00	4.20	2.19E-03	9.98E-02	52%	5.20E-02	9.59E-02	3.87E-04	6.76E-06	8.64E-05		
B135	125	7.00	4.00	3.47E-03	1.17E-01	46%	5.42E-02	9.54E-02	7.17E-04	1.75E-05	9.86E-05		
B185	125	7.00	3.92	4.18E-03	1.61E-01	35%	5.55E-02	9.52E-02	0.00E+00	1.82E-05	1.10E-04	0.41	
B300	125	7.00	3.55	9.80E-03	2.60E-01	23%	6.08E-02	9.23E-02	0.00E+00	2.33E-05	1.21E-04		

B600	125	7.00	4.95	3.87E-04	5.21E-01	14%	7.22E-02	9.21E-02	0.00E+00	4.97E-05	1.80E-04		
<i>Acid birnessite (1)</i>													
Birn50	125	7.00	4.62	8.31E-04	4.34E-02	99%	4.30E-02	8.25E-02	1.43E-03	5.29E-06	1.06E-05		
Birn60	125	7.00	4.46	1.20E-03	5.21E-02	98%	5.11E-02	9.46E-02	2.38E-03	5.73E-06	6.35E-06		
Birn70	125	7.00	4.36	1.51E-03	6.07E-02	93%	5.66E-02	1.04E-01	3.35E-03	2.72E-06	9.26E-06	1.08	
Birn75	125	7.00	4.27	1.86E-03	6.51E-02	90%	5.83E-02	1.09E-01	4.30E-03	1.47E-06	9.52E-06		
Birn85	125	7.00	4.23	2.04E-03	7.38E-02	84%	6.16E-02	1.11E-01	4.78E-03	1.30E-06	1.24E-05		
Birn95	125	7.00	3.81	5.38E-03	8.24E-02	77%	6.32E-02	1.12E-01	4.67E-03	2.37E-06	1.87E-05	0.91	
Birn105	125	7.00	4.00	3.47E-03	9.11E-02	71%	6.48E-02	1.13E-01	5.50E-03	9.19E-07	1.93E-05		
Birn115	125	7.00	3.91	4.27E-03	9.98E-02	65%	6.44E-02	1.17E-01	6.22E-03	2.21E-06	1.84E-05		
Birn135	125	7.00	3.83	5.14E-03	1.17E-01	55%	6.47E-02	1.17E-01	6.89E-03	1.08E-05	4.26E-05		
Birn185	125	7.00	3.96	3.81E-03	1.61E-01	45%	7.18E-02	1.17E-01	7.49E-03	3.40E-06	3.08E-05		
Birn300	125	7.00	3.92	4.18E-03	2.60E-01	29%	7.65E-02	1.15E-01	7.53E-03	0.00E+00	3.55E-05	0.29	
Birn600	125	7.00	3.29	1.78E-02	5.21E-01	16%	8.36E-02	1.14E-01	9.05E-03	1.85E-05	5.22E-05		
<i>Birnessite (2) pH10</i>													
Birn pH10 Ca30	125	7.00	7.27	-1.61E-06	2.60E-02	100%	2.60E-02	5.91E-02	0.00E+00	2.69E-05	0.00E+00		
Birn pH10 Ca50	125	7.00	7.11	-7.78E-07	4.34E-02	100%	4.34E-02	9.57E-02	0.00E+00	1.13E-05	0.00E+00	-0.14	
Birn pH10 Ca150	125	7.00	6.91	8.01E-07	1.30E-01	92%	1.20E-01	2.38E-01	0.00E+00	5.37E-06	3.15E-05	0.88	-0.38
Birn pH10 Ca450	125	7.00	6.39	1.07E-05	3.90E-01	36%	1.39E-01	2.45E-01	5.14E-04	7.04E-05	3.69E-04	0.27	
Birn pH10 Ca600	125	7.00	6.39	1.07E-05	5.21E-01	30%	1.54E-01	2.47E-01	0.00E+00	4.61E-05	3.11E-05		
<i>Birnessite (3) pH4</i>													
Birn pH4 Ca2	125	7.00	7.15	-1.02E-06	1.74E-03	100%	1.74E-03	8.80E-03	0.00E+00	6.41E-05	0.00E+00		
Birn pH4 Ca4	125	7.00	7.15	-1.02E-06	3.47E-03	95%	3.28E-03	1.18E-02	1.20E-04	3.05E-05	2.98E-05		
Birn pH4 Ca6	125	7.00	7.08	-5.85E-07	5.21E-03	77%	3.98E-03	1.29E-02	0.00E+00	7.95E-07	0.00E+00	1.77	-0.50
Birn pH4 Ca10	125	7.00	6.84	1.55E-06	8.68E-03	49%	4.28E-03	1.31E-02	0.00E+00	2.75E-07	5.77E-07	1.03	
Birn pH4 Ca50	125	7.00	6.87	1.21E-06	4.34E-02	13%	5.65E-03	1.45E-02	0.00E+00	4.43E-08	0.00E+00		-0.73
<i>Bacteriogenic MnO2</i>													
MnO2 bio Ca30	125	7.00	7.03	-2.32E-07	2.60E-02	93%	2.42E-02	7.34E-02	0.00E+00	2.98E-04	6.82E-05	0.96	-0.40
MnO2 bio Ca50	125	7.00	6.41	1.01E-05	4.34E-02	63%	2.75E-02	6.97E-02	0.00E+00	7.62E-04	2.33E-04	0.84	-0.61
MnO2 bio Ca150	125	7.00	6.01	3.05E-05	1.30E-01	28%	3.67E-02	6.89E-02	0.00E+00	2.10E-03	2.86E-04		-0.77
MnO2 bio Ca450	125	7.00	5.74	5.98E-05	3.90E-01	15%	5.86E-02	7.68E-02	0.00E+00	3.86E-03	3.20E-04		
MnO2 bio Ca600	125	7.00	5.66	7.26E-05	5.21E-01	13%	6.63E-02	7.40E-02	0.00E+00	4.23E-03	3.19E-04		

En parallèle, le pH final varie de 4,62 à 3,29 et la quantité de Na désorbée est de 0,0825 mmol_{Na}/mmol_{MnO₂} à Ca_{ini}/MnO₂ = 0,0434 mmol_{Ca}/mmol_{MnO₂} et se stabilise à 0,1154 ± 0,0016 mmol_{Na}/mmol_{MnO₂} (2SE, N = 9) à partir de Ca_{ini}/MnO₂ = 0,0911 mmol_{Ca}/mmol_{MnO₂} (Figure 4.4c). D'un point de vue isotopique, la valeur de Δ^{44/40}Ca_{LAA} diminue de 1,08‰ (Ca_{ini}/MnO₂ = 0,0607 mmol_{Ca}/mmol_{MnO₂}) à 0,29‰ (Ca_{ini}/MnO₂ = 0,2603 mmol_{Ca}/mmol_{MnO₂}) (Figures 4.4c et 4.5).

Dans le cas de la *birnessite* (2) pH10, pour une variation de la quantité initiale en Ca de 0,0260 à 0,5206 mmol_{Ca}/mmol_{MnO₂}, la quantité de Ca adsorbée varie de 0,0260 à 0,1541 mmol_{Ca}/mmol_{MnO₂}. En parallèle, le pH final varie de 7,27 à 6,39 et la quantité de Na désorbée augmente de 0,0591 à 0,2465 mmol_{Na}/mmol_{MnO₂} (Figure 4.4d). D'un point de vue isotopique, la valeur de Δ^{44/40}Ca_{LAA} diminue de 0,88‰ (Ca_{ini}/MnO₂ = 0,1302 mmol_{Ca}/mmol_{MnO₂}) à 0,27‰ (Ca_{ini}/MnO₂ = 0,3905 mmol_{Ca}/mmol_{MnO₂}). En parallèle, la valeur de fractionnement dans le solide après adsorption Δ^{44/40}Ca_{SAA} diminue de -0,14‰ (Ca_{ini}/MnO₂ = 0,0434 mmol_{Ca}/mmol_{MnO₂}) à -0,38‰ (Ca_{ini}/MnO₂ = 0,1302 mmol_{Ca}/mmol_{MnO₂}) (Figures 4.4d et 4.5).

Dans le cas de la *birnessite* (3) pH4, pour une variation de la quantité initiale en Ca de 0,0017 à 0,0434 mmol_{Ca}/mmol_{MnO₂}, la quantité de Ca adsorbé varie de 0,0017 à 0,0057 mmol_{Ca}/mmol_{MnO₂}. En parallèle, le pH final varie de 7,15 à 6,87 et la quantité de Na désorbée augmente de 0,0088 à 0,0145 mmol_{Na}/mmol_{MnO₂} (Figure 4.4e). D'un point de vue isotopique, la valeur de Δ^{44/40}Ca_{LAA} diminue de 1,77‰ (Ca_{ini}/MnO₂ = 0,0052 mmol_{Ca}/mmol_{MnO₂}) à 1,03‰ (Ca_{ini}/MnO₂ = 0,0087 mmol_{Ca}/mmol_{MnO₂}). En parallèle, la valeur de fractionnement dans le solide après adsorption Δ^{44/40}Ca_{SAA} diminue de -0,50‰ (Ca_{ini}/MnO₂ = 5,21.10⁻³ mmol_{Ca}/mmol_{MnO₂}) à -0,73‰ (Ca_{ini}/MnO₂ = 4,34.10⁻² mmol_{Ca}/mmol_{MnO₂}) (Figures 4.4e et 4.5).

Dans le cas du *MnO₂ bacteriogénique*, pour une variation de la quantité initiale en Ca de 0,0260 à 0,5206 mmol_{Ca}/mmol_{MnO₂}, la quantité de Ca adsorbé varie de 0,0242 à 0,0663 mmol_{Ca}/mmol_{MnO₂}. En parallèle, le pH final varie de 7,03 à 5,66 et la quantité de Na désorbé est relativement similaire pour l'ensemble des échantillons avec une valeur de 0,0726 ± 0,0029 mmol_{Na}/mmol_{MnO₂} (2SE, N = 5) (Figure 4.4f). D'un point de vue isotopique, la valeur de Δ^{44/40}Ca_{LAA} diminue de 0,96‰ (Ca_{ini}/MnO₂ = 0,0260 mmol_{Ca}/mmol_{MnO₂}) à 0,84‰ (Ca_{ini}/MnO₂ = 0,0434 mmol_{Ca}/mmol_{MnO₂}). En parallèle, la valeur de fractionnement dans le solide après adsorption Δ^{44/40}Ca_{SAA} diminue de -0,40‰ (Ca_{ini}/MnO₂ = 0,0260 mmol_{Ca}/mmol_{MnO₂}) à -0,77‰ (Ca_{ini}/MnO₂ = 0,1302 mmol_{Ca}/mmol_{MnO₂}) (Figures 4.4f et 4.5).

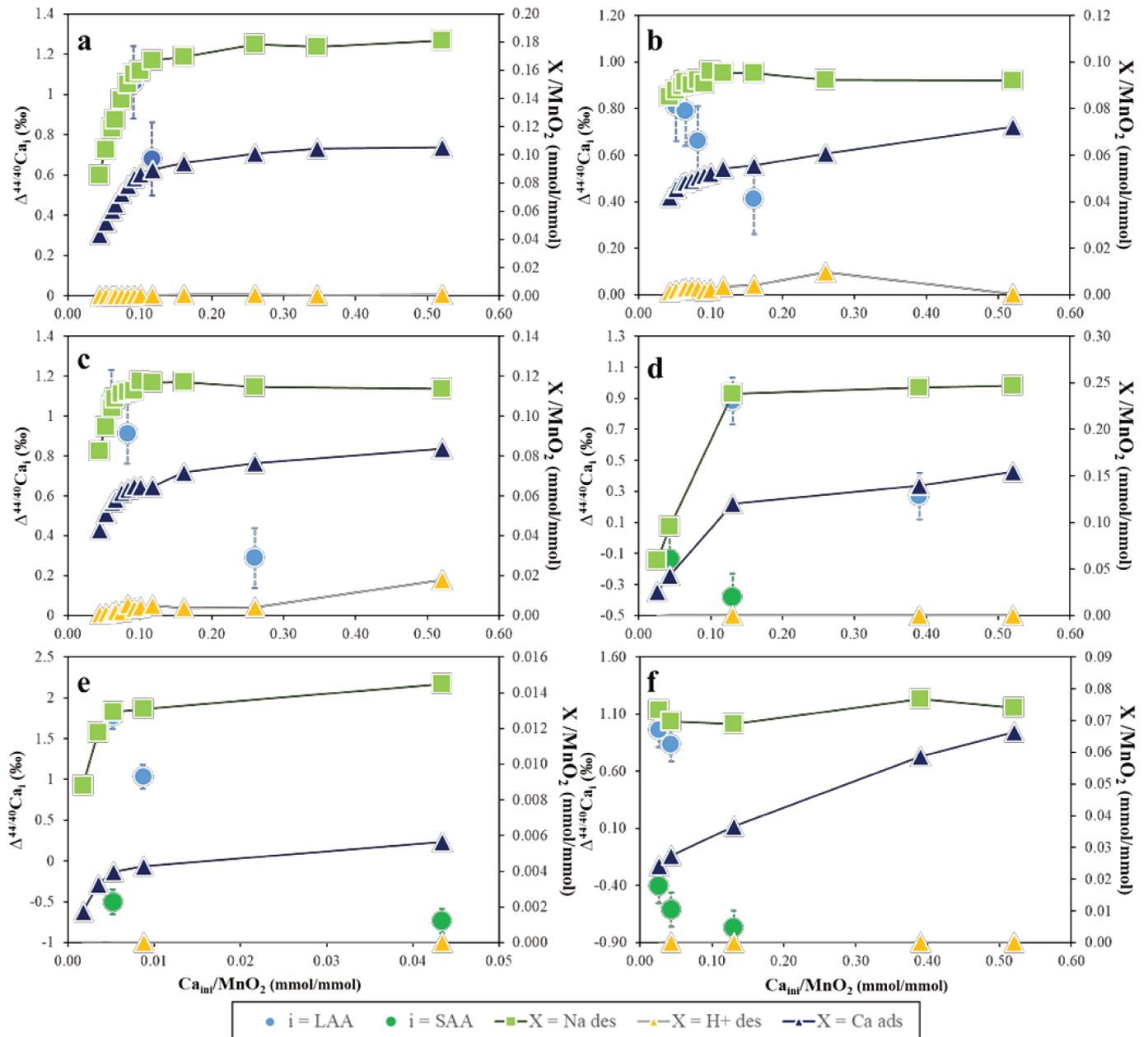


Figure 4-4 : Quantités de Ca adsorbé et Na ou H désorbés et fractionnements isotopiques en Ca associés lors des expérimentations d'adsorption en fonction de la concentration en Ca de la solution initiale à pH 7 et pour 125 min de temps de contact avec a) δ -MnO₂ A, b) δ -MnO₂ B, c) birnessite acide (1), d) birnessite (2) pH10, e) birnessite (3) pH4, f) MnO₂ bactériogénique. LAA = liquide après adsorption, SAA = solide après adsorption

On observe aussi pour certains solides une désorption d'autres éléments tels que le K⁺, le Mg²⁺ ou le Mn²⁺, bien qu'en quantité moins importantes que pour Na⁺ et H⁺ (globalement inférieur d'au moins deux ordres de grandeur). Pour certains échantillons de MnO₂ bactériogénique, la différence entre le Na désorbé et le Mn désorbé n'est que d'un ordre de grandeur (Tableau 4.6).

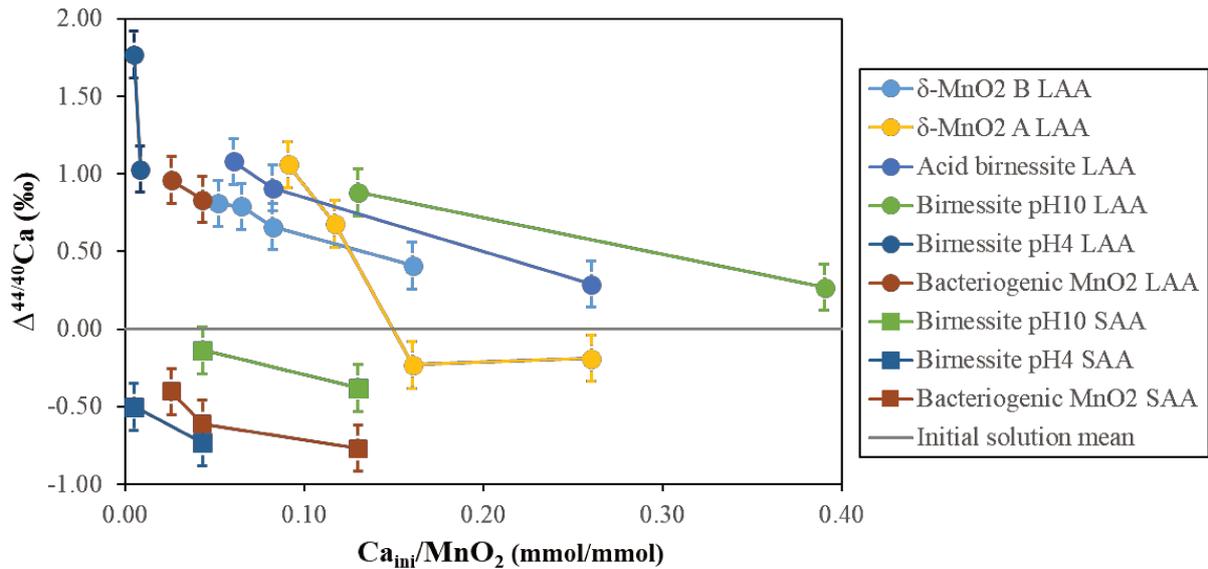


Figure 4-5 : Fractionnements isotopiques du Ca dans les surnageants et les solides, associés aux expérimentations d'adsorption en fonction de la concentration initiale en Ca de la solution. LAA = liquide après adsorption, LAD = liquide après désorption, SAA = solide après adsorption

4.3.2.b. Cinétiques d'adsorptions et de désorptions ($pH = 7$ et Ca_{ini}/MnO_2 fixées pour les différents solides)

Les résultats des expérimentations de cinétiques d'adsorption et de désorptions sont présentées dans les Tableaux 4.7 et 4.8.

Concernant les expérimentations d'adsorption, dans le cas de la *birnessite* (2) *pH10*, après 15 minutes de temps d'interaction, la quantité de Ca adsorbée se stabilise à $0,1224 \pm 0,0016$ mmol_{Ca}/mmol_{MnO₂} correspondant à $94,0 \pm 1,2\%$ de Ca adsorbé (2SE, N =5) (Fig. 4.6a). D'un point de vue isotopique, la valeur de $\Delta^{44/40}Ca_{LAA}$ atteint $0,88 \pm 0,03\%$ (2SE, N = 3) entre 10 et 120 minutes d'interaction mais s'enrichit en ⁴⁰Ca avec une valeur égale à $0,41 \pm 0,10\%$ (2SD, N = 2) après 24h de contact (Fig. 4.7a).

Dans le cas de la *birnessite* (3) *pH4*, après 65 minutes de temps d'interaction, la quantité de Ca adsorbée se stabilise à $0,0033 \pm 0,0001$ mmol_{Ca}/mmol_{MnO₂} correspondant à $96,3 \pm 3,7\%$ de Ca adsorbé (2SE, N = 3) (Fig. 4.6b). D'un point de vue isotopique, la valeur de $\Delta^{44/40}Ca_{LAA}$ atteint $1,19\%$ ($t = 15$ min) (Fig. 4.7a).

Tableau 4.7 : concentrations élémentaires et fractionnements isotopiques mesurées pour les cinétiques d'adsorptions. LAA = liquide après adsorption.

Références	Durée de contact (min)	pH initial	pH final	$\Delta H^{+}/MnO_2$ (mmol/mmol)	$C_{a_{ini}}/MnO_2$	$C_{a_{ads}}/MnO_2$ (%)	$C_{a_{ads}}/MnO_2$	Na^{+}_{des}/MnO_2	K^{+}_{des}/MnO_2 (mmol/mmol)	Mn_{des}/MnO_2	Mg_{des}/MnO_2	$\Delta^{44/40}Ca_{LAA}$ (‰)
<i>Birnessite (2) pH10</i>												
Birn pH10 Ca150 T0min	5	7,00	7,05	-3.78E-07	1.30E-01	52%	6.83E-02	1.59E-01	0.00E+00	4.85E-05	0.00E+00	0.47
Birn pH10 Ca150 T5min	10	7,00	7,04	-3.06E-07	1.30E-01	88%	1.15E-01	2.57E-01	0.00E+00	1.62E-05	2.42E-05	0.85
Birn pH10 Ca150 T10min	15	7,00	7,04	-3.06E-07	1.30E-01	86%	1.12E-01	2.55E-01	0.00E+00	2.32E-05	2.68E-05	0.91
Birn pH10 Ca150 T15min	20	7,00	7,01	-7.92E-08	1.30E-01	93%	1.21E-01	2.73E-01	0.00E+00	1.64E-05	2.44E-05	
Birn pH10 Ca150 T30min	35	7,00	7,06	-4.49E-07	1.30E-01	96%	1.24E-01	2.80E-01	0.00E+00	4.11E-06	2.02E-05	
Birn pH10 Ca150 T60min	65	7,00	7,06	-4.49E-07	1.30E-01	94%	1.23E-01	2.78E-01	0.00E+00	7.67E-06	1.76E-05	
Birn pH10 Ca150 T120min	125	7,00	6,91	8.01E-07	1.30E-01	92%	1.20E-01	2.38E-01	0.00E+00	5.37E-06	3.15E-05	0.88
Birn pH10 Ca150 T24h	1440	7,00	7,06	-4.49E-07	1.30E-01	95%	1.23E-01	2.78E-01	0.00E+00	1.04E-05	5.04E-05	0.40
<i>Birnessite (3) pH4</i>												
Birn pH4 Ca4 T0min	5	7,00	6,82	1.79E-06	3.47E-03	40%	1.39E-03	9.55E-03	0.00E+00	9.30E-07	0.00E+00	0.36
Birn pH4 Ca4 T5min	10	7,00	6,93	6.08E-07	3.47E-03	63%	2.20E-03	1.16E-02	0.00E+00	2.78E-06	0.00E+00	0.89
Birn pH4 Ca4 T10min	15	7,00	6,90	9.00E-07	3.47E-03	70%	2.42E-03	1.22E-02	0.00E+00	2.68E-06	0.00E+00	1.19
Birn pH4 Ca4 T15min	20	7,00	6,95	4.24E-07	3.47E-03	73%	2.54E-03	1.25E-02	0.00E+00	7.99E-07	0.00E+00	
Birn pH4 Ca4 T30min	35	7,00	6,96	3.36E-07	3.47E-03	87%	3.03E-03	1.38E-02	0.00E+00	3.84E-06	0.00E+00	
Birn pH4 Ca4 T60min	65	7,00	-	-	3.47E-03	94%	3.27E-03	1.39E-02	0.00E+00	7.93E-06	0.00E+00	0.00
Birn pH4 Ca4 T120min	125	7,00	7,15	-1.02E-06	3.47E-03	95%	3.28E-03	1.18E-02	1.20E-04	3.05E-05	2.98E-05	
Birn pH4 Ca4 T24h	1440	7,00	6,98	1.64E-07	3.47E-03	100%	3.47E-03	1.50E-02	0.00E+00	9.31E-05	0.00E+00	
<i>Bacteriogenic MnO2</i>												
MnO2 bio Ca30 T0min	5	7,00	7,01	-7.92E-08	2.82E-02	53%	1.48E-02	4.83E-02	0.00E+00	4.41E-04	8.98E-05	0.53
MnO2 bio Ca30 T5min	10	7,00	7,13	-9.00E-07	2.82E-02	81%	2.29E-02	6.91E-02	0.00E+00	3.61E-04	9.14E-05	1.03
MnO2 bio Ca30 T10min	15	7,00	7,18	-1.18E-06	2.82E-02	86%	2.44E-02	7.21E-02	0.00E+00	3.29E-04	1.03E-04	0.94
MnO2 bio Ca30 T15min	20	7,00	7,16	-1.07E-06	2.82E-02	90%	2.52E-02	7.65E-02	0.00E+00	3.19E-04	8.50E-05	
MnO2 bio Ca30 T30min	35	7,00	7,17	-1.13E-06	2.82E-02	90%	2.53E-02	7.51E-02	0.00E+00	2.92E-04	1.02E-04	
MnO2 bio Ca30 T60min	65	7,00	7,17	-1.13E-06	2.82E-02	92%	2.60E-02	7.74E-02	0.00E+00	2.91E-04	9.12E-05	
MnO2 bio Ca30 T120min	125	7,00	7,03	-2.32E-07	2.60E-02	93%	2.42E-02	7.34E-02	0.00E+00	2.98E-04	6.82E-05	0.96
MnO2 bio Ca30 T24h	1440	7,00	-	-	2.82E-02	95%	2.69E-02	8.44E-02	0.00E+00	6.97E-04	7.47E-05	1.02

Tableau 4.8 : concentrations élémentaires et fractionnements isotopiques mesurées pour les expérimentations de désorption. LAA = liquide après adsorption, LAD = liquide après désorption

Références	Durée de contact	$C_{\text{ami}}/\text{MnO}_2$	$C_{\text{LAA}}/\text{MnO}_2$	$C_{\text{ads}}/\text{MnO}_2$	$C_{\text{ads}}/\text{MnO}_2$	$C_{\text{LAD}}/\text{MnO}_2$	$C_{\text{LAD}}/\text{MnO}_2$	$N_{\text{des}}/\text{MnO}_2$	$M_{\text{des}}/\text{MnO}_2$	$\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{LAD}}$
	(h)	(mmol/mmol)			%	(mmol/mmol)	cumulated (%)	(mmol/mmol)		(‰)
<i>Birnessite (2) pH10</i>										
Birn pH10 Ca150ppm T0min	2	0.1302	0.0619	0.0683	52%	0.0293	86%	0.0377	0.0000	-0.35
"	24	"	"	"	"	0.0087	100%	0.0157	0.0000	
Birn pH10 Ca150ppm T5min	2	"	0.0156	0.1145	88%	0.0508	89%	0.0323	0.0000	-0.37
"	24	"	"	"	"	0.0141	100%	0.0018	0.0000	
Birn pH10 Ca150ppm T10min	2	"	0.0180	0.1122	86%	0.0507	90%	0.0172	0.0000	-0.34
"	24	"	"	"	"	0.0103	100%	0.0003	0.0000	
Birn pH10 Ca150ppm T15min	2	"	0.0092	0.1209	93%	0.0540	89%	0.0160	0.0000	-0.35
"	24	"	"	"	"	0.0110	100%	0.0003	0.0000	
Birn pH10 Ca150ppm T30min	2	"	0.0058	0.1243	96%	0.0543	87%	0.0271	0.0000	
"	24	"	"	"	"	0.0151	100%	0.0008	0.0000	
Birn pH10 Ca150ppm T60min	2	"	0.0072	0.1230	94%	0.0552	90%	0.0109	0.0000	
"	24	"	"	"	"	0.0114	100%	0.0001	0.0000	
Birn pH10 Ca150ppm T120min	2	"	0.0100	0.1201	92%	0.0529	88%	0.0063	0.0000	
"	24	"	"	"	"	0.0125	99%	0.0000	0.0000	
Birn pH10 Ca150ppm T24h	2	"	0.0067	0.1235	95%	0.0528	85%	0.0225	0.0000	-0.27
"	24	"	"	"	"	0.0140	100%	0.0008	0.0000	
<i>Birnessite (3) pH4</i>										
Birn pH4 Ca4ppm T0min	2	0.0035	0.0021	0.0014	40%	0.0002	11%	0.0198	0.0000	
"	48	"	"	"	"	0.0001	15%	0.0103	0.0000	
"	72	"	"	"	"	0.0000	15%	0.0013	0.0000	
"	96	"	"	"	"	0.0000	15%	0.0001	0.0000	
Birn pH4 Ca4ppm T5min	2	"	0.0013	0.0022	63%	0.0003	13%	0.0185	0.0000	
"	48	"	"	"	"	0.0001	16%	0.0101	0.0000	
"	72	"	"	"	"	0.0000	16%	0.0013	0.0000	
"	96	"	"	"	"	0.0000	16%	0.0000	0.0000	

Birn pH4 Ca4ppm T10min	2	"	0.0011	0.0024	70%	0.0003	14%	0.0177	0.0000
"	48	"	"	"	"	0.0001	17%	0.0100	0.0000
"	72	"	"	"	"	0.0000	17%	0.0012	0.0000
"	96	"	"	"	"	0.0000	17%	0.0000	0.0000
Birn pH4 Ca4ppm T15min	2	"	0.0009	0.0025	73%	0.0005	18%	0.0200	0.0000
"	48	"	"	"	"	0.0001	22%	0.0096	0.0000
"	72	"	"	"	"	0.0000	22%	0.0011	0.0000
"	96	"	"	"	"	0.0000	22%	0.0000	0.0000
Birn pH4 Ca4ppm T30min	2	"	0.0004	0.0030	87%	0.0004	14%	0.0179	0.0000
"	48	"	"	"	"	0.0001	18%	0.0099	0.0000
"	72	"	"	"	"	0.0000	18%	0.0013	0.0000
"	96	"	"	"	"	0.0000	18%	0.0001	0.0000
Birn pH4 Ca4ppm T60min	2	"	0.0002	0.0033	94%	0.0004	14%	0.0162	0.0000
"	48	"	"	"	"	0.0002	18%	0.0096	0.0000
"	72	"	"	"	"	0.0000	18%	0.0013	0.0000
"	96	"	"	"	"	0.0000	19%	0.0000	0.0000
Birn pH4 Ca4ppm T120min	2	"	0.0002	0.0033	95%	0.0003	10%	0.0122	0.0000
"	48	"	"	"	"	0.0001	13%	0.0075	0.0000
"	72	"	"	"	"	0.0000	13%	0.0005	0.0000
"	96	"	"	"	"	0.0000	15%	0.0000	0.0000
Birn pH4 Ca4ppm T24h	2	"	0.0000	0.0035	100%	0.0005	15%	0.0156	0.0000
"	48	"	"	"	"	0.0002	21%	0.0099	0.0000
"	72	"	"	"	"	0.0000	21%	0.0012	0.0000
"	96	"	"	"	"	0.0001	22%	0.0000	0.0000

Bacteriogenic MnO2

MnO2 bio Ca30ppm T0min	2	0.0282	0.0134	0.0148	53%	0.0111	75%	0.0306	0.0140	-0.2
MnO2 bio Ca30ppm T5min	2	"	0.0053	0.0229	81%	0.0163	71%	0.0172	0.0128	0.00
MnO2 bio Ca30ppm T10min	2	"	0.0038	0.0244	86%	0.0193	79%	0.0182	0.0152	0.11
MnO2 bio Ca30ppm T15min	2	"	0.0030	0.0252	90%	0.0197	78%	0.0173	0.0164	0.02
MnO2 bio Ca30ppm T30min	2	"	0.0029	0.0253	90%	0.0203	80%	0.0143	0.0150	0.02
MnO2 bio Ca30ppm T60min	2	"	0.0022	0.0260	92%	0.0197	76%	0.0141	0.0160	
MnO2 bio Ca30ppm T24h	2	"	0.0040	0.0242	93%	0.0219	100%	0.0134	0.0170	

Dans le cas du *MnO₂ bacteriogénique*, après 15 minutes de temps d'interaction, la quantité de Ca adsorbée se stabilise à $0,0253 \pm 0,0008$ mmol_{Ca}/mmol_{MnO₂} correspondant à $91,0 \pm 2,5\%$ de Ca adsorbé (2SE, N =6) (Fig. 4.6c). D'un point de vue isotopique, la valeur de $\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{LAA}}$ semble se stabiliser à $0,99 \pm 0,04\text{‰}$ (2SE, N = 4) à partir de 10 minutes d'interaction (Fig. 4.7a).

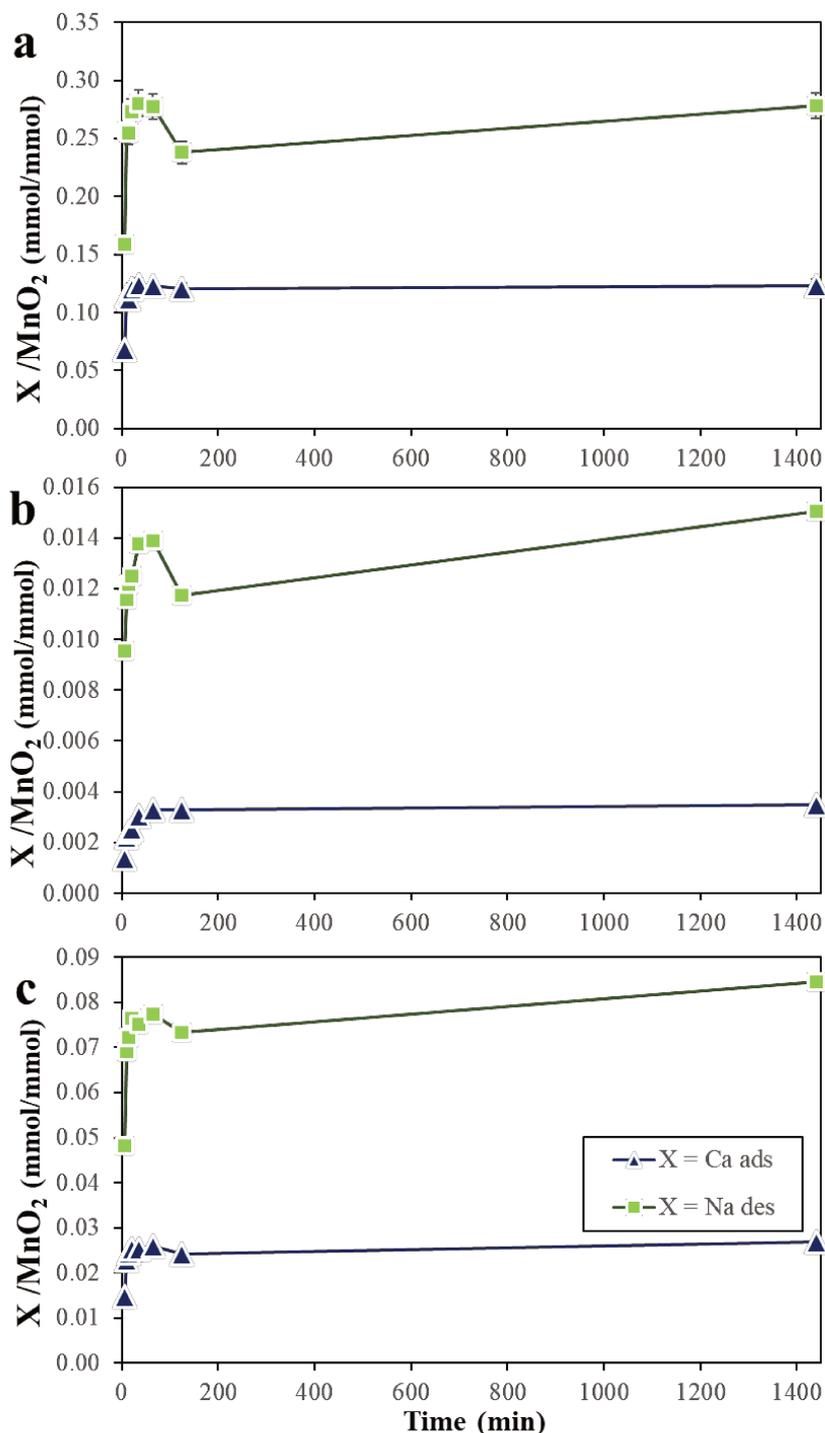


Figure 4-6 : Quantité de Ca adsorbée et de Na désorbée en mmol/mmol_{MnO₂} pour les expérimentations de cinétiques pour a) la birnessite (2) pH10, b) la birnessite (3) pH4 et c) le MnO₂ bactériogénique.

Concernant les expérimentations de désorption, une première série de désorptions d'une durée de 2h a été réalisée pour l'ensemble des échantillons issus des expérimentations de

cinétiques d'adsorptions, avec un rapport liquide/solide identique. D'autres séries de désorptions ont ensuite été réalisées sur les trois différents solides concernés en fonction de la quantité de Ca non désorbée lors de la première tentative. Dans le cas de la *birnessite* (2) pH10, peu importe la quantité de Ca adsorbé dans les différents échantillons, la proportion de Ca désorbée est relativement similaire et équivaut à $88,2 \pm 1,3\%$ du Ca initialement adsorbé (2SE, N = 8) (Figure 4.7b et 4.8a).

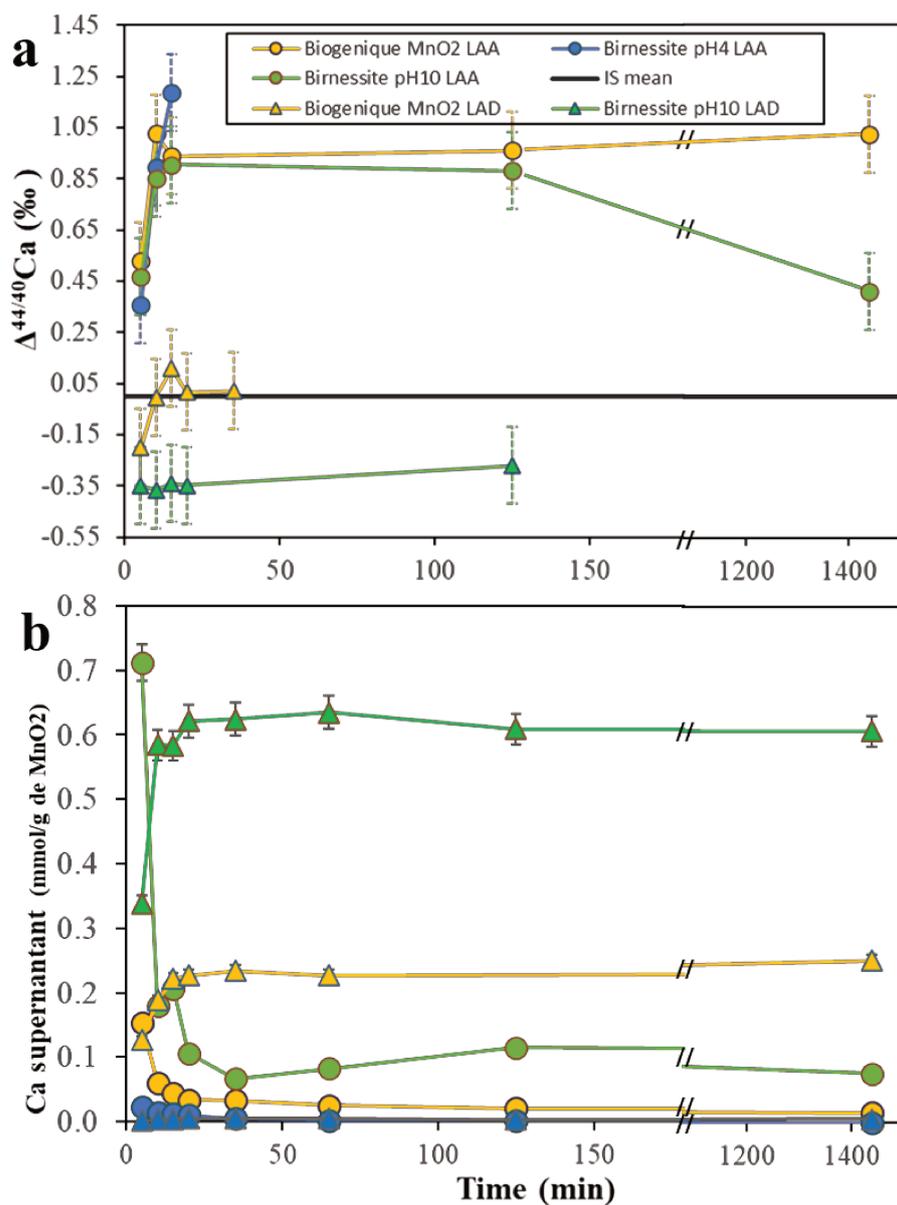


Figure 4-7 : (a) Fractionnements isotopiques lors des cinétiques d'adsorption et de désorption (2h de contact avec le désorbant) et (b) quantités de Ca dans le surnageant des échantillons correspondants. LAA = liquide après adsorption, LAD = liquide après désorption

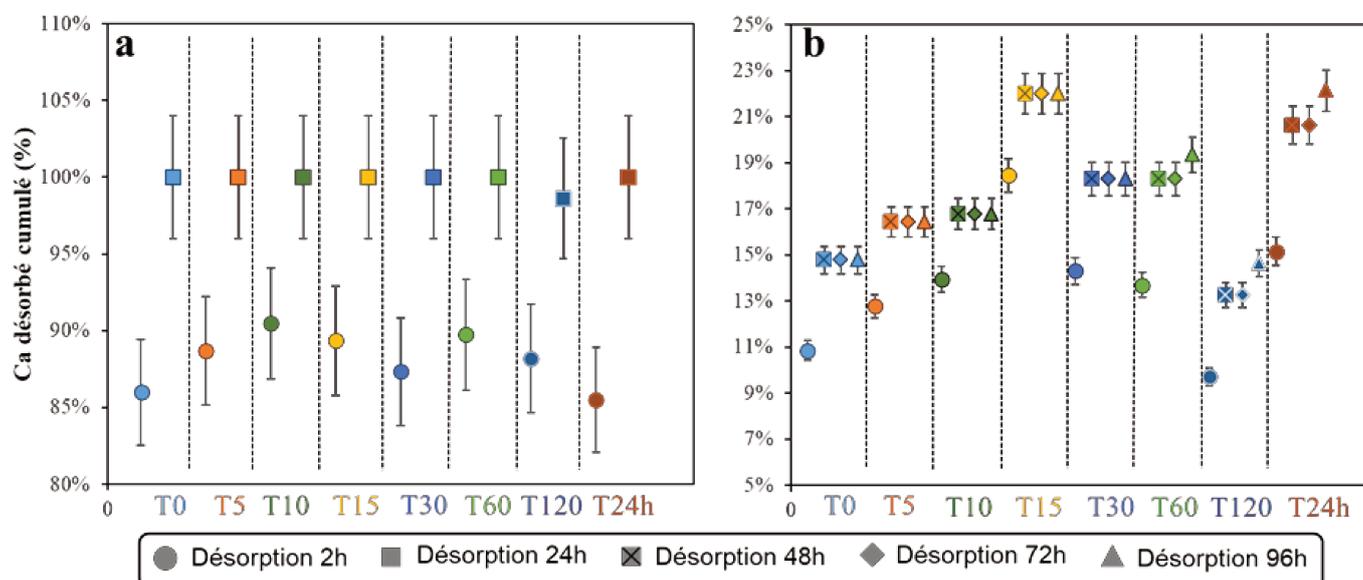
Une deuxième désorption d'une durée de 24h a été réalisée sur cette série d'échantillons, amenant la proportion de Ca désorbée cumulé à $99,8 \pm 0,3\%$ du Ca initialement adsorbé (2SE,

N = 8) (Figure 4.8a à rajouter). On peut détecter du Na désorbé pour les deux cycles de désorptions (2h et 24h). On observe pour la série de désorption de 2h $0,0213 \pm 0,0076$ mmol_{Na}/mmol_{MnO₂}. En revanche, pour la série de désorption de 24h, les quantités de Na détectées sont négligeables (environs deux ordres de grandeur de différence) hormis pour l'échantillon *Birn pH10 Ca150ppm T0min* présentant une quantité de Na désorbée de $0,0157$ mmol_{Na}/mmol_{MnO₂}. D'un point de vue isotopique, les surnageants issus de la première série de désorption (2h) présentent une valeur de $-0,33 \pm 0,03\text{‰}$ (2SE, N = 5), soit un écart à la valeur moyenne des trois surnageants issus de l'adsorption de $1,21\text{‰}$ (Figure 4.7a). Toutefois, pour l'échantillon *Birn pH4 Ca4ppm T24h*, la valeur du surnageant après désorption ($-0,27\text{‰}$) est similaire à celles des autres échantillons tandis que la valeur du surnageant correspondant après adsorption est de $0,41\text{‰} \pm 0,03\text{‰}$ (2SE, N = 2), soit un écart entre les deux valeurs de seulement $0,68\text{‰}$.

Dans le cas de la *birnessite (3) pH4*, peu importe la quantité de Ca adsorbée dans les différents échantillons, la proportion de Ca désorbée est relativement similaire et équivaut à $13,6 \pm 1,9\%$ du Ca initialement adsorbé (2SE, N = 8) (Figure 4.7b). Trois séries de désorption d'une durée de 48h, 72h et 96h ont ensuite été réalisées sur cette série d'échantillons, amenant la proportion de Ca désorbée cumulée à $17,6 \pm 2,0\%$ du Ca initialement adsorbé (2SE, N = 8) pour les désorptions de 48 et 72h, et à $18,0 \pm 2,1\%$ après la désorption de 96h (2SE, N = 8) (Figure 4.8b à rajouter). Etant donné ces résultats, on peut considérer qu'après la deuxième désorption d'une durée de 48h, il n'y a plus de désorption de Ca. On peut toutefois détecter du Na désorbé jusqu'au cycle de désorption de 72h. On observe pour les désorptions de 2h, 48h et 72h respectivement $0,0172 \pm 0,0018$, $0,0096 \pm 0,006$ et $0,0012 \pm 0,0002$ mmol_{Na}/mmol_{MnO₂} (2SE, N = 8) (Tableau 4.8). Il n'a pas été possible d'analyser isotopiquement les surnageants issus des expérimentations de désorption sur la *birnessite (3) pH4* du fait de la trop faible concentration en Ca de ceux-ci, impliquant la nécessité d'évaporer un trop grand volume d'échantillon. Chose rendue impossible par la trop grande quantité de cobalt hexamine, ne permettant pas d'effectuer la procédure de chimie purificatrice sur colonne dans nos conditions, les échantillons séchés devant être remis en solution dans un faible volume de HNO₃ 2N avant de pouvoir être purifiés.

Dans le cas du *MnO₂ bactériogénique*, peu importe la quantité de Ca adsorbée dans les différents échantillons, la proportion de Ca désorbé est relativement similaire et équivaut à $96,3 \pm 3,1\%$ du Ca initialement adsorbé (2SE, N = 7) (Figure 4.7b). On observe pour la série de désorption effectuée (2h) une moyenne de Na désorbé de $0,0179 \pm 0,0045$ mmol_{Na}/mmol_{MnO₂}

(2SE, N = 7). D'un point de vue isotopique, les surnageants issus de la désorption (2h) évoluent d'une valeur de $-0,2\text{‰}$ pour l'échantillon *MnO2 bio Ca30ppm T0min* à une valeur moyenne de



$0,04 \pm 0,05\text{‰}$ (2SE, N = 4) pour les échantillons *T5min*, *T10min*, *T15min* et *T30min* (Figure 4.7a).

Figure 4-8 : Désorption cumulée du Ca pour (a) la *birnessite (2) pH10* et (b) la *birnessite (3) pH4*. Les désorptions sont effectuées à partir des culots issus des expérimentations de cinétiques d'adsorption.

4.3.2.c. Expérimentations d'adsorption en fonction du pH de la solution initiale (Ca_{ini}/MnO_2 fixées pour les différents solides et temps d'interaction de 125 minutes)

Les résultats des analyses élémentaires et isotopiques des expérimentations d'adsorption en fonction du pH initial sont présentés dans le Tableau 4.9 et la figure 4.9.

Dans le cas de la *birnessite (2) pH10*, pour les solutions dont le pH initial varie de 2 à 4, la quantité de Ca adsorbée évolue de 0,0346 à 0,1204 $mmol_{Ca}/mmol_{MnO_2}$ puis se stabilise autour de $0,1201 \pm 0,0009$ $mmol_{Ca}/mmol_{MnO_2}$ (2SE, N = 4) entre pH 4 et 8. En parallèle, le pH après adsorption augmente pour les solutions dont le pH initial va de 2 à 6, et diminue pour les solutions dont le pH initial est de 7 et 8. Ceci correspond à une adsorption de H^+ variant de 0,3471 $mmol_H/mmole_{MnO_2}$ ($pH_{initial} = 2$) à $2,35 \cdot 10^{-5}$ $mmol_H/mmole_{MnO_2}$ ($pH_{initial} = 6$). Pour les solutions dont le pH initial est de 7 et 8, la désorption de H^+ est quasiment nulle (Tableau 4.9).

Tableau 4.9 : concentrations élémentaires et fractionnements isotopiques mesurées pour les expérimentations en fonction du pH initial de la solution. LAA = liquide après adsorption

Références	Durée de contact (min)	pH initial	pH final	Δ H+/MnO2 (mmol/mmol)	Ca _{ini} /MnO2	Ca _{ads} /MnO2 (%)	Ca _{ads} /MnO2	Na _{+des} /MnO2	K _{+des} /MnO2 (mmol/mmol)	Mn _{des} /MnO2	Mg _{des} /MnO2	$\Delta^{44/40}$ Ca _{LAA} (‰)
<i>Birnessite (2) pH10</i>												
Birn pH10 Ca150 pH2	125	2.00	4.76	-3.47E-01	1.30E-01	21%	3.46E-02	2.94E-01	0.00E+00	6.57E-03	0.00E+00	
Birn pH10 Ca150 pH3	125	3.00	5.28	-3.46E-02	1.30E-01	78%	1.04E-01	2.47E-01	0.00E+00	1.03E-04	0.00E+00	0.86
Birn pH10 Ca150 pH4	125	4.00	5.85	-3.43E-03	1.30E-01	92%	1.20E-01	2.89E-01	0.00E+00	4.86E-05	0.00E+00	0.45
Birn pH10 Ca150 pH6	125	6.00	6.49	-2.35E-05	1.30E-01	90%	1.19E-01	3.11E-01	0.00E+00	7.38E-06	0.00E+00	
Birn pH10 Ca150	125	7.00	6.91	8.01E-07	1.30E-01	92%	1.20E-01	2.38E-01	0.00E+00	5.37E-06	3.15E-05	0.88
Birn pH10 Ca150 pH8	125	8.00	7.41	1.01E-06	1.30E-01	92%	1.21E-01	2.71E-01	0.00E+00	3.05E-05	0.00E+00	
<i>Birnessite (3) pH4</i>												
Birn pH4 Ca4 pH2	125	2.00	2.24	-1.48E-01	3.47E-03	8%	2.65E-04	5.20E-02	0.00E+00	1.34E-02	0.00E+00	
Birn pH4 Ca4 pH3	125	3.00	4.79	-3.42E-02	3.47E-03	26%	8.86E-04	3.62E-02	0.00E+00	8.74E-04	0.00E+00	0.43
Birn pH4 Ca4 pH4	125	4.00	6.30	-3.46E-03	3.47E-03	75%	2.61E-03	2.57E-02	0.00E+00	2.46E-06	0.00E+00	1.66
Birn pH4 Ca4 pH6	125	6.00	6.74	-2.84E-05	3.47E-03	91%	3.17E-03	2.01E-02	0.00E+00	3.08E-06	0.00E+00	
Birn pH4 Ca4	125	7.00	7.15	-1.02E-06	3.47E-03	95%	3.28E-03	1.18E-02	1.20E-04	3.05E-05	2.98E-05	
Birn pH4 Ca4 pH8	125	8.00	7.60	5.26E-07	3.47E-03	94%	3.26E-03	1.90E-02	0.00E+00	6.08E-06	0.00E+00	
<i>Bacteriogenic MnO2</i>												
MnO2 bio Ca30 pH2	125	2.00	2.65	-2.70E-01	2.78E-02	6%	1.62E-03	8.13E-02	0.00E+00	5.38E-02	0.00E+00	-0.15
MnO2 bio Ca30 T120min	125	7.00	7.03	-2.32E-07	2.60E-02	93%	2.42E-02	7.34E-02	0.00E+00	2.98E-04	6.82E-05	0.96

Concernant la quantité de Na désorbée, celle-ci vaut en moyenne $0,2758 \pm 0,0281$ $\text{mmol}_{\text{Na}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$ entre pH 2 et 7 (2SE, N = 5) mais chute à $0,0118$ $\text{mmol}_{\text{Na}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$ à pH 8. On observe aussi pour la solution à $\text{pH}_{\text{initial}} = 2$ une désorption de Mn de $0,0066$ $\text{mmol}_{\text{Mn}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$. D'un point de vue isotopique, les valeurs de $\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{LAA}}$ ne semblent pas indiquer de tendances et les points de mesure à pH 3 et 4 nécessiteraient d'être dupliqués afin de s'assurer de la justesse des mesures précédentes. Les valeurs actuelles indiquent un enrichissement en ^{44}Ca à pH 3, 4 et 7 de respectivement 0,86, 0,45 et 0,88‰ (Figure 4.9d).

Dans le cas de la *birnessite (3) pH4*, pour les solutions dont le pH initial varie de 2 à 6, la quantité de Ca adsorbée évolue de $0,0003$ à $0,0032$ $\text{mmol}_{\text{Ca}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$ puis se stabilise autour de $0,0032 \pm 0,0001$ $\text{mmol}_{\text{Ca}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$ (2SE, N = 3) entre pH 6 et 8. En parallèle, le pH après adsorption augmente pour les solutions dont le pH initial va de 2 à 7, et diminue pour la solution dont le pH initial est de 8. Ce qui correspond à une adsorption de H^+ variant de $0,1476$ $\text{mmol}_{\text{H}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$ ($\text{pH}_{\text{initial}} = 2$) à quasiment zéro ($\text{pH}_{\text{initial}} = 7$) (Tableau 4.9). Pour la solution à $\text{pH}_{\text{initial}} = 8$, la désorption de H^+ est quasiment nulle (Tableau 4.9). Concernant la quantité de Na désorbé, celle-ci diminue de $0,0520$ à $0,0201$ $\text{mmol}_{\text{Na}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$ entre pH 2 et 6 et se stabilise autour de $0,0169 \pm 0,0052$ $\text{mmol}_{\text{Na}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$ entre pH 6 et 8 (2SE, N = 3). On observe aussi pour la solution à $\text{pH}_{\text{initial}} = 2$ une désorption de Mn de $0,0134$ $\text{mmol}_{\text{Mn}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$. D'un point de vue isotopique, les valeurs de $\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{LAA}}$ semblent indiquer une tendance entre pH 2 et 4 avec une évolution de $\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{LAA}}$ de $-0,19$ à $1,66$ ‰. Les valeurs actuelles indiquent un enrichissement en ^{44}Ca à pH 3, 4 et 7 de respectivement 0,86, 0,45 et 0,88‰ (Figure 4.9d).

Dans le cas du *MnO₂ bactériogénique*, il n'a pas été possible d'expérimenter plus de deux valeurs de pH initial différentes. On observe ainsi entre pH 2 et pH 7 une valeur de Ca adsorbée de respectivement $0,0016$ et $0,0242$ $\text{mmol}_{\text{Ca}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$. En parallèle, la solution qui était à pH 2 avant adsorption passe à pH 2,65 après adsorption, ce qui correspond à une adsorption de H^+ de $0,2699$ $\text{mmol}_{\text{H}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$ tandis que celle qui était à 7 ne présente pas d'évolution significative (7,03). Concernant la quantité de Na désorbée, celle-ci diminue de $0,0813$ à $0,0734$ $\text{mmol}_{\text{Na}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$ entre pH 2 et 7 ce qui représente une évolution relativement faible mais plus de mesures seraient nécessaires pour établir une tendance. On observe aussi pour la solution à $\text{pH}_{\text{initial}} = 2$ une désorption de Mn de $0,0538$ $\text{mmol}_{\text{Mn}}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$, ce qui représente une quantité de Mn désorbé plus de quatre fois supérieure à celle désorbée à pH 2 pour la *birnessite (3) pH4*. D'un point de vue isotopique, les valeurs de $\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{LAA}}$ varient de $-0,15$ à $0,96$ ‰ entre pH 2 et 7 (Figure 4.9d).

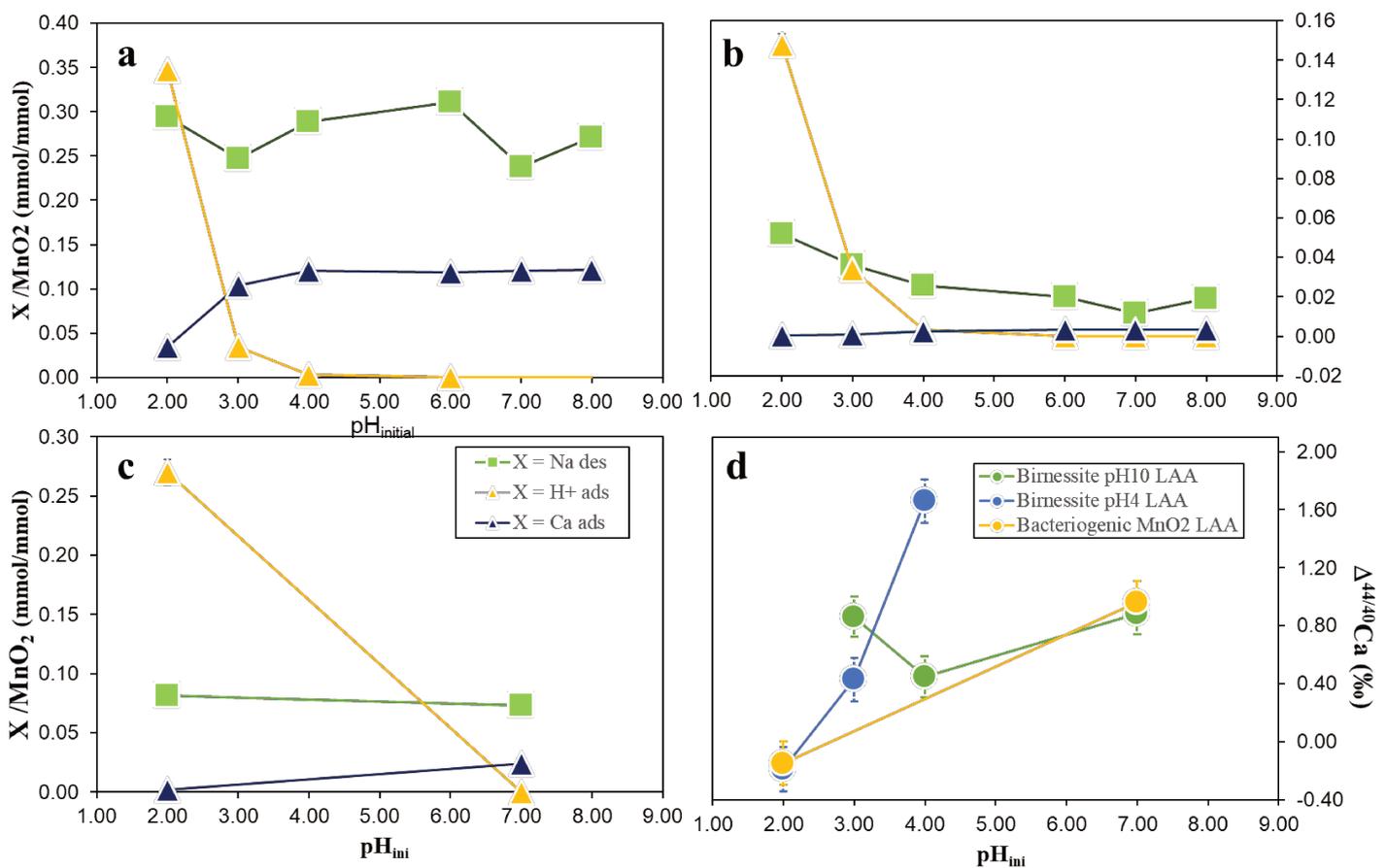


Figure 4-9 : Quantité de Ca^{2+} adsorbée et de Na^+ ou H^+ désorbée en $\text{mmol}/\text{mmol}_{\text{MnO}_2}$ pour les expérimentations en fonction du pH initial pour a) la birnessite (2) pH10, b) la birnessite (3) pH4 et c) le MnO_2 bactériogénique et fractionnement isotopique associé (d). LAA = liquide après adsorption

4.4. Discussion

4.4.1. Distinctions structurales des échantillons étudiés

Les différentes caractérisations des échantillons permettent de distinguer deux catégories selon leur niveau de cristallinité. On distingue ainsi les solides mal cristallisés : $\delta\text{-MnO}_2$ A et B, birnessite acide (1) et MnO_2 bactériogénique et les solides bien cristallisés : birnessites (2) pH10 et (3) pH4. Il est intéressant de noter que l'échantillon de birnessite acide (1) avait été synthétisé dans l'optique d'obtenir un solide bien cristallisé, en opposition avec les échantillons de $\delta\text{-MnO}_2$ A et B. En effet, comme cela a été discuté dans le chapitre Matériel et Méthode de ce manuscrit, le $\delta\text{-MnO}_2$ est un équivalent synthétique de la vernadite (correspondant au MnO_2 bactériogénique étudié ici) qui est une version mal cristallisée turbostratique de la birnessite. Il s'avère finalement que cette birnessite, synthétisée d'après le protocole de Villalobos et al.

(2003), présente une structure faiblement cristallisée et se rapproche des échantillons de δ - MnO_2 . Toutefois, d'après les analyses DRX elle est mieux cristallisée que ceux-ci, ce qui est en accord avec sa surface spécifique inférieure à celle de ces derniers (62 m²/g contre respectivement 117 et 205 m²/g pour les δ - MnO_2 A et B) ainsi qu'avec les images obtenues au MEB présentant des particules plus grandes. Les images obtenues au MEB indiquent aussi de plus gros agrégats, pouvant aussi expliquer une valeur de surface spécifique inférieure. En revanche, malgré cette caractéristique, sa CEC présente une valeur intermédiaire à ceux des deux minéraux de δ - MnO_2 (172 meq/100g contre respectivement 205 et 123 meq/100g pour δ - MnO_2 A et B). Le MnO_2 bactériogénique présente quant à lui une CEC similaire à celle du δ - MnO_2 B (respectivement 137 et 123 meq/100g) alors que sa surface spécifique est beaucoup plus proche de celle du δ - MnO_2 A (respectivement 100 et 117 m²/g, celle du δ - MnO_2 B valant 205 m²/g). En comparaison, le δ - MnO_2 de **Schmitt et al. (2023)** présentait une CEC de 215 méq/100g pour une surface spécifique de 27,6 m²/g (Tableau 4.5) tout en présentant un faible niveau de cristallinité d'après les analyses DRX (Schmitt et al., 2023). L'ensemble de ces spécificités permet d'appuyer l'absence de corrélation entre les variations de surface spécifique et celles de la CEC des échantillons. De plus, concernant les échantillons de δ - MnO_2 A et B, on constate une similitude entre les échantillons synthétisés dans cette étude et les échantillons correspondants dans Marafatto et al. (2018). En effet, l'échantillon δ - MnO_2 A synthétisé avec une concentration en NaOH plus importante (NaOH = 0.6 N) et présentant un rapport Na^+/Mn_{total} de 0,265 et une surface spécifique de 117 m²/g correspond à l'échantillon de Marafatto et al. (2018) présentant un rapport Na^+/Mn_{total} de 0,351 et une surface spécifique de 119 m²/g tandis que l'échantillon δ - MnO_2 B (NaOH = 0.4N) présentant un rapport Na^+/Mn_{total} de 0,142 et une surface spécifique de 205 m²/g correspond à l'échantillon présentant un rapport Na^+/Mn_{total} de 0,161 et une surface spécifique de 196 m²/g. Il a par ailleurs été observé dans Marafatto et al. (2018) que la synthèse ou le conditionnement du δ - MnO_2 à un pH moins élevé favorise l'augmentation de la taille des cristaux, du fait de la formation de ponts H⁺ au niveau des sites de bordures du minéral, et que ce phénomène serait irréversible. En parallèle, l'augmentation du pH et de la présence de cations tels que le Na lors de la synthèse ou du conditionnement du δ - MnO_2 favoriserait l'agrégation des particules, permettant ainsi la formation de plus gros agrégats, et induisant une surface spécifique plus faible pour les solides. Ce phénomène est en revanche réversible (Marafatto et al., 2018). Il découle de ces deux informations que bien que l'on pourrait s'attendre à une diminution de la surface spécifique avec une diminution du pH et une augmentation de la taille des particules, l'agrégation aussi

contrôle la valeur de la surface spécifique. Cette agrégation étant elle aussi influencée par le pH et la quantité de Na, cela explique l'absence de corrélation entre CEC et surface spécifique.

Pour leur part, les échantillons bien cristallisés, les *birnessites* (2) *pH10* et (3) *pH4* tels que l'attestent les résultats au MEB (Figure 4.2) et au DRX (Figure 4.3), présentent une faible valeur de surface spécifique (respectivement 16 et 13 m²/g). En revanche, en plus de se distinguer des autres échantillons, ces deux échantillons se distinguent aussi l'un de l'autre du fait de la variabilité de leur CEC. En effet, malgré des valeurs de surface spécifique très faibles et très similaires, la *birnessite* (2) *pH10* présente la CEC la plus importante de cette étude (208 meq/100g) et la *birnessite* (3) *pH4* présente quant à elle la CEC la plus faible (34 meq/100g). Là aussi cela met en avant la décorrélacion entre surface spécifique et CEC.

Un autre paramètre permettant une distinction entre les échantillons est la quantité de lacunes et/ou de substitutions dans la structure des échantillons. Le δ -*MnO2* A, la *birnessite* (1) présentent dans leur structure à la fois des substitutions de Mn^{IV} par du Mn^{III} et des lacunes tandis que le *MnO2* bactériogénique ne présente que des lacunes, étant donné qu'aucun Mn^{III} n'intervient lors de sa synthèse par *P. putida* GB1, qui oxyde le Mn^{II} directement en Mn^{IV} (Geszvain et al., 2013). Il en découle que la charge structurale de ces trois solides est totalement ou partiellement liée à la présence de lacunes et non à des substitutions de Mn^{IV} par du Mn^{III}. En opposition avec ces solides, le δ -*MnO2* B et les deux *birnessites* (2) *pH10* et (3) *pH4* ne présentent pas de lacunes dans leurs structures, ce qui se traduit notamment pour les deux *birnessites* (2) *pH10* et (3) *pH4* par un degré d'oxydation bien inférieur à celui des autres échantillons (respectivement 3,55 et 3,67 pour les *birnessites* (2) *pH10* et (3) *pH4*) (Tableau 4.3). Cela signifie par ailleurs que leurs charges structurales respectives sont uniquement dues à des substitutions de Mn^{IV} par du Mn^{III}. Pour la *birnessite* (2) *pH10*, cela est cohérent avec **Villalobos et al. (2003)** qui indique l'absence de lacunes dans la formule structurale de la Na-*birnessite*. En revanche, Grangeon et al. (2014) présentent des *birnessites* comprenant des lacunes, et notamment lorsqu'elles sont acidifiées. La présence de H⁺ peut perturber la structure du solide, ce qui mêlé à la disproportionnalité du Mn^{III} induit par l'effet de Jahn-Teller (les faisant passer d'une forme hexagonale à une forme octaédrique) favorise la migration du Mn^{III} du feuillet vers l'interfoliaire, au-dessus des lacunes ainsi formées (Dritz et al., Manceau et al., Silvester et al., 1997, Lanson et al., 2000, Grangeon et al., 2014). Ce phénomène de migration du Mn^{III} vers l'interfoliaire existe aussi à pH élevé et s'accroît avec le vieillissement du solide, jusqu'à ce que sa structure tende vers un état d'équilibre, mais cet effet est favorisé à pH acide (Grangeon et al., 2014). Or, comme déjà évoqué, les *birnessites* (2) *pH10* et (3) *pH4* comportent

beaucoup de Mn^{III} dans leurs structures. On peut ainsi émettre l'hypothèse que dans notre étude, le Mn^{III} passe du feuillet à l'interfoliaire, au-dessus des lacunes, compensent ainsi trois charges sur les quatre induites normalement par une lacune, la dernière charge pouvant être compensée par un H^+ ou un Na^+ , et que ce phénomène est d'autant plus important pour la *birnessite* (3) acidifiée à pH 4. Cela expliquerait l'équation structurale obtenue après application du système d'équation modifié d'après Gaillot (2004) (voir 4.3.1.c). Cette configuration pourrait aussi engendrer un encombrement stérique (Grangeon et al., 2014) rendant l'accès à l'interfoliaire plus difficile pour les cations et notamment les cations hydratés tels que le Ca. La diversité de ces spécificités propres à chacun des minéraux étudiés permettra de caractériser l'importance de chaque paramètre dans le fractionnement du Ca.

4.4.2. Caractérisation élémentaire

La première observation qui peut être faite concernant l'adsorption élémentaire du Ca est le lien existant entre la CEC et la proportion de Ca adsorbée (Tableau 4.5), mais aussi entre le Ca adsorbé et la proportion d'éléments désorbés (Figures 4.4, 4.5 et 4.8). Ceci est un résultat prévisible, la CEC représentant la quantité de cations échangeables, et donc indirectement la quantité de sites d'adsorption possiblement disponibles pour le Ca. Ainsi, c'est bien la *birnessite* (2) *pH10* qui présente le plus haut rapport de Ca adsorbé par quantité de MnO_2 , suivie du δ -*MnO2 A*, de la *birnessite* acide (1), du δ -*MnO2 B*, du *MnO2 bactériogénique*, et enfin de la *birnessite* (3) *pH4* (Tableau 4.5). Si l'on représente graphiquement le pourcentage de Ca adsorbé en fonction de la quantité de Ca dans la solution initiale (à pH 7 pour 125 min de contact) (Figure 4.10), on constate en effet que les courbes des deux *birnessites* (2) *pH10* et (3) *pH4* « encadrent » celles des quatre autres échantillons. On constate par ailleurs que la courbe du *MnO2 bactériogénique* présente une allure qui se rapproche de celle du δ -*MnO2 B* (Figure 4.10). Toutefois, la CEC du *MnO2 bactériogénique* est légèrement supérieure à celle du δ -*MnO2 B* (respectivement 137 et 123 meq/100g) mais c'est ce dernier qui présente une adsorption du Ca légèrement supérieure (par exemple : 63% de Ca adsorbé pour $Ca_{ini}/MnO_2 = 4,34 \times 10^{-2}$ mmol/mmol dans le cas du *MnO2 bactériogénique* contre 61% de Ca adsorbé à $Ca_{ini}/MnO_2 = 8,24 \times 10^{-2}$ mmol/mmol pour δ -*MnO2 B*). Le *MnO2 bactériogénique* nécessite donc une solution moins concentrée en Ca pour être saturé en Ca (Figures 4.4b et f et 4.10).

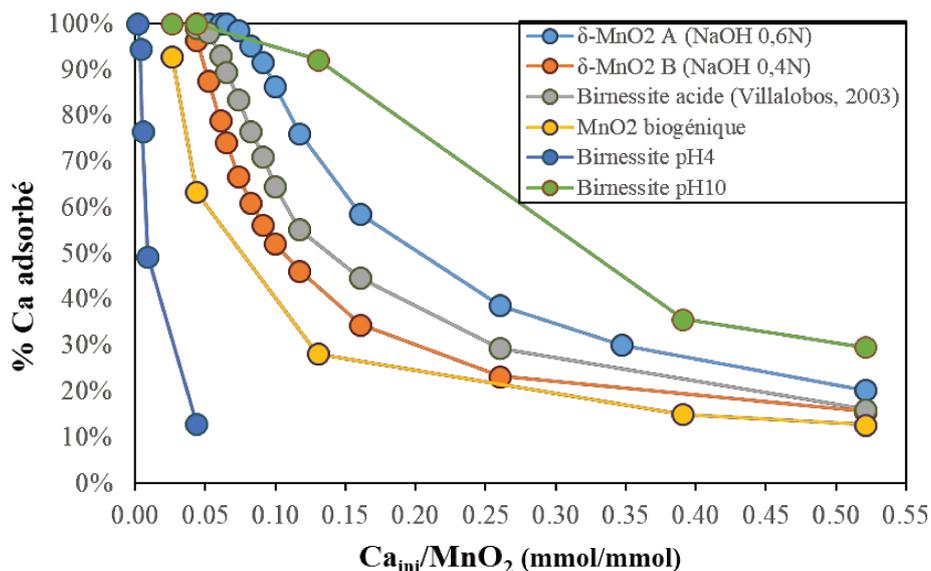


Figure 4.10 : Pourcentage de Ca adsorbé en fonction de la concentration initiale en calcium de la solution.

La CEC du *MnO2 bactériogénique* est en partie représentée par du Mn (15,0%) contrairement à celle du δ -*MnO2 B* qui est représentée à plus de 95% par le Na⁺. Le *MnO2 bactériogénique* est synthétisé par *P. putida* GB1 à partir de Mn^{II} directement oxydé en Mn^{IV} (Geszvain et al., 2013). Ainsi on peut émettre l’hypothèse que le Mn présent dans l’interfoliaire est exclusivement du Mn^{II} résiduel provenant du processus de biosynthèse, en accord avec Villalobos et al. (2006). Cette quantité de Mn^{II} interfoliaire pourrait être la cause de cette adsorption plus faible. En effet, lors du processus d’adsorption du Ca, les proportions de Mn désorbées restent faibles (au moins inférieures d’un rapport de 15 par rapport au Ca adsorbé) bien qu’elles soient bien plus importantes que pour les autres échantillons (d’au moins un facteur 10) (Tableau 4.6 et 4.7 et figure 4.4). Par ailleurs, on désorbe à peu près deux fois plus de Mn lors de la désorption avec le cobalt-hexamine que lors de l’adsorption du Ca (Tableaux 4.7 et 4.8). Il s’agit vraisemblablement d’une compétition entre le Ca et le Mn^{II}, qui semble présenter une plus grande affinité et des liaisons plus stables avec le *MnO2 bactériogénique*.

Les résultats suggèrent dans l’ensemble une désorption de H⁺, de Na⁺ et de Mn²⁺ corrélée à l’adsorption du Ca²⁺ et ce dans des proportions similaires, en tenant compte du nombre de charges de chaque élément (conversion des mmol en méq) (Figure 4.11). Ces résultats sont cohérents avec ceux présentés pour le δ -*MnO2* dans Schmitt et al. (2023). Seul le *MnO2 bactériogénique* se démarque nettement des autres solides, du fait de l’augmentation de la quantité de Ca adsorbée supérieure à l’augmentation de la quantité de cations désorbés (coefficient directeur de la régression linéaire supérieur à 5) (Figure 4.11), sans que nous soyons

en mesure de l'expliquer à l'aide de nos données actuelles. Davantage d'analyses et d'expérimentations s'avèrent nécessaires pour expliquer ce résultat.

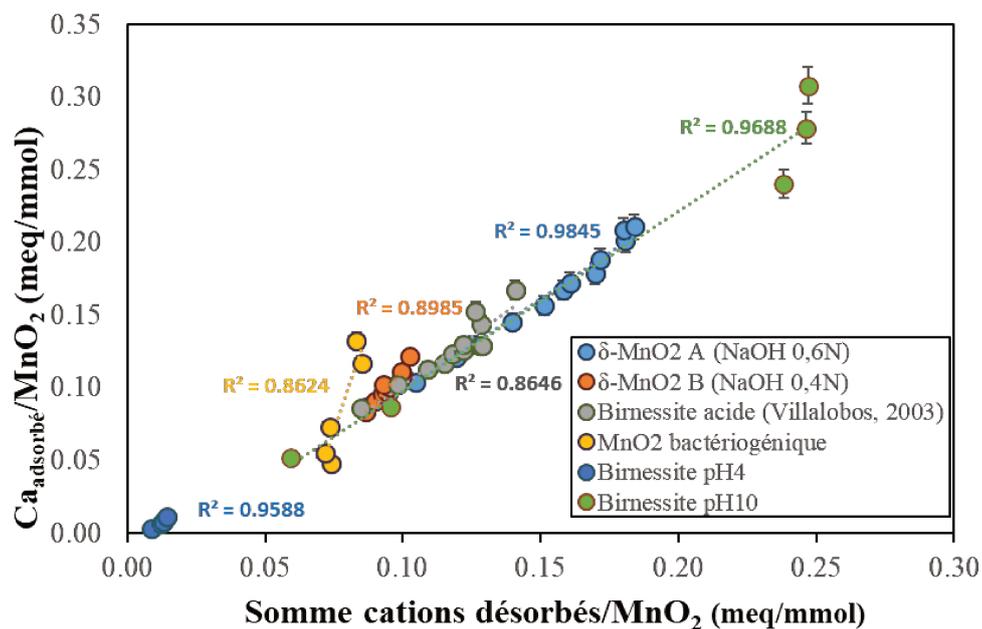


Figure 4.11 : Ca adsorbé en fonction de la somme de cations désorbés (Na^+ , H^+ , Mg^{2+} , K^+ , Mn^{2+}).

On constate globalement des tendances similaires entre les différents échantillons, que ce soit pour les expérimentations en fonction de la concentration initiale en Ca ou du pH initial de la solution, ou en fonction du temps de contact. En effet, pour les expérimentations en fonction de la concentration initiale en Ca on observe une augmentation rapide de l'adsorption du Ca lorsque Ca_{ini}/MnO_2 est faible puis une stabilisation autour d'une valeur plateau. Pour la cinétique d'adsorption, on constate que la quantité de Ca adsorbée atteint un plateau après 30 min – 1h de temps de contact. Pour la désorption, à part pour la *birnessite (3) pH4* pour laquelle même plusieurs désorptions successives ne permettent de désorber qu'une minorité du Ca adsorbé (moins de 22%), les autres solides étudiés (*birnessites (2) pH10* et *MnO2 bactériogénique*) présentent plus de 70-80% de Ca désorbé dès la première désorption. Enfin, lors des expérimentations en fonction du pH, on constate une adsorption du Ca beaucoup plus faible en dessous de pH 3 et une stabilisation à une valeur maximale entre pH 4 et 8. Les résultats obtenus pour les différents échantillons sont globalement cohérents entre eux et présentent de grandes similitudes avec les résultats de Schmitt et al. (2023).

Toutefois, la *birnessite (3) pH4* présente une quantité de Ca adsorbée largement inférieure à celle adsorbée par les autres solides. Comme cela a été discuté dans la partie 4.4.1, la

stabilisation de la birnessite à pH 4 a pu perturber la structure de la birnessite, et amplifier l'effet Jahn-Teller, faisant passer les Mn^{III} d'une forme hexagonale à une forme octaédrique, poussant potentiellement les doublets d'électrons à se rapprocher de l'atome de Mn pour assurer une plus grande stabilité, pouvant ainsi limiter la réactivité au niveau de l'interfoliaire. A cela s'ajoute le potentiel encombrement stérique engendré par la présence du Mn^{III} réadsorbé au-dessus des lacunes, pouvant aussi limiter l'adsorption dans l'interfoliaire. De plus, la formation de liaisons hydrogènes entre les particules est susceptible d'engendrer une croissance des particules (et non pas de l'agrégation) ainsi qu'un accès limité aux sites interfoliaire, réduisant ainsi la réactivité du solide avec les cations. L'ensemble de ces paramètres pourrait être des explications possibles à cette chute de la réactivité de la birnessite après sa stabilisation à pH 4.

4.4.3. Caractérisation isotopique

Concernant les résultats des analyses isotopiques, un coefficient de fractionnement isotopique α a été estimé à partir des données de $\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{LAA}}$ et $\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{SAA}}$, d'après :

$$\alpha_{\text{MnO}_2\text{-solution}} = \frac{\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{SAA}} + 1000}{\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{LAA}} + 1000} \quad (4)$$

On obtient $\alpha_{\text{MnO}_2\text{-solution}} = 0,99860 \pm 0,00012$ (N=2). En comparaison, Schmitt et al. (2023) obtenaient un α de $0,99874 \pm 0,00005$ (N = 5), identique aux erreurs analytiques près, ce qui est cohérent avec les similitudes entre les fractionnements isotopiques observés. Davantage de valeurs isotopiques des solides après adsorptions s'avèrent nécessaires pour obtenir une valeur plus précise de ce coefficient, mais cette estimation préliminaire permet de supposer que les points de mesures semblent correspondre à un fractionnement à l'équilibre plutôt qu'à un fractionnement cinétique et que les solides affichent un comportement similaire, hormis pour la *birnessite (3) pH4*, pour laquelle la valeur des points augmente de manière plus importante lorsque f se rapproche de 0, permettant de supposer un fractionnement potentiellement d'origine cinétique. On constate aussi que le point de mesure dans le surnageant pour la *birnessite (2) pH10* après 24h de contact est en décalage avec les autres points, ce qui sera discuté dans un des paragraphes suivants.

L'intensité du fractionnement isotopique est la plus forte dans le surnageant après adsorption lorsque le pourcentage de Ca adsorbé tend vers 100% sans l'atteindre, et diminue avec la diminution du pourcentage de Ca adsorbé (Figure 4.4). Ces résultats sont cohérents entre eux et avec les résultats de Schmitt et al. (2023) sur un échantillon de $\delta\text{-MnO}_2$ très

similaire au $\delta\text{-MnO}_2\text{ A}$, et avec les résultats de Brazier et al. (2019) sur divers phyllosilicates (Tableau 4.5).

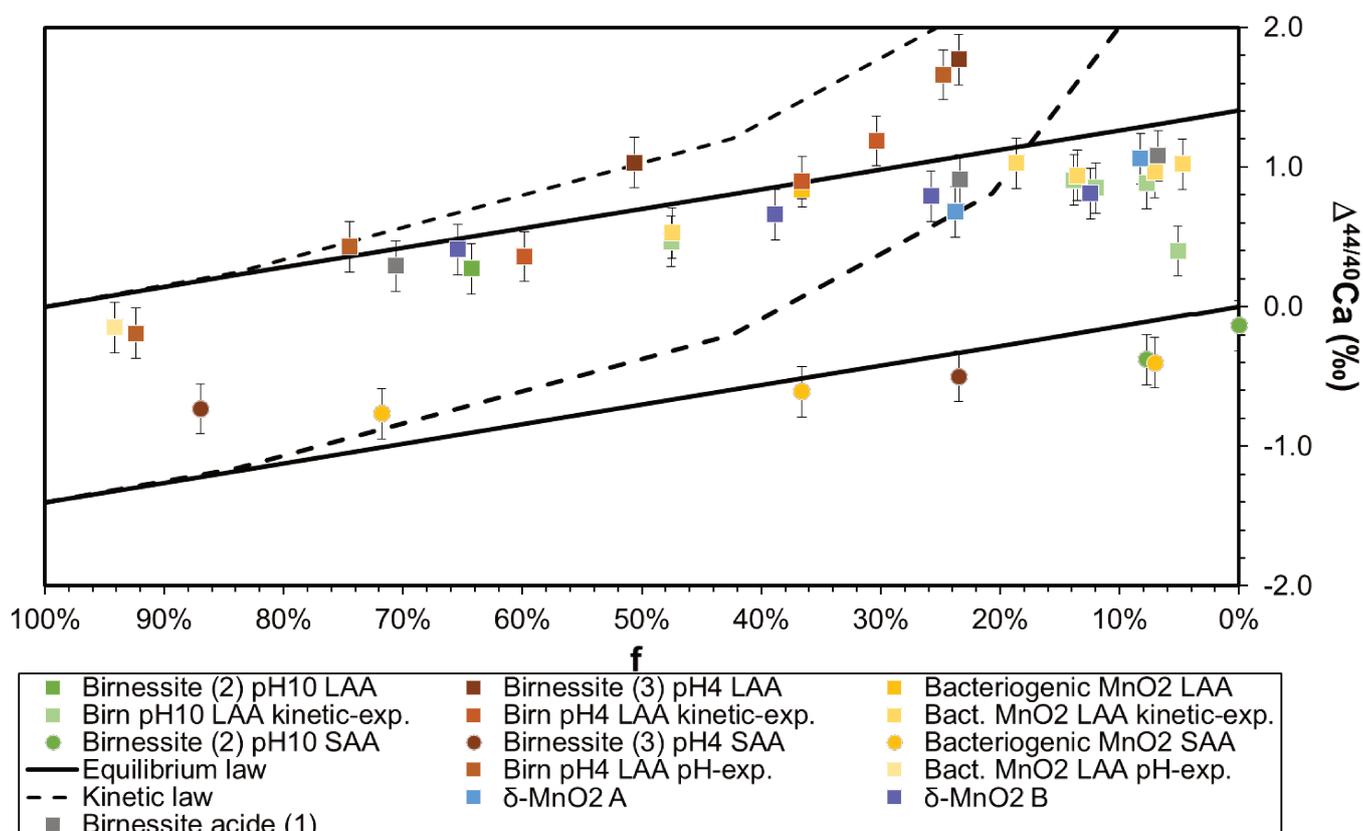


Figure 4.12 : Ensemble des fractionnements isotopiques dans les liquides (carrés) et solides (ronds) après adsorption. Les droites continues et en pointillés correspondent respectivement aux comportements des lois de fractionnement à l'équilibre et de fractionnement cinétique, pour les surnageants (droites du haut) et les solides (droites du bas). LAA = liquide après adsorption, SAA = solide après adsorption

On constate pour les expérimentations de cinétiques d'adsorption une augmentation progressive du fractionnement isotopique dans les trente premières minutes de contact. Néanmoins, plus de points de mesures s'avèrent nécessaires pour préciser la tendance et confirmer une potentielle stabilisation du fractionnement isotopique autour d'un plateau pour les trois solides concernés (*birnessites* (2) *pH10* et (3) *pH4* et *MnO₂ bactériogénique*) comme cela a pu être observé dans Schmitt et al. (2023). Toutefois un point de mesure semble indiquer une chute du fractionnement isotopique pour la *birnessite* (2) *pH10* après 24h de contact et ce malgré un pourcentage de Ca adsorbé de 95%. En effet, $\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{LAA}}$ atteint $0,88 \pm 0,03\text{‰}$ (2SE, N = 3) entre 10 et 120 minutes d'interaction mais diminue à $0,41 \pm 0,10\text{‰}$ (2SD, N = 2) après 24h de contact. Cela pourrait suggérer un rééquilibrage isotopique du solide avec la solution

sur des temps de contact prolongés. Il en découlerait que le fractionnement étudié pour les temps de contact courts est d'origine cinétique mais que les liaisons ainsi établies ne sont pas suffisamment stables pour maintenir ce fractionnement dans le temps. Toutefois, cela serait en opposition avec l'estimation du coefficient de fractionnement isotopique α , laissant penser que le fractionnement suit plutôt une loi de fractionnement à l'équilibre. Il s'agit ainsi d'un point d'ombre à éclaircir avec des analyses supplémentaires. En comparaison, l'échantillon étudié dans Schmitt et al. (2023) présentait un fractionnement supérieur à +1,4‰ après 24h et 48h de contact, soit une valeur similaire à celle de leur échantillon à 125 min de contact. De la même manière, l'échantillon de *MnO₂ bactériogénique* présente une augmentation du fractionnement dans les premières minutes de contact puis une valeur similaire à 125 min et 24h de contact (respectivement +0,96 et +1,02‰). Par conséquent, la tendance observée pour la *birnessite* (2) *pH10* interroge et la réalisation d'une nouvelle série d'expérimentations avec plus de points de mesure à des temps longs permettrait de vérifier et de préciser la nature et le comportement du fractionnement du Ca sur ce solide. Toutefois, d'un point de vue structural, l'échantillon étudié dans Schmitt et al. (2023) et le *MnO₂ bactériogénique* sont beaucoup plus proches entre eux qu'ils ne le sont de la *birnessite* (2) *pH10* et le résultat observé ici pourrait potentiellement trouver son origine dans une différence structurale entre ces solides.

Il serait aussi intéressant d'effectuer des analyses isotopiques à des temps de contact prolongés pour la *birnessite* (3) *pH4* afin de pouvoir comparer les résultats. Il n'a en effet pas été possible d'analyser l'échantillon après 24h de contact, car celui-ci présentait une adsorption du Ca de 100%. La même expérimentation pourrait être réalisée avec une solution de Ca de concentration légèrement inférieure afin d'observer la tendance du fractionnement. Cette comparaison entre les *birnessites* (2) *pH10* et (3) *pH4* s'avérerait d'autant plus intéressante qu'une grande partie du Ca adsorbé par la *birnessite* (3) *pH4* est très difficilement, voire pas du tout désorbable, même après plusieurs séries de désorptions, en comparaison avec la *birnessite* (2) *pH10* pour laquelle la quantité de Ca désorbé équivaut à $88,2 \pm 1,3\%$ du Ca initialement adsorbé (2SE, N = 8) après 2h de désorption et 100% après une deuxième désorption de 24h. La facilité à désorber le Ca dans le cas de la *birnessite* (2) *pH10* pourrait aller de pair avec l'idée que le Ca adsorbé est facilement remplaçable par d'autres atomes de Ca, ce qui pourrait justifier un rééquilibrage isotopique lors d'une interaction prolongée entre le solide et la solution. En revanche, la difficulté à désorber le Ca pour la *birnessite* (3) *pH4* pourrait impliquer un maintien de l'intensité du fractionnement isotopique dans le temps, en limitant le rééquilibrage avec la

solution, à partir du moment où ce fractionnement serait principalement dû à des liaisons fortes limitant la désorption.

Pour les résultats des expérimentations en fonction du pH initial de la solution, on constate des tendances similaires pour les trois solides étudiés : une diminution du fractionnement isotopique en dessous de pH 3. Ces résultats sont cohérents entre eux et avec les résultats de Schmitt et al. (2023), permettant de suggérer l'existence d'un point de charge nul situé entre pH 2 et 3 pour l'ensemble de ces solides.

Ainsi, quasiment l'ensemble des résultats présentés dans cette étude et dans Schmitt et al. (2023) présentent des similitudes, que ce soit élémentairement ou isotopiquement. Il en découle que la plupart des différences structurales existantes entre ces solides n'ont pas d'influence significative sur le fractionnement isotopique. Seule la birnessite (3) pH4 présente des résultats grandement en décalage avec les autres solides : un fractionnement isotopique plus important, une quantité de Ca adsorbée plus faible, et une impossibilité de désorber la majeure partie du Ca adsorbé.

A la suite des travaux de Schmitt et al. (2023), une des interrogations concernait le rôle potentiel de la proportion des lacunes et du niveau de cristallinité dans le fractionnement isotopique. Les résultats de la présente étude suggèrent l'absence de corrélation de ces deux paramètres avec le fractionnement isotopique du Ca. Par ailleurs, d'après Schmitt et al. (2023), les sites de bordure du δ -MnO₂ pourraient présenter une signature isotopique plus importante que les sites interfoliaires. Ainsi, une augmentation de la taille des cristaux, mêlé à l'encombrement stérique de l'interfoliaire, rendant l'interfoliaire moins accessible et induisant une plus grande importance relative des sites de bordure dans la quantité de sites d'adsorption disponibles, pourrait être la cause d'une augmentation significative du fractionnement isotopique pour la *birnessite (3) pH4*. Toutefois, cela n'explique pas l'impossibilité de désorber l'ensemble du Ca adsorbé car les sites de bordures ne retiennent normalement pas le Ca de manière aussi importante (Brazier et al., 2019, Schmitt et al., 2023). Une autre hypothèse pour expliquer la faible quantité de Ca désorbée pourrait alors être que les interactions entre celui-ci et les sites d'adsorptions impliquent des liaisons plus fortes que pour les autres solides. On peut par exemple imaginer une adsorption en sphère interne, dans le cas où le Ca s'affranchirait de sa sphère d'hydratation, ce qui influencerait la nature des liaisons formées par le Ca. En effet, lorsqu'il conserve ses molécules d'eau, le Ca établit des liaisons hydrogènes dans l'interfoliaire, tandis que s'il perdait sa sphère d'hydratation, il pourrait potentiellement établir avec la surface

du solide des liaisons plus fortes que les liaisons hydrogènes, telles que des liaisons ioniques avec les oxygènes du feuillet par exemple.

4.4.4. Conséquences pour le milieu naturel

Si l'on cherche à transposer ces résultats au milieu naturel pour en déduire un effet sur le cycle biogéochimique du Ca dans les sols, on peut se demander (i) si des conditions de pH faible dans le sol sont susceptibles d'impacter la structure des oxydes de manganèse, leur réactivité avec le Ca et son fractionnement isotopique, (ii) si la diminution de la capacité du MnO_2 à adsorber du Ca ne serait pas susceptible de rendre moins accessible les conditions permettant un fractionnement isotopique, c'est-à-dire de diminuer la concentration nécessaire en Ca dans les solutions de sol pour qu'un fractionnement induit par le MnO_2 y soit observable et (iii) si cette même capacité du MnO_2 à adsorber du Ca ne causerait pas une diminution de l'importance relative du MnO_2 dans le fractionnement isotopique du Ca dans les solutions de sol.

De plus, cet effet du pH est observé sur la structure de la birnessite, mais beaucoup moins sur celle des $\delta\text{-MnO}_2$, pourtant synthétisés à des pHs différents, mais ne présentant pas une différence de fractionnement isotopique aussi importante. Par ailleurs, dans les sols les oxydes de manganèse biogénique sont produits à des vitesses bien plus importantes que les oxydes de manganèses d'origine abiotique (Tebo et al., 2004). Il s'agit donc des oxydes de manganèses les plus susceptibles d'avoir la plus grande importance dans le cycle biogéochimique du Ca dans les sols. D'après Marafatto et al. (2018) les conditions de pH de synthèse ou de stabilisation du $\delta\text{-MnO}_2$ influent sur sa structure et notamment à pH faible, favorisant la croissance des cristaux via des liaisons hydrogènes entre les particules. Ce mécanisme est irréversible et est donc susceptible de diminuer durablement l'accès aux sites interfoliaires du MnO_2 . Il serait donc intéressant de vérifier l'effet d'une stabilisation du $\delta\text{-MnO}_2$ ou du MnO_2 bactériogénique (ou vernadite) à pH 4 afin d'en observer l'effet sur l'interaction avec le Ca. Par ailleurs, d'après Grangeon et al. (2014), la stabilisation du $\delta\text{-MnO}_2$ à pH 3 entraîne sous l'effet Jahn-Teller la libération de Mn^{IV} et Mn^{III} en solution, formant ainsi des lacunes. Le Mn libéré est ensuite réadsorbé au-dessus de ces lacunes. On se retrouve ainsi avec une configuration similaire à celle de la birnessite (3) pH 4. Dans l'éventualité où l'effet d'un pH proche de 4 serait aussi important que pour la *birnessite (3) pH 4*, le rôle de la vernadite dans le cycle biogéochimique du Ca dans le sol pourrait fortement varier en fonction de l'acidité des sols. Un paramètre dont il serait important de tenir compte est l'effet du vieillissement des minéraux sur leurs structure. En effet, Grangeon et al. (2014) suggèrent aussi une modification

de la structure du δ -MnO₂ avec le temps. Par ailleurs, nous avons constaté que le Mn^{II} semblait avoir une meilleure affinité que le Ca avec la vernadite. Ainsi, le stockage du Ca dans la vernadite dans les sols pourrait être limité par la présence de Mn^{II} dans la vernadite. Toutefois, des études en macrocosmes resteraient à réaliser pour vérifier la transposabilité ou l'observabilité de l'ensemble de ces résultats dans le milieu naturel.

4.5. Conclusion

Le but de cette étude était d'observer l'influence des différences structurales de différents oxydes de manganèse abiotiques et d'un oxyde de manganèse biogénique sur leur capacité à adsorber et à désorber du Ca, ainsi que le fractionnement isotopique que cela induit. Les résultats ont mis en évidence que l'intensité du fractionnement isotopique induit lors de l'adsorption du Ca ne dépend vraisemblablement pas de la proportion de lacunes ou du niveau de cristallinité de la structure du minéral, mais pourrait plutôt dépendre de la nature de la liaison établie entre le Ca et le solide ou peut être d'une différence de nature du fractionnement isotopique (un fractionnement d'origine cinétique induirait un fractionnement plus important qu'un fractionnement à l'équilibre). En effet, mis à part la birnessite stabilisée à pH 4, l'ensemble des solides étudiés présentent une intensité de fractionnement isotopique similaire et ce malgré des différences de niveau de cristallinité ou de taux de lacunes. La birnessite pH 4, qui adsorbe beaucoup moins de Ca que les autres solides et qui le désorbe très difficilement, fractionne en revanche le Ca avec une plus grande intensité.

De multiples études ont déjà montré l'influence du pH et du vieillissement des birnessites sur leur structure, avec notamment l'effet Jahn-Teller et pour conséquence un encombrement stérique de l'interfoliaire. Ces changements de structure pourraient par exemple être à l'origine d'un autre type de liaison entre le Ca et les couches de MnO₂, tel que des liaisons ioniques, et sont potentiellement la cause de cette différence de fractionnement isotopique observée. En revanche, nous n'observons ces effets sur le fractionnement isotopique que pour la birnessite à pH 4 et non pas pour le MnO₂ bactériogénique ou le δ -MnO₂. Etant donné que les MnO₂ biogéniques se forment dans les sols plus rapidement que les MnO₂ abiotiques, il s'agit des MnO₂ les plus susceptibles d'impacter le cycle biogéochimique du Ca dans les sols et il serait donc intéressant de vérifier si une stabilisation à différents pHs et le vieillissement du minéral auraient le même effet sur le MnO₂ bactériogénique et sur son interaction avec le Ca.

Enfin, bien qu'il reste du chemin à parcourir pour être en mesure d'expliquer l'ensemble des mécanismes étudiés dans ce travail, nos résultats nous permettent d'affirmer que le MnO_2 bactériogénique synthétisé par *P. putida* GBI présente une intensité de fractionnement isotopique similaire aux échantillons de $\delta\text{-MnO}_2$ étudiés dans cette étude et dans Schmitt et al. (2023). Cette intensité de fractionnement isotopique étant largement significative (dépassant un enrichissement en ^{44}Ca supérieur à 1.0‰ dans la solution) et compte tenu de la CEC relativement importante de la vernadite en comparaison avec d'autres minéraux communs des sols, son rôle en tant que réservoir de nutriment pouvant impacter la signature isotopique du Ca dans les solutions de sols est probable. Des études en macrocosme restent à réaliser pour vérifier les résultats en batch et pour tenir compte de nouveaux paramètres : type de sol, paramètres climatiques. Au-delà de ces expérimentations, d'autres microorganismes tels que certains champignons sont capables de synthétiser du MnO_2 . Il existe par ailleurs différents procédés de biosynthèse du MnO_2 selon les microorganismes : passage du Mn^{II} au Mn^{IV} directement et passage successif du Mn^{II} au Mn^{III} puis du Mn^{III} au Mn^{IV} . Cela pourrait impliquer une diversité structurale entre les différents MnO_2 biogéniques. Il serait donc intéressant d'étudier ces autres MnO_2 biogéniques pour les comparer aux MnO_2 étudiés dans nos travaux afin de préciser notre compréhension des mécanismes de stockage du Ca dans les sols et de son fractionnement isotopique dans les solutions de sols.

Conclusion générale

Ce travail de thèse avait pour objectif général d'améliorer notre connaissance des interactions entre le Ca et différents composants des sols susceptibles de jouer un rôle significatif dans le cycle biogéochimique du Ca, dans le but de tendre vers une meilleure compréhension globale de ce cycle à l'interface eau-sol-organismes. En effet, dans les dernières décennies le Ca a montré son efficacité dans le traçage de mécanismes secondaires biotiques ou abiotiques au niveau des sols, mais les études concernant les mécanismes d'interactions entre le Ca et les différents éléments constitutifs des sols restent peu nombreuses.

Ainsi, ce travail de thèse s'est intéressé non seulement aux mécanismes abiotiques que sont l'**adsorption** et la **désorption du Ca sur des minéraux** (divers MnO₂ synthétiques et un biosynthétisé par *P. putida GBI*) **et des surfaces bactériennes** (*B. subtilis* et *P. aeruginosa*), mais aussi à la compréhension de mécanismes biotiques tels que l'**incorporation du Ca dans des bactéries**, et la compréhension du rôle de ces mécanismes, et donc par extension, le rôle des bactéries du sol, dans le fractionnement isotopique du Ca.

Pour réaliser cet objectif, nous avons mis en œuvre des méthodes expérimentales et analytiques (interaction solide/solution en batch, utilisation de colonnes purificatrices à résine échangeuse d'ions, utilisation d'un double spike ⁴²Ca-⁴³Ca lors des analyses isotopiques au TIMS) développées et mises en œuvre lors d'études antérieures, notamment dans les travaux de Brazier (2018), et Schmitt et al. (2023).

Toutefois, ces méthodes étant initialement adaptées à des échantillons inertes, il a été nécessaire de développer et d'adapter des protocoles pouvant s'appliquer à de la matière vivante, sujette à d'autres contraintes. Ainsi, il a fallu s'assurer que les bactéries contenaient le moins de Ca possible à l'issue de leur culture. Du fait qu'il s'agisse d'organismes vivants, les bactéries présentent une complexité toute autre que les échantillons classiquement étudiés avec ces protocoles (matière minérale ou organique inerte). Il a donc été nécessaire de mettre en œuvre des protocoles expérimentaux pour distinguer les différents mécanismes impliqués (adsorption, incorporation passive et/ou active) lors de l'interaction entre Ca et bactéries. On peut notamment citer le protocole de fractionnement cellulaire, qui a permis de donner une idée des proportions dans lesquelles le Ca se stocke dans les différents compartiments cellulaires de *P. aeruginosa* et *B. subtilis*. Il a premièrement fallu adapter ce protocole à nos conditions et objectifs expérimentaux, ce protocole étant généralement utilisé sur une faible quantité de bactéries. Ce protocole, initialement adapté à *P. aeruginosa* qui ne contient qu'une fine couche de peptidoglycane, a ensuite été adapté à *B. subtilis*, comportant une couche de peptidoglycane

bien plus épaisse et nécessitant une plus grande quantité de lysozyme pour être déstructurée. De multiples essais ont ainsi été nécessaires pour trouver le meilleur compromis entre efficacité du protocole et similitudes avec le protocole utilisé pour *P. aeruginosa*, de façon à conserver des conditions expérimentales similaires permettant la comparabilité des résultats ainsi obtenus.

Un autre défi majeur de ces travaux de thèse a été la synthèse et les analyses de multiples oxydes de manganèse. Notamment le tri granulométrique des trois premiers oxydes de manganèse synthétisés, ayant nécessité avec nos conditions matérielles, de nombreux cycles de centrifugations successives, pendant plusieurs semaines. La synthèse de MnO₂ bactériogénique a quant à elle nécessité de réaliser des dizaines de litres de cultures bactériennes de *P. putida* GBI pour n'obtenir au final qu'une très faible quantité de poudre de MnO₂ (s'avérant finalement insuffisante dans le cadre de nos travaux) nettoyée et séchée. En effet, en plus du faible rendement de MnO₂ obtenu par litre de culture, les cultures étaient aussi « capricieuses » et n'engendraient la production de MnO₂ parfois que dans 50% des erlenmeyers ensemencés.

En parallèle, le contexte dans lequel s'est déroulée la thèse s'est aussi avéré être un frein à la réalisation des objectifs initiaux. En effet, le confinement tout comme le déménagement des laboratoires et les pannes successives du TIMS ont imposé le besoin de remanier et d'adapter les plannings expérimentaux et ont fortement ralenti la réalisation des analyses isotopiques. A cela s'est ajouté le besoin de refaire les analyses pour de nombreux échantillons à de multiples reprises, en raison de la difficulté à obtenir des résultats analytiques concluants, probablement du fait de caractéristiques intrinsèques à la matrice des échantillons.

En dépit de l'ensemble de ces difficultés, ce travail de thèse a permis d'approfondir les problématiques qu'elle portait, en apportant des réponses à différents questionnements tout en soulevant de nouvelles interrogations. Ces travaux ont notamment permis de mettre en avant que les interactions entre le Ca et les bactéries étaient susceptibles d'induire un fractionnement isotopique du Ca dans certaines conditions. Dans un premier temps, nos expérimentations ont montré que les interactions du Ca avec les bactéries végétatives étaient vraisemblablement principalement passives, fait se traduisant par la présence de la majeure partie du Ca soit à la surface des bactéries, soit dans les compartiments de la paroi (membrane externe, peptidoglycane). Ce résultat est cohérent avec les connaissances acquises sur les bactéries et sur leur besoin en Ca, qui bien qu'il soit essentiel au fonctionnement des cellules, n'est présent qu'en faible concentration dans celles-ci (Gangola and Rosen, 1987; Knight et al., 1991; Futsaether and Johnsson, 1994; Herbaud et al., 1998; Jones et al., 1999; Torrecilla et al., 2000).

Nous avons montré que l'interaction du Ca avec les bactéries sous leur forme végétative ne fractionnait pas isotopiquement le Ca dans la solution, et ce malgré la présence dans la membrane externe (chez *P. aeruginosa*) de groupements carboxyles connus pour induire un fractionnement du Ca dans les plantes. En revanche, nos résultats indiquent que le phénomène de sporulation de *B. subtilis* semble induire un fractionnement du Ca à l'intérieur des spores, vraisemblablement lors de la formation du complexe entre le Ca et l'acide dipicolinique, synthétisé dans la bactérie lorsque le processus de sporulation est amorcé.

Les expérimentations sur les oxydes de manganèse ont quant à elles permis de vérifier que l'intensité du fractionnement isotopique induit lors de l'adsorption du Ca ne dépend vraisemblablement pas de la proportion de lacunes ou du niveau de cristallinité de la structure du minéral, mais plutôt de la nature de la liaison établie entre le Ca et le solide ou peut être d'une différence de nature du fractionnement isotopique (un fractionnement d'origine cinétique induirait un fractionnement plus important qu'un fractionnement à l'équilibre). De plus, de multiples études sur les oxydes de manganèse ont déjà montré que l'environnement physico-chimique ainsi que le vieillissement du MnO_2 (notamment du fait de l'effet Jahn-Teller et de l'encombrement stérique qui en découle) pouvait impacter sa structure et ainsi, sa capacité à adsorber des cations. Notre étude a mis en avant la différence d'adsorption, de désorption, et de fractionnement isotopique du Ca entre une birnessite synthétisée à pH 10 et une autre birnessite elle aussi synthétisée à pH 10 puis stabilisée à pH 4. En effet, la birnessite à pH 4 adsorbe très peu de Ca et le retient fortement lorsque l'on essaie de le désorber, tout en le fractionnant de façon significativement plus importante que la birnessite pH 10. En revanche, nous n'observons ces résultats que pour la birnessite et non pas pour la vernadite bactériogénique. La vitesse de production des MnO_2 biogéniques dans les sols étant bien plus importante que celle des MnO_2 d'origine abiotique (Tebo et al., 2004) il s'agit des MnO_2 les plus susceptibles d'impacter le cycle biogéochimique du Ca dans les sols. Il serait donc intéressant de vérifier si une stabilisation à différents pH et le vieillissement du minéral auraient le même effet sur la vernadite et sur son interaction avec le Ca. Dans le cadre de nos recherches, nous ne pouvons qu'affirmer que, d'un point de vue isotopique, la vernadite bactériogénique présente un comportement similaire aux échantillons de δ - MnO_2 étudiés dans cette étude et dans Schmitt et al. (2023). Cette intensité de fractionnement isotopique étant largement significative (dépassant un enrichissement en ^{44}Ca supérieur à 1.0‰ dans la solution) et compte tenu de la CEC relativement importante de la vernadite en comparaison avec d'autres minéraux communs des

sols, son rôle en tant que réservoir de nutriment pouvant impacter la signature isotopique du Ca dans les solutions de sols est probable.

Ainsi, les résultats de nos expérimentations permettent un premier pas vers la compréhension du rôle potentiel des bactéries du sol dans le cycle biogéochimique du Ca, que ce soit au travers de leur rôle direct (adsorption, incorporation, sporulation) ou plus indirect (biosynthèse de vernadite). Ces résultats permettent en effet d'**estimer** le fractionnement isotopique qui pourrait avoir lieu lors de l'interaction du Ca avec des bactéries et des minéraux issus de processus biotiques (Figure 5.1).

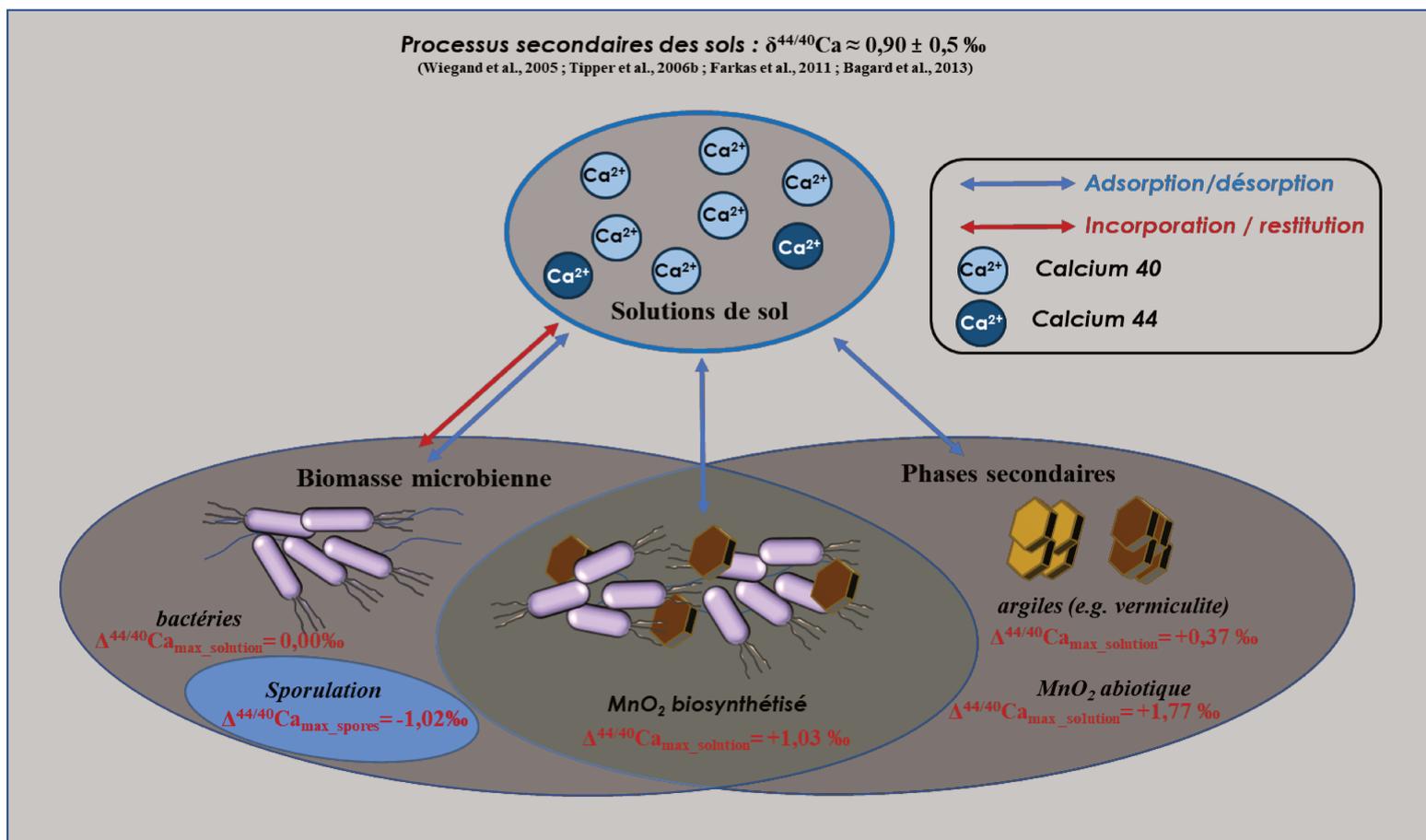


Figure 5.1 : schéma conceptuel représentant les mécanismes d'interaction entre le Ca et différents éléments constitutifs des sols étudiés lors de ce travail de thèse. Le schéma présente les signatures isotopiques maximales mesurées pour chacun des constituants étudiés. Mis à part pour le processus de sporulation pour lequel le fractionnement isotopique est observé dans les spores, les fractionnements affichés sont ceux observés dans le Ca résiduel des surnageants.

Il reste toutefois énormément de travail et de défis avant de pouvoir proposer une modélisation avérée du rôle des bactéries du sol dans le cycle biogéochimique du Ca. En effet, les résultats obtenus l'ont été au travers d'expérimentations en batch, faisant interagir du Ca avec un seul constituant des sols à la fois, avec un seul type de bactérie à la fois et seulement deux bactéries différentes. Cela ne tient donc pas compte de la complexité des phénomènes

ayant lieu dans le milieu naturel. Cette approche expérimentale nécessite d'étudier séparément de nombreux mécanismes pouvant avoir lieu en parallèle dans le sol, avant de pouvoir discerner l'effet avéré de la présence des bactéries. C'est notamment pour cette raison que ce travail n'a pas seulement été axé sur les bactéries, mais aussi sur différents minéraux pouvant jouer un rôle important en tant que réservoirs du Ca dans les sols. Les travaux sur la vermiculite, qui sont présentés en annexe, visent par ailleurs à identifier le fractionnement isotopique du Ca non seulement lors d'expérimentations en batch, mais aussi lors d'expérimentations en système dynamique, impliquant une diffusion du Ca au travers d'un échantillon de vermiculite. L'identification de l'effet individuel de chaque paramètre sur le fractionnement isotopique du Ca est un pas de plus vers une modélisation pouvant s'approcher d'un niveau de complexité plus proche de celui du milieu naturel. Les étapes suivantes consisteraient en l'étude de l'interaction du Ca avec différents constituants des sols comme les oxydes de manganèse ou des argiles mais cette fois-ci en présence de bactéries, afin d'observer l'effet potentiel de ces combinaisons. L'étude de bactéries sous forme de biofilms s'avèrent aussi nécessaire car il s'agit de la forme dans laquelle les bactéries sont les plus présentes dans les sols. De la même manière, les champignons sont des microorganismes majeurs des sols, notamment pour le recyclage de la matière organique et des nutriments. Certains champignons ont tout comme certaines bactéries, la capacité de synthétiser du MnO_2 qu'il serait aussi intéressant d'étudier, et de comparer avec ceux étudiés dans cette thèse. Au-delà de l'étude des différents constituants du sol, des études en macrocosmes s'avèrent nécessaires pour vérifier les résultats en batch et pour tenir compte de nouveaux paramètres : type de sol, paramètres climatiques etc.

En somme, si ces travaux ont permis d'acquérir de nouvelles connaissances concernant le rôle de certains constituants des sols, et notamment le rôle des bactéries, sur le fractionnement isotopique du Ca, il reste énormément de chemin(s) à parcourir pour tendre vers une modélisation précise du cycle biogéochimique du Ca au cœur des processus secondaires des sols. Des chemins bien évidemment semés d'embûches mais aussi de questionnements scientifiques à foison, que les plus aventureux s'empresseront de vouloir soulever.

Références bibliographiques

A

- Åberg, G. (1995) The use of natural strontium isotopes as tracers in environmental studies. *Water, Air, and Soil Pollution*, 79, 309–322.
- Åberg, G., Jacks, G., and Joseph Hamilton, P. (1989) Weathering rates and $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratios: An isotopic approach. *Journal of Hydrology*, 109, 65–78.
- Åberg, G., Jacks, G., Wickman, T., and Hamilton, P.J. (1990) Strontium isotopes in trees as an indicator for calcium availability. *CATENA*, 17, 1–11.
- Aguilar S., A., and van Diest, A. (1981) Rock-phosphate mobilization induced by the alkaline uptake pattern of legumes utilizing symbiotically fixed nitrogen. *Plant and Soil*, 61, 27–42.
- Albarède, F., and Beard, B. (2004) Analytical Methods for Non-Traditional Isotopes. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 55, 113–152.
- Ananyeva, N.D., Susyan, E.A., Chernova, O.V., Chernov, I.Yu., and Makarova, O.L. (2006) The ratio of fungi and bacteria in the biomass of different types of soil determined by selective inhibition. *Microbiology*, 75, 702–707.
- Anne-Désirée, S., Sophie, G., Jean-Michel, B., Nicolas, N., and Emmanuel, T. (2023) Calcium isotope fractionation associated with adsorption and desorption on/from $\delta\text{-MnO}_2$. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 354, 109–122.
- Argüelles, A., Leoni, M., Blanco, J.A., and Marcos, C. (2010) Semi-ordered crystalline structure of the Santa Olalla vermiculite inferred from X-ray powder diffraction. *American Mineralogist*, 95, 126–134.
- Aubert, D., Stille, P., and Probst, A. (2001) REE fractionation during granite weathering and removal by waters and suspended loads: Sr and Nd isotopic evidence. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65, 387–406.
- Aznar, A., Chen, N.W.G., Rigault, M., Riache, N., Joseph, D., Desmaële, D., Mouille, G., Boutet, S., Soubigou-Taconnat, L., Renou, J.-P., and others (2014) Scavenging Iron: A Novel Mechanism of Plant Immunity Activation by Microbial Siderophores. *Plant Physiology*, 164, 2167–2183.

B

- Baes, A.U., and Bloom, P.R. (1988) EXCHANGE OF ALKALINE EARTH CATIONS IN SOIL ORGANIC MATTER. *Soil Science*, 146, 6.
- Bagard, M.-L., Schmitt, A.-D., Chabaux, F., Pokrovsky, O.S., Viers, J., Stille, P., Labolle, F., and Prokushkin, A.S. (2013) Biogeochemistry of stable Ca and radiogenic Sr isotopes in a larch-covered permafrost-dominated watershed of Central Siberia. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 114, 169–187.
- Bailey, S.W., Hornbeck, J.W., Driscoll, C.T., and Gaudette, H.E. (1996) Calcium Inputs and Transport in A Base-Poor Forest Ecosystem as Interpreted by Sr Isotopes. *Water Resources Research*, 32, 707–719.
- Baize, D. (2018) Guide des analyses en pédologie, 1–328.

- Barber, S.A. (1995) *Soil Nutrient Bioavailability: A Mechanistic Approach*, 434 p. John Wiley & Sons.
- Bargar, J.R., Tebo, B.M., Bergmann, U., Webb, S.M., Glatzel, P., Chiu, V.Q., and Villalobos, M. (2005) Biotic and abiotic products of Mn(II) oxidation by spores of the marine *Bacillus* sp. strain SG-1. *American Mineralogist*, 90, 143–154.
- Barns, S.M., and Nierzwicki-Bauer, S.A. (1997) Microbial diversity in ocean, surface and subsurface environments. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 35, 35–79.
- Bar-On, Y.M., Phillips, R., and Milo, R. (2018) The biomass distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, 6506–6511.
- Bedel, L., Poszwa, A., van der Heijden, G., Legout, A., Aquilina, L., and Ranger, J. (2016) Unexpected calcium sources in deep soil layers in low-fertility forest soils identified by strontium isotopes (Lorraine plateau, eastern France). *Geoderma*, 264, 103–116.
- Bergaya, F., and Lagaly, G. (2006) Chapter 1 General Introduction: Clays, Clay Minerals, and Clay Science. In Faïza Bergaya, B.K.G. Theng, and Gerhard Lagaly, Eds., *Developments in Clay Science Vol. 1*, pp. 1–18. Elsevier.
- Berner, R.A., Lasaga, A.C., and Garrels, R.M. (1983) Carbonate-silicate geochemical cycle and its effect on atmospheric carbon dioxide over the past 100 million years. *Am. J. Sci.; (United States)*, 283:7.
- Berner, U., and Faber, E. (1996) Empirical carbon isotope/maturity relationships for gases from algal kerogens and terrigenous organic matter, based on dry, open-system pyrolysis. *Organic Geochemistry*, 24, 947–955.
- Blanc, D. (1987) *Les cultures hors sol*, 1–412.
- Blum, J.D., Klaue, A., Nezat, C.A., Driscoll, C.T., Johnson, C.E., Siccama, T.G., Eagar, C., Fahey, T.J., and Likens, G.E. (2002) Mycorrhizal weathering of apatite as an important calcium source in base-poor forest ecosystems. *Nature*, 417, 729–731.
- Blum, J.D., Klaue, A., Nezat, C.A., Driscoll, C.T., Johnson, C.E., Siccama, T.G., Eagar, C., Fahey, T.J., and Likens, G.E. (2003) Mycorrhizal weathering in base-poor forests. *Nature*, 423, 824–824.
- Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N., and Scheel, D. (2000) Receptor-Mediated Increase in Cytoplasmic Free Calcium Required for Activation of Pathogen Defense in Parsley. *The Plant Cell*, 12, 1425–1440.
- Boulaine, J. (1975) *Géographie des sols*, 204 p. FeniXX.
- Boulaine, J. (1988) *Histoire des pédologues et de la science des sols*, 1–314.
- Brantley, S.L., Megonigal, J.P., Scatena, F.N., Balogh-Brunstad, Z., Barnes, R.T., Bruns, M.A., Van Cappellen, P., Dontsova, K., Hartnett, H.E., Hartshorn, A.S., and others (2011) Twelve testable hypotheses on the geobiology of weathering. *Geobiology*, 9, 140–165.
- Brazier, J.-M. (2018, April 4) *Rôle des phases minérales des sols en tant que réservoirs de nutriments : approche expérimentale (abiotique), en milieu naturel et multi-isotopique (isotopes stables Ca-Sr)*. phdthesis, Université de Strasbourg.
- Brazier, J.-M., Schmitt, A.-D., Gangloff, S., Pelt, E., Chabaux, F., and Tertre, E. (2019) Calcium isotopic fractionation during adsorption onto and desorption from soil phyllosilicates

(kaolinite, montmorillonite and muscovite). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 250, 324–347.

- Brazier, J.-M., Schmitt, A.-D., Gangloff, S., Pelt, E., Gocke, M.I., and Wiesenberg, G.L.B. (2020) Multi-isotope approach ($\delta^{44}/^{40}\text{Ca}$, $\delta^{88}/^{86}\text{Sr}$ and $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$) provides insights into rhizolith formation mechanisms in terrestrial sediments of Nussloch (Germany). *Chemical Geology*, 545, 119641.
- Bruckert, S., and Jacquin, F. (1969) Interaction entre la mobilite de plusieurs acides organiques et de divers cations dans un sol a mull et dans un sol a mor. *Soil Biology and Biochemistry*, 1, 275–294.
- Brunner, I. (2001) Ectomycorrhizas: their role in forest ecosystems under the impact of acidifying pollutants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 4, 13–27.
- Brunner, I., and Frey, B. (2000) Detection and localization of aluminum and heavy metals in ectomycorrhizal Norway spruce seedlings. *Environmental Pollution*, 108, 121–128.
- Bullen, T.D., and Bailey, S.W. (2005) Identifying calcium sources at an acid deposition-impacted spruce forest: a strontium isotope, alkaline earth element multi-tracer approach. *Biogeochemistry*, 74, 63–99.
- Burns, R.G., Burns, V.M., Easton, A.J., Horne, J.E.T., and Dunham, K.C. (1997) The mineralogy and crystal chemistry of deep-sea manganese nodules, a polymetallic resource of the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 286, 283–301.

C

- Capo, R.C., Stewart, B.W., and Chadwick, O.A. (1998) Strontium isotopes as tracers of ecosystem processes: theory and methods. *Geoderma*, 82, 197–225.
- Carlin, F. (2011) Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiology*, 28, 177–182.
- Cenki-Tok, B., Chabaux, F., Lemarchand, D., Schmitt, A.-D., Pierret, M.-C., Viville, D., Bagard, M.-L., and Stille, P. (2009) The impact of water–rock interaction and vegetation on calcium isotope fractionation in soil- and stream waters of a small, forested catchment (the Strengbach case). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73, 2215–2228.
- Churchman, G.J., and Lowe, D.J. (2012) Alteration, formation, and occurrence of minerals in soils pp. 1–72. CRC Press.
- Ciesielski, H., Sterckeman, T., Santerne, M., & Willery, J. P. (1997). Determination of cation exchange capacity and exchangeable cations in soils by means of cobalt hexamine trichloride. Effects of experimental conditions. *Agronomie*, 17(1), 1-7.
- Clarholm, M., and Skjellberg, U. (2013) Translocation of metals by trees and fungi regulates pH, soil organic matter turnover and nitrogen availability in acidic forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 63, 142–153.
- Clarkson, D.T. (1984) Calcium transport between tissues and its distribution in the plant. *Plant, Cell & Environment*, 7, 449–456.

- Cobert, F., Schmitt, A.-D., Calvaruso, C., Turpault, M.-P., Lemarchand, D., Collignon, C., Chabaux, F., and Stille, P. (2011a) Biotic and abiotic experimental identification of bacterial influence on calcium isotopic signatures. *Rapid communications in mass spectrometry: RCM*, 25, 2760–2768.
- Cobert, F., Schmitt, A.-D., Bourgeade, P., Labolle, F., Badot, P.-M., Chabaux, F., and Stille, P. (2011b) Experimental identification of Ca isotopic fractionations in higher plants. *Geochimica Et Cosmochimica Acta - GEOCHIM COSMOCHIM ACTA*, 75, 5467–5482.
- Compston, W., and Oversby, V.M. (1969) Lead isotopic analysis using a double spike. *Journal of Geophysical Research (1896-1977)*, 74, 4338–4348.
- Conant, R.T., Ryan, M.G., Ågren, G.I., Birge, H.E., Davidson, E.A., Eliasson, P.E., Evans, S.E., Frey, S.D., Giardina, C.P., Hopkins, F.M., and others (2011) Temperature and soil organic matter decomposition rates – synthesis of current knowledge and a way forward. *Global Change Biology*, 17, 3392–3404.
- Coplen, T.B., Böhlke, J.K., Bièvre, P.D., Ding, T., Holden, N.E., Hopple, J.A., Krouse, H.R., Lamberty, A., Peiser, H.S., Revesz, K., and others (2002) Isotope-abundance variations of selected elements (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 74, 1987–2017.
- Cornell, R.M., and Giovanoli, R. (1988) Transformation of Hausmannite into Birnessite in Alkaline Media. *Clays and Clay Minerals*, 36, 249–257.
- Cunrath, O., Gasser, V., Hoegy, F., Reimann, C., Guillon, L., and Schalk, I.J. (2015) A cell biological view of the siderophore pyochelin iron uptake pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 17, 171–185.

D

- Dansgaard, W. (1964) Stable isotopes in precipitation. *Tellus*, 16, 436–468.
- Darrah, P.R. (1993) The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. In N.J. Barrow, Ed., *Plant Nutrition — from Genetic Engineering to Field Practice: Proceedings of the Twelfth International Plant Nutrition Colloquium, 21–26 September 1993, Perth, Western Australia* pp. 3–22. Springer Netherlands, Dordrecht.
- de La Calle, C., Pezerat, H., and Gasperin, M. (1977) PROBLÈMES D'ORDRE-DÉSORDRE DANS LES VERMICULITES STRUCTURE DU MINÉRAL CALCIQUE HYDRATÉ A 2 COUCHES. *Le Journal de Physique Colloques*, 38, C7-133.
- Dejou, J., Guyot, J., and Robert, M. (1978) Évolution superficielle des roches cristallines et cristallophylliennes dans les régions tempérées, 464 p. INRA, Paris.
- Descroix, L., Viramontes, D., Vauclin, M., Gonzalez Barrios, J.L., and Esteves, M. (2001) Influence of soil surface features and vegetation on runoff and erosion in the Western Sierra Madre (Durango, Northwest Mexico). *CATENA*, 43, 115–135.
- Diggle, S.P., and Whiteley, M. (2020) Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa* : opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology*, 166(1), 30–33.
- Dodson, M.H. (1963) A theoretical study of the use of internal standards for precise isotopic analysis by the surface ionization technique: Part I - General first-order algebraic solutions. *Journal of Scientific Instruments*, 40, 289.

- Dodson, M.H. (1970) Simplified equations for double-spiked isotopic analyses. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 34, 1241–1244.
- Dominguez, D.C. (2004) Calcium signalling in bacteria. *Molecular Microbiology*, 54, 291–297.
- Domínguez, D.C., Guragain, M., and Patrauchan, M. (2015) Calcium binding proteins and calcium signaling in prokaryotes. *Cell Calcium*, 57, 151–165.
- Dorn, R.I., Krinsley, D.H., Liu, T., Anderson, S., Clark, J., Cahill, T.A., and Gill, T.E. (1992) Manganese-rich rock varnish does occur in Antarctica. *Chemical Geology*, 99, 289–298.
- Drever, J.I. (1994) The effect of land plants on weathering rates of silicate minerals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 58, 2325–2332.
- Drever, J.I., and Vance, G.F. (1994) Role of Soil Organic Acids in Mineral Weathering Processes. In E.D. Pittman and M.D. Lewan, Eds., *Organic Acids in Geological Processes* pp. 138–161. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Driks, A. (1999) *Bacillus subtilis* Spore Coat. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 1–20.
- Drits, V.A., and Tchoubar, C. (1990) The Modelization Method in the Determination of the Structural Characteristics of Some Layer Silicates: Internal Structure of the Layers, Nature and Distribution of the Stacking Faults. In V.A. Drits and C. Tchoubar, Eds., *X-Ray Diffraction by Disordered Lamellar Structures: Theory and Applications to Microdivided Silicates and Carbons* pp. 233–303. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Drits, V.A., Silvester, E., Gorshkov, A.I., and Manceau, A. (1997) Structure of synthetic monoclinic Na-rich birnessite and hexagonal birnessite: I. Results from X-ray diffraction and selected-area electron diffraction. *American Mineralogist*, 82, 946–961.
- Drits, V.A., Lanson, B., Gorshkov, A.I., and Manceau, A. (1998) Substructure and superstructure of four-layer Ca-exchanged birnessite. *American Mineralogist*, 83, 97–118.
- Drits, V.A., Lanson, B., Bougerol-Chaillout, C., Gorshkov, A.I., and Manceau, A. (2002) Structure of heavy-metal sorbed birnessite: Part 2. Results from electron diffraction. *American Mineralogist*, 87, 1646–1661.
- Drouet, Th., Herbauts, J., Gruber, W., and Demaiffe, D. (2005) Strontium isotope composition as a tracer of calcium sources in two forest ecosystems in Belgium. *Geoderma*, 126, 203–223.
- Droz, B., Dumas, N., Duckworth, O.W., and Peña, J. (2015) A Comparison of the Sorption Reactivity of Bacteriogenic and Mycogenic Mn Oxide Nanoparticles. *Environmental Science & Technology*, 49, 4200–4208.
- Duponnois, R., Hafidi, M., Ndoye, I., Ramanankierana, H., Bâ, A. (2013) Généralités sur la symbiose mycorhizienne : introduction.

E

- Eisenhauer, A., Nögler, T.F., Stille, P., Kramers, J., Gussone, N., Bock, B., Fietzke, J., Hippler, D., Schmitt, A.-D., (2004) Proposal for International Agreement on Ca Notation Resulting from

Discussions at Workshops on Stable Isotope Measurements Held in Davos (Goldschmidt 2002) and Nice (EGS-AGU-EUG 2003). *Geostand. Geoanalytical Res.* 28, 149–151.

Elias, R.W., Hirao, Y., and Patterson, C.C. (1982) The circumvention of the natural biopurification of calcium along nutrient pathways by atmospheric inputs of industrial lead. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 46, 2561–2580.

Ellison, D., Morris, C.E., Locatelli, B., Sheil, D., Cohen, J., Murdiyarso, D., Gutierrez, V., Noordwijk, M. van, Creed, I.F., Pokorny, J., and others (2017) Trees, forests and water: Cool insights for a hot world. *Global Environmental Change*, 43, 51–61.

F

Fantle, M.S., and Bullen, T.D. (2009) Essentials of iron, chromium, and calcium isotope analysis of natural materials by thermal ionization mass spectrometry. *Chemical Geology*, 258, 50–64.

Fantle, M.S., and Tipper, E.T. (2014) Calcium isotopes in the global biogeochemical Ca cycle: Implications for development of a Ca isotope proxy. *Earth-Science Reviews*, 129, 148–177.

Farkaš, J., Déjeant, A., Novák, M., and Jacobsen, S.B. (2011) Calcium isotope constraints on the uptake and sources of Ca²⁺ in a base-poor forest: A new concept of combining stable ($\delta^{44}/^{42}\text{Ca}$) and radiogenic (ϵCa) signals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75, 7031–7046.

Feller, C., Blanchart, E., Herbillon, A., and Leprun, J.C. (2007) L'importance des recherches coloniales, en particulier à Madagascar, dans le développement de la pédologie française. *Etude et Gestion des Sols*.

Femi Marafatto, F., Lanson, B., and Peña, J. (2018) Crystal growth and aggregation in suspensions of $\delta\text{-MnO}_2$ nanoparticles: implications for surface reactivity. *Environmental Science: Nano*, 5, 497–508.

Fierer, N., and Jackson, R.B. (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 626–631.

Fink, C., Baumann, K.-H., Groeneveld, J., and Steinke, S. (2010) Strontium/Calcium ratio, carbon and oxygen stable isotopes in coccolith carbonate from different grain-size fractions in South Atlantic surface sediments. *Geobios*, 43, 151–164.

Finkelman, R.B., Evans, H.T., and Matzko, J.J. (1974) Manganese minerals in geodes from Chihuahua, Mexico. *Mineralogical Magazine*, 39, 549–558.

Flemming, H.-C., and Wuertz, S. (2019) Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 17, 247–260.

Franceschi, V.R., and Horner, H.T. (1980) Calcium oxalate crystals in plants. *The Botanical Review*, 46, 361–427.

Frimmersdorf, E., Horatzek, S., Pelnikevich, A., Wiehlmann, L., and Schomburg, D. (2010) How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach. *Environmental Microbiology*, 12, 1734–1747.

Futsaether, C.M., and Johnsson, A. (1994) Using fura-2 to measure intracellular free calcium in *Propionibacterium acnes*. *Canadian Journal of Microbiology*, 40, 439–445.

G

- Gaillot, A.-C. (2002, January 15) Caractérisation structurale de la birnessite : Influence du protocole de synthèse. phdthesis, Université Joseph-Fourier - Grenoble I.
- Gaillot, A.-C., Flot, D., Drits, V.A., Manceau, A., Burghammer, M., and Lanson, B. (2003) Structure of Synthetic K-rich Birnessite Obtained by High-Temperature Decomposition of KMnO_4 . I. Two-Layer Polytype from 800 °C Experiment. *Chemistry of Materials*, 15, 4666–4678.
- Gaillot, A.-C., Drits, V.A., Plançon, A., and Lanson, B. (2004) Structure of Synthetic K-Rich Birnessites Obtained by High-Temperature Decomposition of KMnO_4 . 2. Phase and Structural Heterogeneities. *Chemistry of Materials*, 16, 1890–1905.
- Gaillot, A.-C., Lanson, B., and Drits, V.A. (2005) Structure of Birnessite Obtained from Decomposition of Permanganate under Soft Hydrothermal Conditions. 1. Chemical and Structural Evolution as a Function of Temperature. *Chemistry of Materials*, 17, 2959–2975.
- Gaillot, A.-C., Drits, V.A., Manceau, A., and Lanson, B. (2007) Structure of the synthetic K-rich phylломanganate birnessite obtained by high-temperature decomposition of KMnO_4 : Substructures of K-rich birnessite from 1000°C experiment. *Microporous and Mesoporous Materials*, 98, 267–282.
- Galer, S.J.G. (1999) Optimal double and triple spiking for high precision lead isotopic measurement. *Chemical Geology*, 157, 255–274.
- Gangloff, S., Stille, P., Pierret, M.-C., Weber, T., and Chabaux, F. (2014) Characterization and evolution of dissolved organic matter in acidic forest soil and its impact on the mobility of major and trace elements (case of the Strengbach watershed). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 130, 21–41.
- Gangola, P., and Rosen, B.P. (1987) Maintenance of intracellular calcium in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 12570–12574.
- Gasparatos, D., Tarenidis, D., Haidouti, C., and Oikonomou, G. (2005) Microscopic structure of soil Fe-Mn nodules: environmental implication. *Environmental Chemistry Letters*, 2, 175–178.
- Gauquelin, T., Fromard, F., Badri, W., and Dagnac, J. (1992) Apports d'éléments minéraux au sol par l'intermédiaire de la litière, des pluies et des pluiolessivats dans un peuplement à genévrier thurifère (*Juniperus thurifera* L) du Haut Atlas occidental (Maroc). *Annales des Sciences Forestières*, 49, 599–614.
- Genuchten, C.M. van, and Peña, J. (2016) Sorption selectivity of birnessite particle edges: a d-PDF analysis of Cd(II) and Pb(II) sorption by δ - MnO_2 and ferrihydrite. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 18, 1030–1041.
- Geszvain, K., McCarthy, J.K., and Tebo, B.M. (2013) Elimination of Manganese(II,III) Oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1 by a Double Knockout of Two Putative Multicopper Oxidase Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 357–366.
- Giovanoli, R., Brütsch, R., Diem, D., Osman-Sigg, G., and Sigg, L. (1980) The composition of settling particles in Lake Zürich. *Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie*, 42, 89–100.

- Givaudan, N., Wiegand, C., Le Bot, B., Renault, D., Pallois, F., Llopis, S., and Binet, F. (2014) Acclimation of earthworms to chemicals in anthropogenic landscapes, physiological mechanisms and soil ecological implications. *Soil Biology and Biochemistry*, 73, 49–58.
- Glenn, J.K., Akileswaran, L., and Gold, M.H. (1986) Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 251, 688–696.
- Glover, E.D. (1977) Characterization of a marine birnessite. *American Mineralogist*, 62, 278–285.
- Gobran, G.R., Turpault, M.-P., and Courchesne, F. (2005) Chapter 1 - Contribution of rhizospheric processes to mineral weathering in forest soils. In P.M. Huang and G.R. Gobran, Eds., *Biogeochemistry of Trace Elements in the Rhizosphere* pp. 3–28. Elsevier, Amsterdam.
- Golden, D.C., Chen, C.C., and Dixon, J.B. (1987) Transformation of Birnessite to Buserite, Todorokite, and Manganite under Mild Hydrothermal Treatment. *Clays and Clay Minerals*, 35, 271–280.
- Goldich, S.S. (1938) A Study in Rock-Weathering. *The Journal of Geology*, 46, 17–58.
- Grangeon, S. (2008, December 8) Cristallochimie des phyllomanganates nanocristallins désordonnés. Implications pour l'adsorption d'éléments métalliques. phdthesis, Université Joseph-Fourier - Grenoble I.
- Grangeon, S., Manceau, A., Guilhermet, J., Gaillot, A.-C., Lanson, M., and Lanson, B. (2012) Zn sorption modifies dynamically the layer and interlayer structure of vernadite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 85, 302–313.
- Grangeon, S., Lanson, B., and Lanson, M. (2014) Solid-state transformation of nanocrystalline phyllomanganate into tectomanganate: influence of initial layer and interlayer structure. *Acta Crystallographica Section B: Structural Science, Crystal Engineering and Materials*, 70, 828–838.
- Grangeon, S., Fernandez-Martinez, A., Baronnet, A., Marty, N., Poulain, A., Elkaïm, E., Roosz, C., Gaboreau, S., Henocq, P., and Claret, F. (2017) Quantitative X-ray pair distribution function analysis of nanocrystalline calcium silicate hydrates: a contribution to the understanding of cement chemistry. *Journal of Applied Crystallography*, 50, 14–21.
- Graustein, W.C., and Armstrong, R.L. (1983) The Use of Strontium-87/Strontium-86 Ratios to Measure Atmospheric Transport into Forested Watersheds. *Science*, 219, 289–292.
- Griffith, E.M., Schmitt, A.-D., Andrews, M.G., and Fantle, M.S. (2020) Elucidating modern geochemical cycles at local, regional, and global scales using calcium isotopes. *Chemical Geology*, 534, 119445.
- Guggenheim, S., Adams, J.M., Bain, D.C., Bergaya, F., Brigatti, M.F., Drits, V.A., Formoso, M.L.L., Galán, E., Kogure, T., and Stanjek, H. (2006) Summary of recommendations of Nomenclature Committees relevant to clay mineralogy: Report of the association Internationale pour l'Etude des Argiles (AIPEA) Nomenclature Committee for 2006. *Clays and Clay Minerals*, 54, 761–772.
- Guillon, L., El Mecherki, M., Altenburger, S., Graumann, P.L., and Schalk, I.J. (2012) High cellular organization of pyoverdine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: clustering of PvdA at the old cell pole. *Environmental Microbiology*, 14, 1982–1994.

Gussone, N., Schmitt, A.-D., Heuser, A., Wombacher, F., Dietzel, M., Tipper, E., and Schiller, M. (2016) *Calcium Stable Isotope Geochemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg.

H

Haferburg, G., and Kothe, E. (2007) Microbes and metals: interactions in the environment. *Journal of Basic Microbiology*, 47, 453–467.

Hakem, N., Mahamid, I.A., Apps, J., and Moridis, G. (2004) Sorption of Cesium and Strontium on Hanford Soil. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 246, 275–278.

Hamelin, B., Manhès, G., Albarede, F., and Allègre, C.J. (1985) Precise lead isotope measurements by the double spike technique: A reconsideration. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 49, 173–182.

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*, 126, 247–264.

Hedin, L.O., Granat, L., Likens, G.E., Adri Buishand, T., Galloway, J.N., Butler, T.J., and Rodhe, H. (1994) Steep declines in atmospheric base cations in regions of Europe and North America. *Nature*, 367, 351–354.

Herbaud, M.-L., Guiseppi, A., Denizot, F., Haiech, J., and Kilhoffer, M.-C. (1998) Calcium signalling in *Bacillus subtilis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1448, 212–226.

Heuser, A., Schmitt, A.-D., Gussone, N., and Wombacher, F. (2016) Analytical Methods. In N. Gussone, Anne-Desiree Schmitt, A. Heuser, F. Wombacher, M. Dietzel, E. Tipper, and M. Schiller, Eds., *Calcium Stable Isotope Geochemistry* pp. 23–73. Springer, Berlin, Heidelberg.

Hindshaw, R.S., Tipper, E.T., Reynolds, B.C., Lemarchand, E., Wiederhold, J.G., Magnusson, J., Bernasconi, S.M., Kretzschmar, R., and Bourdon, B. (2011) Hydrological control of stream water chemistry in a glacial catchment (Damma Glacier, Switzerland). *Chemical Geology*, 285, 215–230.

Hinsinger, P., and Gilkes, R. j. (1996) Mobilization of phosphate from phosphate rock and alumina-sorbed phosphate by the roots of ryegrass and clover as related to rhizosphere pH. *European Journal of Soil Science*, 47, 533–544.

Hinsinger, P., and Gilkes, R.J. (1997) Dissolution of phosphate rock in the rhizosphere of five plant species grown in an acid, P-fixing mineral substrate. *Geoderma*, 75, 231–249.

Hinsinger, P., Elsass, F., Jaillard, B., and Robert, M. (1993) Root-induced irreversible transformation of a trioctahedral mica in the rhizosphere of rape. *Journal of Soil Science*, 44, 535–545.

Hinsinger, P., Fernandes Barros, O.N., Benedetti, M.F., Noack, Y., and Callot, G. (2001) Plant-induced weathering of a basaltic rock: experimental evidence. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65, 137–152.

Hinsinger, P., Gobran, G.R., Gregory, P.J., and Wenzel, W.W. (2005) Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytologist*, 168, 293–303.

- Hippler, D., Schmitt, A.-D., Gussone, N., Heuser, A., Stille, P., Eisenhauer, A., and Nögler, T.F. (2003) Calcium Isotopic Composition of Various Reference Materials and Seawater. *Geostandards Newsletter*, 27, 13–19.
- Hoffland, E., Giesler, R., Jongmans, A.G., and Breemen, N. van (2003) Feldspar Tunneling by Fungi along Natural Productivity Gradients. *Ecosystems*, 6, 739–746.
- Hofmann, A. (1971) Fractionation corrections for mixed-isotope spikes of Sr, K, and Pb. *Earth and Planetary Science Letters*, 10, 397–402.
- Holmden, C. (2005). Measurement of ^{44}Ca using a ^{43}Ca - ^{42}Ca double-spike TIMS technique.
- Holmden, C., and Bélanger, N. (2010) Ca isotope cycling in a forested ecosystem. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74, 995–1015.
- Horwitz, E.P., McAlister, D.R., Bond, A.H., and Barrans, R.E. (2005) Novel Extraction of Chromatographic Resins Based on Tetraalkyldiglycolamides: Characterization and Potential Applications. *Solvent Extraction and Ion Exchange*, 23, 319–344.
- Huang, P.M., Li, Y., and Sumner, M.E. (2011) *Handbook of soil sciences: properties and processes*. CRC Press.
- Huang, S., Chen, D., Pelczar, P.L., Vepachedu, V.R., Setlow, P., and Li, Y. (2007) Levels of Ca^{2+} -Dipicolinic Acid in Individual *Bacillus* Spores Determined Using Microfluidic Raman Tweezers. *Journal of Bacteriology*, 189, 4681–4687.

J

- Jackson, M.L. (1957) Frequency Distribution of Clay Minerals in Major Great Soil Groups as Related to the Factors of Soil Formation. *Clays and Clay Minerals*, 6, 133–143.
- Jaillard, B., Guyon, A., and Maurin, A.F. (1991) Structure and composition of calcified roots, and their identification in calcareous soils. *Geoderma*, 50, 197–210.
- Joergensen, R.G., and Wichern, F. (2008) Quantitative assessment of the fungal contribution to microbial tissue in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 2977–2991.
- Johnson, C.M., Beard, B.L., and Albarède, F. (2018) *Geochemistry of Non-Traditional Stable Isotopes*, 472 p. Walter de Gruyter GmbH & Co KG.
- Jones, H.E., Holland, I.B., Baker, H.L., and Campbell, A.K. (1999) Slow changes in cytosolic free Ca^{2+} in *Escherichia coli* highlight two putative influx mechanisms in response to changes in extracellular calcium. *Cell Calcium*, 25, 265–274.
- Jones, L.H.P., and Milne, A.A. (1956) Birnessite, a new manganese oxide mineral from Aberdeenshire, Scotland. *Mineralogical magazine and journal of the Mineralogical Society*, 31, 283–288.
- Jürgensen, A., Widmeyer, J.R., Gordon, R.A., Bendell-Young, L.I., Moore, M.M., and Crozier, E.D. (2004) The structure of the manganese oxide on the sheath of the bacterium *Leptothrix discophora*: An XAFS study. *American Mineralogist*, 89, 1110–1118.

K

- Kafantaris, F.-C.A., and Borrok, D.M. (2014) Zinc isotope fractionation during surface adsorption and intracellular incorporation by bacteria. *Chemical Geology*, 366, 42–51.
- Knight, H., Trewavas, A.J., and Knight, M.R. (1997) Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *The Plant Journal*, 12, 1067–1078.
- Knight, M.R., Campbell, A.K., Smith, S.M., and Trewavas, A.J. (1991) Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature*, 352, 524–526.
- Kodešová, R., Kodeš, V., Žigová, A., and Šimůnek, J. (2006) Impact of plant roots and soil organisms on soil micromorphology and hydraulic properties. *Biologia*, 61, S339–S343.
- Kosmulski, M. (2001) *Chemical properties of material surfaces* Vol. 102. CRC press.
- Kunst, F. j, Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessières, P., Bolotin, A., and Borchert, S. (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390, 249–256.

L

- Lanson, B., Drits, V.A., Silvester, E., and Manceau, A. (2000) Structure of H-exchanged hexagonal birnessite and its mechanism of formation from Na-rich monoclinic busserite at low pH. *American Mineralogist*, 85, 826–838.
- Lanson, B., Drits, V.A., Gaillot, A.-C., Silvester, E., Plançon, A., and Manceau, A. (2002a) Structure of heavy-metal sorbed birnessite: Part 1. Results from X-ray diffraction. *American Mineralogist*, 87, 1631–1645.
- Lanson, B., Drits, V.A., Feng, Q., and Manceau, A. (2002b) Structure of synthetic Na-birnessite: Evidence for a triclinic one-layer unit cell. *American Mineralogist*, 87, 1662–1671.
- Lanson, B., Marcus, M.A., Fakra, S., Panfili, F., Geoffroy, N., and Manceau, A. (2008) Formation of Zn–Ca phyllomanganate nanoparticles in grass roots. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72, 2478–2490.
- Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., and Fierer, N. (2009) Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 5111–5120.
- Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R., and Pugin, A. (2002) Analysis and Effects of Cytosolic Free Calcium Increases in Response to Elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* Cells. *The Plant Cell*, 14, 2627–2641.
- Lecourieux, D., Lamotte, O., Bourque, S., Wendehenne, D., Mazars, C., Ranjeva, R., and Pugin, A. (2005) Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell Calcium*, 38, 527–538.
- Lehn, G.O., Jacobson, A.D., and Holmden, C. (2013) Precise analysis of Ca isotope ratios ($\delta^{44}/^{40}\text{Ca}$) using an optimized ^{43}Ca – ^{42}Ca double-spike MC-TIMS method. *International Journal of Mass Spectrometry*, 351, 69–75.

- Lesack, L.F.W., and Melack, J.M. (1996) Mass balance of major solutes in a rainforest catchment in the Central Amazon: Implications for nutrient budgets in tropical rainforests. *Biogeochemistry*, 32, 115–142.
- Levy, R., and Shainberg, I. (1972) Calcium-magnesium exchange in montmorillonite and vermiculite. *Clays Clay Miner*, 20, 37-46.
- Likens, G.E., Driscoll, C.T., Buso, D.C., Siccama, T.G., Johnson, C.E., Lovett, G.M., Fahey, T.J., Reiners, W.A., Ryan, D.F., Martin, C.W., and others (1998) The biogeochemistry of calcium at Hubbard Brook. *Biogeochemistry*, 41, 89–173.
- Liu, D.-C., Hsu, C.-N., and Chuang, C.-L. (1995) Ion-exchange and sorption kinetics of cesium and strontium in soils. *Applied radiation and isotopes*, 46, 839–846.
- Liu, F., Colombo, C., Adamo, P., He, J.Z., and Violante, A. (2002) Trace Elements in Manganese-Iron Nodules from a Chinese Alfisol. *Soil Science Society of America Journal*, 66, 661–670.
- Lu, J., Tertre, E., and Beaucaire, C. (2014) Assessment of a predictive model to describe the migration of major inorganic cations in a Bt soil horizon. *Applied geochemistry*, 41, 151–162.

M

- Manceau, A., Silvester, E., Bartoli, C., Lanson, B., and Drits, V.A. (1997) Structural mechanism of Co^{2+} oxidation by the phylломanganate buserite. *American Mineralogist*, 82, 1150–1175.
- Manceau, A., Tamura, N., Marcus, M.A., Macdowell, A.A., Celestre, R.S., Sublett, R.E., Sposito, G., and Padmore, H.A. (2002) Deciphering Ni sequestration in soil ferromanganese nodules by combining X-ray fluorescence, absorption, and diffraction at micrometer scales of resolution. *American Mineralogist*, 87, 1494–1499.
- Manceau, A., Lanson, M., and Geoffroy, N. (2007) Natural speciation of Ni, Zn, Ba, and As in ferromanganese coatings on quartz using X-ray fluorescence, absorption, and diffraction. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71, 95–128.
- Manceau, A., Marcus, M.A., Grangeon, S., Lanson, M., Lanson, B., Gaillot, A.-C., Skanthakumar, S., and Soderholm, L. (2013) Short-range and long-range order of phylломanganate nanoparticles determined using high-energy X-ray scattering. *Journal of Applied Crystallography*, 46, 193–209.
- Mancini, S.A., Ulrich, A.C., Lacrampe-Couloume, G., Sleep, B., Edwards, E.A., and Lollar, B.S. (2003) Carbon and Hydrogen Isotopic Fractionation during Anaerobic Biodegradation of Benzene. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 191–198.
- Marcus, M.A., Manceau, A., and Kersten, M. (2004) Mn, Fe, Zn and As speciation in a fast-growing ferromanganese marine nodule. Associate editor: G. R. Helz. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68, 3125–3136.
- Marschner, H. (1995) Mineral nutrition of higher plants.. ed. 2.
- Marschner, H., Römheld, V., and Kissel, M. (1986a) Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *Journal of Plant Nutrition*, 9, 695–713.

- Marschner, H., Römheld, V., Horst, W.J., and Martin, P. (1986b) Root-induced changes in the rhizosphere: Importance for the mineral nutrition of plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 149, 441–456.
- Marschner, P., Gerendás, J., and Sattelmacher, B. (1999) Effect of N concentration and N source on root colonization by *Pseudomonas fluorescens* 2-79RLI. *Plant and Soil*, 215, 135–141.
- Mathee, K., Narasimhan, G., Valdes, C., Qiu, X., Matewish, J.M., Koehrsen, M., Rokas, A., Yandava, C.N., Engels, R., Zeng, E., and others (2008) Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 3100–3105.
- Matlakowska, R., Skłodowska, A., and Nejbort, K. (2012) Bioweathering of Kupferschiefer black shale (Fore-Sudetic Monocline, SW Poland) by indigenous bacteria: implication for dissolution and precipitation of minerals in deep underground mine. *FEMS Microbiology Ecology*, 81, 99–110.
- McBride, M.B., (1994) Environmental chemistry of soils. *Environ. Chem. Soils*.
- McKinney, C.R., McCrea, J.M., Epstein, S., Allen, H.A., and Urey, H.C. (2004) Improvements in Mass Spectrometers for the Measurement of Small Differences in Isotope Abundance Ratios. *Review of Scientific Instruments*, 21, 724–730.
- McLAUGHLIN, S.B., and Wimmer, R. (1999) Tansley Review No. 104 Calcium physiology and terrestrial ecosystem processes. *The New Phytologist*, 142, 373–417.
- Meija, J., Coplen, T.B., Berglund, M., Brand, W.A., Bièvre, P.D., Gröning, M., Holden, N.E., Irrgeher, J., Loss, R.D., Walczyk, T., and others (2016) Atomic weights of the elements 2013 (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 88, 265–291.
- Mermut, A.R., and Lagaly, G. (2001) Baseline studies of the clay minerals society source clays: layer-charge determination and characteristics of those minerals containing 2: 1 layers. *Clays and Clay Minerals*, 49, 393–397.
- Meunier, A. (2005) *Clays*, 477 p. Springer Science & Business Media.
- Michard, E., Lima, P.T., Borges, F., Silva, A.C., Portes, M.T., Carvalho, J.E., Gilliam, M., Liu, L.-H., Obermeyer, G., and Feijó, J.A. (2011) Glutamate Receptor-Like Genes Form Ca²⁺ Channels in Pollen Tubes and Are Regulated by Pistil d-Serine. *Science*, 332, 434–437.
- Miethke, M., and Marahiel, M.A. (2007) Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71, 413–451.
- Miller, E.K., Blum, J.D., and Friedland, A.J. (1993) Determination of soil exchangeable-cation loss and weathering rates using Sr isotopes. *Nature*, 362, 438–441.
- Missana, T., Garcia-Gutierrez, M., and Alonso, U. (2008) Sorption of strontium onto illite/smectite mixed clays. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, 33, S156–S162.
- Miyata, N., Tani, Y., Iwahori, K., and Soma, M. (2004) Enzymatic formation of manganese oxides by an *Acremonium*-like hyphomycete fungus, strain KR21-2. *FEMS Microbiology Ecology*, 47, 101–109.
- Miyata, N., Tani, Y., Maruo, K., Tsuno, H., Sakata, M., and Iwahori, K. (2006) Manganese(IV) Oxide Production by *Acremonium* sp. Strain KR21-2 and Extracellular Mn(II) Oxidase Activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 6467–6473.

- Miyata, N., Tani, Y., Sakata, M., and Iwahori, K. (2007) Microbial manganese oxide formation and interaction with toxic metal ions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104, 1–8.
- Monshausen, G.B., Miller, N.D., Murphy, A.S., and Gilroy, S. (2011) Dynamics of auxin-dependent Ca²⁺ and pH signaling in root growth revealed by integrating high-resolution imaging with automated computer vision-based analysis. *The Plant Journal*, 65, 309–318.
- Moore, D.M., and Reynolds Jr, R.C. (1989) *X-ray Diffraction and the Identification and Analysis of Clay Minerals*. Oxford University Press (OUP).
- Mora, C., Tittensor, D.P., Adl, S., Simpson, A.G.B., and Worm, B. (2011) How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *PLOS Biology*, 9, e1001127.
- Moradali, M.F., Ghods, S., and Rehm, B.H. (2017) *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 39.
- Mulholland, D.S., Poitrasson, F., Shirokova, L.S., González, A.G., Pokrovsky, O.S., Boaventura, G.R., and Vieira, L.C. (2015) Iron isotope fractionation during Fe(II) and Fe(III) adsorption on cyanobacteria. *Chemical Geology*, 400, 24–33.
- Murray, J.W. (1975) The interaction of metal ions at the manganese dioxide-solution interface. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 39, 505–519.

N

- Nagy, K.L. (1995) Dissolution and precipitation kinetics of sheet silicates. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 31, 173–233.
- Navarrete, J.U., Borrok, D.M., Viveros, M., and Ellzey, J.T. (2011) Copper isotope fractionation during surface adsorption and intracellular incorporation by bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75, 784–799.
- Nealson, K.H., and Ford, J. (1980) Surface enhancement of bacterial manganese oxidation: Implications for aquatic environments. *Geomicrobiology Journal*, 2, 21–37.
- Neaman, A., Mouélé, F., Trolard, F., and Bourrié, G. (2004) Improved methods for selective dissolution of Mn oxides: applications for studying trace element associations. *Applied Geochemistry*, 19, 973–979.
- Ni, W., Li, Y., Guan, J., Zhao, J., Cui, J., Wang, R., and Liu, Y. (2016) Effects of Efflux Pump Inhibitors on Colistin Resistance in Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60, 3215–3218.
- Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., and Setlow, P. (2000) Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 548–572.
- Norris, V., Grant, S., Freestone, P., Canvin, J., Sheikh, F.N., Toth, I., Trinei, M., Modha, K., and Norman, R.I. (1996) Calcium signalling in bacteria. *Journal of Bacteriology*, 178, 3677–3682.

O

- Ockert, C., Gussone, N., Kaufhold, S., and Teichert, B.M.A. (2013) Isotope fractionation during Ca exchange on clay minerals in a marine environment. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 112, 374–388.
- Ortega-Morales, B.O., Narváez-Zapata, J., Reyes-Estebanez, M., Quintana, P., De la Rosa-García, S.D.C., Bullen, H., Gómez-Cornelio, S., and Chan-Bacab, M.J. (2016) Bioweathering Potential of Cultivable Fungi Associated with Semi-Arid Surface Microhabitats of Mayan Buildings. *Frontiers in Microbiology*, 7, 201.
- Ortiz-Ramírez, C., Michard, E., Simon, A.A., Damineli, D.S.C., Hernández-Coronado, M., Becker, J.D., and Feijó, J.A. (2017) GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE channels are essential for chemotaxis and reproduction in mosses. *Nature*, 549, 91–95.

P

- Page, B.D., Bullen, T.D., and Mitchell, M.J. (2008) Influences of calcium availability and tree species on Ca isotope fractionation in soil and vegetation. *Biogeochemistry*, 88, 1–13.
- Paidhungat, M., and Setlow, P. (2000) Role of Ger Proteins in Nutrient and Nonnutrient Triggering of Spore Germination in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 182, 2513–2519.
- Palumbo, B., Bellanca, A., Neri, R., and Roe, M.J. (2001) Trace metal partitioning in Fe–Mn nodules from Sicilian soils, Italy. *Chemical Geology*, 173, 257–269.
- Paulsen, I.T., Nguyen, L., Sliwinski, M.K., Rabus, R., and Saier, M.H. (2000) Microbial genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes | Edited by G. von Heijne. *Journal of Molecular Biology*, 301, 75–100.
- Peacock, C.L., and Sherman, D.M. (2007) Sorption of Ni by birnessite: Equilibrium controls on Ni in seawater. *Chemical Geology*, 238, 94–106.
- Perakis, S.S., Maguire, D.A., Bullen, T.D., Cromack, K., Waring, R.H., and Boyle, J.R. (2006) Coupled Nitrogen and Calcium Cycles in Forests of the Oregon Coast Range. *Ecosystems*, 9, 63–74.
- Plášek, J., Babuka, D., and Hofer, M. (2017) H⁺ translocation by weak acid uncouplers is independent of H⁺ electrochemical gradient. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 49, 391–397.
- Plomp, M., Leighton, T.J., Wheeler, K.E., Hill, H.D., and Malkin, A.J. (2007) In vitro high-resolution structural dynamics of single germinating bacterial spores. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 9644–9649.
- Post, J.E. (1999) Manganese oxide minerals: Crystal structures and economic and environmental significance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 3447–3454.
- Post, J.E., and Veblen, D.R. (1990) Crystal structure determinations of synthetic sodium, magnesium, and potassium birnessite using TEM and the Rietveld method. *American Mineralogist*, 75, 477–489.
- Post, J.E., Heaney, P.J., and Hanson, J. (2002) Rietveld refinement of a triclinic structure for synthetic Na-birnessite using synchrotron powder diffraction data. *Powder Diffraction*, 17, 218–221.

- Poszwa, A., Dambrine, E., Pollier, B., and Atteia, O. (n.d.) A comparison between Ca and Sr cycling in forest ecosystems.
- Probst, A., El Gh'mari, A., Aubert, D., Fritz, B., and McNutt, R. (2000) Strontium as a tracer of weathering processes in a silicate catchment polluted by acid atmospheric inputs, Strengbach, France. *Chemical Geology*, 170, 203–219.
- Prospero, J.M., and Mayol-Bracero, O.L. (2013) Understanding the transport and impact of African dust on the Caribbean Basin. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 94, 1329–1337.

R

- Reinholdt, M.X., Hubert, F., Faurel, M., Tertre, E., Razafitianamaharavo, A., Francius, G., Prêt, D., Petit, S., Béré, E., and Pelletier, M. (2013) Morphological properties of vermiculite particles in size-selected fractions obtained by sonication. *Applied clay science*, 77, 18–32.
- Romaniello, S.J., Field, M.P., Smith, H.B., Gordon, G.W., Kim, M.H., and Anbar, A.D. (2015) Fully automated chromatographic purification of Sr and Ca for isotopic analysis. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 30, 1906–1912.
- Romanowicz, K.J., Freedman, Z.B., Upchurch, R.A., Argiroff, W.A., and Zak, D.R. (2016) Active microorganisms in forest soils differ from the total community yet are shaped by the same environmental factors: the influence of pH and soil moisture. *FEMS Microbiology Ecology*, 92, fiw149.
- Rousk, J., and Bengtson, P. (2014) Microbial regulation of global biogeochemical cycles. *Frontiers in Microbiology*, 5.
- Ruas, J.S., Siqueira-Santos, E.S., Rodrigues-Silva, E., and Castilho, R.F. (2018) High glycolytic activity of tumor cells leads to underestimation of electron transport system capacity when mitochondrial ATP synthase is inhibited. *Scientific Reports*, 8, 17383.
- Rudge, J.F., Reynolds, B.C., and Bourdon, B. (2009) The double spike toolbox. *Chemical Geology*, 265, 420–431.
- Russell, W.A., Papanastassiou, D.A., and Tombrello, T.A. (1978) Ca isotope fractionation on the Earth and other solar system materials. *Geochimica et cosmochimica acta*, 42, 1075–1090.

S

- Saratovsky, I., Wightman, P.G., Pastén, P.A., Gaillard, J.-F., and Poeppelmeier, K.R. (2006) Manganese Oxides: Parallels between Abiotic and Biotic Structures. *Journal of the American Chemical Society*, 128, 11188–11198.
- Schauble, E.A. (2004) Applying stable isotope fractionation theory to new systems. *Reviews in mineralogy and geochemistry*, 55, 65–111.

- Schimel, D.S. (1995) Terrestrial ecosystems and the carbon cycle. *Global Change Biology*, 1, 77–91.
- Schmidt, M.W.I., Torn, M.S., Abiven, S., Dittmar, T., Guggenberger, G., Janssens, I.A., Kleber, M., Kögel-Knabner, I., Lehmann, J., Manning, D.A.C., and others (2011) Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. *Nature*, 478, 49–56.
- Schmitt, A., Bracke, G., Stille, P., and Kiefel, B. (2001) The Calcium Isotope Composition of Modern Seawater Determined by Thermal Ionisation Mass Spectrometry. *Geostandards Newsletter*, 25, 267–275.
- Schmitt, A.-D. (2016) Earth-Surface Ca Isotopic Fractionations. In *Calcium Stable Isotope Geochemistry* pp. 145–172. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Schmitt, A.-D., and Stille, P. (2005) The source of calcium in wet atmospheric deposits: Ca-Sr isotope evidence. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69, 3463–3468.
- Schmitt, A.-D., Chabaux, F., and Stille, P. (2003) The calcium riverine and hydrothermal isotopic fluxes and the oceanic calcium mass balance. *Earth and Planetary Science Letters*, 213, 503–518.
- Schmitt, A.-D., Gangloff, S., Brazier, J.-M., Nuvoli, N. (2023) Calcium isotope fractionation associated with adsorption and desorption on/from δ -MnO₂. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 354, 109-122.
- Schmitt, A.-D., Gangloff, S., Cobert, F., Lemarchand, D., Stille, P., and Chabaux, F. (2009) High performance automated ion chromatography separation for Ca isotope measurements in geological and biological samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 24, 1089–1097.
- Schmitt, A.-D., Cobert, F., Bourgeade, P., Ertlen, D., Labolle, F., Gangloff, S., Badot, P.-M., Chabaux, F., and Stille, P. (2013) Calcium isotope fractionation during plant growth under a limited nutrient supply. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 110, 70–83.
- Schmitt, A.-D., Gangloff, S., Labolle, F., Chabaux, F., and Stille, P. (2017) Calcium biogeochemical cycle at the beech tree-soil solution interface from the Strengbach CZO (NE France): insights from stable Ca and radiogenic Sr isotopes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 213, 91–109.
- Setlow, B., Loshon, C.A., Genest, P.C., Cowan, A.E., Setlow, C., and Setlow, P. (2002) Mechanisms of killing spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 362–375.
- Setlow, B., Atluri, S., Kitchel, R., Koziol-Dube, K., and Setlow, P. (2006) Role of Dipicolinic Acid in Resistance and Stability of Spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-Protective α/β -Type Small Acid-Soluble Proteins. *Journal of Bacteriology*, 188, 3740–3747.
- Setlow, B., Peng, L., Loshon, C.A., Li, Y.-Q., Christie, G., and Setlow, P. (2009) Characterization of the germination of *Bacillus megaterium* spores lacking enzymes that degrade the spore cortex. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 318–328.
- Setlow, P. (2003) Spore germination. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 550–556.
- Setlow, P. (2005) The bacterial spore: nature's survival package. *Culture*, 26, 1–8.
- Setlow, P. (2006) Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 514–525.

- Shen, C., Xiong, J., Zhang, H., Feng, Y., Lin, X., Li, X., Liang, W., and Chu, H. (2013) Soil pH drives the spatial distribution of bacterial communities along elevation on Changbai Mountain. *Soil Biology and Biochemistry*, 57, 204–211.
- Shen, Y.F., Zenger, R.P., DeGuzman, R.N., Suib, S.L., McCurdy, L., Potter, D.I., and O'Young, C.L. (1993) Manganese Oxide Octahedral Molecular Sieves: Preparation, Characterization, and Applications. *Science*, 260, 511–515.
- Shuman, L.M. (1975) The Effect of Soil Properties on Zinc Adsorption by Soils. *Soil Science Society of America Journal*, 39, 454–458.
- Siala, A., Hill, I.R., and Gray, T.R.G. (1974) Populations of Spore-forming Bacteria in an Acid Forest Soil, with Special Reference to *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 81, 183–190.
- Simanova, A.A., Kwon, K.D., Bone, S.E., Bargar, J.R., Refson, K., Sposito, G., and Peña, J. (2015) Probing the sorption reactivity of the edge surfaces in birnessite nanoparticles using nickel(II). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 164, 191–204.
- Simpson, A.J., Kingery, W.L., Hayes, M.H., Spraul, M., Humpfer, E., Dvortsak, P., Kerssebaum, R., Godejohann, M., and Hofmann, M. (2002) Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. *Naturwissenschaften*, 89, 84–88.
- Smith, R.J. (1995) Calcium and Bacteria. In R.K. Poole, Ed., *Advances in Microbial Physiology* Vol. 37, pp. 83–133. Academic Press.
- Smits, M.M., Bonneville, S., Benning, L.G., Banwart, S.A., and Leake, J.R. (2012) Plant-driven weathering of apatite – the role of an ectomycorrhizal fungus. *Geobiology*, 10, 445–456.
- Soltner, D. (2003) *Les bases de la production végétale*.
- Sposito, G. (2004) *The Surface Chemistry of Natural Particles*, 256 p. Oxford University Press.
- Sposito, G. (2008) *The chemistry of soils*. Oxford university press.
- Street, J.J., Lindsay, W.L., and Sabey, B.R. (1977) Solubility and Plant Uptake of Cadmium in Soils Amended with Cadmium and Sewage Sludge. *Journal of Environmental Quality*, 6, 72–77.

T

- Taiz, L., and Zeiger, E. (2010) *Plant physiology* 5 th (Ed.). Sunderland. Sinauer Assoc. Inc., Publishers, Sunderland Massachusetts.
- Tan, W.-F., Liu, F., Li, Y.-H., Hu, H.-Q., and Huang, Q.-Y. (2006) Elemental Composition and Geochemical Characteristics of Iron-Manganese Nodules in Main Soils of China1 1Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 40101017) and the Doctor Foundation of the Ministry of Education of China (No. 2002050411). *Pedosphere*, 16, 72–81.
- Tebo, B.M., Bargar, J.R., Clement, B.G., Dick, G.J., Murray, K.J., Parker, D., Verity, R., and Webb, S.M. (2004) BIOGENIC MANGANESE OXIDES: Properties and Mechanisms of Formation. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 32, 287–328.

- Tebo, B.M., Clement, B.G., and Dick, G.J. (2007) Biotransformations of Manganese. In *Manual of Environmental Microbiology* pp. 1223–1238. John Wiley & Sons, Ltd.
- Teng, F.-Z., Dauphas, N., and Watkins, J.M. (2017) Non-Traditional Stable Isotopes: Retrospective and Prospective. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 82, 1–26.
- Tertre, E., Prêt, D., and Ferrage, E. (2011a) Influence of the ionic strength and solid/solution ratio on Ca(II)-for-Na⁺ exchange on montmorillonite. Part 1: Chemical measurements, thermodynamic modeling and potential implications for trace elements geochemistry. *Journal of Colloid and Interface Science*, 353, 248–256.
- Tertre, E., Ferrage, E., Bihannic, I., Michot, L.J., and Prêt, D. (2011b) Influence of the ionic strength and solid/solution ratio on Ca(II)-for-Na⁺ exchange on montmorillonite. Part 2: Understanding the effect of the m/V ratio. Implications for pore water composition and element transport in natural media. *Journal of Colloid and Interface Science*, 363, 334–347.
- Thoennessen, M. (2013) Current status and future potential of nuclide discoveries. *Reports on Progress in Physics*, 76, 056301.
- Thompson, A., and Goynes, K.W. (2012) Introduction to the sorption of chemical constituents in soils. *Nature Education Knowledge*, 4, 7.
- Thor, K. (2019) Calcium—Nutrient and Messenger. *Frontiers in Plant Science*, 10.
- Thorley, R.M.S., Taylor, L.L., Banwart, S.A., Leake, J.R., and Beerling, D.J. (2015) The role of forest trees and their mycorrhizal fungi in carbonate rock weathering and its significance for global carbon cycling. *Plant, Cell & Environment*, 38, 1947–1961.
- Tipper, E. T., Galy, A., and Bickle, M.J. (2006) Riverine evidence for a fractionated reservoir of Ca and Mg on the continents: Implications for the oceanic Ca cycle. *Earth and Planetary Science Letters*, 247, 267–279.
- Tipper, Edward T., Bickle, M.J., Galy, A., West, A.J., Pomiès, C., and Chapman, H.J. (2006) The short term climatic sensitivity of carbonate and silicate weathering fluxes: Insight from seasonal variations in river chemistry. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70, 2737–2754.
- Tipper, E.T., Schmitt, A.-D., and Gussone, N. (2016) Global Ca Cycles: Coupling of Continental and Oceanic Processes. In *Calcium Stable Isotope Geochemistry* pp. 173–222. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Torrecilla, I., Leganés, F., Bonilla, I., and Fernández-Piñas, F. (2000) Use of Recombinant Aequorin to Study Calcium Homeostasis and Monitor Calcium Transients in Response to Heat and Cold Shock in Cyanobacteria. *Plant Physiology*, 123, 161–176.
- Turpault, M.-P., Nys, C., and Calvaruso, C. (2009) Rhizosphere impact on the dissolution of test minerals in a forest ecosystem. *Geoderma*, 153, 147–154.

U

- Urey, H.C. (1947) The thermodynamic properties of isotopic substances. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 562–581.

V

- van der Heijden, G., Legout, A., Midwood, A.J., Craig, C.-A., Pollier, B., Ranger, J., and Dambrine, E. (2013) Mg and Ca root uptake and vertical transfer in soils assessed by an in situ ecosystem-scale multi-isotopic (^{26}Mg & ^{44}Ca) tracing experiment in a beech stand (Breuil-Chenue, France). *Plant and Soil*, 369, 33–45.
- van Leeuwen, H.P., Town, R.M., Buffle, J., Cleven, R.F.M.J., Davison, W., Puy, J., van Riemsdijk, W.H., and Sigg, L. (2005) Dynamic Speciation Analysis and Bioavailability of Metals in Aquatic Systems. *Environmental Science & Technology*, 39, 8545–8556.
- Vanmechelen, L., Groenemans, R., and Van Ranst, E. (1997) Forest soil condition in Europe. Results of a Large-Scale Soil Survey-1997 Technical Report. EC, UN/ECE, Ministry of the Flemish Community.
- Villalobos, A., Ness, J.E., Gustafsson, C., Minshull, J., and Govindarajan, S. (2006) Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments. *BMC Bioinformatics*, 7, 285.
- Villalobos, M., Toner, B., Bargar, J., and Sposito, G. (2003) Characterization of the manganese oxide produced by *Pseudomonas putida* strain MnB1. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67, 2649–2662.
- Villalobos, M., Bargar, J., and Sposito, G. (2005) Trace Metal Retention on Biogenic Manganese Oxide Nanoparticles. *Elements*, 1, 223–226.

W

- Waditee, R., Hossain, G.S., Tanaka, Y., Nakamura, T., Shikata, M., Takano, J., Takabe, Tetsuko, and Takabe, Teruhiro (2004) Isolation and Functional Characterization of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ Antiporters from Cyanobacteria *. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 4330–4338.
- Wang, Q., Yang, P., and Zhu, M. (2018) Structural Transformation of Birnessite by Fulvic Acid under Anoxic Conditions. *Environmental Science & Technology*, 52, 1844–1853.
- Wasylenki, L.E., Anbar, A.D., Liermann, L.J., Mathur, R., Gordon, G.W., and Brantley, S.L. (2007) Isotope fractionation during microbial metal uptake measured by MC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 22, 905.
- Winsor, G.L., Griffiths, E.J., Lo, R., Dhillon, B.K., Shay, J.A., and Brinkman, F.S. (2016) Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic acids research*, 44, D646–D653.

Z

- Zhang, Q., Amor, K., Galer, S.J.G., Thompson, I., and Porcelli, D. (2018) Variations of stable isotope fractionation during bacterial chromium reduction processes and their implications. *Chemical Geology*, 481, 155–164.

Annexes

ANNEXE A : Caractérisation élémentaire et isotopique de l'interaction du calcium sur de la vermiculite en batch et en mode dynamique.

Peu de données sont reportées dans la littérature (Jacobson et Holmden, 2008 ; Gussone et Dietzel, 2016 et réfs associées) en milieu compacté (profil de sol par exemple), concernant un potentiel fractionnement isotopique lors de l'adsorption des alcalino-terreux en mode diffusif (lors du transport dans un sol ou roche compactée à une porosité donnée). Or, dans ces conditions, les mécanismes de fractionnements isotopiques lors de l'adsorption/désorption pourraient être exacerbés par rapport à ce qui a été reporté récemment dans la littérature en utilisant des expériences « batch » traditionnelles (faible rapport solide/solution) (Brazier et al., 2019). Des éléments de réponse dans ce domaine doivent donc être apportés pour mieux comprendre les cycles isotopiques et biogéochimiques du Ca ayant lieu en mode dynamique (transport) dans un milieu compacté, tel qu'un sol.

Dans un premier temps nous avons complété une étude antérieure portant sur l'adsorption du Ca sur des phyllosilicates modèles des sols avec un autre minéral argileux, la vermiculite, comparable à la muscovite déjà étudiée en terme de charge structurale (Brazier et al., 2019) mais avec un interfoliaire ouvert aux cations et à l'eau afin d'essayer de préciser les mécanismes de fractionnement en jeu. Dans un deuxième temps, nous avons mis en place, à l'IC2MP, à Poitiers, en collaboration avec E. Tertre, une expérimentation en mode dynamique (transport) afin de comparer les mécanismes et intensités de fractionnement en mode statique et dynamique.

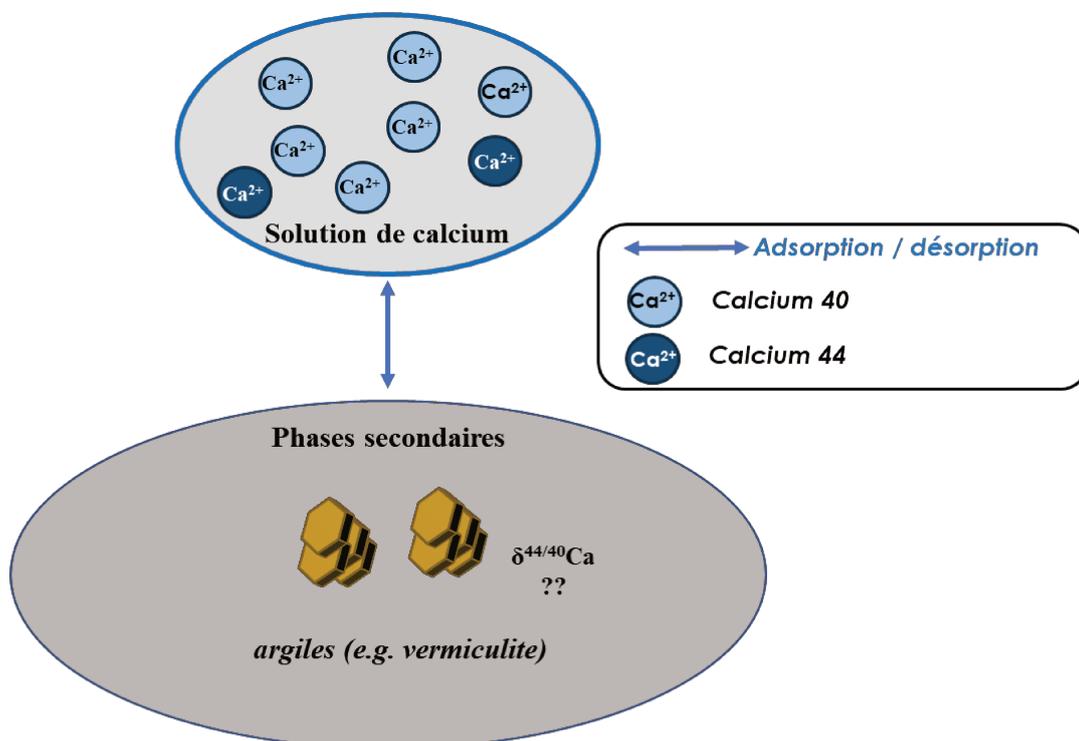


Figure A1 : Schéma de principe des expérimentations réalisées en mettant en contact du Ca avec de la vermiculite afin de préciser le fractionnement isotopique associé à ces interactions.

Dans un premier temps nous avons réalisé des expérimentations d'adsorption sur de la vermiculite en mode statique en batch, similairement à ce qui a été réalisé pour les bactéries et les oxydes de manganèse, en tenant compte des paramètres suivants : (1) le rapport $Ca_{\text{solution initial}}/vermiculite$ (de 17 à 2369 $\mu\text{mol/g}$), (2) la cinétique d'adsorption (0, 5, 15, 30, 60, 120, 1440 min d'interaction) et (3) le pH (2, 4, 6, 7, 8). Une cinétique de désorption a aussi été réalisée. Les données principales issues de ces expérimentations sont présentées dans le Tableau A1 et la figure A2.

Tableau A1 : Résultats des expérimentations d'adsorption du Ca sur de la vermiculite en fonction de la concentration en Ca initiale et du pH initial de la solution ainsi que du temps de contact. Le fractionnement isotopique est exprimé en ‰ entre la valeur isotopique du Ca résiduel dans le surnageant et la valeur isotopique de la solution initiale. L'erreur propagée sur les mesures élémentaires est inférieure ou égale à 4% de la valeur tandis que l'incertitude sur l'expression de $\Delta^{44/40}\text{Ca}$ est de 0,15‰.

Samples	pH	Contact time min	$Ca_{\text{ini}}/vermiculite$ ($\mu\text{mol/g}$)	$Ca_{\text{ads}}/vermiculite$ ($\mu\text{mol/g}$)	%	$\Delta^{44/40}\text{CaSRM915a}$ LAA ‰
<i>[Ca]-experiments</i>						
A	7	125	17	17	100%	
B	7	125	292	292	100%	
verm 1500bis	7	125	578	565	98%	0.25
C	7	125	592	579	98%	0.19
verm 2000	7	125	792	694	88%	0.15
D	7	125	994	758	76%	0.22
E	7	125	1471	804	55%	0.05
verm 5000	7	125	2369	704	30%	0.07
<i>kineti experiments</i>						
Verm Na cin 0	7	5	591	566	96%	0.26
Verm Na cin 5	7	10	591	581	98%	0.31
Verm Na cin 15	7	20	591	583	99%	0.26
Verm Na cin 30	7	35	591	581	98%	0.32
Verm Na cin 1h	7	65	591	578	98%	0.31
Verm Na cin 2h	7	125	591	578	98%	0.25
Verm Na cin 24h	7	1445	591	577	98%	0.31
<i>pH-experiments</i>						
Verm Na pH2	2	125	571	406.9	71%	0.16
Verm Na pH4	4	125	571	555.4	97%	0.37
Verm Na pH6	6	125	580	570.9	99%	0.33
Verm Na pH7	7	125	444	430.4	97%	
Verm Na pH8	8	125	586	574.7	98%	0.37

Il ressort de nos expérimentations que les comportements de l'adsorption du Ca sur la vermiculite sont relativement similaires à ceux observés pour du d-MnO₂ (Schmitt et al., 2023), c'est-à-dire une diminution du fractionnement isotopique avec la diminution du pourcentage de Ca adsorbé (Tableau A1), une stabilisation du fractionnement isotopique au niveau d'un plateau lors de la cinétique (Figure A2-c). L'intensité de fractionnement isotopique $\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{solide-solution}}$ est de 0,30 ‰. L'importance du pH est négligeable : on observe une différence de Ca résiduel dans le surnageant à pH 2 par rapport aux pH entre 4 et 8 (respectivement 29% de Ca résiduel

contre moins de 3%). Au-dessus de pH 4, aucune dépendance au pH n'a été observée pour l'adsorption du Ca sur la vermiculite, ce qui suggère que le Ca est principalement adsorbé sur les surfaces basales (surfaces réactives indépendantes du pH) et/ou dans l'interfoliaire.

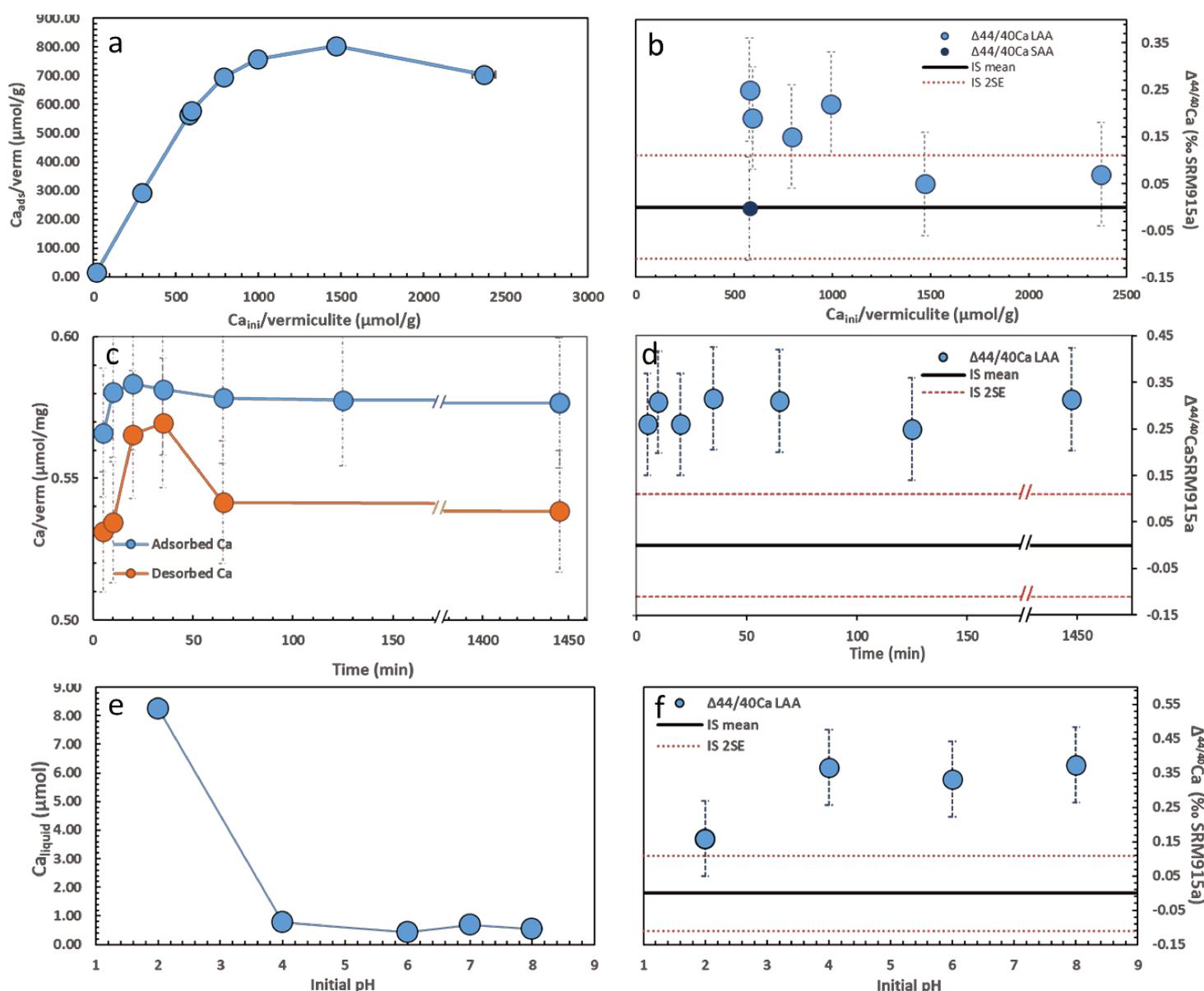


Figure A2 : résultats élémentaires et isotopiques des interactions entre le Ca et la vermiculite lors de leur mise en contact en batch lors des expérimentations en fonction de la concentration en Ca de la solution initiale (a et b), du temps d'interaction (c et d), et du pH initial de la solution (e et f).

On observe ainsi des résultats comparables à ceux précédemment mesurés avec une muscovite de Tuftane (Brazier et al., 2019), présentant une taille de particule et une charge de feuillet similaires. Or on adsorbe 800 $\mu\text{mol/g}$ de Ca pour la vermiculite qui possède un espace interfoliaire accessible, contre 130 $\mu\text{mol/g}$ pour la muscovite dont l'interfoliaire n'est pas accessible. Puisque la quantité de Ca adsorbée sur la vermiculite est d'environ 6 fois supérieure à celle obtenue avec une muscovite de taille et charge structurale similaires, et que les

fractionnements isotopiques du Ca mesurés pour les deux matériaux sont similaires, nous pouvons donc proposer qu'une partie du Ca est adsorbé dans l'interfoliaire pour la vermiculite et que les mécanismes d'adsorption/types de liaisons qui contrôlent le fractionnement isotopique sont les mêmes que ce soient des sites interfoliaires ou basaux (sites planaires externes) qui sont impliqués dans l'adsorption. Cela implique que l'adsorption sur les surfaces basales et interfoliaires fractionne le Ca avec la même intensité, et ce malgré la différence de nature entre l'interfoliaire (milieu nanométrique confiné) et une surface basale libre. Cela pourrait signifier que la nature des liaisons entre le Ca et la vermiculite est la même pour l'interfoliaire et les sites de bordures.

Pour l'expérience en mode diffusif dynamique (Tertre et al. 2018 parmi d'autres), nous avons préparé, dans une cellule de diffusion, un milieu poreux compacté de vermiculite saturé Na (même taille de particule que celle utilisé pour les expériences batch) avec une porosité totale de 50%. Un schéma simplifié du set-up de diffusion utilisé est présenté dans la figure A3. Le milieu poreux saturé Na est placé en sandwich entre 2 réservoirs aqueux : à l'amont un réservoir de NaNO_3 (0.2 mol/L) et à l'aval un réservoir un réservoir de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (0.1 mol/L). Cette configuration permet d'avoir une concentration en anion (NO_3^-) constante de part et d'autre de l'échantillon (pas de diffusion de sel donc) et permet de réaliser des échanges Na/Ca avec le milieu poreux initialement saturé Na. Ces échanges sont suivis en fonction du temps en analysant régulièrement les réservoirs aqueux élémentairement et isotopiquement : (i) le flux de Ca arrivant dans le réservoir amont et la composition isotopique $\Delta^{44/40}\text{Ca}$ associé et(ii) le flux de Na arrivant dans l'aval. Pour les expériences effectuées, un rapport isotopique $\delta^{44/40}\text{Ca}$ naturel (0.7 ‰) a été utilisé.

- Through-diffusion

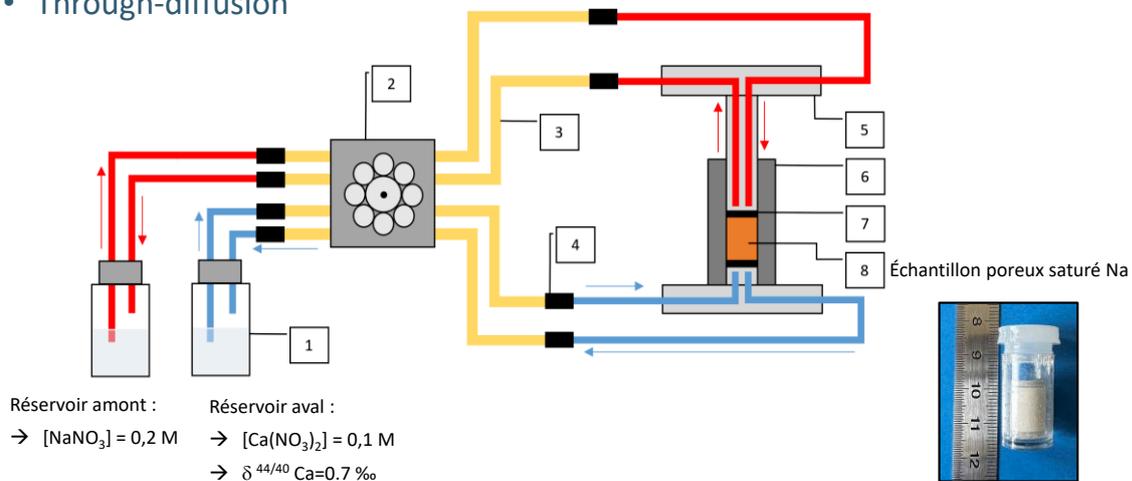


Figure A3 : schématisation du dispositif permettant la diffusion de Ca au travers d'un échantillon compacté de vermiculite (50% de porosité dont 25% de porosité interparticulaire) initialement saturé Na.

Les premières séries d'échantillons de ces expérimentations avec la vermiculite ont été analysés isotopiquement à l'ITES mais des analyses supplémentaires sont nécessaires afin d'évaluer le fractionnement isotopique associé à ces réactions d'échanges en mode dynamique. A titre d'illustration, la même expérience avait été faite avec une illite compactée (charge structurale similaire à celle d'un mica ; même taille de particule que celle de la vermiculite ; espace interfoliaire fermé ; porosité interparticulaire de 25%) par Mr Thibault Champagne

(étudiant de L3 Sciences de la Terre lors de son stage fin de Licence de juin 2023). Ci-dessous sont reportés la courbe de flux de Ca mesuré dans l'amont en fonction du temps ainsi que les signatures isotopiques en Ca des 2 réservoirs aqueux (Figure A4).

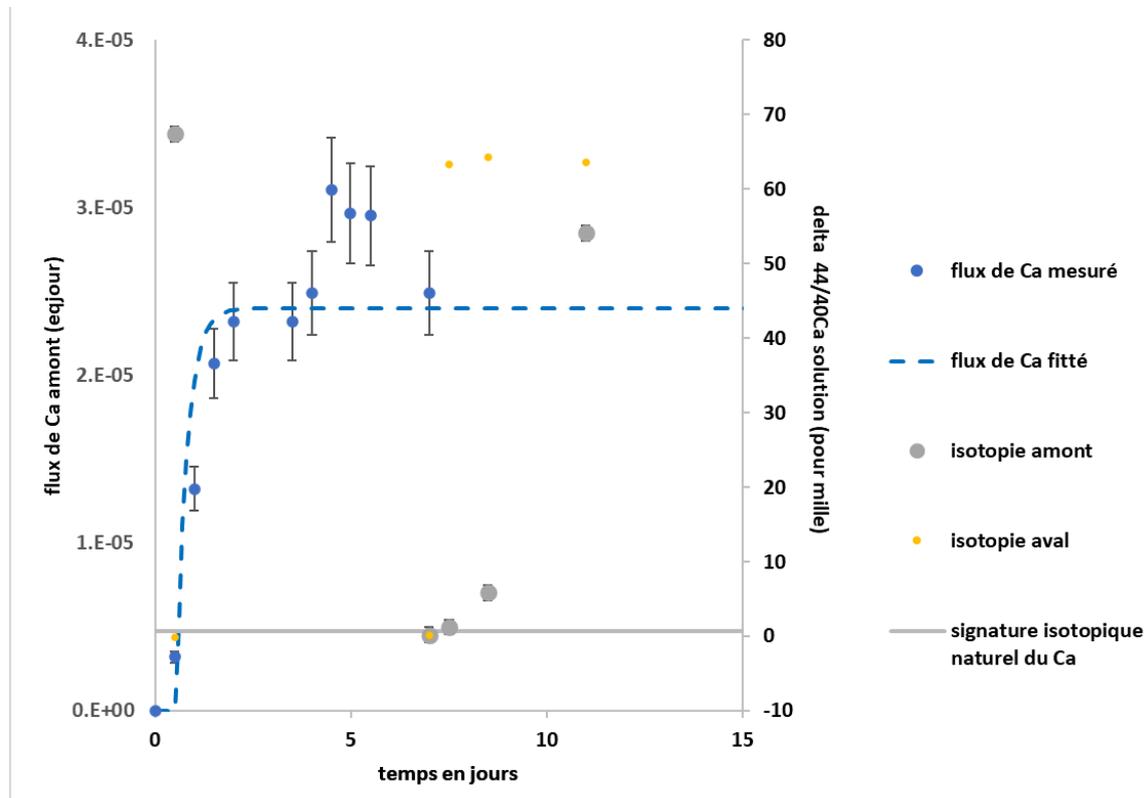


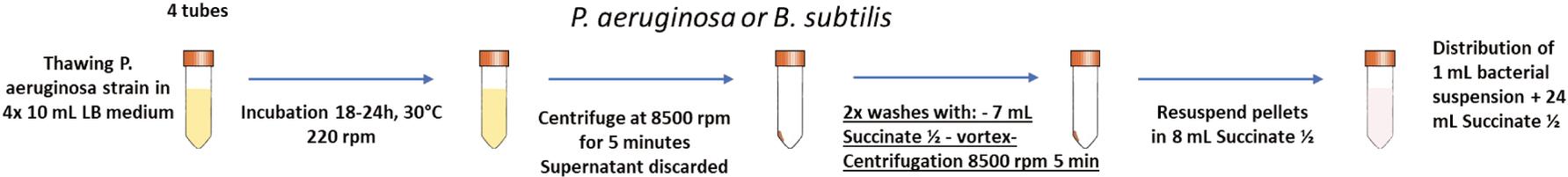
Figure A4 : flux de Ca mesuré dans le réservoir amont en fonction du temps et signatures isotopiques en Ca des 2 réservoirs aqueux pour l'expérimentation sur un échantillon d'illite initialement saturé en Na avec une porosité interparticulaire de 25%. La diffusion du $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ s'effectue du réservoir aval vers le réservoir amont et la diffusion du NaNO_3 de l'amont vers l'aval, sans gradient de NO_3 .

Les premiers résultats semblent montrer un enrichissement du réservoir amont en isotope lourd (^{44}Ca) au temps court de l'échange Na/Ca (1 jour ; +65 pour mille). Ceci serait à mettre en relation avec une désorption préférentielle de cet isotope par rapport au léger (^{40}Ca) pendant les premiers temps de l'échange Na par Ca dans le milieu poreux, et donc en un enrichissement en ^{40}Ca de la phase échangeuse. Au bout de 4 jours, un flux constant de Ca est obtenu (en accord avec un flux constant de Na dans le réservoir amont ; non montré ici), suggérant l'arrêt des réactions d'échange Na/Ca quand $t > 4$ jours. Une expérience préliminaire menée avec un traceur inerte (HDO) (résultat non montré ici) permet de s'assurer qu'il y a bien des réactions Na/Ca qui s'opèrent avec le milieu poreux entre 0 et 4 jours, et que les cations (Na et Ca) ne font pas « que » diffuser, sans interagir avec le milieu poreux dans cet intervalle de temps. Cependant, ces résultats très préliminaires restent à confirmer par des analyses supplémentaires. Sachant que les résultats obtenus en batch et en dynamique sont très différents, il est d'autant plus intéressant de creuser et d'approfondir les expérimentations.

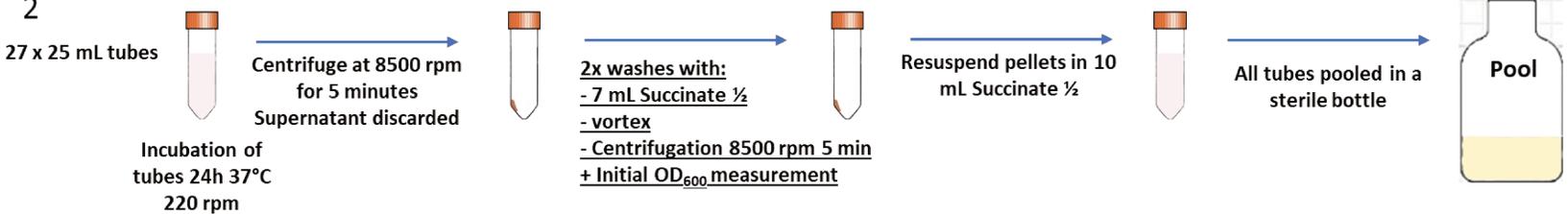
ANNEXE B : Exemple de protocole expérimental de culture microbienne et de préparation des bactéries mortes

Experimental protocol 4-7 janv. 2021 Growing and harvesting *P. aeruginosa* or *B. subtilis*

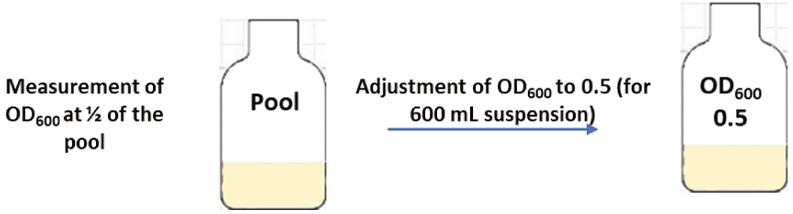
1



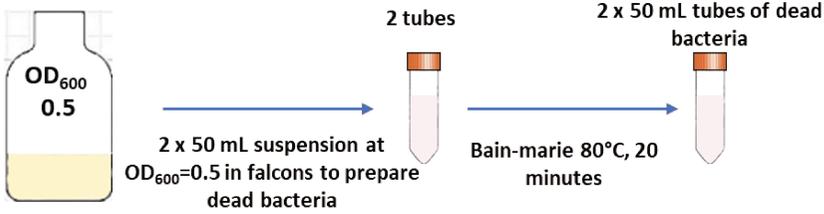
2



3



4



Annexe C : Recette de préparation du milieu Leptotrix (Tebo et al. 2007) (adapté d'après un protocole fourni par Boris Droz)

For 1L in ultrapure water (>18.2 MΩ cm) :

1.0g Glucose from Acros

0.5 g yeast extract from Fisher Chemicals BioReagents

0.5g casamino acid from Fisher Chemicals

2.38g HEPES acid from Fisher Chemicals Enzyme grade

→ Auto clave, cool to 60°C and control the weight

Add 1mL of each stock except for Mn for which we add 2 mL (6 mL in total) element previously filter sterilizes with 0.2µm filter below. Fe stock must be made fresh as possible (not stable)

Stock	Compounds	Con. stock	Con. media
1.Ca	CaCl ₂ *2H ₂ O	3.67 g / 50 mL	0.5 mM
2.Mg	MgSO ₄	5.00 g / 50 mL	0.83 mM
3.Mn	MnCl ₂ *4H ₂ O	8.09 g / 50 mL	2.0 mM
4.Fe	FeCl ₃	25.0 mg / 25 mL	3.7 µM
5.Trace element (TE)	CuSO ₄ *5H ₂ O	5 mg / 500 mL	40 nM
	ZnSO ₄ *7H ₂ O	22 mg / 500 mL	152 nM
	CoCl ₂ *6H ₂ O	10 mg / 500 mL	84 nM
	NaMoO ₄ *2H ₂ O	6.5 mg / 500 mL	54 nM

Reference :

1. Tebo, B. M.; Clement, B. G.; Dick, G. J., Biotransformations of Manganese. In *Manual of Environmental Microbiology, 3rd Ed*, 2007; pp 1223-1238.
2. Peña, J.; Kwon, K. D.; Refson, K.; Bargar, J. R.; Sposito, G., Mechanisms of nickel sorption by a bacteriogenic birnessite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 2010, 74, (11), 3076-3089.

Annexe D : Schmitt et al. 2023



Calcium isotope fractionation associated with adsorption and desorption on/from δ -MnO₂

Schmitt Anne-Désirée^{a,*}, Gangloff Sophie^a, Brazier Jean-Michel^{a,1}, Nuvoli Nicolas^a, Tertre Emmanuel^b

^a Université de Strasbourg, CNRS, ENGEES, ITES UMR 7063, 5, rue Descartes, 67084 Strasbourg Cédex, France

^b Université de Poitiers/CNRS, UMR 7285 IC2MP (équipe HydrASA), B8 rue Albert Turpain, 86073 Poitiers, France

ARTICLE INFO

Associate editor: Oleg Pokrovsky

Keywords:

Ca isotopes

Adsorption/desorption

δ -MnO₂ (vernadite)

Surface complexation model

Fractionation factor

ABSTRACT

Small mineral particles present in soils, such as clay minerals and some oxyhydroxides, constitute important nutrient reservoirs. This behavior is due to the negative charges and high specific surface areas of these particles allowing them to adsorb cations such as calcium (Ca), a macronutrient that occupies key physiological and structural functions in plant metabolism. Although the chemical reactivity of clay minerals is rather well-known in the literature, especially toward macronutrients such as Ca, that of oxyhydroxides such as phyllo-manganate minerals remains largely unexplored.

To enhance our understanding of the mechanisms at the origin of the storage/release of the different isotopes of Ca in a soil solution, the possible fractionation between ⁴⁰Ca and ⁴⁴Ca during adsorption and desorption of Ca on a synthetic phyllo-manganate, abiotically precipitated in the laboratory [synthetic analog of vernadite (δ -MnO₂)], was studied. Experiments were performed in batch (closed system), and several parameters (time, pH of the solution, Ca concentration and nature and concentration of the desorbent) were tested to cover a large range of physicochemical conditions.

This study demonstrated that the light ⁴⁰Ca isotope is preferentially adsorbed on δ -MnO₂, with $\Delta^{44/40}\text{Ca}$ (the apparent fractionation of the aqueous solution at the stationary state of adsorption compared to the initial one) of the adsorbed Ca that can reach $1.19 \pm 0.15\%$. The results showed that this isotopic fractionation occurs at chemical equilibrium in a closed system and that the isotopic fractionation measured in this study during Ca adsorption on phyllo-manganate is significantly higher than that reported in the literature during Ca adsorption on other soil constituents such as clay minerals. At pH below 4 Ca occupies only the interlayer/basal sites whereas above this pH Ca fills interlayer/basal sites (~86%) and edges sites (~14%). By combining the experimental data obtained at different pH values, initial Ca concentrations and interaction times, our results suggest that isotopic signature of the Ca adsorbed on δ -MnO₂ is dependent on the nature of the site involved in the adsorption step (i.e., enriched in ⁴⁰Ca in the interlayer with $\Delta^{44/40}\text{Ca}$ equal to -0.43% and enriched in ⁴⁴Ca when bound to the edges with $\Delta^{44/40}\text{Ca}$ equal to $+3.5\%$). As revealed by surface complexation modeling, such contrasting behavior between the two types of adsorption sites could be due to the bidendate nature of the Ca adsorption occurring on edges and to ion exchange of Ca²⁺ with H⁺ in the interlayer sites. Finally, desorption experiments point to total but not instantaneous Ca desorption, probably due to a partial collapse of the interlayer with some ions used to desorb Ca²⁺ (K⁺, NH₄⁺, hexamine-cobalt). This suggests that the amount of bioavailable Ca in soils by simple ion-exchange reactions is highly dependent on the nature of the ions which could desorb Ca present in the soil solution.

1. Introduction

Sustainable management of forest ecosystems requires better

knowledge of the dynamics of nutrients in forest soils. In contrast to other macronutrients, such as nitrogen (N) or phosphorus (P), studies about the dynamics in soils and the availability to plants of calcium (Ca)

* Corresponding author.

E-mail address: adschmitt@unistra.fr (S. Anne-Désirée).

¹ Present address: University of Bern, Institute of Geological Sciences, Baltzerstrasse 1+3, 3012 Bern, Switzerland.

are not well developed although it is an essential nutrient with key physiological and structural functions in plant metabolism (Marschner, 1995). Field-based studies performed in nutrient-depleted soils (e.g. acidic substratum and/or subject to acidic rain) point to the essential role of nutrient reservoirs within soil in the Ca uptake by vegetation (e.g., soil solutions, adsorbed Ca on organo-mineral soil phases, secondary minerals) (Schmitt et al., 2017). Consequently, it appears essential to precisely identify and characterize these reservoirs to improve our understanding of the dynamics operating in the different soil reservoirs and the Ca bioavailability for trees.

Over the last decade, studies of the Ca biogeochemical cycle in the critical zone using the different stable Ca isotopes have revealed isotopic fractionations associated with biotic (taken up by roots and translocation within trees, recycling by vegetation) or abiotic (precipitation of secondary minerals, adsorption/desorption) processes (e.g., Cenki-Tok et al., 2009; Cobert et al., 2011; Schmitt et al., 2012; Bagard et al., 2013; Schmitt et al., 2013; 2017; 2018; Gangloff et al., 2014; Schmitt, 2016; Brazier et al., 2019; 2020; Griffith et al., 2020).

A recent study showed that during the adsorption and desorption of Ca on model phyllosilicates commonly found in soils (i.e., kaolinite KGa-2, montmorillonite Swy2 and Tuftane muscovite sorted in size), the light isotope (^{40}Ca) was preferentially adsorbed/desorbed (relative to ^{44}Ca) and that the amplitude of this fractionation for a given mineral was a function of (i) the particle size fraction considered (0.1–1 μm versus 50–200 μm ; i.e., influence of the external specific surface area), (ii) the surface charge (induced in particular by the structural charge due to defects in the considered crystal structures), and (iii) the presence of an interlayer space accessible to cations (Brazier et al., 2019). In particular, these authors have shown that the most significant isotopic fractionation that has been measured (+0.24‰, apparent fractionation of the aqueous solution at the stationary state of adsorption compared to the initial one) was obtained with the small size fraction (0.1–1 μm) of muscovite, suggesting that the structural charge was, at least at zero order, the main force driving the isotopic fractionation for a given size fraction of a phyllosilicate mineral.

In addition to clay minerals, other layered minerals as phyllo-manganates are ubiquitous in soils. Therefore, question remains to discuss if parameters governing Ca isotopic fractionation during Ca adsorption on phyllo-manganates are the same than those previously obtained for phyllosilicates (Brazier et al., 2019). For example, vernadite, $(\text{Na}_{0.24}(\text{H}_2\text{O})_{0.72}[\text{Mn}_{0.94}^{4+}\square_{0.06}]\text{O}_2)$, Villalobos et al., 2006, which is a nanocrystalline turbostratic disordered phyllo-manganate oxide, is also common as nodules and coatings on minerals found in soils, sediments and rocks (e.g., Burns and Burns, 1977; Dorn et al., 1992; Palumbo et al., 2001). Because of substitutions in its structure, hydrated cations such as Ca^{2+} can be located between the layers of this mineral to compensate for the negative layer charge deficit and can also be adsorbed onto the edges of the particles if these sites are negatively charged (e.g., Lanson et al., 2000; 2002; Grangeon et al., 2012; Manceau et al., 2013; Peña et al., 2015; Simanova et al., 2015; Grangeon et al., 2017). These minerals therefore have a high chemical reactivity in soils and play a major role in solid-solution interactions (Baize, 1997), especially in the biogeochemical cycles of cationic species.

The main objective of this study is to quantify the isotope fractionation during Ca adsorption and desorption on and from a phyllo-manganate. To do this, we abiotically precipitated a synthetic analog of vernadite ($\delta\text{-MnO}_2$) in laboratory and performed Ca sorption experiments in batch reactors to test the influence of several parameters (time, pH of the solution, Ca concentration and nature and concentration of the desorbent) on the magnitude of Ca isotopic fractionation during adsorption and desorption on/from $\delta\text{-MnO}_2$. The obtained data were interpreted by using a surface complexation model (SCM) to improve our understanding of the mechanisms leading to the Ca storage/release from vernadite and to better explain the behavior of some of its natural isotopes (i.e., ^{40}Ca and ^{44}Ca).

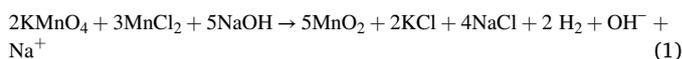
2. Materials and methods

2.1. Preparation of $\delta\text{-MnO}_2$ minerals

The phyllo-manganate used in this work was synthesized in the laboratory following the protocol of Villalobos et al. (2003). For this, three solutions were prepared, containing the following:

- 1) 28 g (i.e., 0.7 mol) of NaOH in 1440 mL of distilled water
- 2) 40 g (i.e., 0.25 mol) of KMnO_4 in 1280 mL of distilled water
- 3) 75 g (i.e., 0.37 mol) of $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in 1280 mL of distilled water

The amounts used correspond to the stoichiometric quantities for the synthesis of $\delta\text{-MnO}_2$, therefore avoiding adsorption of Mn^{2+} in excess onto the surfaces of the synthesized material, according to the following reaction proposed by Villalobos et al. (2003) and Marafatto et al. (2018):



All of the solution 2) was added slowly to the solution 1) in a borosilicate beaker, previously cleaned with distilled water and 10% HCl, under continuous stirring with a magnetic bar at 400 rpm. Following this, the solution 3) was added to the solution 1)-2) mixture dropwise (3 mL \cdot min $^{-1}$). The brown precipitates that formed were then transferred to 50 mL centrifuge tubes and rinsed following five washing cycles with a 1 M NaCl solution and five rinsing cycles with distilled water. These washing and rinsing cycles consisted of replacing the solutions in the tubes with 1 M NaCl or distilled water followed by a stirring of the mixture solid-solution for 1 h at 40 rpm on an SB3 StuartTM rotator and a centrifugation at 4700 rpm for 15 min on a Thermo Jouan multifunction B4I®. After these cycles, the residue was dried for 72 h in an oven at 60 °C and gently hand ground in an agate mortar. The grounded solid was then sorted granulometrically (size fraction of 0.1–1 μm) to minimize impurities and match some previous studies using other sorbents (i.e., phyllosilicates) (Brazier et al., 2019). For this, 1 g of raw dried powder was mixed with 50 mL of a deflocculant solution (10 $^{-2}$ mol \cdot L $^{-1}$ $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) to disperse the particles as much as possible and thus avoid aggregates. After 24 h of stirring at 40 rpm on an SB3 StuartTM, size separation was performed according to Stokes' law applied to centrifugation steps, allowing the elimination of particles with sizes out the 0.1–1 μm range (see Reinholdt et al., 2013). These centrifugations were carried out on a Thermo Scientific Heraeus Megafuge 40RTM centrifuge and a Beckman Coulter Avanti J-30ITM ultracentrifuge instrument. After the size sorting, the 0.1–1 μm solid was rinsed several times with distilled water by successive centrifugation, supernatant removal, and mixing with new distilled water to remove the deflocculant before its drying in an oven at 60 °C.

The 0.1–1 μm size fraction powder was then conditioned in mono-ionic form (using Na^+ in our case) to facilitate the interpretation of Ca adsorption. For Na saturation, 0.25 g of powder was mixed with 50 mL of a 1 M NaCl solution (99.99%) (at distilled water pH = 5.6) for nine days. Every three days, the supernatant was replaced with a new NaCl solution (three cycles) to remove the desorbed elements, with the second solution being at pH = 3 (acidified with HCl) to ensure decarbonation of the sample. The samples were then dialyzed with distilled water for five days in dialysis bags (porosity 6–8 kDa) from Spectrum Laboratories IncTM by filling them with 200 mL of solution ($\text{NaCl} + \delta\text{-MnO}_2$) and let them equilibrate in 1.5 L of distilled water. This distilled water was renewed every 24 h until its conductivity is sufficiently low ($\sim 30 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$) and no longer changed, indicating that the dialysis/rinsing was finished. The 0.1–1 μm size fraction powder was then dried in an oven at 60 °C for five days, finely and gently crushed using an agate mortar and stored until it was used (see Brazier et al., 2019).

2.2. Characterization of δ -MnO₂

The synthesized and conditioned final mineral was characterized by performing four types of analyses: (1) A powder X-ray diffraction (XRD) analysis using a Bruker AXS D5000 diffractometer at the ITES (Strasbourg, France) was carried out in θ/θ mode by scanning between 3° and 65° with steps of 0.04° every 10 sec. Acquisition was obtained using an X-ray tube equipped with a copper (Cu) anticathode operating at 40 kV and 30 mA. (2) The cation exchange capacity (CEC) was measured at ITES (Strasbourg, France) using the hexamine cobalt-chloride method described by Ciesielski et al. (1997). Succinctly, 100 mg of powder was mixed with 45 mL of 10^{-2} mol. L⁻¹ hexamine cobalt-chloride solution for two hours at 40 rpm on an SB3 Stuart™ rotator at room temperature. The suspensions were then filtered at 0.22 μ m using regenerated cellulose filters and elementarily analyzed. (3) The external specific surface area was measured on a Micrometrics Tristar™ at IC2MP (Poitiers, France) according to the Brunauer–Emmett–Teller (BET) method (Brunauer et al., 1938) using the N₂ adsorption isotherm. (4) The chemical composition of the solid δ -MnO₂ was determined by wet chemistry analysis. For this, 50 mg of initial δ -MnO₂ (after Na saturation and before Ca-exchange) and aliquots of final δ -MnO₂ (after Ca adsorption) were digested in Saville™ beakers with 5 N HCl on a hot plate at 100 °C and then evaporated to dryness. The residues were then converted in nitric form, evaporated to dryness, and then dissolved in 0.25 M HNO₃ for analysis.

2.3. Ca-for-Na⁺ cation-exchange experiments and Ca desorption procedure

All adsorption and desorption experiments were performed in well-mixed closed reactors (“batch” system) allowing the homogeneity of the medium and by considering the decrease in the Ca concentration of the starting solution due to adsorption. The aqueous concentration of Ca in the initial solution was adjusted to be limiting (i.e., more than 75% of the initial Ca quantity is adsorbed at steady state) but to still have enough Ca remaining in the reactive solution for isotopic fractionation quantification.

Adsorption experiments were performed with an initial solution prepared using hydrated Ca(NO₃)₂ salt (Alfa Aesar 99.99% purity) at room temperature (20 °C) and by considering a 2.5 g.L⁻¹ solid/solution ratio. The ionic strength was comprised between 0.009 (at pH 10) and 0.019 mol.L⁻¹ (at pH 2) and fixed solely by Ca(NO₃)₂, and the reagent used to adjust the pH of the initial solutions between 2 and 10 (i.e., 5.10^{-2} mol.L⁻¹ HNO₃ or 5.10^{-2} mol.L⁻¹ NaOH). Each experiment consisted of mixing 50 mg of dried δ -MnO₂ (0.1–1 μ m Na⁺-size fraction) with 20 mL of initial Ca solution and corresponded to a single measurement point. Each mixture was stirred at 40 rpm on an SB3 Stuart™ rotator for a given duration and centrifuged for 5 min at 4000 rpm in a Thermo Jouan multifunction B4-I™ centrifuge. This procedure was used for the following experiments):

1. Adsorption kinetics made of eight measurement points at different time (i.e., 5 min, 10 min, 15 min, 35 min, 65 min, 125 min, 24 h and 48 h; including the 5 min of centrifugation) at pH 7 with initial aqueous Ca concentrations fixed at 2.25 mmol. L⁻¹ (i.e., 0.10 mmol/mmol Mn).
2. Adsorption experiments performed at different initial pH values ranging from 2 to 10 (range chosen to match different pH soil environments) with initial Ca concentrations fixed at 2.86 mmol. L⁻¹ (i.e., 0.124 mmol/mmol Mn) and an adsorption time reaction of 125 min.
3. Adsorption isotherms performed at different initial aqueous Ca concentration varying from 2.20 to 9.81 mmol. L⁻¹ (i.e., 0.098 to 0.436 mmol/mmol Mn) at pH 7 and with an adsorption time of 125 min. This initial aqueous Ca concentrations range was chosen to

cover a range from limiting to infinite Ca aqueous reservoir considering the solid/solution ratio used (see discussion).

(Note that throughout the manuscript, mmol/mmol Mn refers to mmol Ca_{aq}/mmol Mn in the solid or mmol Ca_{adsorbed}/mmol Mn in the solid depending on the experimental conditions (adsorption or desorption). After each experiment, the supernatant was removed using a 20-mL syringe and filtered at 0.22 μ m using cellulose acetate membrane filters and stored prior to analyses.

Additionally, some solid residues recovered after adsorption experiments performed at pH 7 using an initial aqueous Ca concentration of 2.86 mmol. L⁻¹ were used for Ca desorption experiments. These residues (i.e., slurry remaining after supernatant removal) were weighed to quantify the residual liquid mass, and were then stirred during 2 h, at room temperature (20 °C), with 20 mL of different desorbents: hexamine cobalt-chloride - [(Co(NH₃)₆Cl₃) (2.10⁻², 10⁻² and 10⁻¹ mol.L⁻¹), ammonium acetate (CH₃COONH₄) (10⁻¹ and 1 M) and potassium nitrate (KNO₃) (10⁻², 10⁻¹ and 1 mol. L⁻¹) (hereafter abbreviated Cohex, NH₄⁺ and K⁺, respectively). The mixtures were then centrifuged at 4000 rpm for 5 min, the supernatant was taken up and filtered (following the same procedure presented above), and replaced by 20 mL of fresh desorbents that were let to react for 48 h with the residues. This procedure was repeated two additional times with 72 h and 120 h of interaction between fresh desorbents and residues.

These leaches will be referred to as “sequential leaches” later in the paper. In parallel, 20 mL of Cohex was added to the slurry for 72 h of interaction (referred to as “cumulative leaching” hereafter).

2.4. Analytical procedures

The evolution of pH with time was measured on an aliquot of each filtered sample using a Metrohm 905 Titrand™ titrator calibrated at 25 °C. Elemental and isotopic analyses were performed at the Cortecspacite platform of the University of Strasbourg at ITES (Strasbourg, France).

Aqueous Ca, Na, P and Mn concentrations were measured with an ICP–AES iCAP 6000 Series (ThermoFisher Scientific™), with detection limits, respectively equal to 0.08, 0.1, 0.1 and 0.01 μ mol.L⁻¹. The repeatability was equal to 5% of the concentration of the sample. The accuracy was assessed by repeated measurements of reference materials (SLRS5, Perade-20, Rain 97, Big-Moose 02, Super 05) during each sequence.

For the $\delta^{44/40}$ Ca analyses, 0.14 μ mol of Ca from each analyzed solution supernatant and digestion product was mixed with 0.01 μ mol of Ca from a ⁴²Ca–⁴³Ca double spike (⁴²Ca/⁴³Ca spike ratio of ~5), and this mixture was dried at 70 °C on a hot plate. The mixtures were then dissolved in 2 mol.L⁻¹ HNO₃, and chemical separations were performed on a DGA resin normal (TODGA, Triskem™) according to the procedure of Brazier et al. (2019). Eluted Ca was dried a first time at 70 °C and converted to nitric form with 7 M HNO₃ before a second phase of drying at 70 °C on a hot plate. The total Ca blank for the chemical separation procedure represents less than 1.25 nmol. This represents an average contribution of 0.009% to the Ca present in the sample and will be considered negligible in the rest of this work.

The dried residues of the chemical separation were dissolved in 1 to 3 μ L of 1 mol.L⁻¹ HNO₃ and deposited on single tantalum filaments (99.995% purity) previously outgassed and oxidized (under primary vacuum) for the $\delta^{44/40}$ Ca measurements. All Ca isotope measurements were performed on a TIMS (ThermoFischer Scientific Triton™) in static mode (see details in Schmitt et al., 2013; Brazier et al., 2019). To avoid $\delta^{44/40}$ Ca_{SRM915a} intersession drifts, the ⁴²Ca–⁴³Ca double spike was calibrated at each measurement session by measuring three mixtures composed of NIST SRM 915a standard solution and ⁴²Ca–⁴³Ca double spike following the protocol proposed by Lehn et al. (2013).

The measured values were expressed as $\delta^{44/40}$ Ca per mil relative to the NIST SRM915a standard (Hippler et al., 2003; Eisenhauer et al.,

2004);

$$\delta^{44/40}Ca_{SRM915a}(\text{‰}) = \left(\frac{\left(\frac{^{44}Ca}{^{40}Ca} \right)_{\text{Sample}}}{\left(\frac{^{44}Ca}{^{40}Ca} \right)_{SRM915a}} - 1 \right) \times 1000 \quad (2)$$

To directly assess the apparent isotopic fractionation, our results will be expressed as a difference ($\Delta^{44/40}Ca_i$) between the measured Ca isotopic composition in the final aqueous or solid phase ($\delta^{44/40}Ca_i$) and that of the initial solution ($\delta^{44/40}Ca_{ini}$):

$$\Delta^{44/40}Ca_i(\text{‰}) = \delta^{44/40}Ca_i - \delta^{44/40}Ca_{ini} \quad (3)$$

where i represents the liquid after adsorption (LAA), the solid after adsorption (SAA) or the liquid after desorption (LAD).

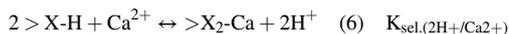
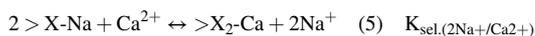
The associated propagated uncertainty (Δ_{error} , in ‰) can be expressed as

$$\Delta_{\text{error}}(\Delta^{44/40}Ca_i) = \sqrt{(\Delta_{\delta^{44/40}Ca_i})^2 + (\Delta_{\delta^{44/40}Ca_{ini}})^2} \quad (4)$$

The average internal repeatability obtained during the course of the study was 0.07‰ based on repeated measurements of NIST SRM 915a (2 SD, N = 63). Repeated measurements of the initial Ca solution yielded a value equal to $0.85 \pm 0.04\text{‰}$ (2SE, N = 6). The external uncertainty calculated from external long-term sample replicates was equal to 0.11‰ (2SD, N = 22) for $\delta^{44/40}Ca$ values. Using these values and according to Eq. (4), the propagated error associated with $\Delta^{44/40}Ca$ is equal to 0.15‰. The accuracy of our measurements was explored through the measurements of an in-house Atlantic seawater standard ($1.90\text{‰} \pm 0.11$, 2SD, N = 22) during the same period of time, which showed consistent values with those reported by Hippler et al. (2003) and Heuser et al. (2016 and references therein).

3. Modeling of adsorption experimental data

δ -MnO₂ minerals have a layered structure with cations adsorbed in interlayer, allowing to compensate the negative charge due to cation vacancies in the layer, and possible cations adsorbed onto edge sites (van Genuchten and Peña, 2016; Marafatto et al., 2018). Thus, to model the experimental data of Ca²⁺ adsorption on δ -MnO₂, two types of adsorption sites on two different surfaces are considered. The first type of site corresponds to cation exchange sites located in the interlayer/basal surface compensating the negative permanent charges due to the vacancies in the structure (i.e., called >X⁻ hereafter) and formed during the synthesis of δ -MnO₂ (see below). On/in these sites, the Ca present in solution adsorbs on δ -MnO₂ by an exchange with the compensating cations (Na⁺ and/or H⁺) electrostatically bounded to the basal/inter-layer surfaces (above the vacancies). This cationic exchange can be described by a selectivity coefficient K_{sel} (Gaines and Thomas, 1953; Bradbury and Baeyens, 2009; Tertre et al., 2011). The reactions of cation exchange can be expressed by the following equations:



The second type of sites corresponds to the surface edge sites of the sheets with variable charge depending on the pH (i.e., called >SOH hereafter). Experimental data were modeled by using a geometrical diffuse layer model (DLM). It was used due to its simplicity (i.e., only K_{edge} as adjustable parameter; no capacitance values to fix; see Table 1). Coupling to protonation/deprotonation of the >SOH sites, the reactions of Ca²⁺ adsorption on these sites can be expressed by the following equations:

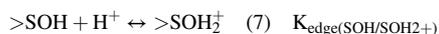
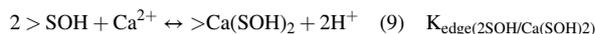


Table 1

Parameters of the surface complexation model used to interpret Ca adsorption on δ -MnO₂ (E_i: equivalent fraction in charge of the CEC occupied by the “i” species (eq/eq), {i}: activity of the aqueous species “i”, F: Faraday constant 96,485C/mol, R: ideal gas constant 8.314 J/mol/K, T: temperature in K, φ_0 : surface potential (V) in the surface plane (O – plane) and see Section 3 in the text for details). * from Tonkin et al. (2004) and van Genuchten and Peña (2016), ** optimized values, determined by PEST option, allowing to interpret experimental data.

Permanently charged sites (Vacancies)		
Cation exchange reaction	Selectivity coefficients	K_{sel}
$2 >X\text{-H} + Ca^{2+} \leftrightarrow >X_2\text{-Ca} + 2H^+$	$K_{\text{sel}(2H^+/Ca^{2+})} = \frac{E_{Ca} \cdot \{H^+\}^2}{E_H^2 \cdot \{Ca^{2+}\}}$	0.33
$2 >X\text{-Na} + Ca^{2+} \leftrightarrow >X_2\text{-Ca} + 2Na^+$	$K_{\text{sel}(2Na^+/Ca^{2+})} = \frac{E_{Ca} \cdot \{Na^+\}^2}{E_{Na}^2 \cdot \{Ca^{2+}\}}$	3.33
Vacancy site concentrations 2.15×10^{-3} eq/g (calculated from CEC)		
Variable charge site (edge sites)		
Ca sorption reaction on edge for DLM	Surface complexation constants	Log K_{edge}
$>SOH + H^+ \leftrightarrow >SOH_2^+$	$K_{\text{edge}(\text{SOH}/\text{SOH}_2^+)} = \frac{[\text{SOH}_2^+]}{[\text{SOH}] \cdot \{H^+\}} \cdot \exp\left(\frac{-F \cdot \varphi_0}{R \cdot T}\right)$	8*
$>SOH \leftrightarrow >SO^- + H^+$	$K_{\text{edge}(\text{SOH}/\text{SO}^-)} = \frac{[\text{SO}^-] \cdot \{H^+\}}{[\text{SOH}]} \cdot \exp\left(\frac{-F \cdot \varphi_0}{R \cdot T}\right)$	-6.1*
$2 >SOH + Ca^{2+} \leftrightarrow >Ca(\text{SOH})_2 + 2H^+$	$K_{\text{edge}(2\text{SOH}/\text{Ca}(\text{SOH})_2)} = \frac{[\text{Ca}(\text{SOH})_2] \cdot \{H^+\}^2}{[\text{SOH}]^2 \cdot \{Ca^{2+}\}} \cdot \exp\left(\frac{-2F \cdot \varphi_0}{R \cdot T}\right)$	-0.689**
Edge site concentrations 0.54×10^{-3} eq/g. (edge concentration = $0.25 \times$ vacancies concentration according to Marafatto et al. (2018)).		



The Visual Minteq program (Version 3.1; Gustafsson, 2013) together with the PEST optimization option (Parameter ESTimation; see also <https://www.pesthomepage.org>) was used to model the experimental data of Ca²⁺ adsorption on δ -MnO₂ considering the two types of adsorption sites mentioned above. The adsorption model was applied to the initial Ca solutions in contact with δ -MnO₂ (see Section 4), using the aqueous species constants from the default thermodynamic database associated with Visual Minteq 3.1., and the sites densities (for >X⁻ and >SOH) deduced from experimental data measured in this study.

4. Results

4.1. Mineral characterization

The acid digestion experiment allowed us to determine the molar ratios Ca/Mn and Na/Mn of the δ -MnO₂ mineral (0.001 and 0.29, respectively). Based on the generic formula for δ -MnO₂ minerals (Na_y(Mn_x□_a)O₂·H₂O), and the fact that Na/Mn = y/x, x + a = 1 and y = 4a (Villalobos et al., 2003), the following structural formula can be proposed for the solid: Na_{0.27}(Mn_{0.93}□_{0.07})O₂·H₂O (M = 107.73 g·mol⁻¹) in accordance with the literature (Post and Veblen, 1990; Drits et al., 1997; Luo et al., 2000; Villalobos et al., 2003). The solid characterized by this structural formula will be represented by the term “ δ -MnO₂” throughout the manuscript. Consequently, the minimum percentage of structural vacancies is equal to 7%. By considering this structural formula, the average Mn oxidation number is equal to 3.93, which is close to that reported by previous authors (between 3.49 and 4.02) (Villalobos et al., 2003; Zhao et al., 2009; Grangeon et al. 2012). Furthermore, the Na⁺/Mn_{total} ratio equal to 0.29 in our case is representative of the negative structural charge of the solid (Villalobos et al., 2003) and gives an indication of the layer charge per cell value.

The CEC and BET N₂ specific surface area values measured in this work on the 0.1–1 μm size fraction of the Na⁺- δ -MnO₂ synthesized

grains are presented in Table 2. The CEC is rather high (215 meq/100 g) compared to those of the previous phyllosilicate minerals used for similar experiments (see Table 2). The percentage of the CEC represented by Na cations in the initial solids was calculated (see Table 2) and was higher than 99%, indicating that Na-homoionic conditioning was effective. The BET specific surface area measured (i.e., 27.6 m²/g) is in the range of the values that can be found in the literature for MnO₂ solids (from 15 to 290 m²/g) (e.g., Murray, 1975; Balistrieri and Murray, 1982; Catts and Langmuir, 1986; Burdige et al., 1992; Godtfredsen and Stone, 1994; Nelson et al., 1999; Villalobos et al., 2003; Tonkin et al., 2004; Marafatto et al., 2018). The value obtained is coherent with those obtained for other materials characterized by the same particle size (see Table 2). The experimental XRD pattern confirmed that δ-MnO₂ is poorly crystallized (see S1 in Appendix A).

4.2. Calculation of Ca and Na concentrations and mass balance

The Ca adsorption and desorption experimental results from the filtered supernatant obtained at the end of the adsorption and desorption steps are presented in Tables 3 and 4. The amount of adsorbed Ca (and desorbed Na) is calculated as the difference between (i) the initial amount of Ca (or Na) in the liquid (Ca_{ini} = 0.124 mmol/mmol Mn; Na_{ini} = 0.002 mmol/mmol Mn) and (ii) the amount of Ca (or Na) in the supernatant after adsorption (Ca_{LAA}) (or desorption, Na_{LAA}) experiments.

It has to be noted that the filtration process is never total at the end of the adsorption step procedure, and thus some aqueous Ca remaining in the pores of the slurry after Ca adsorption have to be considered in the calculation of the amount of desorbed Ca (and associated isotopic ratio). These values (i.e., Ca_{LAD_corr}, δ^{44/40}Ca_{LAD_corr}) are calculated as the difference between the quantity of Ca measured in the supernatant after desorption (Ca_{LAD}, δ^{44/40}Ca_{LAD}) and the sum of Ca remaining in the slurry and present in the desorbent itself (see Brazier et al., 2019 for detailed calculations). Applied corrections were not significant in either elemental concentration (~1% in average) or isotopic measurements (1.5% of the Δ-value in average), and they will no longer be considered in this work.

The dissolution of δ-MnO₂ during the adsorption/desorption experiments can also be neglected. Indeed, no aqueous Mn was detected in the analyzed supernatants (<0.01 μmol. L⁻¹), and the total amount of Ca from dissolution of the solid (0.01 μmol.mg⁻¹) was less than 1% of the Ca coming from the initial solution used for adsorption experiments. Similarly, no P (<0.1 μmol.L⁻¹) was detected, so that there could be no pyrophosphate adsorption onto MnOx particles nor interferences to subsequent Ca²⁺ adsorption. Finally, for the samples for which the apparent isotopic composition of Ca in both the residual liquid (LAA) and in the solid (SAA) after adsorption were analyzed, we ensured that the mass balance was equilibrated using the equation (see Section 4.1):

Table 2

Characteristics of studied δ-MnO₂ mineral and maximum amount of adsorbed Ca and associated Δ^{44/40}Ca isotopic fractionation measured in this study. Comparison of data with those previously obtained by Brazier et al. (2019) for clay minerals.

Mineral	Grain size (μm)	CEC (meq/100 g)	CEC represented by Na ⁺ in initial solid (%)	BET (N ₂) (m ² /g)	Layer charge (/cell)	Interlayer open	pH	Ca _{ads_max} (mmol/g)	Δ ^{44/40} Ca (‰)	Reference
δ-MnO ₂	0.1–1	215	99.2	27.6	0.29	yes	4	1.06	1.15	this study
"	"	"	"	"	"	"	7	1.16	1.19	"
Kaolinite (KGa-2)	0.1–1	3.74	94.5	20.14	0	no	4	4.26	0.00	Brazier et al. (2019)
"	"	"	"	"	"	"	7	9.66	"	"
Montmorillonite (Swy-2)	0.1–1	74.6	90.1	28.6	0.6	yes	4	292.9	0.10	"
"	"	"	"	"	"	"	7	293.7	"	"
Tuftane muscovite	0.1–1	46.7	94.2	62.23	2	no	4	57.95	0.22	"
"	"	"	"	"	"	"	7	63.79	0.27	"
"	50–200	0.42	92.7	0.07	2	no	7	0.209	0.00	"

$$\Delta^{44/40}Ca_{IS} = f \times \Delta^{44/40}Ca_{LAA} + (1-f) \times \Delta^{44/40}Ca_{SAA} \quad (10)$$

with IS the initial solution, and *f* is the proportion of Ca remaining in the aqueous phase after the adsorption step.

4.3. Kinetics of Ca adsorption and desorption

After 20 min of adsorption, the amount of Ca remaining in the aqueous phase stabilizes to approximately 1.5 ± 0.9% of the initial Ca, which corresponds to approximately 98.5 ± 0.9% (2SE, N = 7) of Ca adsorbed (Table 3; Fig. 1a). In contrast, Ca desorption by Cohex is not complete since beyond 30 min of reaction this amount stabilizes to 72.1 ± 1.4% (2SE, N = 6) of adsorbed Ca (Table 4; Fig. 1a).

Isotopically, the first interaction times experience high Δ^{44/40}Ca values of the solution, followed by a decrease (after 15 and 10 min for adsorption and desorption, respectively) and again an increase, whether for adsorption or desorption steps. After 20 (or 15) min of adsorption (desorption), the isotope composition in Ca of the solution stabilizes to approximately Δ^{44/40}Ca = 1.26 ± 0.09‰ (2SE, N = 5) (0.49 ± 0.07‰, 2SE, N = 5) (Fig. 1b). Note that the Ca isotope composition of the supernatant after desorption is enriched in the light ⁴⁰Ca isotope of 0.77‰ relative to the supernatant after adsorption, pointing to partial desorption.

Furthermore, the amount of Ca that is desorbed is linked to the nature of the desorbent used, its concentration and the interaction time with the solid (Fig. 2a). The higher the concentration of the desorbent, and the higher the number of successive sequential desorption, the greater the quantity of Ca extracted (Fig. 2a). The maximum quantity of Ca (99.5%) is extracted with 0.1 M Cohex and with four successive desorption cycles (2 h + 48 h + 72 h + 120 h) (Fig. 2a). After 2 h of interaction, the apparent isotopic fractionation compositions of the desorbed Ca are variable (from 0.12‰ for 0.1 M Cohex to 0.90‰ for 0.01 M) (Fig. 2b). For 0.1 M Cohex, the first fractions are enriched in the heavy ⁴⁴Ca isotope (0.12‰ for the first 56.6%), while the more we extract Ca, the more we enrich the aqueous phase in the light ⁴⁰Ca isotope (-1.17‰ for the last 8.3%) (Table 4; Fig. 2b). The weighted average Δ^{44/40}Ca value of the different 0.1 M Cohex extractions is -0.12 ± 0.24‰, which is equal, within propagated error, to the value of the initial solution (i.e. Δ^{44/40}Ca = 0) used for the experiments, confirming that mass balance is effective.

4.4. Results of pH and initial Ca concentration

4.4.1. pH effect (at initial Ca equal to 0.124 mmol/mmol Mn and 125-min interaction time)

For this experiment, the elemental and isotopic analysis results of the liquid and solid fractions after Ca adsorption are presented in Table 5

Table 3

Percentage of adsorbed Ca, chemical composition of aqueous phase after adsorption step and apparent isotopic fractionation between supernatant and initial solution after Ca-adsorption for different interaction times (case of initial Ca concentrations of 0.10 mmol/mmol Mn). LAA = liquid after adsorption, ini = initial, fin = final.

Reference	pH _{ini}	pH _{fin}	Interaction time (min)	Ca _{LAA} (mmol)	Ca _{ads} (%)	Ca _{LAA} /Mn (mmol/mmol)	Na _{LAA} (mmol)	Na _{LAA} /Mn (mmol/mmol)	$\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{LAA},1}$ (‰)	$\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{LAA},2}$	$\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{LAA,mean}}$
AdsMnO-0.1 pH7 0 m	7	–	5	0.00852	82.0	0.01893	0.078	0.174	1.29	1.33	1.31
AdsMnO-0.1 pH7 5 m	“	–	10	0.00482	89.8	0.01072	0.084	0.187	1.00	1.19	1.10
AdsMnO-0.1 pH7 10 m	“	–	15	0.00225	95.2	0.00500	0.088	0.196	0.55	0.70	0.63
AdsMnO-0.1 pH7 15 m	“	–	20	0.00032	99.3	0.00072	0.092	0.204	–	–	–
AdsMnO-0.1 pH7 30 m	“	–	35	0.00052	98.9	0.00116	0.094	0.210	1.08	1.25	1.17
AdsMnO-0.1 pH7 60 m	“	–	65	0.00050	98.9	0.00111	0.093	0.207	1.11	1.21	1.16
AdsMnO-0.1 pH7 120 m	“	–	125	0.00038	99.2	0.00084	0.091	0.203	1.34	–	1.34
AdsMnO-0.1 pH7 7 h	“	–	425	0.00036	99.2	0.00080	0.087	0.193	–	–	–
AdsMnO-0.1 pH7 24 h	“	–	1445	0.00104	97.8	0.00231	0.086	0.192	1.28	–	1.28
AdsMnO-0.1 pH7 48 h	“	6.8	2885	0.00184	96.1	0.00409	0.090	0.200	1.37	–	1.37

and in Fig. 3a and b. For Ca solutions with an initial pH between 2 and 4, the concentrations of adsorbed Ca vary between 0.042 mmol/mmol Mn and 0.118 mmol/mmol Mn. At the same time, an increase in final pH from 2.3 to 5.6 is observed, coinciding with a decrease in H_3O^+ in solution, as well as a variation in desorbed Na concentration from 0.244 mmol/mmol Mn (at pH = 2) to 0.202 mmol/mmol Mn (at pH = 4). Over this pH range, there is thus an adsorption of H_3O^+ and Ca^{2+} with a desorption of Na^+ . For Ca solutions with an initial pH between 6 and 10, the adsorbed Ca concentrations are relatively stable at 0.122 mmol/mmol Mn. At the same time, the final pH decreased with a stabilization of approximately 6.1.

In parallel, the isotopic compositions in $\Delta^{44/40}\text{Ca}$ of the aqueous phase, at the end of the Ca adsorption step, increase from pH 2 to pH 4 from 0.25 to 1.15‰ and stabilize above pH 4 at 1.23 ± 0.06 (2SE, $N = 2$). Concomitantly, the isotopic compositions of solids vary from -0.43% at pH 2 to -0.06% at pH 4 to finally attain 0.12‰ at pH 10 (Table 5 and Fig. 3b).

4.4.2. Ca concentration effect (at pH = 7 and 125-min interaction time)

The results of elemental and isotopic analyses of the supernatant liquid after adsorption and of the solid after the Ca-adsorption step are presented in Table 6 and Fig. 3c and d. At pH 7, when the initial Ca concentration increases from 0.098 mmol/mmol Mn to 0.436 mmol/mmol Mn, the adsorbed Ca concentrations vary between 0.097 mmol/mmol Mn and 0.138 mmol/mmol Mn. During this variation, we also noticed a decrease in pH, initially at 7, from 6.36 to 4.48 and an increase in desorbed Na^+ from 0.184 to 0.229 mmol/mmol Mn (Table 6), suggesting desorption of H^+ and Na^+ during Ca^{2+} adsorption. Such a decrease in pH was also observed by van Genuchten et Peña (2016) during the sorption of cations to $\delta\text{-MnO}_2$. The adsorbed Ca concentrations stabilize to approximately 0.129 ± 0.006 (2SE, $N = 6$) mmol/mmol Mn from the initial Ca concentration of 0.127 mmol/mmol Mn, and those of desorbed Na stabilize to approximately 0.226 ± 0.004 (2SE, $N = 6$) (Table 6; Fig. 3c). Isotopically, as the initial Ca concentration increases, $\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{LAA}}$ decreases from 1.19 ± 0.01 (2SE, $N = 2$) to stabilize at 0.34 ± 0.06 (2SE, $N = 2$) for the largest amount of Ca adsorbed investigated. The behavior of the solid logically follows that of the liquid with lighter values of $1.27 \pm 0.23\%$ (2SE, $N = 4$) (Fig. 3d).

4.5. Modelling

The results obtained by modelling the experimental Ca adsorption data on $\delta\text{-MnO}_2$ by considering two types of sites (i.e. interlayer and edge sites) are shown in Fig. 4a and b. Corresponding modeling parameters are shown in Table 1. These results allow to deduce the relative proportion of the two species of Ca as a function of the initial pH values (Fig. 5). For initial pH values between 2 and 4, this model shows that there is an exchange between Ca^{2+} in solution, and Na^+ and H^+ adsorbed. This exchange occurs only through sites of fixed charge (interlayer/basal site due to vacancies in the structure). For initial pH > 4, the adsorption of Ca^{2+} is maximal and is distributed for approximately 14% on the edge sites and approximately 86% on/in interlayer sites for charge compensation. For adsorption of Ca^{2+} on edge sites, the best fit is obtained by considering a bidentate coordination (see Fig. 4a) rather than monodentate coordination (results not shown).

Final pH's calculated by the model are also in good agreement with experimental ones measured at stationary state. This can be illustrated in the Appendix in which a good agreement can be observed by comparing the pH variations (i.e. between the initial Ca solution and the supernatant at the end of the experiment) of both experimental and modelled data sets (see Tables 5 and 6 for the variations). The initial pH and the initial Ca concentrations have been presented on the abscissa for the graphical representations throughout the manuscript, in agreement with representations used in previous studies (e.g. Su et al., 2010; Huang et al., 2017; Yuan et al., 2018; Li et al., 2020; Xu et al., 2012).

Note also that over the pH range considered in this study, Ca is either in dissolved or adsorbed form and is never located in precipitated forms. Calculations performed with VisualMinteq TM version 3.1 software associated with the “thermo.vdb” thermodynamic database (Gustafsson, 2013) indeed showed that all solutions recovered after adsorption and desorption experiments are strongly undersaturated with respect to Ca (NO_3)₂, CaCO_3 , $\text{Ca}(\text{MnO}_4)_2$ and $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ solid phases. Thus, isotopic fractionation due to Ca precipitation in solution can be excluded.

5. Discussion

5.1. Calcium fractionation coefficient $\alpha_{\delta\text{-MnO}_2\text{-solution}}$

The experiments show that the solution is enriched in the heavy isotope ^{44}Ca over time to reach a plateau after 65 min of adsorption

Table 4

Chemical composition of aqueous phases after adsorption and desorption steps, and apparent isotopic fractionation between supernatants and initial solution after desorption, LAD = liquid after desorption, ini = initial, LAD_corr = liquid after desorption corrected from slurry and from desorbent Ca contributions.

Reference	Desorbent	Concentration (mol.L ⁻¹)	Interaction time (h: min)	Dead volume (g)	Ca _{LA} (mmol)	Ca in slurry (mmol)	Ca in desorbent (mmol)	Ca _{ini} (mmol)	Ca _{LAD} (mmol)	Ca _{LAD_corr} (mmol)	Ca _{LAD_corr} (cumulated %)	Ca _{LAD_corr} / Mn (mmol/ mmol)	$\Delta^{44}/$ $^{40}\text{Ca}_{LAD,1}$ (‰)	$\Delta^{44}/$ $^{40}\text{Ca}_{LAD,2}$ (‰)
aC2pH7	K ⁺	0.01	2:00	0.31	3.78	0.058	0.03	57.2	0.825	0.73	1.5	0.0016	0.87	-
"	"	"	48:00	"	"	"	"	"	1.34	1.31	4.0	0.0029	-	-
"	"	"	72:00	"	"	"	"	"	1.04	1.00	5.9	0.0022	-	-
C2pH7	"	0.1	2:00	0.22	3.78	0.042	"	"	7.89	7.81	14.6	0.0174	-	-
"	"	"	48:00	"	"	"	"	"	2.70	2.67	19.6	0.0059	-	-
C2pH7F	"	"	72:00	"	"	"	"	"	1.93	1.90	23.2	0.0042	-	-
aC2pH7	"	1	2:00	0.34	3.78	0.065	"	"	29.46	29.36	54.5	0.0653	-	-
"	"	"	48:00	"	"	"	"	"	6.26	6.23	66.1	0.0138	-	-
aC2pH7F	"	"	72:00	"	"	"	"	"	3.64	3.60	72.9	0.0080	-	-
bC2pH7	NH ₄ ⁺	0.1	2:00	0.20	3.78	0.039	0.05	"	15.95	15.86	29.5	0.0352	-	-
"	"	"	48:00	"	"	"	"	"	4.64	4.59	38.1	0.0102	-	-
"	"	"	72:00	"	"	"	"	"	2.79	2.74	43.3	0.0061	-	-
cC2pH7	"	1	2:00	0.21	3.78	0.040	"	"	33.29	33.20	61.6	0.0738	0.30	-
"	"	"	48:00	"	"	"	"	"	7.45	7.40	75.4	0.0165	-	-
"	"	"	72:00	"	"	"	"	"	3.55	3.50	82.0	0.0078	-	-
dC2pH7	"	0.01	2:00	0.07	3.78	0.014	0.03	"	16.64	16.59	30.8	0.0369	0.90	-
"	Colhex	"	48:00	"	"	"	"	"	11.26	11.23	51.7	0.0250	-	-
"	"	"	72:00	"	"	"	"	"	6.00	5.96	62.8	0.0133	-	-
dC2pH7F	"	0.1	2:00	0.20	3.78	0.039	"	"	30.58	30.50	56.6	0.0678	0.13	-
"	"	"	48:00	"	"	"	"	"	14.17	14.14	82.8	0.0314	-0.12	-
eC2pH7	"	"	72:00	"	"	"	"	"	4.54	4.50	91.2	0.0100	-0.77	-
"	"	"	120:00	"	"	"	"	"	4.49	4.45	99.5	0.0099	-1.17	-
eC2pH7F	"	"	72:00	0.22	"	"	"	"	47.0	46.96	87.0	0.1043	-	-
Cc2pH7D4	"	0.02	0:05	0.18	8.11	0.072	"	39.2	26.7	26.62	67.9	0.0592	0.35	0.34
DesMnO- 0.1 pH7	"	"	0:10	0.12	4.74	0.028	"	42.6	31.12	31.06	73.0	0.0690	0.18	0.19
DesMnO- 0.1 pH7 5 min	"	"	0:15	0.08	2.37	0.009	"	44.9	33.47	33.43	74.4	0.0743	0.49	0.51
DesMnO- 10 min	"	"	0:20	0.24	0.57	0.007	"	46.7	32.70	32.66	69.9	0.0726	-	-
DesMnO- 15 min	"	"	0:35	0.12	0.58	0.003	"	46.7	33.31	33.27	71.2	0.0739	-	-
DesMnO- 30 min	"	"	1:05	0.16	0.48	0.004	"	46.8	33.67	33.64	71.8	0.0747	0.60	-
DesMnO- 60 min	"	"	2:05	0.09	0.44	0.002	"	46.9	33.08	33.04	70.5	0.0734	0.55	0.60
DesMnO- 120 min	"	"	7:05	0.11	0.12	0.001	"	47.2	33.46	33.42	70.8	0.0743	-	-
DesMnO- 0.1 pH7 7h	"	"	24:05	0.09	0.81	0.004	"	46.5	34.29	34.26	73.7	0.0761	0.42	0.41
DesMnO- 24h	"	"	48:05	0.09	1.66	0.007	"	45.6	34.11	34.07	74.6	0.0757	0.41	-
DesMnO- 0.1 pH7 48h	"	"												

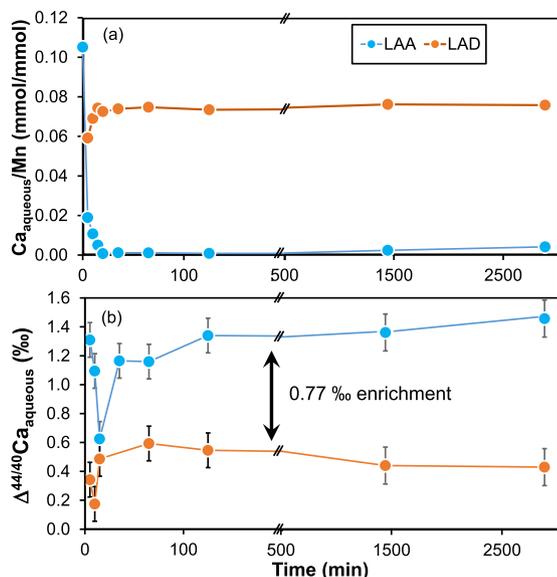


Fig. 1. Variation of (a) concentration of Ca and (b) $\Delta^{44/40}\text{Ca}$ in the liquid after adsorption (LAA) and desorption (LAD) experiments as function of interaction time. Experiments were conducted at pH 7 with Ca concentration of 0.1 mmol/mmol Mn. Desorption was performed using 0.1 M Cohex. LAA = liquid after adsorption, LAD = liquid after desorption.

(Fig. 1). These results agree with those obtained by using phyllosilicate minerals, for which authors reported that the light ^{40}Ca isotope was preferentially adsorbed on the solid (Brazier et al., 2019). The representation of $\Delta^{44/40}\text{Ca}$ versus the fraction of Ca in solution (f) shows that the data follow a straight line (Fig. 6). This implies a fractionation in a closed system at equilibrium between $\delta\text{-MnO}_2$ and the corresponding solution of Ca and not by a kinetic fractionation process. At first sight the desorption is slow (Fig. 1a), but it is nevertheless complete after 4 successive sequential extractions with Cohex and 242 h of interactions (Fig. 2), probably because Ca is more strongly retained in the interlayer sites which are more abundant than edge sites (see paragraph 4.5). This behavior tends to indicate that Ca forms exchangeable bonds with the studied manganese oxide.

From isotopic signatures of supernatant recovered after the adsorption experiment ($\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{LAA}}$) and that of the initial solution ($\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{IS}}$), a global isotope fractionation factor (i.e. $\delta\text{-MnO}_2\text{-solution}$) can be calculated as follows:

$$\alpha_{\delta\text{-MnO}_2\text{-solution}} = \frac{\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{IS}} + 1000}{\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{LAA}} + 1000} \quad (11)$$

We obtain a fractionation factor $\alpha_{\delta\text{-MnO}_2\text{-solution}}$ equal to 0.99874 ± 0.00005 ($N = 5$). This value is slightly lower than those obtained during the adsorption of Ca on the muscovite of Tuftane (0.99976) or the montmorillonite Swy-2 (0.99991) due to larger amplitudes of fractionation between the solid and the liquid (see paragraph 5.3). Ikeda et al. (2007) showed that exchange reactions of hydrated Ca^{2+} have a weak associative character, suggesting that Ca is mainly linked to water molecules in the solution, in accord with previous studies (e.g., Koneshan et al., 1998; Jalilehvand et al., 2001). Consequently, since our experiments follow a closed-system equilibrium fractionation process, the ^{44}Ca heavy isotope is mainly concentrated in the aqueous phase having the highest bond force constant (Urey, 1947; Bigeleisen and Mayer, 1947), whereas the light ^{40}Ca isotope is preferentially adsorbed to the reactant (i.e., $\delta\text{-MnO}_2$ in our case). Thus, similar to the explanation proposed for ^{40}Ca incorporation in carbonate minerals (Marriott et al., 2004) we suggest that the change from Ca binding to water molecules in solution to the binding of Ca to $\delta\text{-MnO}_2$ involves a decrease in bond strength and thus causes light ^{40}Ca isotope enrichment

into the solid.

5.2. Factors controlling adsorption

Cations can adsorb on internal and external sites of Mn oxides. For vernadite samples, internal sites (i.e., interlayers) exist due to the deficit of charge in the sheets (vacancies) and lead to adsorption of cations above the sheet or within the interlayer space. Cations can also adsorb on edge sites located on the lateral borders of the $\delta\text{-MnO}_2$ sheets (i.e., $-\text{OH}$ functional groups). Their reactivity depends on the pH of the medium (Villalobos et al., 2003; Manceau et al., 2007; Grangeon et al., 2008; Sherman and Peacock, 2010; Grangeon et al., 2012; Li et al., 2020). The point of zero charge (PZC) of $\delta\text{-MnO}_2$ is between pH values of 1.5 and 3 (Murray, 1974; Tonkin et al., 2004 and references therein), which is consistent with our results. Over the whole range of pH values investigated in this study, adsorption takes place which implies that, the pH_{PZC} of studied $\delta\text{-MnO}_2$ is below 2. For pH values lower than 4, there is competition between H^+ and Ca^{2+} for the exchange sites available in the system studied (Fig. 3a). This competition is not significant for pH values above 4 (Fig. 3a). Indeed, as pH increases, the $-\text{OH}$ sites at the edge of the sheet deprotonate (their pK_a has been estimated to be between pH 6 and 7; Tonkin et al., 2004; van Genuchten and Pena, 2016), allowing the binding of metal cations such as Ca^{2+} (Morton et al., 2001; Tonkin et al., 2004; Villalobos, 2015; van Genuchten and Pena, 2016).

At pH 7, except for the lowest values of initial Ca, amounts of adsorbed Ca and desorbed Na remain rather stable compared to the amount of adsorbed protons which increases with increasing initial Ca concentration (Fig. 3c). Furthermore, for a given concentration, for initial pH values above 4, the final pH stabilizes at approximately 6.3 ± 0.3 (2SE, $N = 4$) (Table 5). Beyond pH 6–7, the edge sites are deprotonated, and a release of H^+ ions at these pH values could suggest that the H^+ were located initially in the interlayer or above the vacant sites.

At pH = 7, during the first 5 min, the $\Delta^{44/40}\text{Ca}$ of the liquid increases rapidly to reach 1.31‰, which corresponds to approximately 82% Ca adsorption. After 15 min, it decreases to 0.63‰, corresponding to approximately 95% adsorption, and then reaches a plateau at 1.26‰ beyond 35 min and almost 100% adsorption (Table 3, Fig. 1). This could correspond to Ca adsorption on two different types of sites: first in the interlayer, and then on the edge sites, then again in the interlayer. It could also correspond to an effect of interlayer migration of adsorbed Ca ions to edge sites. Based on the results reported in Tables 3 and 5, we can estimate that the signatures of Ca bound to the interlayer are enriched in ^{40}Ca ($\Delta^{44/40}\text{Ca}$ equal to -0.43‰), while those bound to the edge sites are enriched in ^{44}Ca ($\Delta^{44/40}\text{Ca}$ equal to 3.5‰) (see explanations in Appendix A). At first sight these two splitting intensities might be contradictory to the discussion in Section 5.1. However, in Section 5.1, we discussed the global average isotope fractionation factor which results from the combination of the apparent isotopic signatures due to adsorption in/on different adsorption sites, as in interlayer space and on the edges (see e.g. Tertre et al., 2009; Lu et al., 2014 for additivity of sorption properties of different types of sorption sites).

5.3. Fractionation amplitude during Ca adsorption on phyllosilicates

In this study, a higher amplitude of $\Delta^{44/40}\text{Ca}$ fractionation between final and initial solutions during Ca adsorption on $\delta\text{-MnO}_2$ (1.19‰) was measured and compared to other minerals previously analyzed in the literature (phyllosilicates; between 0 and 0.22‰) (Brazier et al., 2019). Different fractionation amplitudes were already suggested for different adsorption sites (interlayer or edge sites, as in this study) or for different minerals containing Ca in their crystal lattice (silicates, carbonates, phosphates, hydrous minerals...) or aqueous species. Previous works explained that these different fractionation amplitudes could be related to the coordination number or the mineral-dependent Ca-O bond length (e.g., Hedwig et al., 1980; Katz et al., 1996; Jalilehvand et al., 2001;

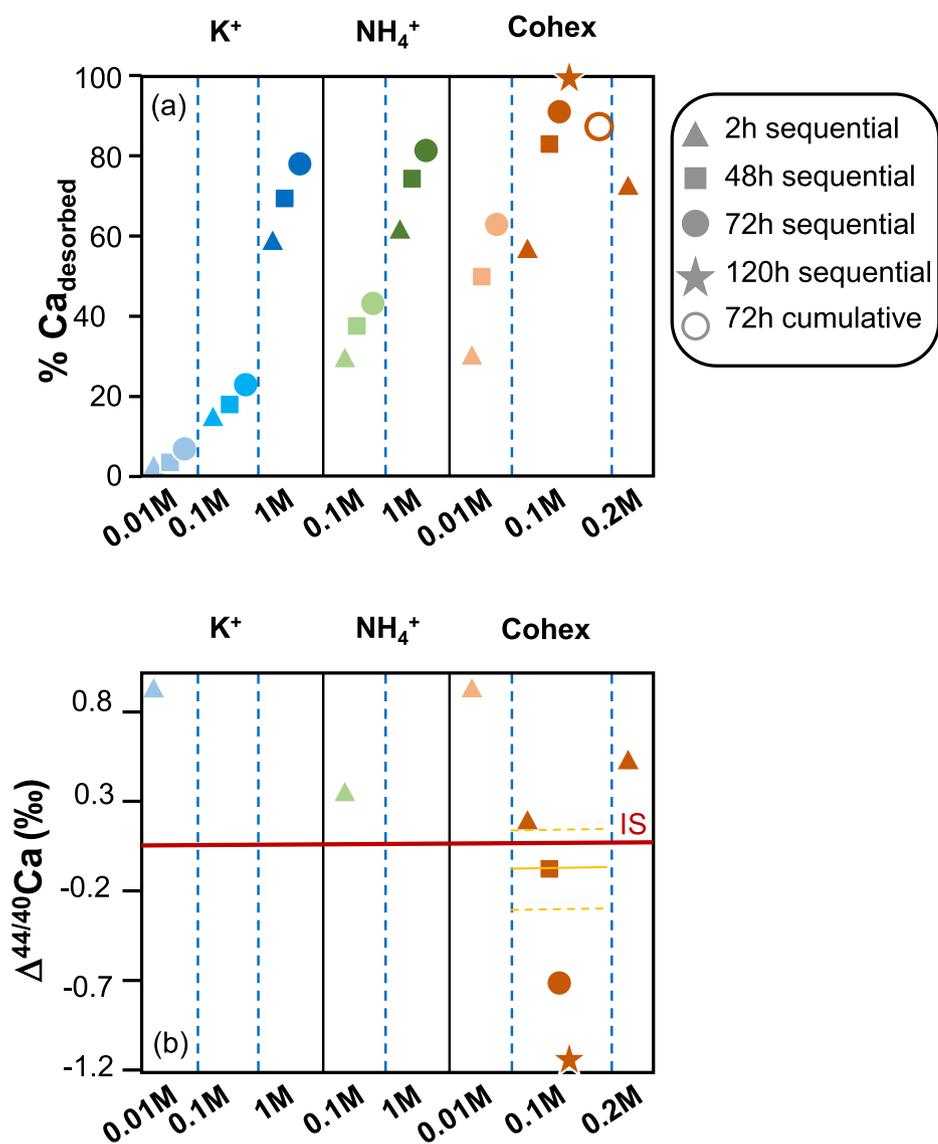


Fig. 2. Variation of (a) percentage of Ca desorbed (the 5% repeatability is comprised within the symbols) and (b) $\Delta^{44/40}\text{Ca}$ in liquid after desorption with different desorbents at different concentrations and at varying times. IS = initial solution. The weighted average value of the different 0.1 M Cohex extractions is $-0.12 \pm 0.24\text{‰}$, which is equal, within propagated error, to the value of the initial solution used for the experiments ensuring mass balance composition. This value is represented by the orange straight line, and the error corresponds to the orange dashed lines in 2b.

Table 5

Amount of adsorbed Ca and H, desorbed Na and Ca apparent isotopic fractionation between supernatant and initial solution and in solid after adsorption using 50 mg of $\delta\text{-MnO}_2$, initial Ca concentration of 0.124 mmol/mmol Mn at variable initial pH values and after 125 min of interaction time. Concentration of adsorbed Ca is calculated as the difference between initial concentration of Ca (i.e., 0.124 mmol/mmol Mn) and concentration of Ca in supernatant after adsorption experiment. Concentration of desorbed Na is calculated from the concentration of Na in solution after adsorption minus the initial concentration of Na (i.e., 0.002 mmol/mmol Mn). LAA = liquid after adsorption, SAA = solid after adsorption, ini = initial, fin = final.

Reference	C2pH2	C2pH2.5	C2pH3	C2pH4	C2pH6	C2pH7	C2pH8	C2pH10
pH_{ini}	2.0	2.5	3.2	4.0	6.0	7.0	8.0	10.0
pH_{fin}	2.3	3.8	5.2	5.6	6.1	6.2	6.1	6.7
ΔH^+ (mmol/L)	5.0E+00	3.0E+00	6.2E-01	9.7E-02	2.1E-04	6.9E-04	7.3E-04	2.0E-04
Ca_{ads} (mmol)	0.019	0.035	0.048	0.053	0.055	0.055	0.054	0.056
Ca_{ads} (%)	32.9	61.1	84.2	93.2	96.3	95.9	93.5	97.1
[A]: $\text{Ca}_{\text{ads}}/\text{Mn}$ (mmol/mmol)	0.042	0.078	0.107	0.118	0.122	0.122	0.119	0.123
H_{ini}^+ (mmol)	2.0E-01	6.3E-02	1.3E-02	2.0E-03	2.0E-05	2.0E-06	2.0E-07	2.0E-09
$\text{H}_{\text{ini}}^+/\text{Mn}$ (mmol/mmol)	4.4E-01	1.4E-01	2.8E-02	4.4E-03	4.4E-05	4.4E-06	4.4E-07	4.4E-09
H_{ads}^+ (mmol)	1.0E-01	6.0E-02	1.2E-02	1.9E-03	4.1E-06	1.4E-05	1.5E-05	4.0E-06
$\text{H}_{\text{ads}}^+/\text{Mn}$ (mmol/mmol)	2.2E-01	1.3E-01	2.8E-02	4.3E-03	9.1E-06	3.1E-05	3.2E-05	8.9E-06
Na_{des} (mmol)	0.110	0.096	0.094	0.091	0.098	0.097	0.098	0.098
[B]: $\text{Na}_{\text{des}}/\text{Mn}$ (mmol/mmol)	0.244	0.214	0.209	0.202	0.218	0.215	0.217	0.218
[A] - [B] (meq/mmol)	<0	<0	0.005	0.035	0.027	0.029	0.020	0.029
$\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{LAA}}$ (‰)	0.25	0.54	0.99	1.15	-	-	1.20	1.26
$\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{SAA}_1}$ (‰)	-0.43	-	-	-0.06	-	-	-	0.12
$\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{SAA}_2}$ (‰)	-	-	-	-0.05	-	-	-	-
$\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{SAA}_{\text{mean}}}$ (‰)	-0.43	-	-	-0.06	-	-	-	0.12

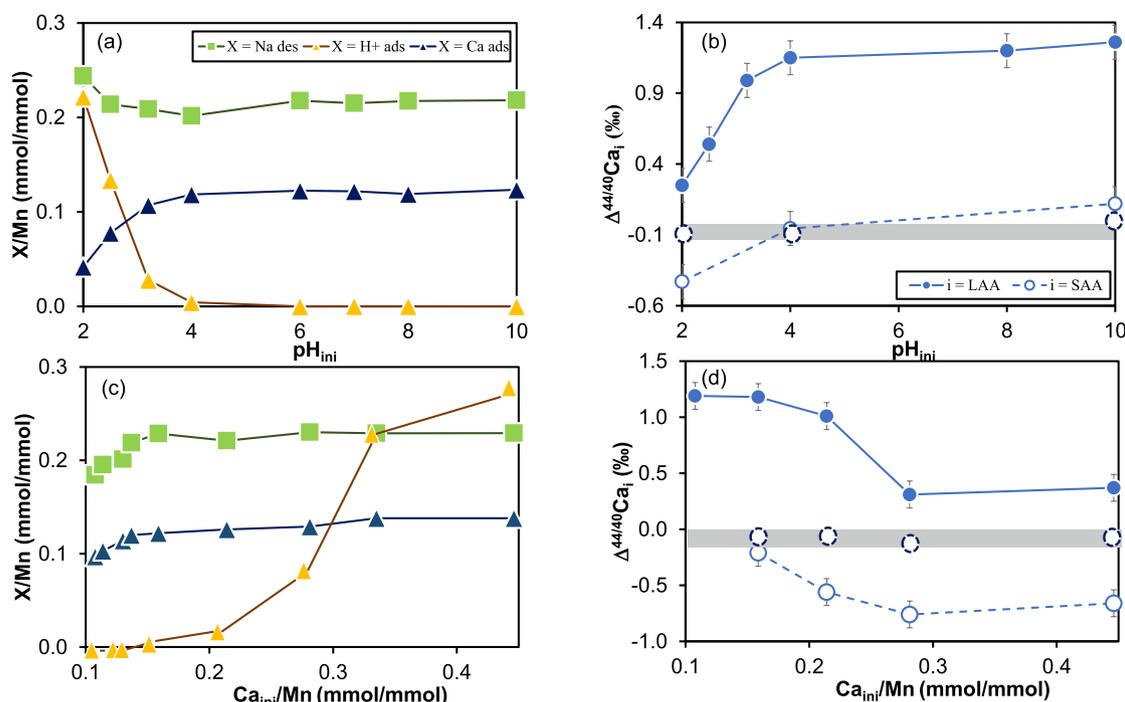


Fig. 3. Variation of: (a) concentrations H^+ and Ca^{2+} adsorbed and Na^+ desorbed as a function of initial pH, (b) $\Delta^{44/40}Ca_i$ in liquid after adsorption (LAA) and solid after adsorption (SAA) as function of initial pH, (c) concentrations H^+ and Ca^{2+} adsorbed and Na^+ desorbed as function of initial Ca concentration, and (d) $\Delta^{44/40}Ca_i$ in liquid (LAA) and in solid (SAA) after adsorption as function of initial Ca concentration. For (b) and (d), dotted circles correspond to weighted average isotopic value between LAA and SAA. The dashed line shows that all the values are equal to zero, i.e., similar to that of initial solution, pointing to isotopic mass balance (see text for explanation).

Table 6

Amount of adsorbed Ca and desorbed Na, and Ca apparent isotopic fractionation between initial solution and supernatant and in solid after adsorption using 50 mg of δ - MnO_2 at variable initial Ca concentrations and after 125 min of interaction time. Amount of adsorbed Ca was calculated as the difference between initial amount of Ca and amount of Ca in supernatant after adsorption experiment. Amount of desorbed Na was calculated from the difference between the amount of Na in solution after adsorption and in the initial solution (i.e., 0.002 mmol/mmol Mn). LAA = liquid after adsorption, SAA = solid after adsorption, ini = initial, fin = final, ads = adsorption, des = desorption.

Reference	C8pH7	C6pH7	C1pH7	C2pH7	C3pH7	C4pH7	C5pH7	ADS300pH7	ADS400pH7
pH_{ini}	7	7	7	7	7	7	7	7	7
pH_{fin}	6.36	6.32	6.31	6.22	5.92	5.55	5.00	4.56	4.48
ΔH^+ (mmol/L)	6.7E-06	7.6E-06	7.8E-06	1.0E-05	2.2E-05	5.4E-05	2.0E-04	5.5E-04	6.6E-04
H_{des}^+/Mn (mmol/mmol)	1.5E-05	1.7E-05	1.7E-05	2.2E-05	4.9E-05	1.2E-04	4.4E-04	1.2E-03	1.5E-03
Ca_{ini} (mmol)	0.044	0.047	0.054	0.057	0.067	0.092	0.122	0.146	0.196
[A]: Ca_{ini}/Mn (mmol/mmol)	0.098	0.104	0.120	0.127	0.149	0.204	0.271	0.325	0.436
Ca_{ads} (mmol)	0.044	0.046	0.051	0.054	0.055	0.057	0.058	0.062	0.062
Ca_{ads} (%)	99.3	99.2	95.0	94.5	82.0	61.7	47.6	42.5	31.6
[B]: Ca_{ads}/Mn (mmol/mmol)	0.097	0.103	0.114	0.120	0.122	0.126	0.129	0.138	0.138
Na_{des} (mmol)	0.083	0.084	0.087	0.092	0.094	0.093	0.092	0.107	0.107
Na_{des}/Mn (mmol/mmol)	0.184	0.195	0.201	0.219	0.229	0.221	0.230	0.229	0.229
[A] - [B] (meq/mmol)	0.010	0.011	0.027	0.021	0.015	0.031	0.028	0.047	0.047
$\Delta^{44/40}Ca_{LAA}$ (‰)	1.19	-	-	-	1.18	1.01	0.31	-	0.37
$\Delta^{44/40}Ca_{SAA}$ (‰)	-	-	-	-	-0.21	-0.56	-0.76	-	-0.66

Ikeda et al., 2007; Colla et al., 2013; Moynier and Fujii, 2017; Huang et al., 2019; Nelson et al., 2021). For the adsorption of Ca on phyllosilicate minerals, Brazier et al. (2019) showed that the magnitude of the apparent fractionation of Ca was controlled by the layer charge and the external specific surface of the mineral (i.e., size fraction) considered, as well as by the presence or absence of an interlayer space open to aqueous cations. Following the results of the present study, it can be proposed that the fractionation amplitude depends also on the nature of the site involved in the adsorption (interlayer vs. edge sites; see Section 5.2) and thus on the nature of the bonds. Indeed, the results from the surface complexation model suggest that the adsorption bonds with the edges are of the bidentate type, while those implying interlayer sites create H-bonds between H_2O bound to Ca and O of the sheet (Gaillot, 2002).

Further structural studies are necessary to better explain the mechanisms of fractionation depending on the nature of the adsorption sites involved.

5.4. Conventional methods of extracting bioavailable Ca and implication for natural environments

Identifying nutrient pools and accurately quantifying their size are necessary for the sustainable management of forest ecosystems. Classically, exchangeable reservoirs are considered as major contributors in nutrient cycles in soils. Decomposition of litter, atmospheric inputs and rock/mineral weathering provide nutrient cations, while root removal and runoff via gravity water carry them out of the reservoir. The cations

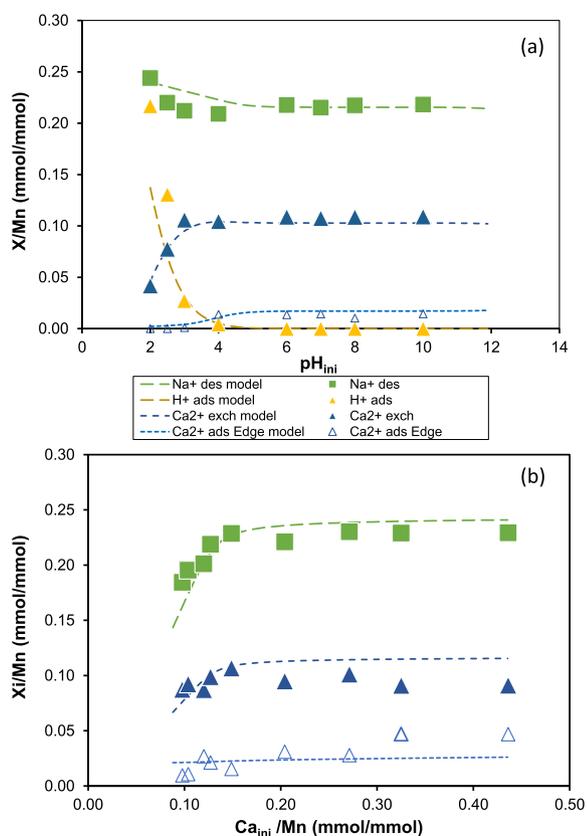


Fig. 4. (a) Amount of Ca²⁺ and H⁺ adsorbed and Na⁺ desorbed as function of initial pH, and (b) Amount of Ca²⁺ and H⁺ adsorbed and Na⁺ desorbed as function of the initial concentration of Ca (initial pH = 7). Our experimental data are shown with symbols while the SCM results are depicted by dotted lines.

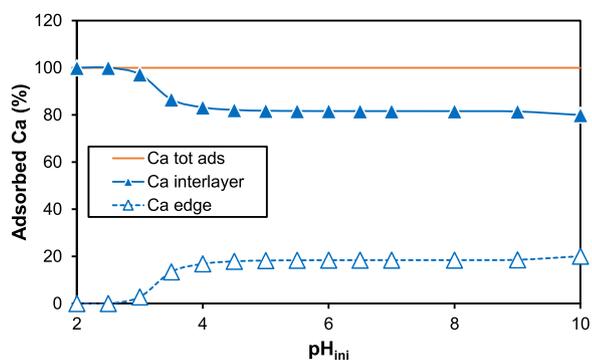


Fig. 5. Percentage of Ca adsorbed on interlayer and edge sites as a function of initial pH.

(such as Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺) electrostatically retained on the negative charges of the soil constituents (e.g., humic substances, phyllosilicates, oxy-hydroxides) by outer sphere complexes are generally easily exchangeable with other cations (e.g., Gangloff et al., 2016).

The reserves of basic cations in soils are classically estimated by measuring the quantities of cations extracted by soluble salts (e.g., ammonium acetate, sodium acetate, magnesium chloride, magnesium nitrate, potassium nitrate, ammonium chloride, barium chloride, cobalt hexamine chloride (e.g., Tessier et al., 1979; Ciesielski et al., 1997; Leleyter and Probst, 1999; Blum et al., 2002; Nezat et al., 2007; Holmden and Bélanger, 2010; Bélanger et al., 2012; Moore et al., 2013; Andrews et al., 2016; Bullen and Chadwick, 2016; Lehn et al., 2017). Note, however, that several authors showed that the choice of the salt

used for the extraction, as well as the concentration of the salt, pH and interaction times (from 1 h to 24 h), could induce significant variation in the amount of cations that could be exchanged (e.g., Ciesielski et al., 1997; Jaremko and Kalembasa, 2014). The results obtained in the present study showed that the isotopic signature of the solution after Ca desorption from δ-MnO₂ by using a specific desorbent (Cohex) was highly dependent on the concentration of this desorbent and the time of the interaction. Indeed, solution after partial desorption (lower than ~70% of Ca desorbed) was enriched in heavier isotopes (i.e., positive Δ^{44/40}Ca value in Fig. 2b) compared to the initial solution, while it was enriched in lighter isotopes (i.e., negative Δ^{44/40}Ca value in Fig. 2b) when more than 70% of the Ca is desorbed. In agreement with what we observed for the adsorption experiments, one could suggest that desorption occurs first from a ⁴⁴Ca-enriched site and then from a ⁴⁰Ca-enriched site. However, if we make the analogy that, as for the phyllosilicates, Ca desorbs first from the interlayer sites and then from the edges, this is in contradiction with the results of this study, which suggest that the edges have a signature enriched in the heavy isotope (⁴⁴Ca). Meanwhile, the interlayer space has a signature enriched in the light isotope ⁴⁰Ca. Such behavior obtained for δ-MnO₂ is significantly different from what was recently measured from clay minerals (Brazier et al., 2019), especially for smectites and fine muscovite particles, for which isotopic signatures of the desorbed Ca solutions (from Cohex as used in this study) were instantaneously equal to that of the initial solution used to perform adsorption, due to full desorption, irrespective of the time contact. These different behaviors between clay minerals and δ-MnO₂ could be tentatively assigned to structural control during the exchange of Ca²⁺ in the interlayer space of δ-MnO₂ considering other cations (Cohex, K⁺ or NH₄⁺; Table 4 and Fig. 2). Indeed, for Mn oxides, a possible rearrangement of the different cations in the interlayer space during exchange cannot be excluded; a process which could lead to a decrease in the thickness of the interlayer space and can cause then a partial collapse of the interlayer as reported in previous studies (Drits et al., 1998; Gaillot, 2002; Han and Kwon, 2022). Furthermore, it is interesting to note that the concentration of aqueous K⁺ in natural waters is generally lower than 10⁻² mol/L (e.g., Wang et al. 2021) implying that desorption of an initial cation adsorbed on mineral (as Ca²⁺ on δ-MnO₂) by another cation in the fluid (as K⁺) is rarely total. This leads then to isotopic signature of the fluid after interaction that are highly dependent on the Ca fraction desorbed from the solid. In this context, it is likely that a part of the Ca trapped in the interlayer space will tend not to be desorbed without a weathering reaction leading to hydrolysis of δ-MnO₂. This suggests that under natural condition, not all the bioavailable Ca in soils is attainable by exchange reactions, as often suggested.

Finally, other studies have questioned the relevance of using these salts to access the bioavailable fraction of nutrient cations in soils (e.g., Mengel and Rahmatullah, 1994; Hamburg et al., 2003; Lucash et al., 2012). Indeed, different reservoirs that can play a role as Ca reservoirs in soils are not extractable by soluble salts, such as Ca trapped in oxalate compounds, microbial biomass, carbonate minerals, primary minerals (e.g., apatite or secondary minerals, such as Fe oxy-hydroxides) and organic complexes bound in P fractions (Sparks, 1987; Farkas et al., 2011; Dauer and Perakis, 2014; van der Heijden et al., 2014; Schmitt et al., 2017; Chabaux et al., 2019; Rodionov et al., 2020; Uhlig et al., 2020). To extract bioavailable nutrients from these different reservoirs, sequential leaching can be considered. Problems similar to those noted in this study are therefore likely to arise depending on the different reagents/interaction times used in these steps, as well as on the type of the soil. Combining these basic approaches with isotopic measurements allows us to identify the underlying mechanisms.

6. Conclusion

This study confirms that, as observed for Ca adsorption on phyllosilicates, the light isotope ⁴⁰Ca is preferentially adsorbed on δ-MnO₂. As

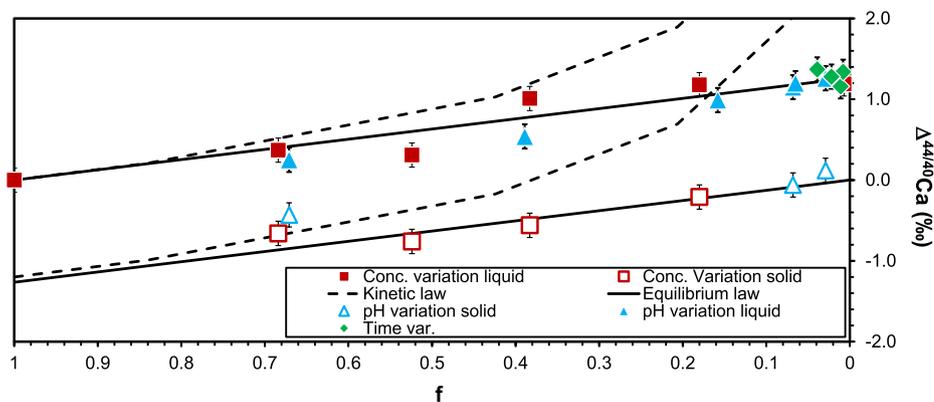


Fig. 6. Evolution of apparent isotopic fractionation of aqueous phase after Ca-adsorption on δ -MnO₂ compared to initial solution as a function of the fraction of remaining Ca in solution at stationary state. The pH variation dataset corresponds to a fixed initial Ca²⁺ concentration of 0.124 mmol/mmol Mn and variable pH values (i.e. $\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{LAA}}$ & $\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{SAA}}$ from Table 4). The Conc. variation dataset corresponds to variable Ca²⁺ concentrations and fixed initial pH equal to 7 (i.e. $\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{LAA}}$ & $\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{SAA}}$ from Table 5). The Time var. dataset refers to a fixed initial Ca²⁺ concentration of 0.10 mmol/mmol Mn and fixed initial pH equal to 7 for experimental time over 65 min (i.e. $\Delta^{44/40}\text{Ca}_{\text{LAA}}$ from Table 2). Kinetic theoretical law was drawn from equation $\partial_{\text{reactant}} = \left[(\partial_{\text{reactant}0} + 1000) \times f^{\alpha-1} \right] - 1000$ (Ding et al., 2005). Equilibrium theoretical law was its part drawn from $\partial_{\text{product}} = \alpha \times (\partial_{\text{reactant}0} + 1000) \times f^{\alpha-1} \times 1000$ (Black et al., 2008),

with α fractionation factor (reactant/product) and f the fraction of Ca remaining in solution.

the experiments follow equilibrium fractionation in a closed system, this implies that the heavy isotope ⁴⁴Ca remains preferentially bound to the aqueous phase of the nutrient solution. Our results suggest that at pH below 4, Ca almost exclusively occupies the interlayer space, while above pH 4, Ca first fills the interlayer space (~86%) and then edges (~14%). Our results propose that the isotopic signature of Ca bound to the edge sites is enriched in ⁴⁴Ca ($\Delta^{44/40}\text{Ca}$ equal to 3.5‰) compared to that of Ca adsorbed in the interlayer space ($\Delta^{44/40}\text{Ca}$ equal to -0.43‰).

This contrasting behavior between the two types of adsorption sites could be due to the bidentate nature of the Ca surface complex formed on the edge sites and to exchange of Ca²⁺ with H⁺ in the interlayer sites, as revealed by surface complexation modeling. Finally, our study shows that Ca adsorption on a poorly crystallized phyllosilicate (δ -MnO₂) exhibits the highest fractionation intensity observed to date in Ca adsorption on solids ($\Delta^{44/40}\text{Ca}$ is equal to 1.19 ± 0.15 ‰). These inter- and intramineral differences could be explained by different types of Ca binding or coordination, with the precise mechanisms yet to be determined.

We also observed that, unlike phyllosilicates, the Ca desorption was complete, but not instantaneous. This could be explained by structural control during the exchange of Ca²⁺ in the interlayer, which can lead to the partial collapse of the latter, making Ca difficult to extract. This questions the use of salts in the laboratory and the representativeness of the exchange complex to have access to the full amount of bioavailable Ca. Similarly, in the natural environment, this suggests that other Ca reservoirs should be considered, and that much of bioavailable Ca remains non-extractable using conventional methods.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This project received financial support from CNRS through the MITI interdisciplinary ISOTOP program. Colin Fournet from ITES is acknowledged for his help with elementary concentration measurements. Eric Pelt, also from ITES, is thanked for his help with Triton. Jean-Dominique Comparot from IC2MP is thanked for specific surface area measurements. AD Schmitt wants to thank Merlin Méheut for discussion about mechanisms governing isotopic fractionations. The manuscript benefitted from constructive reviews by three anonymous reviewers, the executive editor, J. G. Catalano, and the associate editor

O. S. Pokrovsky.

Appendix A. Supplementary material

Information about X-ray data performed on the studied δ -MnO₂, comparison of initial and final pH values for experimental and modelled data as well as calculation of $\Delta^{44/40}\text{Ca}$ isotope signature in the interlayer and on the edges are provided in Supplementary materials. Supplementary material to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.gca.2023.06.003>.

References

- Andrews, M.G., Jacobson, A.D., Lehn, G.O., Horton, T.W., Craw, D., 2016. Radiogenic and stable Sr isotope ratios (⁸⁷Sr/⁸⁶Sr, ⁸⁸/⁸⁶Sr) as tracers of riverine cation sources and biogeochemical cycling in the Milford Sound region of Fiordland, New Zealand. *Geochim. Cosmochim. Acta* 173, 284–303.
- Bagard, M.-L., Schmitt, A.-D., Chabaux, F., Pokrovsky, O.S., Viers, J., Stille, P., Labolle, F., Prokushkin, A.S., 2013. Biogeochemistry of stable Ca and radiogenic Sr isotopes in a larch-covered permafrost-dominated watershed of Central Siberia. *Geochim. Cosmochim. Acta* 114, 169–187.
- Baize, D., 1997. *Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France)*. INRA Editions, Versailles.
- Balistreri, L.S., Murray, J.W., 1982. The surface chemistry of δ MnO₂ in major ion sea water. *Geochim. Cosmochim. Acta* 46, 1041–1052.
- Bélangier, N., Holmden, C., Courchesne, F., Côté, B., Hendershot, W.H., 2012. Constraining soil mineral weathering ⁸⁷Sr/⁸⁶Sr for calcium apportionment studies of a deciduous forest growing on soils developed from granitoid igneous rocks. *Geoderma* 185–186, 84–96.
- Bigeleisen, J., Mayer, M.G., 1947. Calculation of equilibrium constants for isotopic exchange reactions. *J. Chem. Phys.* 15, 261–267.
- Black, J.R., Epstein, E., Rains, W.D., Yin, Q., Casey, W.H., 2008. Magnesium isotope fractionation during plant growth. *Environ. Sci. Technol.* 42, 7831–7836.
- Blum, J.D., Klaue, A., Nezat, C.A., Driscoll, C.T., Johnson, C.E., Siccama, T.G., Eagar, C., Fahey, T.J., Likens, G.E., 2002. Mycorrhizal weathering of apatite as an important calcium source in base-poor forest ecosystems. *Nature* 417, 729–731.
- Bradbury, M.H., Baeyens, B., 2009. Sorption modelling on illite Part I: Titration measurements and the sorption of Ni Co, Eu and Sn. *Geochim. Cosmochim. Acta* 73, 990–1003.
- Brazier, J.-M., Schmitt, A.-D., Gangloff, S., Pelt, E., Chabaux, F., Tertre, E., 2019. Calcium isotopic fractionation during adsorption onto and desorption from soil phyllosilicates (kaolinite, montmorillonite and muscovite). *Geochim. Cosmochim. Acta* 250, 324–347.
- Brazier, J.-M., Schmitt, A.-D., Gangloff, S., Pelt, E., Gocke, M.I., Wiesenberg, G.L.B., 2020. Multi-isotope approach ($\delta^{44/40}\text{Ca}$, $\delta^{88/86}\text{Sr}$ and $\delta^{87}\text{Sr}/\delta^{86}\text{Sr}$) provides insights into rhizolith formation mechanisms in terrestrial sediments of Nussloch (Germany). *Chem. Geol.* 545, 119641.
- Brunauer, S., Emmett, P.H., Teller, E., 1938. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J. Am. Chem. Soc.* 60, 309–319.
- Bullen, T., Chadwick, O., 2016. Ca, Sr and Ba stable isotopes reveal the fate of soil nutrients along a tropical climosequence in Hawaii. *Chem. Geol.* 422, 25–45.
- Burdige, D.J., Dhakar, S.P., Nealon, K.H., 1992. Effects of manganese oxide mineralogy on microbial and chemical manganese reduction. *Geomicrobiol. J.* 10, 27–48.
- Burns, R.G., Burns, V.M., 1977. Chapter 7 Mineralogy. In: Glasby, G.P. (Ed.), *Elsevier Oceanography Series. Marine Manganese Deposits*. Elsevier, pp. 185–248.

- Catts, J.G., Langmuir, D., 1986. Adsorption of Cu, Pb and Zn by δMnO_2 : applicability of the site binding-surface complexation model. *Appl. Geochem.* 1, 255–264.
- Centi-Tok, B., Chabaux, F., Lemarchand, D., Schmitt, A.-D., Pierret, M.-C., Viville, D., Bagard, M.-L., Stille, P., 2009. The impact of water–rock interaction and vegetation on calcium isotope fractionation in soil- and stream waters of a small, forested catchment (the Strengbach case). *Geochim. Cosmochim. Acta* 73, 2215–2228.
- Chabaux, F., Stille, P., Prunier, J., Gangloff, S., Lemarchand, D., Morvan, G., Négrel, J., Pelt, E., Pierret, M.-C., Rihs, S., Schmitt, A.-D., Trémolières, M., Viville, D., 2019. Plant-soil-water interactions: Implications from U-Th-Ra isotope analysis in soils, soil solutions and vegetation (Strengbach CZO, France). *Geochim. Cosmochim. Acta* 259, 188–210.
- Ciesielski, H., Sterckeman, T., Santerre, M., Willery, J.P., 1997. Determination of cation exchange capacity and exchangeable cations in soils by means of cobalt hexamine trichloride. Effects of experimental conditions. *Agronomie* 17, 1–7.
- Cobert, F., Schmitt, A.-D., Bourgeade, P., Labolle, F., Badot, P.-M., Chabaux, F., Stille, P., 2011. Experimental identification of Ca isotopic fractionations in higher plants. *Geochim. Cosmochim. Acta* 75, 5467–5482.
- Colla, C.A., Wimpenny, J., Yin, Q.-Z., Rustad, J.R., Casey, W.H., 2013. Calcium-isotope fractionation between solution and solids with six, seven or eight oxygens bound to Ca(II). *Geochim. Cosmochim. Acta* 121, 363–373.
- Dauer, J.M., Perakis, S.S., 2014. Calcium oxalate contribution to calcium cycling in forests of contrasting nutrient status. *For. Ecol. Manage.* 334, 64–73.
- Dorn, R.L., Krinsley, D.H., Liu, T., Anderson, S., Clark, J., Cahill, T.A., Gill, T.E., 1992. Manganese-rich rock varnish does occur in Antarctica. *Chem. Geol.* 99, 289–298.
- Drits, V.A., Silvester, E., Gorshkov, A.I., Manceau, A., 1997. Structure of synthetic monoclinic Na-rich birnessite and hexagonal birnessite: I. Results from X-ray diffraction and selected-area electron diffraction. *Am. Mineral.* 82, 946–961.
- Drits, V.A., Lanson, B., Gorshkov, A.I., Manceau, A., 1998. Substructure and superstructure of four-layer Ca-exchanged birnessite. *Am. Mineral.* 83, 97–118.
- Eisenhauer, A., Nägler, T.F., Stille, P., Kramers, J., Gussone, N., Bock, B., Fietzke, J., Hippler, D., Schmitt, A.-D., 2004. Proposal for international agreement on Ca notation resulting from discussions at workshops on stable isotope measurements held in Davos (Goldschmidt 2002) and Nice (EGS-AGU-EUG 2003). *Geostand. Geoanal. Res.* 28, 149–151.
- Farkaš, J., Déjeant, A., Novák, M., Jacobsen, S.B., 2011. Calcium isotope constraints on the uptake and sources of Ca^{2+} in a base-poor forest: A new concept of combining stable ($\delta^{44/42}\text{Ca}$) and radiogenic ($e\text{Ca}$) signals. *Geochim. Cosmochim. Acta* 75, 7031–7046.
- Gaillot A.-C., 2002. **Caractérisation structurale de la birnessite : Influence du protocole de synthèse.** Phd-thesis, Université Joseph-Fourier - Grenoble I.
- Gaines, G.L., Thomas, H.C., 1953. Adsorption studies on clay minerals. II. A formulation of the thermodynamics of exchange adsorption. *J. Chem. Phys.* 21, 714–718.
- Gangloff, S., Stille, P., Pierret, M.-C., Weber, T., Chabaux, F., 2014. Characterization and evolution of dissolved organic matter in acidic forest soil and its impact on the mobility of major and trace elements (case of the Strengbach watershed). *Geochim. Cosmochim. Acta* 130, 21–41.
- Gangloff, S., Stille, P., Schmitt, A.-D., Chabaux, F., 2016. Factors controlling the chemical composition of colloidal and dissolved fractions in soil solutions and the mobility of trace elements in soils. *Geochim. Cosmochim. Acta* 189, 37–57.
- Godfredsen, K.L., Stone, A.T., 1994. Solubilization of manganese dioxide-bound copper by naturally occurring organic compounds. *Environ. Sci. Technol.* 28, 1450–1458.
- Grangeon, S., Lanson, B., Lanson, M., Manceau, A., 2008. Crystal structure of Ni-sorbed synthetic vernadite: a powder X-ray diffraction study. *Mineral. Mag.* 72, 1279–1291.
- Grangeon, S., Manceau, A., Guilhermet, J., Gaillot, A.-C., Lanson, M., Lanson, B., 2012. Zn sorption modifies dynamically the layer and interlayer structure of vernadite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 85, 302–313.
- Grangeon, S., Fernandez-Martinez, A., Claret, F., Marty, N., Tournassat, C., Warmont, F., Gloter, A., 2017. In-situ determination of the kinetics and mechanisms of nickel adsorption by nanocrystalline vernadite. *Chem. Geol.* 459, 24–31.
- Griffith, E.M., Schmitt, A.-D., Andrews, M.G., Fantle, M.S., 2020. Elucidating modern geochemical cycles at local, regional, and global scales using calcium isotopes. *Chem. Geol.* 534, 119445.
- Gustafsson, J.P., 2013. *Visual MINTEQ, Version 3.1*, Division of Land and Water Resources. Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden.
- Hamburg, S.P., Yanai, R.D., Arthur, M.A., Blum, J.D., Siccamo, T.G., 2003. Biotic control of calcium cycling in northern hardwood forests: acid rain and aging forests. *Ecosystems* 6, 399–406.
- Han, S., Kwon, K.D., 2022. Interlayer water structure of phyllophanates: Insights from MD simulations of chalcophanite-group oxide dehydration. *Geochim. Cosmochim. Acta* 318, 495–509.
- Hedwig, G.R., Liddle, J.R., Reeves, R.D., 1980. Complex formation of nickel(II) ions with citric acid in aqueous solution: a potentiometric and spectroscopic study. *Aust. J. Chem.* 33, 1685–1693.
- Heuser, A., Schmitt, A.-D., Gussone, N., Wombacher, F., 2016. Analytical methods. In: Gussone, N., Schmitt, A.-D., Heuser, A., Wombacher, F., Dietzel, M., Tipper, E., Schiller, M. (Eds.), *Calcium Stable Isotope Geochemistry*. Springer, pp. 23–73.
- Hippler, D., Schmitt, A.-D., Gussone, N., Heuser, A., Stille, P., Eisenhauer, A., Nägler, T. F., 2003. Calcium isotopic composition of various reference materials and seawater. *Geostand. Newsl.* 27, 13–19.
- Holmden, C., Bélanger, N., 2010. Ca isotope cycling in a forested ecosystem. *Geochim. Cosmochim. Acta* 74, 995–1015.
- Huang, X., Chen, T., Zou, X., Zhu, M., Chen, D., Pan, M., 2017. The adsorption of Cd(II) on manganese oxide investigated by batch and modeling techniques. *IJERPH* 14, 1145.
- Huang, F., Zhou, C., Wang, W., Kang, J., Wu, Z., 2019. First-principles calculations of equilibrium Ca isotope fractionation: Implications for oldhamite formation and evolution of lunar magma ocean. *Earth Planet. Sci. Lett.* 510, 153–160.
- Ikedo, T., Nishiyama, T., Yamada, S., Yanagi, T., 2007. Microstructures of olivine-plagioclase corona in meta-ultramafic rocks from Sefuri Mountains, NW Kyushu, Japan. *Lithos* 97, 289–306.
- Jalilehvand, F., Spångberg, D., Lindqvist-Reis, P., Hermansson, K., Persson, I., Sandström, M., 2001. Hydration of the calcium ion. An EXAFS, large-angle X-ray scattering, and molecular dynamics simulation study. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 431–441.
- Jaremko, D., Kalembasa, D., 2014. A comparison of methods for the determination of cation exchange capacity of Soils/Porównanie Metod Oznaczania Pojemności Wymiany Kationów I Sumy Kationów Wymiennych W Glebach. *Ecol. Chem. Eng. S* 21, 487–498.
- Katz, A.K., Glusker, J.P., Beebe, S.A., Bock, C.W., 1996. Calcium ion coordination: a comparison with that of beryllium, magnesium, and zinc. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 5752–5763.
- Koneshan, S., Rasaiah, J.C., Lynden-Bell, R.M., Lee, S.H., 1998. Solvent structure, dynamics, and ion mobility in aqueous solutions at 25 °C. *J. Phys. Chem. B* 102, 4193–4204.
- Lanson, B., Drits, V.A., Silvester, E., Manceau, A., 2000. Structure of H-exchanged hexagonal birnessite and its mechanism of formation from Na-rich monoclinic buserite at low pH. *Am. Mineral.* 85, 826–838.
- Lanson, B., Drits, V.A., Gaillot, A.-C., Silvester, E., Plançon, A., Manceau, A., 2002. Structure of heavy-metal sorbed birnessite: Part 1. Results from X-ray diffraction. *Am. Mineral.* 87, 1631–1645.
- Lehn, G.O., Jacobson, A.D., Holmden, C., 2013. Precise analysis of Ca isotope ratios ($\delta^{44/40}\text{Ca}$) using an optimized ^{43}Ca - ^{42}Ca double-spike MC-TIMS method. *Int. J. Mass Spectrom.* 351, 69–75.
- Lehn, G.O., Jacobson, A.D., Douglas, T.A., McClelland, J.W., Barker, A.J., Khosh, M.S., 2017. Constraining seasonal active layer dynamics and chemical weathering reactions occurring in North Slope Alaskan watersheds with major ion and isotope ($\delta^{34}\text{SSO}_4$, $\delta^{13}\text{CDIC}$, $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, $\delta^{44/40}\text{Ca}$, and $\delta^{44/42}\text{Ca}$) measurements. *Geochim. Cosmochim. Acta* 217, 399–420.
- Leleyter, L., Probst, J.-L., 1999. A new sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace elements in river sediments. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 73, 109–128.
- Li, Y., Zhao, X., Wu, J., Gu, X., 2020. Surface complexation modeling of divalent metal cation adsorption on birnessite. *Chem. Geol.* 551, 119774.
- Lu, J., Tertre, E., Beaucaire, C., 2014. Assessment of a predictive model to describe the migration of major inorganic cations in a Bt soil horizon. *Appl. Geochem.* 41, 151–162.
- Lucash, M.S., Yanai, R.D., Blum, J.D., Park, B.B., 2012. Foliar nutrient concentrations related to soil sources across a range of sites in the Northeastern United States. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 76, 674–683.
- Luo, J., Zhang, Q., Suib, S.L., 2000. Mechanistic and kinetic studies of crystallization of birnessite. *Inorg. Chem.* 39, 741–747.
- Manceau, A., Lanson, M., Geoffroy, N., 2007. Natural speciation of Ni, Zn, Ba, and As in ferromanganese coatings on quartz using X-ray fluorescence, absorption, and diffraction. *Geochim. Cosmochim. Acta* 71, 95–128.
- Manceau, A., Marcus, M.A., Grangeon, S., Lanson, M., Lanson, B., Gaillot, A.-C., Skanthakumar, S., Soderholm, L., 2013. Short-range and long-range order of phyllo-manganese nanoparticles determined using high-energy X-ray scattering. *J. Appl. Crystallogr.* 46, 193–209.
- Marafiot, F.F., Lanson, B., Peña, J., 2018. Crystal growth and aggregation in suspensions of $\delta\text{-MnO}_2$ nanoparticles: implications for surface reactivity. *Environ. Sci.: Nano* 5, 497–508.
- Marriott, C.S., Henderson, G.M., Belshaw, N.S., Tudhope, A.W., 2004. Temperature dependence of $\delta^7\text{Li}$, $\delta^{44}\text{Ca}$ and Li/Ca during growth of calcium carbonate. *Earth Planet. Sci. Lett.* 222, 615–624.
- Marschner, H., 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd ed. Institute of Plant Nutrition University of Hohenheim, Germany.
- Mengel, K., Rahmatullah, 1994. Exploitation of potassium by various crop species from primary minerals in soils rich in micas. *Biol. Fertil. Soils* 17, 75–79.
- Moore, J., Jacobson, A.D., Holmden, C., Craw, D., 2013. Tracking the relationship between mountain uplift, silicate weathering, and long-term CO_2 consumption with Ca isotopes: Southern Alps, New Zealand. *Chem. Geol.* 341, 110–127.
- Morton, J.D., Semrau, J.D., Hayes, K.F., 2001. An X-ray absorption spectroscopy study of the structure and reversibility of copper adsorbed to montmorillonite clay. *Geochim. Cosmochim. Acta* 65, 2709–2722.
- Moynier, F., Fujii, T., 2017. Calcium isotope fractionation between aqueous compounds relevant to low-temperature geochemistry, biology and medicine. *Sci. Rep.* 7, 44255.
- Murray, J.W., 1974. The surface chemistry of hydrous manganese dioxide. *J. Colloid Interface Sci.* 46, 357–371.
- Murray, J.W., 1975. The interaction of metal ions at the manganese dioxide-solution interface. *Geochim. Cosmochim. Acta* 39, 505–519.
- Nelson, C.J., Jacobson, A.D., Kitch, G.D., Weisenberger, T.B., 2021. Large calcium isotope fractionations by zeolite minerals from Iceland. *Commun. Earth Environ.* 2, 1–12.
- Nelson, Y.M., Lion, L.W., Ghiorse, W.C., Shuler, M.L., 1999. Production of biogenic Mn oxides by *Leptothrix discophora* SS-1 in a chemically defined growth medium and evaluation of their Pb adsorption characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 175–180.
- Nezat, C.A., Blum, J.D., Yanai, R.D., Hamburg, S.P., 2007. A sequential extraction to determine the distribution of apatite in granitoid soil mineral pools with application

- to weathering at the Hubbard Brook Experimental Forest, NH, USA. *Appl. Geochem.* 22, 2406–2421.
- Palumbo, B., Bellanca, A., Neri, R., Roe, M.J., 2001. Trace metal partitioning in Fe–Mn nodules from Sicilian soils, Italy. *Chem. Geol.* 173, 257–269.
- Peña, J., Bargar, J.R., Sposito, G., 2015. Copper sorption by the edge surfaces of synthetic birnessite nanoparticles. *Chem. Geol.* 396, 196–207.
- Post, J.E., Veblen, D.R., 1990. Crystal structure determinations of synthetic sodium, magnesium, and potassium birnessite using TEM and the Rietveld method. *Am. Mineral.* 75, 477–489.
- Reinholdt, M.X., Hubert, F., Faurel, M., Tertre, E., Razafitianamaharavo, A., Francius, G., Prêt, D., Petit, S., Béré, E., Pelletier, M., Ferrage, E., 2013. Morphological properties of vermiculite particles in size-selected fractions obtained by sonication. *Appl. Clay Sci.* 77–78, 18–32.
- Rodionov, A., Bauke, S.L., von Sperber, C., Hoeschen, C., Kandler, E., Kruse, J., Lewandowski, H., Marhan, S., Mueller, C.W., Simon, M., Tamburini, F., Uhlig, D., von Blanckenburg, F., Lang, F., Amelung, W., 2020. Biogeochemical cycling of phosphorus in subsoils of temperate forest ecosystems. *Biogeochemistry* 150, 313–328.
- Schmitt, A.-D., 2016. Earth-surface Ca isotopic fractionations. In: *Calcium Stable Isotope Geochemistry Advances in Isotope Geochemistry*. Springer, Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 145–172.
- Schmitt, A.-D., Vigier, N., Lemarchand, D., Millot, R., Stille, P., Chabaux, F., 2012. Processes controlling the stable isotope compositions of Li, B, Mg and Ca in plants, soils and waters: A review. *C. R. Geosci.* 344, 704–722.
- Schmitt, A.-D., Cobert, F., Bourgeade, P., Ertlen, D., Labolle, F., Gangloff, S., Badot, P.-M., Chabaux, F., Stille, P., 2013. Calcium isotope fractionation during plant growth under a limited nutrient supply. *Geochim. Cosmochim. Acta* 110, 70–83.
- Schmitt, A.-D., Gangloff, S., Labolle, F., Chabaux, F., Stille, P., 2017. Calcium biogeochemical cycle at the beech tree-soil solution interface from the Strengbach CZO (NE France): insights from stable Ca and radiogenic Sr isotopes. *Geochim. Cosmochim. Acta* 213, 91–109.
- Schmitt, A.-D., Borrelli, N., Ertlen, D., Gangloff, S., Chabaux, F., Osterrieth, M., 2018. Stable calcium isotope speciation and calcium oxalate production within beech tree (*Fagus sylvatica* L.) organs. *Biogeochemistry* 137, 197–217.
- Sherman, D.M., Peacock, C.L., 2010. Surface complexation of Cu on birnessite (δ -MnO₂): Controls on Cu in the deep ocean. *Geochim. Cosmochim. Acta* 74, 6721–6730.
- Simanova, A.A., Kwon, K.D., Bone, S.E., Bargar, J.R., Refson, K., Sposito, G., Peña, J., 2015. Probing the sorption reactivity of the edge surfaces in birnessite nanoparticles using nickel(II). *Geochim. Cosmochim. Acta* 164, 191–204.
- Sparks, D.L., 1987. Potassium dynamics in soils. In: Stewart, B.A. (Ed.), *Advances in Soil Science*. Advances in Soil Science. Springer, New York, NY, pp. 1–63.
- Su, Q., Pan, B., Wan, S., Zhang, W., Lv, L., 2010. Use of hydrous manganese dioxide as a potential sorbent for selective removal of lead, cadmium, and zinc ions from water. *J. Colloid Interface Sci.* 349, 607–612.
- Tertre, E., Beaucaire, C., Coreau, N., Juery, A., 2009. Modeling of Zn sorption onto clayey sediments using a multi-site and multi-component ion-exchange model. *Appl. Geochem.* 24, 1852–1861.
- Tertre, E., Prêt, D., Ferrage, E., 2011. Influence of the ionic strength and solid/solution ratio on Ca(II)-for-Na⁺ exchange on montmorillonite. Part 1: Chemical measurements, thermodynamic modeling and potential implications for trace elements geochemistry. *J. Colloid Interface Sci.* 353, 248–256.
- Tessier, A., Campbell, P.G.C., Bisson, M., 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Anal. Chem.* 51, 844–851.
- Tonkin, J.W., Balistrieri, L.S., Murray, J.W., 2004. Modeling sorption of divalent metal cations on hydrous manganese oxide using the diffuse double layer model. *Appl. Geochem.* 19, 29–53.
- Uhlig, D., Amelung, W., von Blanckenburg, F., 2020. Mineral nutrients sourced in deep regolith sustain long-term nutrition of mountainous temperate forest ecosystems. *Global Biogeochem. Cycles* 34, 1–21.
- Urey, H.C., 1947. The thermodynamic properties of isotopic substances. *J. Chem. Soc. Resumed.* 7, 562–581.
- van der Heijden, G., Legout, A., Pollier, B., Ranger, J., Dambrine, E., 2014. The dynamics of calcium and magnesium inputs by throughfall in a forest ecosystem on base poor soil are very slow and conservative: evidence from an isotopic tracing experiment (²⁶Mg and ⁴⁴Ca). *Biogeochemistry* 118, 413–442.
- van Genuchten, C.M., Peña, J., 2016. Sorption selectivity of birnessite particle edges: a d-PDF analysis of Cd(II) and Pb(II) sorption by δ -MnO₂ and ferrihydrite. *Environ. Sci. Process Impacts* 18, 1030–1041.
- Villalobos, M., 2015. The role of surface edge sites in metal(loid) sorption to poorly-crystalline birnessites. In: *Advances in the Environmental Biogeochemistry of Manganese Oxides ACS Symposium Series*. American Chemical Society, pp. 65–87.
- Villalobos, M., Toner, B., Bargar, J., Sposito, G., 2003. Characterization of the manganese oxide produced by *Pseudomonas putida* strain MnB1. *Geochim. Cosmochim. Acta* 67, 2649–2662.
- Villalobos, M., Lanson, B., Manceau, A., Toner, B., Sposito, G., 2006. Structural model for the biogenic Mn oxide produced by *Pseudomonas putida*. *Am. Mineral.* 91, 489–502.
- Wang, K., Peucker-Ehrenbrink, B., Chen, H., Lee, H., Hasenmueller, E.A., 2021. Dissolved potassium isotopic composition of major world rivers. *Geochim. Cosmochim. Acta* 294, 145–159.
- Xu, J., Fan, Q., Niu, Z., Li, Y., Li, P., Wu, W., 2012. Studies of Eu(III) sorption on TiO₂: Effects of pH, humic acid and poly(acrylic acid). *Chem. Eng. J.* 179, 186–192.
- Yuan, W., Saldi, G.D., Chen, J., Vetusch, Z.M., Birck, J.-L., Liu, Y., Schott, J., 2018. Gallium isotope fractionation during Ga adsorption on calcite and goethite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 223, 350–363.
- Zhao, W., Feng, X., Tan, W., Liu, F., Ding, S., 2009. Relation of lead adsorption on birnessites with different average oxidation states of manganese and release of Mn²⁺/H⁺/K⁺. *J. Environ. Sci.* 21, 520–526.

Nicolas NUVOLI

Rôle des bactéries du sol dans l'accès aux nutriments par la végétation : approche isotopique

Résumé

L'objectif de cette thèse est de tendre vers une compréhension plus précise du cycle biogéochimique du Ca dans les sols, notamment au travers de la caractérisation élémentaire et isotopique de l'interaction du Ca avec des bactéries : *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*, ainsi qu'avec des minéraux tels que des MnO_2 abiotiques (δ - MnO_2 et birnessites) et un MnO_2 bactériogénique (vernadite) produit par *Pseudomonas Putida GB1* ainsi qu'avec un échantillon de vermiculite. Nos résultats indiquent que *B. subtilis* est susceptible d'induire un fractionnement du Ca lors de la formation du complexe entre le Ca et l'acide dipicolinique formé dans la cellule bactérienne lors de l'amorce du processus de sporulation. En revanche le mécanisme d'adsorption du Ca ne semble pas induire de fractionnement isotopique significatif du Ca. Les expérimentations sur les oxydes de manganèse ont quant à elles permis de vérifier que l'intensité du fractionnement isotopique sur le MnO_2 induit lors de l'adsorption du Ca ne dépend vraisemblablement pas de la proportion de lacunes ou du niveau de cristallinité de la structure du minéral, mais plutôt de la nature de la liaison établie entre le Ca et le solide ou peut être d'une différence de nature du fractionnement isotopique. Quoi qu'il en soit, les échantillons de MnO_2 présentent tous un enrichissement de la solution en isotopes lourds de plus de 1,00‰. Les travaux sur la vermiculite ont permis de mettre en évidence que l'adsorption sur les surfaces basales et interfoliaires de la vermiculite fractionne le Ca avec la même intensité, et ce malgré la différence de nature entre l'interfoliaire (milieu nanométrique confiné) et une surface basale libre.

Mots clés : isotopes du calcium, bactéries, adsorption/désorption, biogéochimie, oxydes de manganèse, vermiculite

Abstract

This thesis aims to gain a more precise understanding of the biogeochemical cycle of Ca in soils, in particular through the elemental and isotopic characterization of the interaction of Ca with bacteria: *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*, as well as with minerals such as abiotic MnO_2 (δ - MnO_2 and birnessites) and a bacteriogenic MnO_2 (vernadite) produced by *Pseudomonas Putida GB1*, and with a vermiculite sample. Our results indicate that *B. subtilis* is capable of inducing Ca fractionation during the formation of the complex between Ca and dipicolinic acid formed in the bacterial cell at the start of the sporulation process. In contrast, the Ca adsorption mechanism does not appear to induce significant Ca isotopic fractionation. Experiments on manganese oxides have shown that the intensity of isotopic fractionation on MnO_2 induced during Ca adsorption is unlikely to depend on the proportion of vacancies or the level of crystallinity of the mineral structure, but rather on the nature of the bond established between Ca and the solid, or perhaps on a difference in the nature of the isotopic fractionation. In any case, the MnO_2 samples all show a solution enrichment in heavy isotopes of over 1.00‰. Work on vermiculite has demonstrated that adsorption on the basal and interfoliar surfaces of vermiculite fractionates Ca with the same intensity, despite the difference in nature between the interfoliar (confined nanometric medium) and a free basal surface.

Key words : calcium isotopes, bacteria, adsorption/desorption, biogeochemistry, manganese oxides, vermiculite