



En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT de l'Université Paul-Sabatier**  
**Spécialité : BIOGEOCHIMIE expérimentale.**

Par GELABERT Alexandre

# **Caractérisation physico-chimique des interactions métaux-diatomées**

Soutenue publiquement le 14 Octobre 2005.

Membres du Jury :

Jean-Luc ROLS (Université Toulouse III)	- Président du Jury
Gérard BLANC (Université Bordeaux 1)	- Rapporteur
François GUYOT (Univ. Paris Diderot)	- Rapporteur
Jacques SCHOTT (CNRS, LMTG)	- Directeur de Thèse
Oleg POKROVSKY (CNRS, LMTG)	- Directeur de Thèse

Travail réalisé au Laboratoire des Mécanismes de Transfert en Géologie  
14 avenue Edouard Belin  
31400 Toulouse.

## REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été conduit au Laboratoire des Mécanismes de Transfert en Géologie (LMTG), laboratoire de l'Université Toulouse III associé au CNRS. A mon sens, il a bénéficié d'un environnement exceptionnel, tant sur le plan professionnel qu'humain, et c'est à son terme que je tiens à remercier vivement toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Je tenais en premier lieu à adresser mes remerciements à mes deux directeurs de thèse Oleg et Jacques. Ils ont très largement contribué de par leur disponibilité et leur compétence à construire ce travail, et bien au delà m'ont donné les outils pour appréhender le monde des géosciences que je ne connaissais pas jusqu'alors. A mon arrivée au Laboratoire (à la fin du siècle dernier...) j'avais pour seul bagage un cursus en chimie organique, et des connaissances en sciences de la Terre qui se limitaient à une vision quasi « romantique » des volcans et de la tectonique des plaques. C'est au contact de leur enthousiasme parfois débordant que j'ai découvert le monde de la géochimie, et c'est d'ailleurs avec beaucoup d'émotion que je me souviens de Jacques me présentant mon futur stage de DEA avec une argumentation telle que j'ai tout de suite été convaincu de poursuivre dans cette discipline. Finalement, si j'ai eu l'opportunité de largement développer de multiples approches techniques, c'est paradoxalement l'attitude de mes deux directeurs qui m'a peut être le plus marqué: un mélange de rigueur, d'optimisme, et une vision globale qui m'ont permis de me faire une idée de ce qu'est une démarche scientifique.

Je remercie bien entendu les membres de mon jury de soutenance d'avoir accepté de juger ce travail, et particulièrement d'en avoir assuré une lecture détaillée malgré l'envoi du manuscrit au début du mois d'Août ! Merci à François Guyot et Gérard Blanc pour en avoir été les rapporteurs, merci pour leurs commentaires et suggestions précieuses, et pour les discussions critiques qu'ils ont pu initier.

Bien sûr, ce travail a pu être réalisé grâce à l'implication forte du service analytique. C'est pourquoi je souhaitai remercier Jocelyne Escalier, à la fois pour son implication mais aussi pour sa bonne humeur légendaire ; Caco Boucayrand qui m'a permis de démarrer des analyses isotopiques dans les conditions idéales (et avec le sourire malgré les heures passées devant mes colonnes); Caro

Causserand qui a toujours été disponible même dans les plus gros moments d'urgence (et il y en eu quelques uns); et d'une manière générale tout le staff technique.

Mes questions scientifiques, qu'elles fussent fondamentales ou désespérément basiques (il y en eu beaucoup), ont (presque) toujours pu trouver réponses grâce à la disponibilité et la compétence des nombreux chercheurs que j'ai eu la chance de rencontrer au cours de ce travail.

Outre l'accueil toujours sympathique du LEESA, les discussions que j'ai pu avoir avec Agnès Feurtet-Mazel, Caroline Gold ou Alain Boudou lors de mes nombreuses visites à Arcachon, m'ont permis de mieux appréhender les mystères de la biologie des diatomées. Je les remercie donc pour leur gigantesque patience à l'égard de mes nombreuses lacunes en biologie.

Par ailleurs, j'ai eu l'opportunité d'apprendre beaucoup au contact de Jérôme Viers et Rémi Freyrier pour les analyses isotopiques ou encore Gleb Pokrovski pour les techniques de spectroscopie d'absorption des rayons X, quelque peu ésotériques au premier abord... Là encore je les remercie pour leur patience et leur engagement.

Enfin, ce sont aussi les nombreuses « discussions-autour-de-la-machine-à-café » (avec ou sans machine à café d'ailleurs) qui ont permis d'élargir considérablement ma vision des sciences de la Terre ... et du monde en général. J'en remercie Jeroen, Galen, Claude, Bernard, Margot, Christophe, David. En particulier, un grand merci à Yves et Michel pour leur soutien sans faille pendant (et avant, ... et après aussi) la rédaction de ce manuscrit, avec leur bonnes blagues ou leurs nouvelles découvertes musicales, et toujours un fauteuil qui m'attendait dans leur bureau !

Faire une thèse c'est aussi partager avec d'autres thésards embarqués dans le même navire, parfois sur les eaux calmes de la mer des Caraïbes, parfois dans le tumulte des 40<sup>ème</sup> rugissants. Un énorme merci à Céline pour ses quiches aux poireaux, les apéros sur sa terrasse et sa bonne humeur communicative; à Fred, « adversaire » au squash ; au petit comité d'escalade : Stéphanie, Manu, Yann, Anthony, Christelle ; à Najatte, Marie, Ekaterina, Fabrice pour m'avoir supporté dans le bureau (l'inverse est vraie aussi bien sûr !); à Gwen et Agnès qui ont contribué à améliorer la vie à Castelnaudary ; David qui restera un modèle de blagues vaseuses ; et finalement à tous les étudiants du labo pour les excellents moments passés à jouer au volley le midi.

C'est certainement en grande partie grâce à mon oncle Yvon que j'ai très tôt été emballé par le monde de la recherche, et je le remercie (mais après coup !) pour ses récits d'hivernages en Antartique pendant les repas de famille, ou pour ses commentaires incompréhensibles mais

passionants sur le métabolisme des manchots ! Mes parents bien sûr ont joué leur part en encourageant ma curiosité, et c'est aussi ici une occasion spéciale de les remercier pour tout cela.

Enfin, merci à toi Fabienne, pour m'avoir encouragé (et supporté) pendant les moments difficiles de la rédaction, pour avoir su me remotiver quand tout ne marchait pas comme je l'aurai souhaité, et tout simplement pour ton sourire de tous les jours.

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>1</b>
<b>CHAP.1 - LA DIATOMEE</b> .....	<b>5</b>
<i>I. CONSIDERATIONS BIOLOGIQUES ET ECOLOGIQUES</i> .....	6
A. Classification .....	7
B. Organisation de la cellule .....	8
C. Mode de reproduction .....	9
D. Le frustule .....	11
E. Répartition sur terre et rôle écologique .....	12
<i>II. MECANISMES D'ABSORPTION DES NUTRIMENTS</i> .....	14
A. Diffusion passive .....	14
B. Transport actif .....	15
<i>III. MECANISMES DE DETOXIFICATION METALLIQUE</i> .....	15
A. Phytochélatines .....	16
B. Méthallothionéines .....	17
<i>IV. UN ROLE CLEF POUR DE NOMBREUSES THEMATIQUES</i> .....	17
A. Pompe biologique du CO <sub>2</sub> .....	18
B. Utilisation des diatomées comme indicateurs de paléo-environnement.....	18
C. Indicateur de pollution .....	19
D. Agent de biorémediation .....	20
E. Disponibilité des métaux dans les environnements .....	22

<i>V. CHOIX DES ESPECES ETUDIEES</i> .....	23
<b>CHAP.2 - LES INTERFACES BIOLOGIQUES</b> .....	<b>25</b>
<i>I. REACTIVITE DES DIFFERENTS METAUX</i> .....	26
A. Métaux essentiels .....	27
B. Métaux toxiques .....	28
<i>II. COMPOSITION CHIMIQUE DES SURFACES BIOLOGIQUES</i> .....	28
A. Bactéries .....	29
1. Bactéries Gram positives .....	30
2. Bactéries Gram négatives .....	32
3. Polymères extracellulaires et couches S .....	32
B. Algues .....	34
C. Diatomées .....	35
<i>III. PROPRIETES ACIDO-BASIQUES DES SURFACES BIOLOGIQUES</i> .....	38
<i>IV. INTERACTIONS ENTRE LES METAUX ET LES SURFACES BIOLOGIQUES</i> .....	41
A. Bactéries .....	42
1. Similitudes dans les propriétés d'adsorption des bactéries .....	42
2. Prédiction des constantes de stabilité .....	44
3. Modéliser les systèmes naturels .....	45
4. Adsorption de molécules organiques .....	45
B. Algues .....	46
C. Diatomée .....	47
D. Stœchiométrie .....	48
E. Influence de la concentration et la nature de l'électrolyte .....	51
F. Cinétique d'adsorption et d'incorporation .....	51
<i>V. PRODUCTION D'EXUDATS</i> .....	53
<b>CHAP.3 - METHODES</b> .....	<b>59</b>

<i>I. CULTURE DES CELLULES</i> .....	60
<i>II. PREPARATION DES DIATOMÉES</i> .....	61
A. Détermination de la concentration .....	61
B. Prélèvement et lavage .....	62
C. Séparation du frustule de la cellule .....	62
<i>III. MESURES DE SURFACE SPECIFIQUE</i> .....	63
A. Mesures au BET .....	63
B. Mesures SAXS .....	63
C. Problèmes de mesures de surfaces spécifiques.....	64
<i>IV. TITRAGES ACIDO-BASIQUES</i> .....	65
A. Principe .....	65
B. Artefacts intervenants lors du titrage .....	66
1. Dégradation cellulaire.....	66
2. Libération d'exudats .....	67
3. Incorporation des protons et des métaux dans la paroi cellulaire .....	68
C. Protocoles utilisés .....	69
1. Titration en réacteur fermé .....	69
2. Titration en réacteur à temps de résidence limité .....	71
3. Titration du surnageant .....	72
<i>V. EXPERIENCES D'ADSORPTION DES METAUX</i> .....	73
A. Principe.....	73
B. Protocole utilisé .....	74
1. Isothermes d'adsorption .....	74
2. Adsorption en fonction du pH .....	75
<i>VI. MESURES ELECTROKINETIQUES</i> .....	75
A. Principe des mesures .....	76
B. Phénomène d'électroosmose .....	76
C. Calcul du potentiel $\zeta$ .....	77
D. Protocole de mesure .....	78

1. Réglages préliminaires de l'appareil .....	78
a) Plan stationnaire/Electroosmose .....	78
b) Calibration de la conductivité .....	78
2. Mesures de mobilité électrophorétique .....	78
a) Mesures en fonction du pH .....	78
b) Mesures avec exposition aux métaux .....	79
<i>VII. SPECTROSCOPIE DE PHOTOELECTRONS-X (ESCA OU XPS)</i> .....	80
A. Précautions à l'utilisation de matériel organique .....	80
B. Informations fournies par les analyses XPS.....	81
1. Analyse qualitative .....	81
2. Structure et états d'oxydation .....	82
3. Analyse quantitative .....	82
4. Traitement des données .....	82
C. Protocole utilisé .....	83
<i>VIII. ANALYSES INFRAROUGES</i> .....	84
A. Principe de l'analyse.....	84
B. Protocoles utilisés .....	85
1. Mesures en transmission (FT-IR) .....	85
2. DRIFT (Réflexion diffuse) .....	86
3. ATR (Réflexion Totale Atténuée) .....	87
C. Informations fournies par les mesures Infrarouge .....	89
<i>IX. DETERMINATION DES RAPPORTS ISOTOPIQUES</i> .....	89
A. Protocole d'attaque.....	90
B. Contamination .....	91
C. Purification par colonne échangeuse d'ions .....	91
D. Mesures.....	91
E. Traitement des données .....	92
<i>X. STRATEGIES DE MODELISATION</i> .....	93
A. Modèles non-électrostatiques .....	94
B. Modèles de complexation surfacique .....	95

1. Prise en compte de la charge électrique de surface .....	96
a) Modèle à capacitance constante (CCM).....	96
b) Modèle à couche diffuse (DLM) .....	97
c) Modèle de Stern .....	98
d) Modèle à triple couche .....	99
2. Valeurs discrètes et valeurs continues des constantes de dissociation surfacique....	100
a) Valeurs discrètes .....	100
b) Valeurs continues .....	101
C. Modèle utilisé dans ce travail.....	101
1. Choix du modèle.....	101
2. Logiciel FITEQL .....	102
3. Procédure de modélisation utilisée .....	104
4. Sensibilité du modèle aux valeurs des paramètres .....	106
<b>CHAP.4 - CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES SURFACES DE DIATOMÉES .....</b>	<b>109</b>
<i>I. INTRODUCTION.....</i>	<i>110</i>
<i>II. RESUME EN FRANÇAIS DE L'ARTICLE : "STUDY OF DIATOM/AQUEOUS SOLUTION INTERFACE. I. ACID-BASE EQUILIBRIA AND SPECTROSCOPIC OBSERVATION OF FRESHWATER AND MARINE SPECIES" .....</i>	<i>111</i>
A. Observations spectroscopiques.....	111
B. Observations macroscopiques .....	113
<i>III. STUDY OF DIATOM/AQUEOUS SOLUTION INTERFACE I. ACID-BASE EQUILIBRIA, SURFACE CHARGE AND SPECTROSCOPIC OBSERVATION OF FRESHWATER AND MARINE SPECIES .....</i>	<i>116</i>
<b>CHAP.5 - INTERACTIONS AVEC LE ZINC .....</b>	<b>137</b>
<i>I. INTRODUCTION.....</i>	<i>138</i>
<i>II. RESUME EN FRANCAIS DE L'ARTICLE: "SPECIATION OF ZN ASSOCIATED WITH DIATOMS USING X-RAY ABSORPTION SPECTROSCOPY" .....</i>	<i>139</i>
<i>III. SPECIATION OF ZN ASSOCIATED WITH DIATOMS USING X-RAY ABSORPTION SPECTROSCOPY .....</i>	<i>141</i>

<i>IV. RESUME EN FRANCAIS DE L'ARTICLE : "INTERACTION BETWEEN ZINC AND FRESHWATER AND MARINE DIATOM SPECIES : SURFACE COMPLEXATION AND ZN ISOTOPE FRACTIONATION"</i> .....	151
<i>V. INTERACTION BETWEEN ZINC AND FRESHWATER AND MARINE DIATOM SPECIES : SURFACE COMPLEXATION AND ZN ISOTOPE FRACTIONATION</i> .....	153
<b>CHAP.6 - INTERACTIONS DES DIATOMEES AVEC LE PLOMB ET LE CADMIUM</b> .....	207
<i>I. INTRODUCTION</i> .....	208
<i>II. VERSION ABREGEE EN FRANCAIS DE "A SURFACE COMPLEXATION MODEL FOR CADMIUM AND LEAD ADSORPTION ONTO DIATOM SURFACE"</i> .....	208
<i>III. A SURFACE COMPLEXATION MODEL FOR CADMIUM AND LEAD ADSORPTION ONTO DIATOM SURFACE</i> .....	212
<b>CHAP. 7 - INTERACTIONS AVEC CERTAINS ANIONS ET CATIONS TRIVALENTS</b> .....	243
<i>I. INTRODUCTION</i> .....	244
<i>II. METHODE</i> .....	244
A. Adsorption des éléments .....	244
B. Analyses par ICP-MS .....	245
<i>III. RESULTATS D'ADSORPTION</i> .....	245
A. ADSORPTION DES METAUX HEXAVALENTS .....	245
B. ADSORPTION DU GALLIUM .....	245
<i>IV. MODELISATION ET DISCUSSION</i> .....	246
<b>CONCLUSION</b> .....	249
<i>I. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES INTERACTIONS METAUX- DIATOMEES</i> ...	250
A. Structure chimiques des parois de diatomées .....	250

B. Modélisation des titrages acido-basiques .....	251
C. Adsorption des métaux (Zn, Pb, Cd) .....	251
<i>II. APPORTS DE NOTRE ETUDE.....</i>	<i>253</i>
<i>III. APPLICATIONS AUX THEMATIQUES ENVIRONNEMENTALES.....</i>	<i>254</i>
A. Outil de biorémediation .....	254
B. Contrôle des systèmes naturels .....	256
<i>IV. PERSPECTIVES.....</i>	<i>258</i>
A. Caractérisation structurale .....	258
B. Résistance liée aux capacités d'adsorption .....	258
C. Incorporation à l'intérieur de la cellule .....	259
D. Adsorption des ions de l'électrolyte .....	259
E. Faibles concentrations en métaux .....	259
F. Caractérisation des exudats .....	259
G. Complexité des milieux naturels : métaux et ligands organiques .....	260
H. Rapport entre structure du biofilm et morphologie du frustule .....	260
I. Caractérisation isotopique .....	261
 <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	 <b>262</b>
 <b>TABLE DES FIGURES.....</b>	 <b>274</b>
 <b>TABLE DES TABLEAUX.....</b>	 <b>276</b>

---

# INTRODUCTION GENERALE

---

Les diatomées sont les algues unicellulaires qui constituent le groupe de phytoplanctons eucaryotes le plus important puisqu'elles produisent à elles seules 40% de l'activité photosynthétique marine totale. Responsables d'environ 20 à 25 % de la productivité primaire à l'échelle de la Terre (ARMBRUST et al., 2004; SCALA and BOWLER, 2001), leur contribution aux cycles globaux du carbone et du silicium est énorme. Leur diversité l'est tout autant puisqu'il s'agit du deuxième groupe d'organismes photosynthétiques du point de vue du nombre d'espèces, après les angiospermes. Leur représentativité est extrêmement large puisque ces organismes se retrouvent sous toutes les latitudes jusqu'aux pôles, et dans les eaux marines aussi bien que dans les eaux douces. L'ensemble de ces facteurs font des diatomées une composante majeure des hydrosystèmes. Elles représentent donc un élément clé pour de multiples thématiques géochimiques, environnementales, écotoxicologiques, ou encore économiques. Elles jouent en particulier un rôle primordial dans les cycles géochimiques du carbone, ou encore de la silice, constituant principal de leur test.

Depuis une dizaine d'années, la communauté géochimique a pris conscience de l'importance de la biomasse dans les milieux naturels. Leur présence en grandes quantités dans nombre de systèmes géochimiques, et leur rapport surface/volume extrêmement important, font que ces microorganismes sont capables de contrôler, au moins partiellement, la spéciation et le transfert des métaux dans les milieux naturels. Ce contrôle est lié à leur surface qui contient de multiples groupes fonctionnels capables d'interagir avec les protons et les ions métalliques du milieu extérieur par des processus d'adsorption/incorporation (YEE and FEIN, 2002). De la même manière, en raison de leur omniprésence dans les hydrosystèmes, les surfaces des diatomées sont à même de réguler la concentration des métaux dissous dans la majorité des eaux continentales et marines. De plus, étant situées à la base de très nombreuses chaînes alimentaires, elles conditionnent le transfert des polluants le long des réseaux trophiques.

Un des problèmes cruciaux des années qui viennent sera celui de l'eau. Dans un monde où la population mondiale aura augmentée de deux milliards d'individus, les questions de l'approvisionnement et de la répartition des ressources en eau potable deviendront des problèmes majeurs dont nombres de conflits actuels sont déjà les précurseurs. Aujourd'hui, déjà, les problèmes d'assèchement des nappes phréatiques, même dans les pays tempérés, soulèvent des inquiétudes au sujet de la disponibilité future de l'eau potable. Ainsi, les thématiques de qualité des eaux sont déjà une priorité pour beaucoup de gouvernements, et de

nombreuses campagnes de contrôles ont été mises en place. Les diatomées constituent de très bons candidats comme indicateur de la qualité des eaux, notamment grâce à leur sensibilité différente à la pollution selon les espèces (GOLD et al., 2002). Etant des organismes vivants, elles combinent de plus l'avantage de permettre une intégration dans le temps et dans l'espace des conditions du milieu, ce qu'il n'est pas possible d'obtenir avec des analyses chimiques ponctuelles. Elles ont aussi la capacité de rendre compte de la véritable toxicité des polluants notamment au point de vue de leur biodisponibilité. Enfin, étant donné leur zone de diffusion très large dans les écosystèmes aquatiques, elles sont déjà présentes naturellement dans la majorité des milieux concernés par ces contrôles.

Du fait de leurs propriétés d'incorporation des métaux, de nombreux microorganismes, bactéries et algues, sont utilisés comme agent de dépollution métallique. Leur succès en tant qu'agents de biorémédiation est principalement dû à leur faible coût de production, leur facilité d'obtention et leur capacité d'absorption, qui est bien souvent supérieure à celle des complexants synthétiques. Des études récentes ont comparé les capacités d'accumulation de différentes espèces afin de sélectionner les meilleurs candidats à la biorémédiation. Les diatomées arrivent au premier rang dans ce classement en raison d'un faible coût de production, d'une production de biomasse rapide, illustrée dans les milieux naturels par leur domination des blooms phytoplanctoniques grâce à leur faible taux de mortalité comparé aux autres algues à vitesse de croissance égale (HAMM et al., 2003), une capacité d'adsorption comparable à celle des autres espèces d'algues. Là encore, les diatomées pourraient avoir un rôle à jouer mais le nombre d'étude qui leur est consacré est très restreint.

La connaissance des propriétés physico-chimiques des interfaces eau/diatomées est indispensable à la compréhension et à la prévention d'un grand nombre de processus de premier intérêt tant du point de vue géochimique, qu'environnemental, écotoxicologique ou même économique. Malheureusement, les propriétés physico-chimiques des surfaces qui contrôlent les échanges entre les eaux naturelles et les diatomées sont encore très mal connues.

Le travail présenté dans le cadre de cette thèse s'inscrit dans la thématique de la

caractérisation des relations entre surfaces biologiques et métaux, particulièrement au niveau des interfaces de diatomées/solution en raison de leur importance majeure dans les écosystèmes aquatiques. La compréhension du rôle joué par ces organismes dans la spéciation métallique passe par une détermination précise des paramètres physico-chimiques et ce travail aura pour but, in fine, l'élaboration d'un modèle de complexation surfacique capable de prédire les propriétés des diatomées quant à l'adsorption des métaux. Dans cette optique, le plan choisi est d'abord la présentation des diatomées et de leurs implications dans les multiples thématiques de recherche actuelles (chapitre I), puis nous reviendrons sur les différentes démarches déjà utilisées pour la description des surfaces de microorganismes tels que les bactéries et d'autres espèces d'algues (chapitre II). Les méthodes analytiques et les protocoles utilisés au cours de cette thèse seront alors présentés (chapitre III). La partie suivante consiste en la caractérisation physico-chimique de la paroi cellulaire des diatomées, pressentie comme jouant un rôle majeur dans l'association avec les métaux (chapitre IV). Cette description des interfaces diatomées/eau sera ensuite utilisée comme base à la détermination des paramètres de complexation du zinc à la surface des diatomées ; complétée par la détermination de l'environnement chimique du zinc adsorbé à la surface et incorporé à l'intérieur des cellules par mesures XAFS (chapitre V). Pour mieux contraindre les paramètres d'adsorption des métaux, l'interaction du cadmium et du plomb sera étudiée (chapitre VI) ainsi que celles avec les anions (chapitre VII).

·

·

# CHAPITRE 1

# LA DIATOMÉE

·

Les diatomées, du grec *diatomos* (littéralement coupé en deux), doivent leur nom au test en silice qu'elles contiennent, le frustule, constitué de deux parties emboîtables à la manière d'une boîte et son couvercle. Ce sont ces structures siliceuses, très ordonnées, qui ont été à la base de la taxonomie et de l'identification des différentes espèces de diatomées.

Les premières observations de diatomées à l'aide de microscopes rudimentaires datent du début du XVIIIème siècle. En 1832, 144 espèces différentes sont déjà décrites dans les planches publiées par Ehrenberg. Cependant la question de leur nature, animale ou végétale, reste longtemps en suspend. Elles seront ainsi classées, dans les publications de Nitzsch, en 1817, parmi les espèces animales du fait de leur faculté à se mouvoir.

Au cours de la seconde moitié du XIXème siècle, les diatomées commenceront à être systématiquement répertoriées et le nombre d'espèces décrites ne cessera de croître suite à une forte contribution des missions océanographiques dans les mers froides. Différentes méthodes de classement sont alors établies. Par exemple, en 1882, Pfitzer tentera de les classer suivant le nombre de leurs chromatophores.

Ainsi au début du XXème siècle, plus de 1000 espèces sont déjà connues et classifiées pour les seuls environnements aquatiques de France. Des applications pratiques à leur étude commencent alors à voir le jour et au milieu des années 1920 les diatomées vont être utilisées comme outil stratigraphique. L'apparition de nouveaux moyens d'observations microscopiques comme le MEB, vont, à partir des années 60, relancer l'étude des structures des frustules des diatomées. Aujourd'hui au vu de l'importance des diatomées dans les écosystèmes mais aussi en raison des applications aux nanotechnologies, c'est leur ADN, relativement simple, qui est étudiée (ARMBRUST et al., 2004).

## I. CONSIDERATIONS BIOLOGIQUES ET ECOLOGIQUES

Les diatomées sont des organismes unicellulaires dont la taille varie de trois ordres de grandeur, entre 5 nm et 5 mm pour les espèces les plus grandes (SMETACEK, 2000).

A ce jour plus de 7000 espèces de diatomées réparties en 250 genres différents, ont été identifiées. Cependant, selon certaines estimations de biologistes, seule une infime partie d'entre elles ont été identifiées puisqu'il pourrait en exister au total une centaine de milliers d'espèces à la surface de la terre. Deux types principaux de diatomées existent, différenciés

par la forme de leur frustule : les diatomées centrales et les diatomées pennales.

Les diatomées centrales sont apparues sur terre il y a 150 millions d'années et sont restées pratiquement inchangées durant toute l'époque tout le tertiaire. Les diatomées pennales, quant à elles, sont apparues il y a respectivement 70 MA et 50 MA pour les espèces sans et avec raphé. Les premières espèces d'eau douce sont les formes pennales qui sont apparues à l'éocène. A l'inverse des diatomées centrales, les diatomées pennales ont évoluées et leur proportion a fortement augmenté à partir de la fin du miocène pour aujourd'hui surpasser en nombre les diatomées centrales. Actuellement, les diatomées centrales tendent à être majoritairement planctoniques alors que les diatomées pennales sont plus importantes parmi les espèces benthiques.

Puisque les diatomées du crétacé sont déjà constituées de nombreuses espèces différentes il a été postulé que les diatomées ne se sont réellement développées qu'à la fin du paléozoïque ou au début du mésozoïque et qu'elles ont longtemps existé sous forme de simples protoplasmes ou n'ont jamais été fossilisées à cette époque.

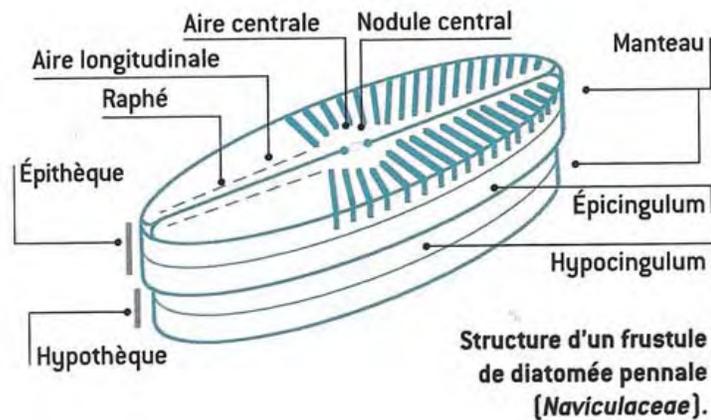
### A. Classification

Les diatomées sont des algues unicellulaires appartenant à l'embranchement des Chrysophycées. Cet embranchement se divise en trois classes principales: les algues brun-jaune, les algues vert-jaune et les diatomées (aussi appelées bacillariophycées).

Selon la forme de leur frustule, les diatomées se divisent en deux types : les centriques (ordre des *Biddulphiales*) caractérisées par un frustule de symétrie radiale le plus souvent en forme de disque ou de boîte de Pétri ; et les pennées (ordre des *Bacillariales*) de forme plus allongée et généralement de symétrie bilatérale.

Cependant, d'autres classifications des diatomées existent, par exemple, une classification en sept groupes a été proposée en fonction de la morphologie du frustule et de la présence ou non de raphé (fente réalisée au travers de la paroi d'une valve, voir figure 1) ou de pseudoraphé pour la diatomée (BURCKLE, 1998).

## B. Organisation de la cellule



**Figure 1: représentation du frustule d'une diatomée pennale**

Une des particularités des diatomées est la présence, tout autour du contenu cellulaire, d'une enveloppe siliceuse appelée frustule. Ce test a la forme d'une boîte composée de la « base » et de son « couvercle » (hypovalve et épivalve) reliés par des bandes intercalaires appelées ceintures connectives. La géométrie particulière du frustule est caractéristique de chaque espèce de diatomée et permet leur identification. Ce test siliceux est lui-même recouvert d'une fine pellicule organique, le mucilage, qui entre en jeu lors de la mobilité de la cellule et de son adhésion éventuelle à un substrat ou à d'autres cellules. Le frustule et la fine couche organique qui le recouvre constituent la paroi cellulaire de la diatomée (KROGER et al., 1994).

Comme tous les organismes eucaryotes, les diatomées possèdent un noyau contenu dans le protoplasme qui présente diverses formes. Les chromatophores entourent le noyau. En fonction des espèces, elles peuvent varier en nombre, taille, forme et position dans la cellule. Les pigments des chloroplastes, les chromatophores, confèrent aux diatomées un aspect brunâtre, ce sont les caroténoïdes (xanthophylle, fucoxanthine...) qui masquent la couleur des chlorophylles et permettent de classer les diatomées parmi les espèces d'algues brun-jaune. Cependant, des interrogations subsistent quant à l'activité photosynthétique des diatomées puisqu'il n'est pas encore clairement établi si les diatomées font de la photosynthèse en C3 ou C4 (JOHNSTON et al., 2001) alors que le phytoplancton est généralement considéré comme un organisme en C3.

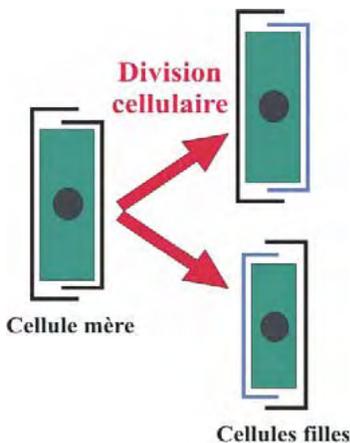
A certaines périodes de l'année, principalement en automne, les diatomées produisent une substance grasse stockée dans la cellule sous forme de globules et contenant des polyphosphates (DUKE and REIMANN, 1977). Bien que le rôle de ces globules ne soit pas

connu avec précision, il semblerait qu'il s'agisse d'une réserve de nutriments.

Mis à part leurs spécificités structurales (frustule, pigments spécifiques et peut-être quelques interrogations au niveau de la structure des chloroplastes), les diatomées ne présentent pas de différences importantes avec les autres classes d'algues unicellulaires eucaryotes. Dans tous les cas, le rapport moyen atomique des éléments organiques (C, N, P) contenus dans leur cellule (rapport de Redfield) est le même que pour le phytoplancton : il est de 106 C : 16 N : 1P. Cependant il a été montré que ce rapport peut varier légèrement en fonction de l'espèce de diatomée mais aussi selon les éléments nutritifs disponibles pour l'algue (SANUDO-WILHELMY et al., 2004).

### C. Mode de reproduction

La multiplication par bipartition, c'est-à-dire la division cellulaire, est la méthode la plus fréquemment employée par les diatomées pour se reproduire. Dans ce processus, chaque cellule fille reçoit une des deux thèques de la cellule mère comme épithèque propre et fabrique une nouvelle hypothèque. Il y a tout d'abord formation de l'hypocingulum (le cingulum est la paroi verticale entourant la valve, voir figure1) de chacune des deux nouvelles thèques. Suivent la division du noyau et du cytoplasme (partie de la cellule qui contient le noyau et divers organites), puis la formation de deux hypovalves qui sont ensuite silicifiées en 10 à 20 minutes après division. Lorsque les frustules sont achevés, les deux cellules se séparent (sauf dans le cas des espèces formant des colonies).



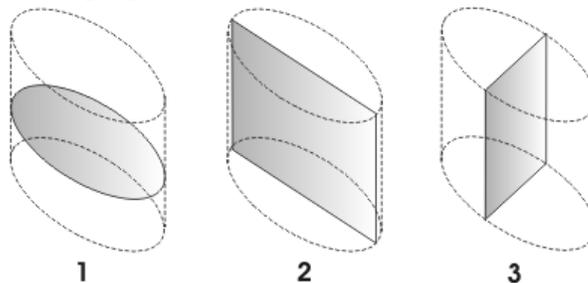
**Figure 2: Schéma de division cellulaire chez la diatomée. Une des deux cellules filles est plus petite que la cellule mère.**

Puisque, à chaque nouveau cycle de reproduction, une des deux nouvelles cellules filles reprend l'ancienne hypothèque (la thèque est une des deux parties du frustule,

l'hypothèque est la partie la plus petite) de la cellule mère comme épithèque propre, une des deux cellules filles est plus petite que la cellule mère. On assiste ainsi, au fur et à mesure qu'arrivent de nouvelles générations, à une diminution de la taille d'une partie de la population de diatomées. Lorsqu'elles atteignent une taille critique, deux cellules de diatomées entament alors un processus de reproduction sexuée qui permet de générer à nouveau des cellules de taille normale. Chez les diatomées centrales, les cellules se transforment en gamètes femelles et en gamètes mâles. Ces derniers, munis d'un flagelle, pénètrent dans les gamètes femelles. Chez les diatomées pennales, il y a adhésion de deux cellules. Chacune évolue ensuite en gamètes actifs (mâles sans flagelles) ou passifs (femelles). Il y a alors fusion entre gamètes de sexe opposé.

Le vésicule de dépôt de silice (SDV) est formé dans les deux protoplasmes nouvellement créés. Puis le SDV s'élargit et de la silice se dépose. Une fois la nouvelle thèque formée à l'intérieur du SDV, elle est expulsée par exocytose dans l'espace extracellulaire et les deux cellules filles se séparent, chacune avec une thèque (valve + bandes ceinturantes) de la cellule mère et une hypovalve nouvellement formée. La croissance se poursuit ensuite avec l'addition de nouvelles bandes ceinturantes au niveau de l'hypovalve nouvellement formé, ce mécanisme garantissant que la cellule puisse augmenter de volume sans provoquer de fissuration de la paroi cellulaire. Chaque bande ceinturante est produite séparément dans son propre SDV et est additionnée à l'hypovalve au niveau de la région de superposition des deux thèques (KROGER et SUMPER, 1998).

La symétrie des diatomées est souvent décrite par rapport à trois axes : l'axe apical, parallèle à la valve prise dans le sens de la longueur ; l'axe transapical, perpendiculaire à l'axe apical ; et l'axe peralvaire qui passe à l'intersection des deux valves (figure 3).



**Figure 3: Plans d'observation des diatomées: Plan valvaire (1), plan apical (2), plan transapical (3)**

#### D. Le frustule

La pluie continue de cellules mortes de diatomées sur le fond des océans résulte en

l'accumulation d'un dépôt siliceux, après dégradation de la matière organique. Les dépôts de silice de diatomées fossiles constituent une roche appelée diatomite utilisée aujourd'hui comme filtre dans les déodorants ou les agents décolorants ou comme abrasifs comme dans les dentifrices. Cependant, les applications les plus prometteuses des frustules sont liées à leurs mécanismes de formation dont le décryptage permettrait, dans le domaine des nanotechnologies, l'élaboration de structures siliceuses de formes définies (KROGER et al., 2002). C'est pourquoi beaucoup de travaux ont été consacrés à cette thématique depuis une quinzaine d'années.

Très tôt le frustule a été utilisé pour la classification des différentes espèces de diatomées puisque chaque espèce produit un test siliceux doté d'une architecture propre. De plus, le pourcentage massique de frustules par rapport à la cellule entière n'est pas le même dans les espèces marines et fluviales ni dans les espèces pennées et centrales (CONLEY and KILHAM, 1989). La forte correspondance entre architecture du frustule et espèce de diatomée a laissé penser que l'élaboration du frustule était déterminée génétiquement (KROGER et al., 1994 ; KROGER and SUMPER, 1998). Dans la cellule, c'est au niveau des vésicules de précipitation de silice que les frustules sont produits avec la silice qui est ajoutée par des vésicules de transport qui fusionnent avec la membrane appelée le silicalemma. Pendant longtemps les mécanismes de minéralisation dans les SDV sont l'objet de débats: contrôle par autopolycondensation de la silice à l'intérieur du silicalemma ou par interaction entre la matrice organique et le minéral (SWIFT and WHEELER, 1992)? En 1998, KROGER et SUMPER ont montré que la morphologie de la silice biogénique était déterminée au niveau des SDV avec une forte probabilité pour que des molécules organiques soient très intimement liées avec les tétraèdres  $\text{SiO}_4$  des frustules. Ce sont des glycoprotéines, identifiées chez la diatomée marine *Cylindrotheca fusiformis* et la diatomée d'eau douce *Navicula pelliculosa*, qui permettraient d'obtenir les contraintes moléculaires pour la polymérisation des parois en silice du frustule dans les vésicules de précipitation de silice. La silice ne se déposerait pas à l'emplacement occupé par les glycoprotéines ce qui conférerait à chaque espèce de diatomée une structure de frustule propre. Différentes molécules organiques, principalement des protéines, ont alors été mises en évidence lors de l'élaboration du frustule. Parmi elles, une classe de protéines polycationiques présentes dans la paroi cellulaire de la diatomée *Cylindrotheca fusiformis*, les silaffines, accélèrent la formation des structures siliceuses et

sont donc directement impliquées dans l'élaboration du frustule. Elles ont la capacité de précipiter des nanosphères de silice en milieu peu acide (KROGER et al., 1999) en facilitant l'agglomération et forme ainsi le patron pour la polycondensation de l'acide silicique (KROGER et al., 2002). En revanche, les frustulines (anioniques) qui sont les protéines les plus externes de la paroi cellulaire de *Cylindrotheca fusiformis* (KROGER et al., 1994) ne semblent pas être impliquées dans la formation du frustule (KROGER and WETHERBEE, 2000).

Il existe encore des débats sur le rôle réel du frustule, mais il semblerait que sa fonction première soit d'assurer une protection externe contre les prédateurs. En effet, de part son architecture, le frustule est extrêmement solide (HAMM et al., 2003) et les résultats de tests de résistivité indiquent qu'il agit comme une armure contre les prédateurs éventuels. Cela pourrait même suggérer que la grande variété de formes et tailles des diatomées est principalement due à une réponse aux prédateurs spécifiques.

### E. Répartition sur terre et rôle écologique

Trois nutriments sont considérés comme essentiels pour les diatomées : le phosphore, le nitrate et l'acide silicique. Ainsi, les zones d'upwelling dans les océans et près des côtes, qui permettent la constitution de « blooms » favorisent le développement préférentiel des diatomées qui, à l'inverse d'autres microorganismes comme les bactéries nécessitent de grandes quantités de nutriments pour se développer. On les trouve au niveau des côtes Sud-Ouest d'Afrique, à l'Ouest de l'Amérique du Sud ou encore en Californie. Dans ces zones, la production annuelle de carbone organique peut atteindre 200 à 400 g.m<sup>-2</sup> (pour comparaison le maïs a une production de 1000 à 2500 g.m<sup>-2</sup>). Bien que les autres zones marines soient moins productives, il n'en reste pas moins que les diatomées planctoniques marines produisent à elles seules 20 à 25% des 1,4.10<sup>14</sup> kg de biomasse sèche par an, soit la moitié de la production algale totale.

Les zones de répartition des diatomées, très étendues, comprennent pratiquement tous les domaines aquatiques (eaux douces, saumâtres et marines) (GOSSELIN et al., 1997). Certaines espèces ont même la capacité de se développer dans le sol et en milieu aérien sur les plantes et les roches humides. Leur localisation géographique est aussi très étendue puisqu'elles se retrouvent sous pratiquement toutes les latitudes, avec une prédilection pour les eaux froides. Enfin elles sont présentes dans toutes les gammes de qualité d'eau, depuis les sources non-polluées jusqu'aux milieux les plus dégradés.

Il existe deux grands types de diatomées: (1) les diatomées benthiques au niveau du littoral, attachées (sessiles) ou capable de mouvement au niveau du sol (vagiles) et (2) les diatomées planctoniques en suspension dans la colonne d'eau dans l'océan ou dans les rivières.

Selon le type d'espèce, les cellules de diatomées peuvent vivre de manière indépendante ou former des colonies appelées biofilms. Puisque la quasi-totalité de la vie marine est directement ou indirectement dépendante de la production primaire pour la nourriture, le rôle des diatomées dans les écosystèmes aquatiques, du fait de leur omniprésence, est primordial. De là découlent toutes les thématiques de bioaccumulation puisque ce sont les diatomées qui contrôlent les chaînes alimentaires. Les diatomées ont tendance à être plus abondantes au début du printemps, période à laquelle il y a davantage de nutriments disponibles (phosphate, nitrate, silicate) et l'intensité lumineuse augmente en même temps que la longueur du jour. Elles constituent alors des blooms. Un second pic de production, moins important, est généralement observé au début de l'automne.

Il a été rapporté un important mouvement vertical des diatomées entre le jour et la nuit. Les cellules sont plus légères la nuit que le jour en raison, notamment, d'une plus faible concentration en  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$ . Ce mouvement vertical dans les eaux de surface est sensé permettre une meilleure incorporation des nutriments. Leur capacité à ne pas couler au fond de l'eau est obtenue, pour certaines espèces, par la présence de fibres de chitines.

Certaines espèces, qualifiées de benthiques, vivent sur des supports comme des roches, des plantes ou encore au niveau des sédiments. Les diatomées benthiques sont la plupart du temps des diatomées pennales possédant un raphé qui leur permet de se mouvoir au sein du substrat. La production de ces diatomées est souvent plus faible que celle des diatomées planctoniques, de l'ordre de  $100 \text{ g.m}^{-2}$  de carbone, ce qui est dû en partie à la forte turbidité de l'eau au niveau des substrats et à l'instabilité de celui-ci au moment d'événements violents. Les diatomées dominent les blooms phytoplanctoniques car leur taux de mortalité, à vitesse de croissance égale, est plus faible que ceux d'autres algues (HAMM et al., 2003). Signalons de plus, que les diatomées sont capables de constituer des spores de résistance lorsque les conditions extérieures sont défavorables.

## II. MECANISMES D'ABSORPTION DES NUTRIMENTS

Bien que les diatomées soient des organismes photosynthétiques, elles doivent tout de même absorber les éléments qu'elles ne sont pas capables de synthétiser elles-mêmes (comme les sels minéraux ou les métaux essentiels).

La membrane plasmique des microorganismes est une structure dont le rôle principal est d'empêcher le libre passage des substances vers l'intérieur de la cellule afin de protéger les organites d'une exposition à des éléments nocifs. Il existe cependant des zones par lesquelles les éléments essentiels à la cellule peuvent pénétrer à l'intérieur de celle-ci. La connaissance des processus et des structures biologiques impliqués dans la pénétration intracellulaire d'éléments essentiels peut amener à une meilleure compréhension des interactions entre les surfaces des diatomées et les métaux. C'est la raison pour laquelle cette partie est consacrée à une description très générale des mécanismes d'absorption chez les microorganismes. Ils sont en général divisés en deux grandes parties : les processus passifs qui ne nécessitent pas d'activité métabolique de la part de la cellule et les processus actifs.

### A. Diffusion passive

Quelques substances, comme H<sub>2</sub>O, O<sub>2</sub> ou certaines molécules lipophiles (WANG and GUO, 2000), peuvent traverser la membrane plasmique par diffusion passive suivant un gradient de concentration, des concentrations élevées (extérieur de la cellule) vers les concentrations plus faibles (intérieur de la cellule). La diffusion passive ne fonctionne bien que si la différence de concentration est importante.

Le même type de transport peut se produire avec la contribution de protéines de transport présentes au niveau de la membrane plasmique sans toutefois qu'il y ait consommation d'énergie par ce processus. On parle alors de transport facilité. Chaque transporteur (protéine) est sélectif et ne permet le passage que de molécules apparentées (souvent des sucres et des acides aminés dans le cas des cellules eucaryotes).

### B. Transport actif

Dans les situations où le gradient est très faible, voire défavorable au passage

d'éléments nutritifs vers l'intérieur de la cellule, d'autres mécanismes doivent être mis en place. Puisqu'ils nécessitent une utilisation d'énergie ces mécanismes de transport sont qualifiés d'actifs. C'est très souvent le cas pour les métaux qui sont la plupart du temps incorporés à l'intérieur de la cellule par ces processus.

Les protéines de transport sont en règle générale sélectives quand aux molécules ou éléments qu'elles transportent. TIEN, 2004 a noté une corrélation entre l'absorption de P, Ca, Mn et Pb pour plusieurs espèces de diatomées ce qui suggère des mécanismes d'absorption non-compétitifs ou un stockage commun à l'intérieur de la cellule pour ces éléments. Malgré tout cette spécificité n'est pas totale, notamment pour les transporteurs métalliques et plusieurs types de compétition entre métaux pour un même type de récepteur ont été mis en évidence. Il existe par exemple une compétition entre  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , et  $Mn^{2+}$ , métaux très proches du point de vue chimique, pour les transporteurs à zinc et manganèse (SUNDA and HUNTSMAN, 1998a). De même pour Pb et Ca chez l'algue *Chlorella vulgaris* (SLAVEYKOVA and WILKINSON, 2002).

D'un point de vue plus général, les sites fonctionnels des protéines de transport constituent seulement un pourcentage très faible de la totalité des groupes fonctionnels présents au niveau de la paroi cellulaire (SLAVEYKOVA and WILKINSON, 2002).

### III. MECANISMES DE DETOXIFICATION METALLIQUE

Exposées à des concentrations élevées en métaux, les plantes et en particulier les phytoplanctons, utilisent des mécanismes de détoxification. Les stratégies développées ont toutes pour but de maintenir un niveau de concentration intracellulaire bas en éléments toxiques. Un des mécanismes les plus répandus est l'extrusion active des substances toxiques une fois qu'elles ont pénétré la cellule. Un second mécanisme consiste en la production par la cellule de ligands qui pourront complexer les métaux dans la cellule (phytochélatines et métallothionéines), à la surface de celle-ci ou encore en dehors, au niveau de la solution. Un troisième mécanisme est la conversion de l'ion en une espèce moins toxique impliquant des réactions d'oxydation (HE and TEBO, 1998) ou de réduction. Parfois des stratégies de séquestration des métaux sont utilisées (MEJARE and BULOW, 2001; FOLSOM et al., 1986).

L'analyse de la réponse des microorganismes à un stress métallique par la production de ligands intracellulaire est un moyen d'étude répandu des interactions entre métaux toxiques et diatomées, et de ce fait sont intéressants pour notre étude. Dans cette partie seront présentés les deux grandes classes de molécules fabriquées par les cellules lors d'un stress métallique : les phytochélatines et les métallothionéines.

### A. Phytochélatines

Ce sont les molécules impliquées dans la plus grande partie des mécanismes de détoxification métalliques pour les végétaux. Les phytochélatines sont des polypeptides synthétisés à partir de molécules de glutathione (GSH) de formule  $(\gamma\text{-glu-cys})\text{-gly}$  (le  $\gamma$  indiquant la liaison entre le groupe carboxyle du glutamate et le groupe aminé de la cystéine). Elles ont pour formule générale:  $(\gamma\text{-glu-cys})_n\text{-gly}$  avec  $n$  allant de 2 à 11. Les phytochélatines sont toujours présentes en faible quantité dans la cellule même sans stimulation particulière (AHNER et al., 1995). A la différence des métallothionéines, elles sont catalysées in situ par une enzyme appelée la phytochélatine synthase. Celle-ci devient active en présence d'ions métalliques, particulièrement le cadmium qui induit la plus forte réponse (AHNER et al., 1995) mais aussi l'Ag, Bi, Pb, Zn, Cu et Au (COBBET, 2000). Une molécule de glutathione est alors clivée au niveau de la glycine et associée à une autre glutathione, puis cette action est répétée jusqu'à obtenir le nombre de répétitions du motif voulu. Dans le cas d'une exposition au cadmium la réponse de la cellule peut-être très rapide puisque la phytochélatine est produite après seulement quelques minutes d'exposition (COBBET, 2000).

Une ou plusieurs (dans le cas d'oligopeptides avec  $n=2$  ou 3) molécules de phytochélatines peuvent être impliqués dans la complexation d'un atome de métal. Ce sont les groupes sulfhydryles présents au niveau des cystéines qui complexent les métaux suivant un rapport soufre/métal compris entre 2 et 4.

En 1995, (AHNER et al., 1995) ont pu isoler et mesurer des concentrations de phytochélatines dans huit espèces d'algues phytoplanctoniques (dont deux diatomées *Thalassiosira weissflogii* et *Thalassiosira oceanica*) exposées à diverses teneurs de cadmium.

Cette étude a permis de montrer que la concentration en phytochélatines est proportionnelle à la concentration en cadmium dans le milieu nutritif. Plus généralement, la concentration de phytochélatines permet de quantifier le niveau de stress métallique sur les cellules.

## B. Métallothionéines

Les métallothionéines sont des protéines de faible poids moléculaire (6-7 kDa), riches en cystéine, que l'on retrouve dans les cellules animales, les végétaux supérieurs, les microorganismes eucaryotes et quelques procaryotes. A la différence des phytochélatines résultant d'une activité enzymatique, ces protéines sont synthétisées par codage des gènes de la cellule. Les métallothionéines se divisent en trois classes en fonction de l'agencement et de la quantité de cystéine qu'elles possèdent. Leur production est induite par plusieurs facteurs comme les hormones, les agents cytotoxiques ou encore une exposition aux métaux (Cd, Zn, Hg, Cu, Au, Ag, Co, Ni et Bi) (MEJARE and BULOW, 2001). Elles ont la capacité de s'associer aux ions métalliques par formation de clusters metal-thiolate. Plus de 50 séquences différentes de métallothionéines ont été mises en évidence dans différentes plantes.

## IV. UN ROLE CLEF POUR DE NOMBREUSES THEMATIQUES

Les diatomées sont un des groupes majeurs des phytoplanctons, tant en raison de leur nombre que leur diversité, puisqu'elles sont responsables à elles seules de près de 40% de l'activité photosynthétique marine totale soit 20 à 25% de la productivité primaire sur Terre (ARMBRUST et al., 2004; SCALA and BOWLER, 2001). Ces chiffres imposent les diatomées comme l'un des composants principaux des hydrosystèmes. De ce fait, elles sont impliquées dans de très nombreuses thématiques géochimiques, environnementales, écotoxicologiques, ou encore économiques. En particulier, la compréhension de l'adsorption des métaux par les cellules des diatomées est nécessaire à plusieurs thématiques de recherche majeures, qu'il s'agisse de la compréhension des cycles glaciaires ou de thématiques plus appliquées comme la qualité de l'eau. Ce sont ces implications que nous allons passer en revue succinctement dans cette partie.

### A. Pompe biologique

Etant donné la contribution majeure des diatomées à la productivité primaire, elles sont considérées comme responsables d'une grande partie de l'exportation de carbone vers

l'océan profond à la mort des organismes ; c'est ce qu'on appelle la pompe biologique de CO<sub>2</sub> (TREGUER et PONDAVEN, 2000; TREGUER, 2002). Plus précisément, il semblerait que ce sont essentiellement les diatomées géantes qui participent à cette exportation, en raison de leur taille et de la solide défense que leur confère leur frustule face à leurs prédateurs. Elles ont ainsi plus de chances de couler jusqu'au fond des océans et de contribuer à la disparition du CO<sub>2</sub>. Il semblerait que ce rôle de pompe biologique ait été déterminant lors des dernières glaciations (TOGGWEILER, 1999; TREGUER, 2002).

### B. Utilisation des diatomées comme indicateurs de paléo-environnement

Outre le fait que certaines espèces de diatomées soient spécifiques à des périodes géologiques précises, ce qui en fait de bons outils de datation, plusieurs études ont envisagé les diatomées comme possibles indicateurs de paléo-environnement à partir de la fin du crétacé (BURCKLE, 1998). On sait aujourd'hui que chaque espèce a ses préférences propres en matière d'environnement (pH de l'eau, température, salinité...). En supposant que ces préférences étaient les mêmes dans le passé, il doit être possible de reconstituer certains paramètres paléo-environnement (température, salinité , ...) en fonction des espèces présentes dans les assemblages fossilisés (DIXIT et al., 1992). Le même type d'étude peut être effectué en mesurant la taille des frustules de diatomées puisque celle-ci elle dépend de la disponibilité en nutriments pour la cellule.

D'un point de vue plus général, la teneur en opale des sédiments peut servir d'indicateur de paléo-productivité du fait du rôle que jouent les diatomées dans l'extraction du CO<sub>2</sub>. Il suffit pour cela de mesurer l'abondance de diatomées par gramme de sédiment ou encore d'estimer la diversité des espèces (BURCKLE, 1998).

### C. Indicateur de pollution

Face aux problèmes rencontrés actuellement dans l'approvisionnement en eau potable, le contrôle de la qualité des eaux et de la santé des écosystèmes est devenue une thématique très importante. A la différence des résultats fournis par des analyses physico-chimiques ponctuelles, les organismes aquatiques tels que les algues permettent une intégration dans le temps et dans l'espace des conditions du milieu dans lequel ils évoluent (OMAR, 2002). Ils

ont aussi la capacité de rendre compte de la véritable toxicité des polluants notamment au point de vue de leur biodisponibilité. Parmi les organismes aquatiques, les diatomées constituent de très bons indicateurs de la qualité des eaux grâce, notamment, à la sensibilité spécifique de chacune des espèces à la pollution (GOLD et al., 2002) mais aussi en raison de leur zone de diffusion très étendue dans les écosystèmes aquatiques. Leur cycle vital étant très court, leur temps de réponse à de brusques changements environnementaux est très rapide par comparaison avec les organismes supérieurs. De plus, de nombreuses espèces de diatomées sont dites benthiques, c'est à dire qu'elles constituent des colonies accrochées à des supports solides dans le fond des cours d'eau, et que les assemblages qu'elles forment sont en réalité composés de dizaines d'espèces différentes, chacune avec ses propres tolérances aux conditions du milieu environnant. Connaissant les préférences de chaque espèce et les proportions relatives de celles-ci dans un écosystème aquatique donné, il est possible de déterminer le niveau de pollution du milieu ou de détecter de brusques changements environnementaux (DIXIT et al., 1992). Ainsi plusieurs protocoles d'analyses existent pour détecter dans les eaux, à l'aide des populations de diatomées, des changements du pH, des pollutions organiques, de l'eutrophisation ou encore des pollutions en métaux.

De ce fait, parallèlement aux mesures physico-chimiques, plusieurs indices biologiques ont été développés pour la surveillance des cours d'eau. Par exemple, l'Indice Biologique Diatomées (IBD) reprend les propriétés d'indicateur de pollution de ces organismes et les applique au suivi de la qualité de cours d'eaux français comme la Seine. Ces techniques sont aussi utilisées pour la surveillance de nombre de rivières polluées comme à Taiwan (TIEN, 2004).

#### D. Agent de biorémediation

Il est bien connu qu'un grand nombre de plantes, de microorganismes et d'animaux (Baudrimont et al., 2005) ont la capacité d'accumuler divers éléments chimiques tels que les métaux lourds. Ainsi, le phytoplancton contient en moyenne 300 ppm de Zn, 900 ppm de Fe, 60 ppm de Cu et 3 ppm de Cd (SAVENKO, 1988), des concentrations bien supérieures à celles présentes dans les eaux naturelles.

Plusieurs études ont signalé, vers la fin des années quatre-vingt, l'utilisation de ces propriétés de la biomasse comme outil de préconcentration préalablement à l'analyse des

éléments traces trop dilués pour la résolution des appareils d'analyse de l'époque (MAHAN et al., 1989). Cette utilisation deviendra de plus en plus marginale compte tenu de la mise en œuvre de nos jours d'appareils d'analyse de plus en plus sensibles.

L'application des propriétés accumulatrices des diatomées à des fins de dépollution est appelée biorémédiation ou phytorémédiation lorsqu'il s'agit de végétaux. Généralement, une distinction est faite entre l'adsorption des métaux à la surface des cellules par complexation passive - il s'agit du phénomène de biosorption - et le stockage des métaux à l'intérieur des cellules par l'intermédiaire de mécanismes métaboliques ou non, on parlera alors de bioaccumulation. Le choix de l'une ou l'autre technique est effectué en fonction de la concentration en métal dans les eaux. L'étude des mécanismes de biorémédiation de Cd par la diatomée *Phaeodactylum tricorutum* (TORRES et al., 1998) a montré que pour une concentration en cadmium allant jusqu'à 25 mg/L la majeure partie du métal extrait de la solution est stocké à l'intérieur de la cellule suivant une relation linéaire entre le taux de cadmium stocké dans la cellule et la teneur en cadmium de la solution. Par contre, au-delà de cette concentration, il semblerait que les cellules soient trop endommagées du point de vue métabolique pour pouvoir absorber activement le cadmium. La majorité du stockage du cadmium s'effectue alors par adsorption à la surface de la cellule.

La phytorémédiation par les algues peut se faire soit avec des cellules vivantes, soit avec des cellules mortes. La biomasse morte, qui n'agit que par des processus d'adsorption à sa surface, à l'avantage de pouvoir être régénérée après utilisation (par lavage dans des solutions acides par exemple) (ZHOU et al., 1998), mais elle ne permet pas d'utiliser les propriétés d'accumulation (nécessitant parfois une activité métabolique de l'organisme) à l'intérieur des cellules. Ainsi, la biomasse morte est le plus souvent utilisée lorsque les concentrations en métaux sont suffisamment élevées, voire létales pour les cellules.

Le choix de la biomasse comme agent de dépollution est lié à son faible coût de revient comparé aux autres techniques de précipitation ou de purification par passage dans des résines échanges d'ions, à sa forte capacité d'absorption (supérieure à celles des zéolites naturelles et des charbons activés) et sa haute spécificité vis à vis de certains métaux lourds, même en présence d'autre métaux alcalins ou alcalino-terreux (MATHEICKAL and YU, 1999). Comparées aux autres organismes, les algues présentent l'avantage d'utiliser la lumière comme source d'énergie grâce à leur activité photosynthétique. Certains auteurs divisent les plantes utilisées en biorémédiation en 3 groupes suivant les éléments qu'elles peuvent accumuler : (1) les accumulatrices de Cu/Co, (2) celles de Zn/Cd/Pb, et (3) celles de Ni (MEJARE and BULOW, 2001). Afin d'améliorer la capacité de phytoremédiation de certaines plantes, l'introduction de protéines et de peptides complexant les métaux est actuellement développée.

Les diatomées sont actuellement comme d'autres types d'algues, de sérieuses candidates pour la phytoremédiation (TIEN, 2004 ; CETINKAYA DONMEZ et al., 1999; PISTOCCHI et al., 2000). En règle générale, les critères de sélection des espèces sont d'une part une vitesse de croissance suffisamment rapide et, d'autre part, une forte capacité d'accumulation des métaux souvent corrélée avec la tolérance de l'organisme aux conditions élevées de pollution (OMAR, 2002). Par exemple, *Phaeodactylum tricornutum* est une diatomée très tolérante au cadmium ce qui en fait un bon candidat à la biorémédiation, surtout pour de faibles teneurs en métaux si elle est utilisée vivante (TORRES et al., 1998).

Pour les algues en général, de très nombreuses études comparatives ont été effectuées pour déterminer quels étaient les organismes les plus à même d'être utilisés comme agent de biorémédiation. Une des applications les plus courantes est la détoxification des effluents industriels (SCHIEWER and WONG, 2000). Dans cette étude, les propriétés d'accumulation de différentes espèces d'algues brunes (*Sargassum hemiphyllum*, *Colpomenia sinuosa* et *Petalonia fascia*) et verte (*Ulva fascia*) ont été comparées par estimation du nombre de sites disponibles. Il a alors été montré que pour la complexation du cuivre et du nickel, les capacités de biorémédiation des quatre algues se classent comme le nombre de sites disponibles: *Petalonia fascia* ~ *Sargassum hemiphyllum* > *Colpomenia sinuosa* > *Ulva fascia*. CETINKAYA DONMEZ et al.(1999), ont comparé au moyen d'isothermes de Langmuir et

de Freundlich les propriétés d'adsorption de Cu, Ni, et Cr(VI) par trois algues, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* et *Synechocystis sp.*. Les isothermes d'adsorption ont permis de déterminer les capacités maximales de chaque espèce du point de vue de la biorémediation. (OMAR, 2002) a testé l'absorption du zinc par deux algues vertes *Scenedesmus obliquus* et *Scenedesmus quadricauda* grâce à la détermination des paramètres de leurs isothermes d'adsorption de ce métal.

D'autres études ont été consacrées à l'influence des paramètres physico-chimiques du milieu extérieur sur la biorémediation. Outre le pH, un paramètre important de la biosorption est la force ionique de la solution, notamment pour le traitement des eaux usées qui contiennent en général beaucoup de sodium. Ce dernier s'associe par liaison électrostatique avec les groupes fonctionnels présents sur la biomasse (le plus souvent des groupes carboxyliques) ce qui engendre des phénomènes de compétition à la surface des cellules (FOLSOM et al., 1986).

En définitive, la connaissance de la structure des biosorbents est essentielle pour modéliser et prédire leur capacité en tant qu'agents de biorémediation pour les métaux lourds. L'identification et la caractérisation des propriétés des groupes fonctionnels (pKa et densité de sites) permet d'effectuer une première sélection des candidats potentiels pour des utilisations industrielles.

## E. Disponibilité des métaux dans les environnements

Du fait de leurs capacités accumulatrices, les microorganismes jouent un rôle important pour la mobilité (complexation, transport) des métaux dans les environnements naturels. En comparant différentes fractions de sol (bactéries, champignons et minéraux), LEDIN et al., 1999, ont montré qu'à eux seuls les microorganismes accumulaient plus de 38% des métaux présents (Zn et Hg) alors qu'ils ne représentent qu'une fraction de 0.4 à 1.7 % de la masse totale de sol tandis que le quartz et les feldspaths (80 % de la masse totale) en renaient moins de 10%.

YEE and FEIN (2002) ont mis en évidence le rôle important des bactéries pour le

transport du cadmium dans des colonnes contenant du quartz. Selon les propriétés du milieu (pH, traitement subi par le quartz, quartz modifié ou non), la présence de bactéries peut accélérer ou ralentir le transport de  $Cd^{2+}$ . Ce phénomène est dû principalement à des effets (1) de taille : le cadmium, petit, est piégé par les pores du quartz lors de son trajet ce qui le retarde ; ces pores ne sont pas visibles à l'échelle de la bactérie, elles ne sont donc pas retardées par piégeage dans ces pores et leur trajet est plus rapide ; et (2) de charge surfacique qui permet aux bactéries de charge globalement négative de complexer  $Cd^{2+}$ , elles jouent ainsi le rôle de transporteur de cadmium dans la colonne de quartz. Des simulations à l'aide de logiciels de modélisation ont été effectuées par Yee et Fein pour montrer l'impact de ce transport dans les milieux naturels, notamment en ce qui concerne la diffusion des polluants.

Les diatomées, comme beaucoup d'autres organismes unicellulaires qui ont colonisé un grand nombre de biotopes et possèdent une grande complexation, jouent un rôle fondamental lors du transport des métaux.

## V. CHOIX DES ESPECES ETUDIEES

Au cours de notre étude, quatre espèces de diatomées ont été principalement utilisées : *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira weissfloggi*, *Achnanidium minutissimum* et *Navicula minima*. Pour plus de clarté dans le texte, nous utiliserons les abréviations SC, TW, AMIN et NMIN respectivement. Pour notre étude, elles ont été sélectionnées principalement en raison des différences qu'elles présentaient les unes par rapport aux autres.

Tout d'abord leur structure est différente: AMIN et NMIN sont des diatomées pennées alors que les deux autres espèces sont des diatomées centriques. Leur taille n'est pas la même, avec les cellules de NMIN qui sont plus petites que celles des trois autres espèces. Cela suggère un rapport surface sur masse de cellules nettement plus élevé chez NMIN.

Ces espèces proviennent de trois milieux différents : marin (SC), estuarien (TW) et fluviatile (AMIN et NMIN). Elles n'ont par conséquent pas la même tolérance aux variations de force ionique comme cela a été suggéré chez les algues vertes estuariennes

(ROLLEMBERG et al., 1999). Elles n'ont pas non plus les mêmes besoins en éléments nutritifs ; par exemple il a été montré que des espèces marines avaient la possibilité de croître dans des milieux très pauvres en fer à l'inverse des autres diatomées (SUNDA and HUNTSMAN, 1995). Enfin, la teneur en silice des espèces fluviatiles (pourcentage massique) est plus élevée que celle des espèces marines (CONLEY and KILHAM, 1989) ce qui pourrait influencer les propriétés d'adsorption des métaux.

Les deux espèces fluviatiles, AMIN et NMIN, sont des espèces péryphytiques, c'est-à-dire que dans leur milieu naturel elles sont attachées à un support solide, alors que les deux autres espèces sont planctoniques et vivent en suspension dans la colonne d'eau. Cela est à même d'engendrer des différences dans la composition surfacique des deux types d'espèces, notamment avec la présence éventuelle de structures d'adhésion chez les espèces péryphytiques.

Enfin, parmi ces espèces, deux sont considérées comme résistantes à une pollution en métaux : AMIN et NMIN. Elles sont d'ailleurs utilisées comme indicateur de qualité des eaux (GOLD et al., 2002). En revanche SC est beaucoup plus sensible. Cette différence va permettre de comparer les propriétés d'adsorption des métaux avec le caractère tolérant ou non de la diatomée.

Ponctuellement, d'autres espèces ont été utilisées : *Melosira Varians* (MVAR) qui est une diatomée non-tolérante aux métaux et qui a été étudiée dans le cadre des expériences de spectroscopie XAFS ; *Odontella* qui est une diatomée marine géante de diamètre compris entre 200 et 300  $\mu\text{m}$  et NVRO, une espèce fluviatile géante de diamètre compris entre 50 et 100  $\mu\text{m}$ , qui ont été utilisées lors des essais d'adsorption du cadmium et du plomb à la surface des diatomées.

CHAPITRE 2  
LES INTERFACES BIOLOGIQUES

La compréhension des propriétés d'adsorption des diatomées passe obligatoirement par la connaissance des paramètres physico-chimiques de leur surface. Malheureusement, très peu d'études y sont consacrées. Plus généralement, quelques travaux ont été effectués sur les caractérisations des parois cellulaires de certaines algues, majoritairement des algues vertes et brunes. La très grande majorité des études impliquant des surfaces biologiques d'organismes unicellulaires concerne les bactéries. Beaucoup de ces travaux se sont attachés à déterminer la structure de leur paroi cellulaire, d'autres les processus d'adsorption d'éléments à leur surface. Bien que les bactéries ne puissent en aucun cas être considérées comme analogues aux diatomées (leur structure cellulaire et leurs caractéristiques biologiques sont différentes), notre étude s'est appuyée sur les travaux effectués sur ces organismes qui ont, eux aussi, une surface biologique, et ils ont été utilisés comme comparaison avec les résultats de notre étude.

Dans cette partie sont ainsi rassemblés un grand nombre de références dont la plupart ont trait aux bactéries (du fait du grand nombre d'études qui leurs sont consacrées), et dans une moindre mesure aux diatomées et autres espèces d'algues.

## I. REACTIVITE DES DIFFERENTS METAUX

Les premiers organismes se sont développés dans un océan anoxique il y a 2 milliards d'années. Leurs propriétés biologiques ont été conditionnées par l'environnement anoxique, probablement riche en H<sub>2</sub>S, qui existait à leur apparition et qui impliquait une spéciation des métaux très différente de celle qui prévaut aujourd'hui. La vie ayant évolué à partir de ces organismes primitifs, il apparaît que les besoins actuels en éléments chimiques des cellules sont directement hérités de ces conditions initiales, même si certains éléments sont devenus beaucoup plus rares aujourd'hui dans les milieux naturels.

De tous les éléments existants dans le tableau périodique de Mendeleïev (figure 4), seules deux douzaines d'entre eux sont nécessaires au développement structural ou métabolique dans la cellule. Il est classique en microbiologie, écotoxicologie et biogéochimie de classer les éléments selon leur caractère essentiel ou non (BEVERIDGE et al., 1997a).

H	II												XIII	XIV	XV	XVI	XVII	He
Li	Be												B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	Al	Si	P	S	Cl	Ar	
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr	
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe	
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn	
Fr	Ra	Ac																

**Figure 4 :Tableau périodique des éléments représentant les éléments toxiques (rouge) et essentiels (verts)**

#### A. Métaux essentiels

Les métaux essentiels sont ceux qui pourront être utilisés par la cellule pour remplir des fonctions biologiques. Il s'agit de : Na, K, Mg, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo et W. Selon les études, Cr peut aussi en faire partie.

Le potassium, le magnésium et le calcium sont présents à de fortes concentrations dans la cellule. Les autres métaux sont présents à des teneurs beaucoup plus faibles. Les éléments de transition et le zinc sont souvent complexés aux molécules organiques, en général des protéines, et peuvent être des catalyseurs enzymatiques pour des réactions redox ou d'hydrolyse, le transport et la conservation de petites molécules (comme par exemple le rôle du fer contenu dans l'hémoglobine vis-à-vis de l'oxygène). Les alcalins et alcalino-terreux (par exemple  $Mg^{2+}$ ) sont eux aussi impliqués dans des processus de catalyse enzymatique, ils ont des fonctions structurelles, de neutralisation de charge, et de contrôle de pression osmotique. Na et K sont particulièrement impliqués dans ces deux derniers rôles du fait de leur abondance et de leur faible complexation avec les ligands de la cellule.

Les besoins en éléments varient selon les espèces. Par exemple, les diatomées marines ont des besoins moins importants en Fe que les autres espèces de diatomées (STRZEPEK and HARRISON, 2004).

## B. Métaux toxiques

Les principaux métaux toxiques sont Ag, Cd, Sn, Au, Hg, Tl, Pb, Bi and Al et les métalloïdes As et Sb (WARREN and HAACK, 2001). Par exemple, Cd a pour effet de bloquer les phénomènes photosynthétiques par accumulation dans les chloroplastes. De plus sa présence peut inhiber l'activité d'enzymes comme la glutamine synthétase (DEVRIESE et al., 2001).

De nombreux métaux essentiels peuvent devenir toxiques à de fortes concentrations. C'est particulièrement le cas de Zn (OMAR, 2002) ou de Cu (NASSIRI et al. (1997); FOLSOM et al. (1986)). Ainsi, Cu ou Zn peuvent, à forte concentration (150  $\mu\text{M}$ ), bloquer l'adsorption du nitrate par les cellules d'algues (DEVRIESE et al., 2001). A l'inverse, certains métaux, traditionnellement considérés comme toxiques, peuvent être utilisés par la cellule en remplacement d'éléments essentiels indisponibles. Par exemple, le cadmium peut assurer en partie le rôle du zinc dans le fonctionnement d'une anhydrase carbonique existant chez les diatomées (LANE and MOREL, 2000).

La toxicité des métaux est dépendante de leur capacité à être adsorbée. Celle-ci dépend des propriétés des métaux et des surfaces biologiques ainsi que de celles du milieu environnant (par exemple, pH ou force ionique de la solution aqueuse), ainsi pour les cations elle est moindre à pH acide. La notion de disponibilité des métaux pour les cellules est définie par le terme biodisponibilité. Un cation est généralement plus disponible lorsqu'il est sous une forme libre que s'il est complexé par des ligands, bien que la tendance puisse s'inverser si le ligand est lipophile et est capable de traverser les parois des cellules. Ainsi la toxicité des métaux est souvent liée à leur spéciation en solution (SUNDA and HUNTSMAN, 1998c).

## II. COMPOSITION CHIMIQUE DES SURFACES BIOLOGIQUES

La cellule, constituée d'un cytoplasme contenant tous les électrolytes, est délimitée par la membrane plasmique. Celle-ci permet le passage des éléments nutritifs du milieu extérieur vers l'intérieur de la cellule. La membrane plasmique des organismes unicellulaires est

recouverte d'une paroi cellulaire qui permet de protéger la cellule ou au contraire d'attirer les éléments essentiels ; elle assure le plus souvent une certaine rigidité (c'est le cas du peptidoglycane chez les bactéries Gram positives, du test siliceux chez les diatomées ou du test en calcite chez les coccolithophoridés...) et elle contient presque toujours une partie organique constituée des trois grands types de molécules biologiques: protéines, polysaccharides et lipides. Les proportions relatives et la composition chimique de ces trois grandes structures peuvent varier selon les espèces.

La composition chimique et la structure de la paroi cellulaire est propre à chaque espèce, mais certains facteurs extérieurs (disponibilité des nutriments, pH) peuvent les modifier. Des changements structuraux dus à des conditions nutritives différentes ont été mis en évidence par Beveridge sur des bactéries. Plus récemment, BORROK et al. (2004b) ont montré que les bactéries *Pseudomonas fluorescens* et *Shewanella oneidensis* étaient de plus petite taille dans des milieux nutritifs pauvres.

Lors de l'étude des microorganismes, différentes distinctions sont faites selon l'état métabolique des cellules: cellule vivante métaboliquement active, cellule vivante non métaboliquement active, cellule morte et paroi cellulaire seule. La densité de sites surfaciques de la paroi cellulaire peut varier significativement en fonction du stade de croissance des organismes unicellulaires comme les bactéries, la phase exponentielle de croissance correspondant à une plus grande densité de sites que la phase stationnaire ou celle de formation de spores (Daughney et al., 2001 à voir).

Dans la suite nous décrirons plus en détail les surfaces chez trois groupes biologiques : les bactéries qui sont les organismes pour lesquels le plus grand nombre de travaux a été consacré et dont l'étude reprend beaucoup de méthodes d'analyses que nous avons utilisées; les algues, plus proches du point de vue biologique des diatomées ; et enfin les diatomées.

## A. Bactéries

Les bactéries sont des organismes unicellulaires procaryotes, c'est-à-dire qu'à l'intérieur du cytoplasme leur noyau n'est pas délimité par une membrane, à la différence de la majorité des algues ou des diatomées qui sont des cellules eucaryotes. La structure des bactéries est très simple, leur vitesse de croissance extrêmement rapide et leur rapport surface/volume parmi les plus élevés de tous les organismes, leur confère des capacités

d'adsorption importantes par unité de masse. Il existe en effet chez plusieurs espèces de bactéries de nombreuses dépressions et fibres organiques qui tendent à augmenter de manière très importante le rapport surface/volume (BEVERIDGE et al., 1997).

L'omniprésence, en quantités importantes, des bactéries dans les milieux naturels, qu'ils soient ou non aquatiques, explique le grand nombre de travaux qui leur sont consacrés. Les implications géochimiques qui en découlent sont le contrôle qu'elles peuvent exercer dans le transport et la spéciation des éléments métalliques dans certains écosystèmes naturels. Bien que les mécanismes de ce contrôle soient encore souvent mal compris et contraints, plusieurs études ont tenté d'inclure les bactéries dans des modèles de spéciation et de transports de polluants dans les milieux naturels (YEE and FEIN, 2002). Par exemple, la spéciation du mercure dans un système bactérie/métal dissous/gibbsite a été calculée par FEIN et al. (2001). Sous des conditions particulières (pH, concentration de bactéries et de gibbsite), environ 65% du mercure est complexé et donc transporté par les bactéries.

La plupart des bactéries comporte une paroi cellulaire à l'extérieur de la membrane plasmique qui confère à la cellule sa rigidité. Les bactéries se subdivisent en deux groupes principaux, les « Gram positives » et les « Gram négatives », différenciées selon la structure et la composition chimique de leur paroi cellulaire. La réaction de Gram élaborée par Christian Gram en 1884 est une technique de coloration sélective de la composition chimique des parois cellulaires ; soumises à ce test, les bactéries Gram positives se colorent en pourpre tandis que les bactéries Gram négatives se colorent en rose ou rouge. Cependant certaines espèces avec une structure de paroi cellulaire de bactérie Gram positives répondent négativement au test (*Bacillus brevis*) et inversement (BEVERIDGE and FERRIS, 1985). Une troisième catégorie de microorganisme procaryote, souvent hôtes d'environnements extrêmes, possède une structure et une chimie de la paroi cellulaire inhabituelle par rapport aux deux types de bactéries précédentes, ce sont les Archæobactéries. Nous ne décrivons pas les surfaces de ces organismes qui sont peu étudiées.

### **1. Bactéries Gram positives**

Les bactéries Gram positives ont une épaisseur de paroi cellulaire allant de 20 à 50 nm (BEVERIDGE and FERRIS, 1985) (WARREN and HAACK, 2001). Celle-ci est constituée d'environ 25 couches de polymères de peptidoglycane, d'une épaisseur d'environ 25 nm (KELLY et al., 2002), assemblées par « cross-linking » ce qui confère une certaine rigidité à

la bactérie. Ces chaînes de peptidoglycane sont constituées de 40 à 50 répétitions du dimère acide *N-acetylglucosamine* et de l'acide *N-acétylmuramique* et sont ainsi très riches en groupes carboxyliques. Plusieurs polymères secondaires ont la possibilité d'être intercalés dans la structure du peptidoglycane comme l'acide teichuronique et l'acide teichoïque qui peuvent représenter jusqu'à 50 à 60% de la masse totale de la paroi cellulaire (figure 5).

Chez les bactéries Gram positives, la proportion relative des divers constituants est variable d'une espèce à l'autre. VAN DER WAL et al. (1997) ont mesuré un pourcentage de peptidoglycane égal à 23-31 % du poids sec de la paroi cellulaire chez les bactéries coryneformes contre 5 % pour *Bacillus brevis*. A l'inverse, la proportion de protéines est de 7 % chez les bactéries coryneformes mais est supérieure à 56% chez *Bacillus brevis* (attribué à la présence d'une couche « S » sur cette bactérie, voir ci-dessous la caractérisation de cette structure). Les analyses des bactéries par spectroscopie des photoélectrons (XPS) permettent une bonne estimation des structures présentes à la surface des bactéries coryneformes et *Bacillus brevis* (levures) (dans les 2 à 5 nm d'épaisseur) (DENGIS et al., 1995).

La paroi cellulaire complexe des bactéries gram positives contient plusieurs groupes fonctionnels (DAUGHNEY et al., 1998): - les groupes carboxyliques, rencontrés principalement au niveau des peptidoglycanes mais aussi des acides teichuroniques et des protéines

- les fonctions phosphates de l'acide teichoïque

- les groupes aminés provenant des protéines

- les groupes hydroxyles situés sur les peptidoglycanes et les acides teichuroniques et teichoïques. De plus, l'organisation spatiale des surfaces de ces bactéries permet d'avoir un plus grand nombre de groupes carboxyliques sur la partie la plus externe de la surface (où les peptidoglycanes sont clivés) alors que les plus fortes charges négatives par unité de surface sont localisées dans la partie la plus interne de la paroi cellulaire (BEVERIDGE et al., 1997). Enfin, (DAUGHNEY et al., 1998) ont montré que, pour deux espèces de bactéries Gram positives (*Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis*), les groupements carboxyliques sont suffisamment éloignés les uns des autres pour qu'il n'y ait pas d'influence d'un site par rapport à un autre sur la déprotonation (autrement une seule valeur de pKa permet de décrire la stabilité des groupements carboxyliques). D'un point de vue

géométrique, ces sites ne sont pas distribués de manière homogène sur la surface de *Bacillus subtilis* mais semblent concentrés sur les extrémités de la cellule (SONNENFELD et al., 1985).

## 2. Bactéries Gram négatives

La paroi cellulaire des bactéries Gram négatives est plus complexe que celle des Gram positives (figure 5). Leur structure est composée de multiples couches: une faible épaisseur de peptidoglycane (sans polymères secondaires associés) intercalée entre une couche inférieure et supérieure à laquelle la couche de peptidoglycane est attachée par des lipoprotéines. La couche inférieure de la paroi cellulaire est constituée de phospholipides (de la membrane cytoplasmique) et la couche supérieure essentiellement composée de lipopolysaccharides.

Les groupes fonctionnels que l'on rencontre à la surface des bactéries Gram négatives sont de deux types :

- les groupes phosphoryles (de la couche inférieure)
- les groupes carboxyliques des lipopolysaccharides. Bien que le peptidoglycane des bactéries Gram négatives puisse interagir fortement avec les métaux, il est masqué au milieu extérieur par la membrane externe. Par conséquent, ce sont les lipopolysaccharides de la membrane extérieure qui gouvernent l'essentiel de la physico-chimie des surfaces des bactéries Gram négatives. Les propriétés acido-basiques de la paroi cellulaire sont ainsi dominées par les groupes phosphoryles présents dans la structure des lipopolysaccharides et dans une moindre mesure par les groupes carboxyliques.

## 3. Polymères extracellulaires et couches S

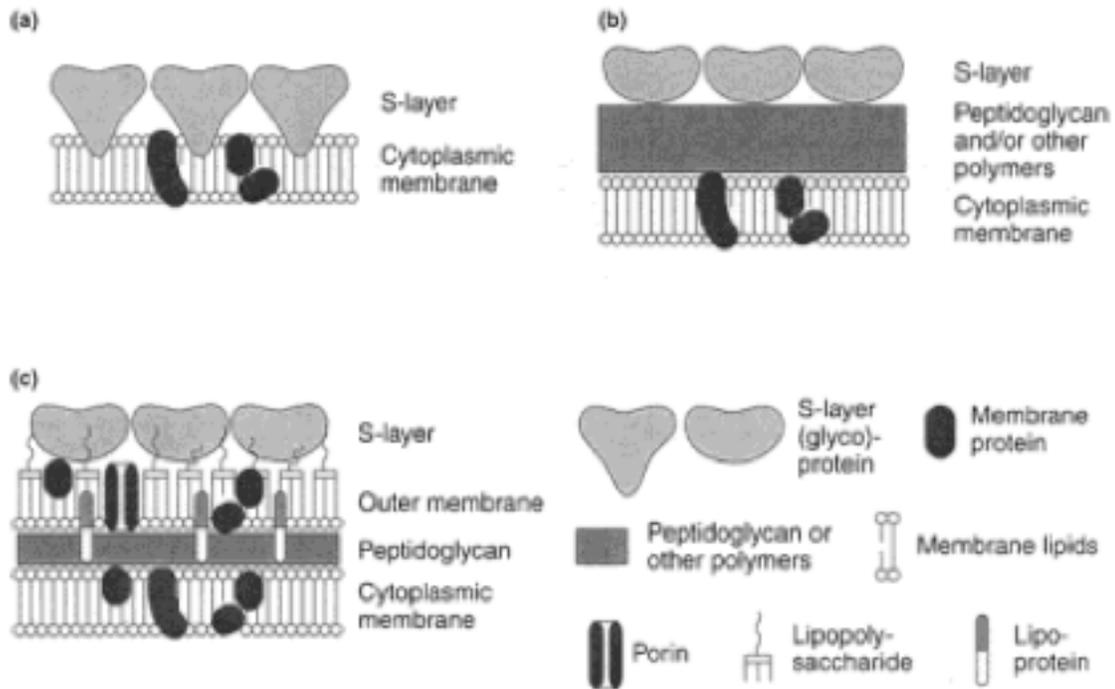
D'autres types structuraux, les polymères extracellulaires, capsules et slime, et les couches S, peuvent recouvrir les surfaces des bactéries. Il s'agit de matrices fortement hydratées (environ 95% d'eau) qui sont associées ou qui recouvrent les surfaces des bactéries Gram positives et Gram négatives. Bien qu'elles puissent être composées de substances polymérisées différentes de la paroi cellulaire, elles possèdent les mêmes types de groupes fonctionnels (BEVERIDGE et al., 1997).

Leur rôle est de protéger les bactéries des changements des paramètres

environnementaux, comme le pH ou la température, et de contribuer à l'adhésion de la cellule aux autres bactéries ou sur les surfaces. Il a été aussi reconnu que certains métaux toxiques peuvent induire la formation de telles structures, ce qui correspondrait à un mécanisme de défense de la part des bactéries. Ainsi, le métal se retrouverait complexé au niveau des couches S et serait ensuite relargué en solution sans effet toxique sur la cellule. A l'inverse, ce type de structures peut disparaître si les bactéries sont cultivées dans des milieux nutritifs riches (en laboratoire par exemple) (BEVERIDGE et FERRIS, 1985).

Les capsules ou polysaccharides extracellulaires sont des polymères hydrophobes composés de sucres et de protéines (HELM and NAUMANN, 1995). Elles sont en général intimement associées aux parois cellulaires et peuvent atteindre une épaisseur de 3 µm autour de la cellule (BEVERIDGE et FERRIS, 1985). Les couches de slime ont la même composition chimique que les capsules sans être directement attachées à la paroi cellulaire, elles sont libérées dans le milieu extérieur. Grâce à leur structure très fortement hydratée, les capsules et les slimes ont pour rôle d'éviter la pénétration de molécules hydrophobes à l'intérieur de la cellule. En outre, ces propriétés anioniques leur permettent de fonctionner comme des résines échangeuses d'ions (avec comme effet l'extension de la charge négative de la bactérie au-delà de la paroi cellulaire). Ces structures constituent un site privilégié pour le piégeage des métaux. Ce sont aussi elles qui sont impliquées dans les phénomènes d'adhésion sur les surfaces inorganiques ou d'interactions entre cellules pour former des colonies.

Les couches S sont des structures très intimement liées à la surface externe des bactéries. Elles sont composées d'une ou plusieurs couches paracristallines de protéines ou de glycoprotéines de formes carrée, tétragonale ou hexagonale leur permettant de jouer un rôle de « tamis » contrôlant à la fois les passages d'éléments vers l'intérieur mais aussi vers l'extérieur (BEVERIDGE et FERRIS, 1985). De part leur configuration spatiale les couches S présentent le plus souvent au milieu extérieur une surface plus hydrophobe que la bactérie sous-jacente, ce qui permettrait de réguler la diffusion de grandes molécules hydrophobes. En revanche, du fait de cette hydrophobicité, on observe rarement dans les milieux naturels d'interactions entre les couches S et les métaux (BEVERIDGE et al., 1997). Une autre fonction des couches S serait de protéger les bactéries d'agents dangereux comme certaines enzymes qui dégradent les peptidoglycanes (les muramidases) ou encore des bactériophages.



**Figure 5: Structure schématique de la paroi cellulaire de Archea (a), de bactérie Gram positive (b) et de bactérie Gram négative (c) d'après WARREN et HAACK, 2001)**

## B. Algues

Les parois cellulaires des algues sont constituées en grande partie de polysaccharides, comme la cellulose, dont certains d'entre eux contiennent des groupes carboxyliques et sulfates (SCHIEWER et WONG, 2000) capables de complexer les métaux. Les surfaces de deux types d'algues ont été plus particulièrement étudiées : celles des algues brunes et celles des algues vertes.

Un des constituants principaux de la paroi cellulaire chez l'algue brune est un polysaccharide appelé alginate (qui peut représenter jusqu'à 45% du poids sec total de l'algue chez *Sargassum fluitans* (FOUREST et VOLESKY, 1996)). Il est composé d'acides guluroniques et mannuroniques et comporte de nombreux groupes carboxyliques.

Les algues brunes présentent aussi une quantité importante (de 5 à 20%) de fucoïdane, polysaccharide contenant des résidus de L-fucose associés à des groupes sulfates en C4 (soit au total 40% d'ester de sulfates).

Les protéines constituent moins de 30% de la paroi cellulaire (jusqu'à 10 % pour *Sargassum*) et présentent des groupes carboxyliques (au niveau des acides aspartiques et glutamiques) et des groupes aminés (au niveau de la lysine et de l'arginine). Des polyphénols ont déjà été mis en évidence au niveau de certaines vésicules (FOUREST et VOLESKY, 1996). Compte tenu de l'importance relative des différents groupes fonctionnels présents au niveau de la paroi cellulaire, les sites responsables du contrôle de la charge surfacique et de la complexation des métaux chez les algues brunes sont les groupes carboxyles des alginates alors que les groupes carboxyliques et aminés des protéines et les sulfates présentent une moindre importance.

Les algues vertes présentent elles aussi des groupes carboxyliques et sulfates au niveau des divers hétéropolysaccharides de leur paroi cellulaire. Par exemple chez l'algue verte *Ulva*, les polysaccharides qui représentent 12% du poids sec total de la cellule sont constitués de 16% de sulfate et de 15 à 19% d'acide uronique. Les protéines constituent 10 à 70% de la paroi cellulaire (15 à 25% pour *Ulva*), présentant aussi des groupes carboxyliques (dus à la présence des acides aspartiques et glutamiques (KIEFER et al., 1997)) et des groupes aminés (dus à la présence de la lysine et de l'arginine).

La présence de carboxyles, des groupes hydroxyles et aminés a aussi été décelée chez une espèce d'algue marine (*Pilayella littoralis*) à l'aide de mesures RMN du proton et du  $^{113}\text{Cd}$  associées à des analyses en spectroscopie infrarouge FT-IR (CARRILHO et al., 2002).

### C. Diatomées

Peu d'informations sont disponibles sur la nature et la proportion des groupes fonctionnels des surfaces des diatomées. La plupart des études ont été consacrées à la détermination des structures moléculaires existantes. Nous avons essayé, dans un tableau récapitulatif, de faire le lien entre les molécules mises en évidence sur diverses espèces de diatomées et les groupes fonctionnels qu'elles présentent (tableau 1).

La paroi cellulaire des diatomées est composée d'un frustule, test en silice protégeant entièrement ou partiellement la cellule, qui est recouvert d'une couche de matière organique. On a longtemps supposé que le rôle de ce revêtement organique était une protection contre la dissolution de la silice (DUKE et REIMANN, 1977). Comme dans les autres types d'algues, les parois cellulaires des diatomées contiennent des polysaccharides (qui, d'un point de vue

général, peuvent présenter des fonctions carboxyliques et aminées), des protéines (qui présentent aussi des fonctions carboxyliques et aminées) et des lipides.

Très tôt, plusieurs études ont suggéré que les molécules spécifiques de la surface des diatomées, comme les dérivés de la proline (NAKAJIMA et VOLCANI, 1969), pouvaient jouer un rôle lors de la biogenèse du frustule. HECKY et al. (1973) ont proposé que les groupes hydroxyles de la sérine liés aux silicates puissent entraîner la polymérisation de l'acide silicique. Plus récemment, il a été montré que certaines molécules organiques sont si intimement liées à la structure du frustule qu'elles ne sont pas dégradées lors d'un traitement très fortement oxydant de l'ensemble de la cellule, ce qui suggère que ces molécules puissent jouer un rôle lors de la synthèse du frustule (KROGER et WETHERBEE, 2000; SCALA and BOWLER, 2001). Ces études ont permis d'identifier diverses molécules présentes à la surface des diatomées avec, à ce jour, trois grandes classes de molécules potentiellement impliquées dans la formation du frustule : 1) KROGER et al. (1994) ont mis en évidence, sur les diatomées marine *Cylindrotheca fusiformis* et la diatomée d'eau douce *Navicula pelliculosa*, une famille de glycoprotéine extractibles par EDTA possédant des domaines riches en cystéine (contenant donc des groupes sulfhydriles) connectés entre eux par des domaines riches en polyproline. Cette glycoprotéine, appelée frustuline, semble être associée à la biogenèse du frustule et a été identifiée chez *Navicula pelliculosa*, *Nitzschia alba*, *Nitzschia angularis* et *Phaeodactylum tricornutum* (KROGER et SUMPER, 1998). 2) Une autre famille de protéine de la surface des diatomées, les pleuralines ont été isolées par extraction à l'acide fluorhydrique (KROGER et WETHERBEE, 2000). Ces molécules contiennent des séquences avec une grande quantité de proline (> 65%) au niveau de la terminaison N, associée à des domaines contenant de la proline (22%), de la sérine (11%) (groupes hydroxyles), de la cystéine (11%) (avec R-SH), de l'aspartate (9%) (avec R-COOH). 3) D'autres molécules ont été isolées, comme les silaffines qui sont responsables de la précipitation de silice aboutissant à la formation du frustule.

D'une manière plus générale, la nature précise de l'association entre les molécules organiques de la paroi cellulaire et le frustule est encore très peu connue. HECKY et al. (1973) ont proposé un modèle selon lequel la silice est liée par liaison covalente aux acides aminés bien qu'aucune liaison Si-O-C n'ait jamais été mise en évidence par RMN de  $^{29}\text{Si}$  et qu'on n'ait jamais observé de liaisons hydrogènes entre la silice et la sérine.

Chez *Thalassiosira weissflogii* et *Phaeodactylum tricornutum* trois groupes de la paroi cellulaire contrôlent la charge surfacique : les groupes carboxyliques présents en position terminale des protéines, les  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> des protéines et des groupes aminés primaires portés par la chitine (GONZALEZ-DAVILA et al.; 2000). Deux sites surfaciques ont été identifiés chez *Cyclotella cryptica* : des groupes carboxyliques terminaux des protéines et des groupes  $\alpha$ -aminés présents dans certains acides aminés comme l'asparagine, l'alanine, la leucine ou des groupes hydroxyles de la tyrosine (KIEFER et al.; 1997). Des glycoprotéines ont été identifiées à la surface des diatomées. Chez *Cyclotella meneghiniana* elles contiennent de la serine et de la glycine en quantités importantes, associées à des molécules comportant du soufre et des protéines phosphorylées. Les analyses effectués sur des diatomées non traitées révèlent une quantité de protéines égale à environ 307  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  de poids sec et une quantité de polysaccharides de 63  $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$  de poids sec au niveau de la paroi cellulaire (SWIFT et WHEELER., 1992). La lysine est aussi un composant essentiel des parois cellulaires de diatomées (KROGER et al., 2002).

Plusieurs espèces de diatomées sécrètent une substance proche de la chitine, appelée chitane, (*Thalassiosira fluviatilis* et *Cyclotella cryptica*) principalement composée de glucosamine. Les filaments formés peuvent mesurer 60-80  $\mu\text{m}$  de long et 0.1-0.2  $\mu\text{m}$  d'épaisseur à leur base et permettraient aux cellules de rester en suspension dans la colonne d'eau. Des capsules de slime (comme les bactéries) majoritairement composées d'acide glucuronique peuvent aussi être produites. C'est le cas de *Navicula pelliculosa* (DUKE et REIMANN, 1977). Des diatomées côtières possèdent une queue composée de galactane polyxylose sulfatée associée à des fibrilles. Une production de protéoglycane extracellulaire a été rapportée pour la diatomée marine *Stauroneis decipiens* (LIND et al., 1997).

Comme pour beaucoup d'autres microorganismes, la composition chimique des cellules de diatomées et, a fortiori, celle de leurs parois cellulaires, dépend du milieu nutritif. Par exemple, la diatomée *Chaetoceros muellerii* synthétise davantage de lipides et moins de protéines, saccharides et chlorophylle lorsqu'elle est cultivée dans un milieu pauvre en composés azotés (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> et NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (GIORDANO et al., 2001).

structure	molécule importante	site fonctionnel associé	référence
-	proline	-	Nakajima et Volcani, (1969)
-	sérine	hydroxyles	Hecky et al. (1973)
frustuline	cystéine	sulfhydriles	Kroger et al.(1994) et Kroger et Sumper (1998)
pleuralines	cystéine	sulfhydriles	Kroger et Wetherbee (2000)
pleuralines	sérine	hydroxyles	Kroger et Wetherbee (2000)
pleuralines	aspartate	carboxyles	Kroger et Wetherbee (2000)
glycoprotéines	sérine	hydroxyles	Swift et Wheeler. (1991)
glycoprotéines	glycine	-	Swift et Wheeler. (1992)
-	lysine	-	Kroger et al. (2002)
capsules de slime	acide glucuronique	carboxyles	Duke et Reimann. (1977)
protéines	(groupes terminaux)	carboxyles	Gonzalez-Davila et al. (2000)
protéines	groupes $\alpha$ aminés	amines	Gonzalez-Davila et al. (2000)
chitine	amine primaire	amines	Gonzalez-Davila et al. (2000)
protéines	groupes $\alpha$ aminés	amines	Kiefer et al. (1997)
protéines	(groupes terminaux)	carboxyles	Kiefer et al. (1997)

**Tableau 1: Structures particulières et sites fonctionnels associés présents à la surface de diatomées.**

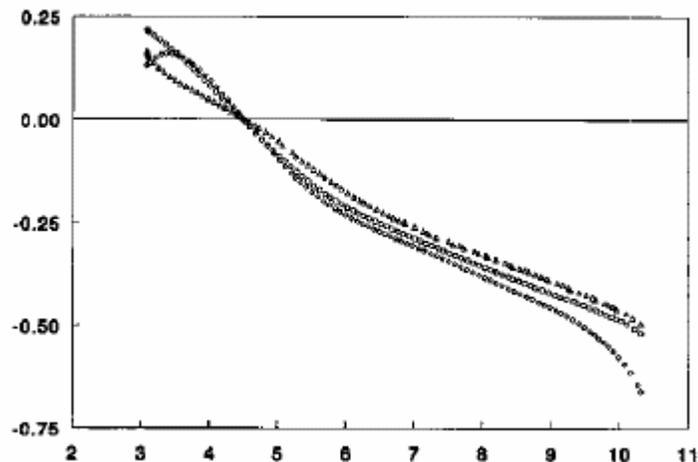
### III. PROPRIETES ACIDO-BASIQUES DES SURFACES BIOLOGIQUES

Les nombreux groupes fonctionnels présents sur les molécules constitutives de la paroi cellulaire contrôlent les propriétés acido-basiques des surfaces des microorganismes. Les constantes d'équilibre des réactions d'adsorption des protons ou des ions hydroxyles sur les groupes fonctionnels surfaciques, qui sont responsables du développement de la charge surfacique, peuvent être déterminés par des titrages acido-basiques. Un autre moyen d'accéder à la charge surfacique est la mesure des propriétés électrocinétiques des cellules.

Dans le cas des bactéries, la synthèse de plusieurs études donne un pH du point de charge nulle situé dans une zone assez large, autour de  $\text{pH}=5 \pm 2$ , dépendant principalement des espèces étudiées (figure 6). Par exemple, la charge surfacique des parois cellulaires isolées de la bactérie Gram positive *Rhodococcus erythropolis* A177, est positive aux  $\text{pH} < 4,5$  et négative au-delà de cette valeur (PLETTE et al., 1995). Le même comportement est

observé pour les spores des bactéries *Bacillus* (HE et TEBO, 1998). Lors de la comparaison des propriétés acido-basiques de la surface de deux bactéries Gram positives, *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis*, (DAUGHNEY et al., 1998) mettent en évidence le développement d'une charge négative dès  $\text{pH} \geq 3,5$ .

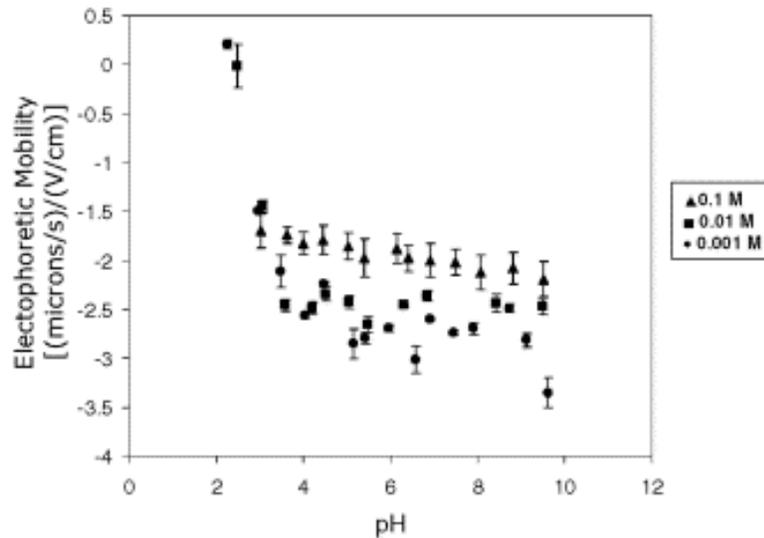
En général, les bactéries Gram négatives ont des constantes de protonation similaires à celles des bactéries Gram positives mais des densités de sites d'un ordre de grandeur inférieur. Ceci est dû au fait que, chez les bactéries Gram négatives, le peptidoglycane est recouvert d'une couche de lipopolysaccharides qui masque les sites carboxyliques et phosphoryles (MARTINEZ et FERRIS, 2001).



**Figure 6 : Charge (absolue) de la paroi cellulaire (fragments) de *Rhodococcus erythropolis*, en fonction du pH et à trois forces ioniques (PLETTE et al., 1995)**

La détermination des propriétés électrophorétiques de la surface de *Bacillus subtilis* (figure 7) montre que celle-ci n'est chargée positivement qu'aux pH inférieurs à 2,2 et qu'elle devient de plus en plus négative au fur et à mesure que le pH augmente (FEIN et al., 1997). Ceci est en accord avec les résultats des titrations acido-basiques qui indiquent la présence de charges négatives dans toute la gamme de pH étudiée (de 3.6 à 10.5). Cette tendance est générale pour les matériaux biologiques. Des mesures électrocinétiques réalisées sur *Bacillus subtilis* en fonction du pH (YEE et al., 2004) montrent que la surface des cellules est chargée négativement de pH 2.5 à 10. Le potentiel de surface étant constant dans la gamme de pH 4 à 10, ce que les auteurs justifient par l'existence de phénomènes de conduction ionique dans la couche hydrodynamique stagnante.

HARDEN and HARRIS (1953) ont montré que les propriétés électrocinétiques, en particulier le pH du point isoélectrique, ne sont pas directement corrélées au caractère Gram positif ou Gram négatif de la bactérie. Ceci implique que les propriétés électrocinétiques ne découlent pas directement de la structure chimique de la paroi cellulaire.



**Figure 7 : Mobilité électrophorétique de *Bacillus subtilis* en fonction du pH à 3 forces ioniques différentes (KNO<sub>3</sub>) (YEE et al., 2004)**

La charge surfacique n'est pas uniformément répartie sur toute la surface de la cellule. Des analyses par microscopie à force atomique AFM (microscopie à force atomique) effectuées sur *Shewanella putrefaciens* ont permis de mettre en évidence des hétérogénéités électrochimiques à la surface de ces bactéries (SOKOLOV et al., 2001). L'excès de charges négatives déterminé à la surface est expliqué par le fait que la structure de la paroi cellulaire des bactéries possède, sur ses couches les plus extérieures, des lipopolysaccharides qui jouent un rôle structural. Ces derniers contiennent les groupes carboxyles et phosphoryles responsables de la charge négative, d'où le fort contraste de charge observé à pH élevé. À l'inverse, les protéines, qui sont réparties sur toute l'épaisseur de la paroi cellulaire (couches extérieures mais aussi peptidoglycane), sont masquées par les groupes négatifs superficiels bien que les titrations acido-basiques témoignent de leur existence car les protons peuvent pénétrer sur toute l'épaisseur de la paroi cellulaire.

## IV. INTERACTIONS ENTRE LES METAUX ET LES SURFACES BIOLOGIQUES

Deux tableaux: 3 et 4, situés à la fin de ce chapitre rappellent les résultats de travaux antérieurs sur les interactions entre métaux et surfaces de bactéries, d'algues et de diatomées.

Il est en général admis que les métaux sont complexés sous leur forme libre par les surfaces des microorganismes (SLAVEYKOVA and WILKINSON, 2002). En revanche plusieurs travaux ont mis en évidence des exceptions à cette règle pour certaines espèces et certains éléments : MIRIMANOFF et WILKINSON (2000) ont montré que la bactérie gram positive *Rhodococcus opacus* produisait un ligand extracellulaire capable de réduire la concentration de  $Zn^{2+}$  libre dans le milieu, dans ce cas l'absorption du zinc par la cellule n'est pas directement corrélée à la concentration totale de Zn ou de  $Zn^{2+}$  en solution. ERRECALDE et al. (1998) ont mis en évidence l'absorption de complexes Cd-citrate et Zn-citrate à la surface de l'algue verte *Selenastrum capricornutum*. FOWLE et FEIN (1999) ont considéré l'adsorption des complexes hydroxylés ( $MOH^+$ ) pour modéliser l'adsorption du cuivre et du plomb sur des surfaces bactériennes. ROLLEMBERG et al. (1999) ont envisagé la possibilité d'adsorption de  $CdCl^+$  à la surface de *Chlorella marina*.

L'adsorption des métaux à la surface des microorganismes est un mécanisme abiotique gouverné par les propriétés physico-chimiques du métal et de la surface. En effet, une étude de la compétition entre  $Ca^{2+}$  et  $Cd^{2+}$  montre que l'adsorption de l'élément essentiel (le calcium) à la surface de deux espèces de bactéries n'est pas favorisée par rapport à l'élément toxique. Ceci est confirmé par le fait qu'il existe une relation linéaire entre les logarithmes des constantes de stabilité des complexes surfaciques formés par les métaux à la surface des microorganismes et leurs complexes aqueux qu'ils forment avec les ligands analogues (acétates, oxalate, citrate) (FEIN et al., 2001). Cette corrélation démontre, selon ces auteurs, le caractère non spécifique des interactions métaux/surface des bactéries.

## A. Bactéries

Plusieurs sites de la paroi cellulaire sont impliqués dans la complexation avec les métaux. Les groupes carboxyliques situés sur les acides glutamiques des peptidoglycanes ont été identifiés dès 1980 comme centres principaux de complexation des métaux pour la bactérie Gram positive *Bacillus subtilis* (BEVERIDGE and MURRAY, 1980). Les groupes phosphodiester des acides teichoïques interviennent aussi, mais dans une moindre mesure, dans les phénomènes d'adsorption métallique. En revanche, les sites aminés ne semblent pas participer à la complexation de la plupart des métaux (sauf partiellement dans le cas du cuivre). Récemment Kelly et al. (2002) ont montré que les ions uranyles ( $UO_2^{2+}$ ) formaient des complexes surfaciques avec les groupes phosphoryles à la surface de *Bacillus subtilis*.

Deux démarches principales ont été appliquées à la description des interactions métaux/bactéries. D'une part, la détermination des coefficients de partage des métaux dans des systèmes très spécifiques (en conditions de pH, de force ionique), par exemple suivant l'approche propre aux isothermes de Langmuir ou Freundlich, et d'autre part l'élaboration d'un modèle thermodynamique de complexation à la surface des bactéries.

Dans le cadre de l'utilisation d'un modèle de complexation surfacique, il est possible de prédire l'adsorption des métaux dans les systèmes complexes (multi métalliques et/ou multi surfaciques) à partir des constantes thermodynamiques élaborées pour des systèmes monométalliques avec un seul type de surface biologique (FOWLE and FEIN., 1999).

### **1. Similitudes dans les propriétés d'adsorption des bactéries**

Quelques groupes de travail ont tenté de dégager un comportement global lors des processus d'adsorption métallique.

Les pKa des différents groupes surfaciques des bactéries ont pu être déterminés à partir de titrages acido-basiques tandis que des expériences d'adsorption de métaux en fonction du pH permettent de déterminer les constantes de stabilité des complexes métalliques (Cd, Pb, Cu et Al) à la surface des cellules. Celles-ci ont pu être déterminées par l'utilisation d'un modèle thermodynamique décrivant la surface des bactéries (FEIN et al., 1997; FOWLE et FEIN, 2000 ; YEE et FEIN, 2001).

Selon la méthode utilisée pour modéliser les courbes de titrage acido-basique ou d'adsorption métallique, le nombre de sites et les valeurs des constantes thermodynamiques peuvent varier d'une étude à l'autre. De même deux espèces différentes de bactéries ne sont pas forcément similaires du point de vue de leurs propriétés d'adsorption des protons ou des métaux (DAUGHNEY et al., 1998) et présente par exemple des valeurs de pKa différentes (d'une valeur de pKa =3.72 pour les sites les plus acides de *Shewanella putrefaciens* et 5.2 pour *Bacillus Subtilis* (PLETTE et al., 1995 ; COX et al., 1999)).

En général les modèles de complexation surfacique permettent la détermination de trois (FEIN et al., 1997), quatre (MARTINEZ et al., 2002) ou cinq sites fonctionnels à la surface des bactéries(COX et al., 1999 ; SOKOLOV et al., 2001) (voir le tableau 2).

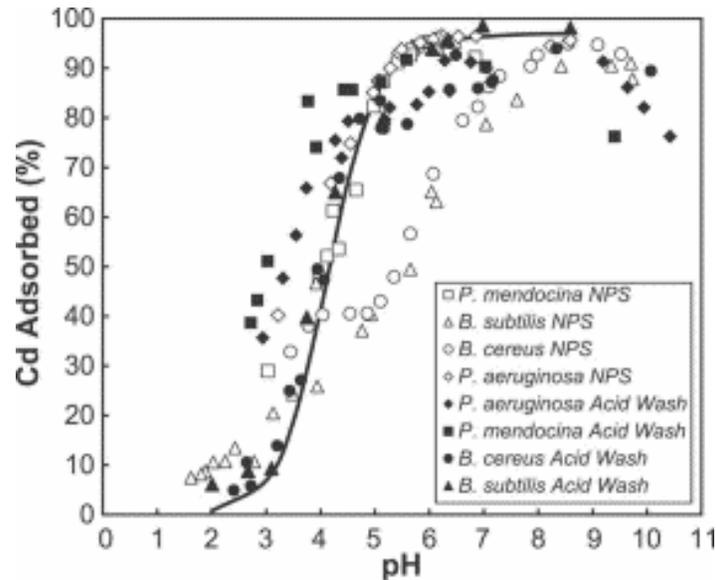
L'adsorption des métaux sur les surfaces est effectuée principalement au niveau des groupes carboxyliques et dans une moindre mesure au niveau des sites phosphatiques (vers les pH neutres) (PLETTE et al., 1996 ; YEE and FEIN, 2001). L'existence d'un troisième groupe phosphate plus acide et impliqué dans les processus d'adsorption métallique a été proposée (BOYANOV et al., 2003). En général, lorsque le rapport métal : cellules est élevé, seuls les groupes carboxyliques sont impliqués dans les phénomènes de complexation des métaux.

L'affinité des métaux pour les surfaces organiques suit en général l'ordre: Pb > Cu > Zn > Cd (PAGNANELLI et al., 2003). Cet ordre est le même que celui observé pour certaines surfaces inorganiques comme les oxydes de fer (STUMM et MORGAN, 1996).

Devant la multitude d'approches effectuées et la grande disparité des résultats obtenus, certains auteurs ont tenté de dégager un comportement général d'adsorption.

Des similitudes dans les propriétés surfaciques de deux bactéries ont tout d'abord pu être observées (DAUGHNEY et al., 1998). Des propriétés d'adsorption communes entre plusieurs espèces ont ensuite été mises en évidence pour l'adsorption de Pb, Cu et Zn (NGWENYA et al.; 2003; KULCZYCKI et al.; 2002). Des tentatives de rassembler les propriétés d'adsorption du cadmium de toutes les espèces de bactéries au sein d'un même modèle thermodynamique ont été effectués (YEE et FEIN, (2001); BORROK et al. (2004b)) notamment avec des consortiums de bactéries prélevées dans des milieux naturels. Un seuil d'adsorption commun à toutes les espèces investiguées a été mis en évidence (figure 8).

Cependant, peu de données existent quand à la description d'isothermes d'adsorption en fonction de la concentration en métal et il serait possible que les capacités maximales d'adsorption de chaque espèce de bactérie soient différentes.



**Figure 8: Adsorption du Cd pour diverses espèces de bactéries Gram positives et Gram négatives, non traitées (en blanc) et soumises à un lavage acide (en noir). Le trait plein est le seuil d'adsorption universel défini par YEE and FEIN (2001). (BORROK et al., 2004b).**

Les propriétés d'adsorption des bactéries provenant d'environnements naturels sont plus faibles que celles cultivées en laboratoire. Cela s'explique par la différence de structure qui existe entre des cellules se développant dans un milieu de culture riche et les cellules naturelles qui vivent dans des milieux moins favorables (BORROK et al., 2004b). A l'inverse, des organismes provenant de milieux pollués semblent capables d'adsorber des quantités inhabituellement élevées de métaux (BORROK et al., 2004c).

## 2. Prédiction des constantes de stabilité

Une corrélation existe entre les constantes de stabilité (log K) des complexes métal-carboxyle des bactéries (pour différents métaux) et les constantes de stabilité correspondantes en solution aqueuse avec des ligands comme par exemple les acétates, les oxalates ou les citrates (FEIN et al., 1997 ; FEIN et al., 2001 ; FOWLE et al., 2000). Ces corrélations

indiquent que les valeurs des constantes de complexation à la surface des bactéries peuvent être déduites de celles entre une bactérie et un métal si cette constante est déjà connue pour le même métal associé à un ligand organique ou une autre espèce de bactérie (figure 9).

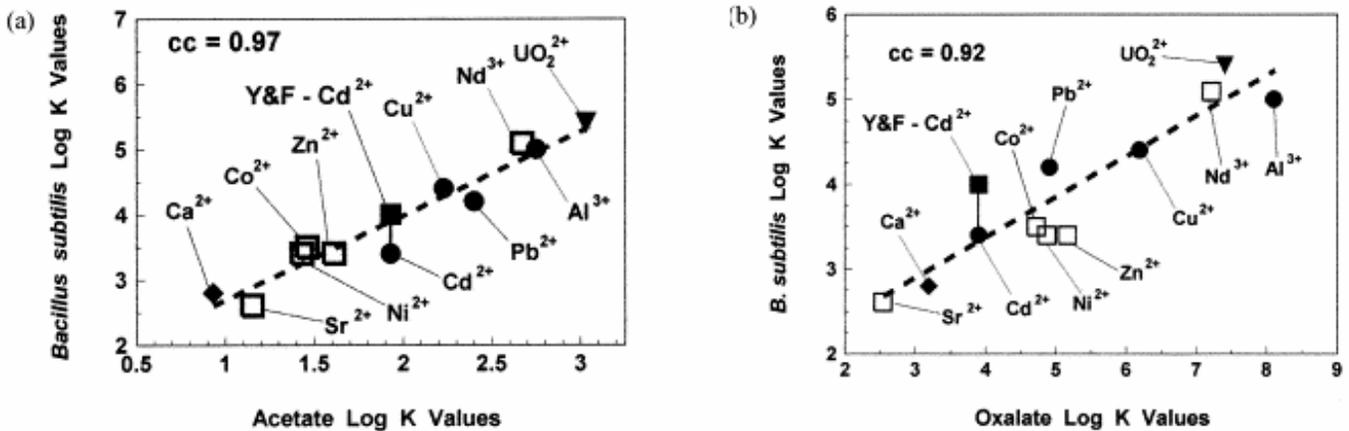


Figure 9 :Corrélation entre les log K des groupes carboxyliques de *Bacillus subtilis* et les log K du ligand acétate (a) et oxalate (b) (FEIN et al., 2001)

### 3. Modéliser les systèmes naturels

Une des principales applications d'un modèle de complexation surfacique est la prédiction de la spéciation des éléments chimiques, métaux ou polluants organiques, dans les systèmes naturels complexes.

Ce type d'étude a été réalisé par exemple avec des systèmes EDTA/*Bacillus subtilis* pour l'adsorption de Cd en fonction du pH (FEIN and DELEA, 1999) ou gibbsite/bactérie (FEIN et al., 2001). Par cette démarche YEE et FEIN, (2002) ont montré que la mobilité du cadmium dans des colonnes de quartz était influencée par la présence des bactéries.

### 4. Adsorption de molécules organiques

L'adsorption de molécules organiques sur des surfaces biologiques a été très peu étudiée bien que ce phénomène puisse se produire en considérant une adsorption d'un composé hydrophobe sur la paroi des bactéries (elles aussi hydrophobes).

Par exemple, l'EDTA (Ethylene Diamine Tetra acetic Acid) et le TCP (2,4,6-trichlorophénol) sous leur forme pleinement protonée s'adsorbent sur *Bacillus subtilis* par interactions hydrophobes avec les surfaces des cellules (FEIN et DELEA, 1999 ; DAUGHNEY et FEIN, 1998b). Lors de ce processus et aux conditions expérimentales l'EDTA est présent sous sa forme protonée de ses quatre groupes fonctionnels (leur conférant ainsi un caractère hydrophobe car non chargé).

## B. Algues

Les algues ont la capacité de complexer les métaux en quantités importantes, c'est pour cette raison qu'elles sont souvent utilisées comme agents de biorémediation. Il existe plusieurs analyses comparatives de sorption des métaux sur les algues (KLIMMEK et al., 2001 ; MANN and FYFE, 1984 ; HUNT and FITZGERALD, 1983). Cependant la plupart des études a été effectuée sur les algues brunes, qui ont des propriétés d'adsorption élevées.

Cette complexation métallique est principalement effectuée par deux groupes fonctionnels au niveau des polysaccharides de la paroi cellulaire: 1) les groupes carboxyliques des alginates, et 2) les groupes sulfates des fucoïdanes, (SCHIEWER and WONG, 2000).

Cependant la plupart des études insiste sur l'importance de l'alginate, et par conséquent des groupes carboxyliques, dans l'adsorption des métaux par les algues brunes (YUN et al., 2001). Ces groupes sont, notamment, les principaux responsables de la complexation du cadmium et du plomb (FOUREST et VOLESKY (1996)). La conformation spatiale de l'alginate semble, de plus, être un facteur important dans la sélection des métaux (DAVIS et al., 2003).

En revanche les algues vertes, et en particulier *Ulva fasciata*, ont une capacité d'adsorption en métaux inférieure aux algues brunes à cause de l'absence d'alginates dans leur paroi cellulaire (SCHIEWER and WONG, 2000).

Malgré la prépondérance des sites carboxyliques des alginates chez les algues brunes, plusieurs autres sites peuvent participer à la complexation avec les métaux selon les espèces.

- Des groupes sulfonates, peu abondants, ont été mis en évidence lors de l'adsorption

de  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  chez l'algue brune *Sargassum fluitans* (SCHIEWER and VOLESKY, 1995). Ces groupes sulfonates, plus acides et dix fois moins nombreux que les groupes carboxylique participent peu à la complexation des métaux (FOUREST et VOLESKY, 1996).

- L'histidine, peu nombreuse à la surface de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* a une très forte constante de complexation avec le cuivre (KIEFER et al., 1997)

- Des sites phosphatiques jouent un rôle lors de l'adsorption du plomb et du cadmium sur l'algue *Heterosigma akashiwo* (SEKI et al. (2000)).

Chez les algues, il semble que la température soit un facteur important lors de l'adsorption des métaux. Un changement de température de  $45^{\circ}\text{C}$  à  $5^{\circ}\text{C}$  abaisse le taux de Pb adsorbé de près de 28% chez *Dunaliella tertiolecta* (SANTANA-CASIANO et al., 1995).

Comme dans le cas des bactéries les paramètres d'adsorption définis sur des systèmes mono-métalliques sont extrapolables, la plupart du temps, aux systèmes multi-métalliques (SCHIEWER and VOLESKY, 1996). Cependant, ce n'est pas le cas pour tous les éléments : HUNT et FITZGERALD (1983) ont constaté une compétition dans l'adsorption de  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  sur des phytoplanctons marins collectés dans des milieux naturels.

### C. Diatomée

Dans le cas de l'adsorption des métaux, peu de travaux présentent une détermination des paramètres physico-chimiques qui décrivent les interactions entre métaux et surfaces de diatomées. Ainsi, cette partie s'attache davantage à présenter les processus de défense développés par les diatomées lors de leur exposition à des métaux ainsi que l'identification des sites surfaciques qui y sont impliqués.

Les diatomées mettent en place des mécanismes de détoxification lorsqu'elles sont exposées à une concentration élevée en métal. Tout d'abord, la cellule excrète un ligand à forte affinité, puis, un ligand de faible affinité est ensuite libéré passivement, correspondant certainement à des produits de lyse (c'est-à-dire dégradation) cellulaire (RIJSTENBIL et GERRINGA.; 2002). Des adaptations physiologiques à un stress en métal ont aussi été observées : une augmentation du nombre de sites de la paroi cellulaire, une augmentation de la taille de la cellule, une baisse de la vitesse de reproduction, la production de phytochélatines et de glutathione.

La production d'exudats chez les diatomées *Thalassiosira weissflogii* et *Phaeodactylum tricornutum* a été observée après 36 heures d'exposition au cuivre (GONZALEZ-DAVILA et al.; 2000). De même, PISTOCCHI et al. (2000) ont rapporté une production de polysaccharides chez les diatomées en présence des polluants Cu et Cd.

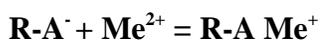
La plupart des interactions entre métaux et diatomées ont été étudiées sur des espèces marines en raison de leur possible impact sur les cycles globaux des éléments. Parmi ceux-ci le cuivre est sans doute celui qui a été le plus étudié. C'est aussi l'un des métaux les plus toxiques pour les algues unicellulaires ((NASSIRI et al., 1997).

Comme dans le cas plus général des algues, GONZALEZ-DAVILA et al. (2000) ont pu détecter la présence de deux sites (forts/peu concentrés et faibles/concentrés) lors de l'adsorption du cuivre sur des diatomées. KIEFER et al. (1997) ont identifié l'histidine comme étant complexant de Cu (avec une constante de complexation très élevée autour de  $11.9 \pm 0.2$ ) chez *Cyclotella cryptica* alors que d'autres études indiquent une complexation effectuée principalement par les groupes carboxyliques pour des concentrations en métaux plus élevées (CRIST et al., 1981; CRIST et al., 1988).

Comme dans le cas de nombreux microorganismes, l'adsorption de certains éléments n'est pas totalement sélective et des compétitions peuvent se produire. AHNER et al. (1997) ont montré qu'il existait une compétition entre l'adsorption du Cu et du Zn puisqu'en présence des deux métaux la réponse de la cellule (production de phytochélatines) est inférieure à la réponse obtenue pour la même quantité de Cu seul.

#### D. Stœchiométrie

Lors de l'utilisation des modèles de complexation surfacique, la plupart du temps les métaux lourds comme  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  ou  $Pb^{2+}$ , sont généralement supposés s'adsorber suivant une stœchiométrie 1 :1 comme celle présentée dans la réaction (DAUGHNEY et al., 1998 ; BORROK et al., 2004a ; PLETTE et al., 1996):



Ce coefficient stœchiométrique est confirmé par plusieurs observations: - Entre plusieurs stœchiométries testées lors de l'adsorption de Cd sur des bactéries Gram positives et Gram négatives, le rapport métal : ligand de 1:1 s'est révélé être le meilleur (YEE and

FEIN, 2001).

- Il permet de modéliser convenablement des courbes d'adsorption métallique pour différents rapports masse de bactérie/métal en utilisant les mêmes jeux de constantes thermodynamiques (DAUGHNEY et al., 1998). - Plusieurs bactéries présentent une surface négativement chargée qui augmente progressivement et devient positive en présence de métaux (COLLINS and STOTZKY, 1992). Ce phénomène implique un excès de charge positive et donc une stoechiométrie 1 :1.

- FEIN et al. (2001) a montré une corrélation entre les constantes d'association de plusieurs métaux avec différents acides organiques en solution. La meilleure correspondance est effectuée avec le ligand acétate (devant oxalate et citrate) ce qui suggère que les métaux se complexent aux groupes carboxyliques de la surface des bactéries suivant la même géométrie c'est-à-dire de manière monodentate.

- Enfin des analyses récentes par spectroscopie d'adsorption de métaux sur des cellules montre, la plupart du temps, la présence de complexes monodendates.

En revanche une stoechiométrie de 1:2 a été mise en évidence pour l'adsorption des métaux alcalino-terreux Ca, Sr et Ba sur *Bacillus subtilis* (YEE et al., 2004). Toutefois, cette stoechiométrie 1:2 n'a pas été retenue par SMALL et al. (1999) qui ont appliqué une stoechiométrie 1:1 pour l'adsorption de  $Sr^{2+}$  sur des bactéries Gram négatives.

De nombreux travaux antérieurs sur les algues ont consisté à décrire l'adsorption des métaux suivant un modèle d'échange ionique (CRIST et al., 1988 ; CRIST et al., 1990 ; CRIST et al., 1992 ; CRIST et al., 1994; SCHIEWER and VOLESKY, 1995 ; FOUREST and VOLESKY, 1996 ; SCHIEWER and WONG, 1999 ; CRIST et al., 1981). A cette fin, ces auteurs ont souvent utilisé une stoechiométrie a métal:ligand de 1:2. Cependant, ces modèles font l'approximation de considérer l'adsorption des contre-ions sous la même forme de complexes de sphère interne que des métaux comme le cadmium. Aux vues des multiples évidences d'une stoechiométrie 1 :1 présentée précédemment, il apparaît que cette approximation 1 :2 ne soit pas exacte.

Le tableau 2 présente les stoechiométries d'adsorption pour de multiples surfaces biologiques et métaux.

Surface	Métal	site	stœchiométrie (métal:ligand)	Référence
<b>Bactéries</b>				
<i>Bacillus subtilis</i>	Ba	1 site ND	1:2	(Yee et al., 2004)
<i>Bacillus subtilis</i>	Ca	carboxyl	2:5	(Beveridge and Murray, 1980)
<i>Bacillus subtilis</i>	Ca	carboxyl -phosphate	1:1	(Fowle and Fein, 1999)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Ca	carboxyl -phosphate	1:1	(Fowle and Fein, 1999)
<i>Bacillus subtilis</i>	Ca	1 site ND	1:2	(Yee et al., 2004)
<i>Bacillus subtilis</i>	Cd	carboxyl -phosphate	1:1	(Fein et al., 1997)
<i>Bacillus subtilis</i>	Cd	carboxyl -phosphate	1:1	(Fowle and Fein, 1999)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Cd	carboxyl -phosphate	1:1	(Daughmey et al., 1998)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Cd	carboxyl -phosphate	1:1	(Fowle and Fein, 1999)
Consortium bactéries Gram + et Gram-	Cd	carboxyl	1:1	(Yee and Fein, 2001)
Consortium de bactéries naturelles	Cd	4 sites ND	1:1	(Borrok et al., 2004a)
<i>Bacillus subtilis</i>	Co	carboxyl	1:1	(Fein et al., 2001)
<i>Bacillus subtilis</i>	Cu	carboxyl	1:2	(Beveridge and Murray, 1980)
<i>Bacillus subtilis</i>	Cu	carboxyl -phosphate	1:1	(Fowle and Fein, 1999)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Cu	carboxyl -phosphate	1:1	(Fowle and Fein, 1999)
<i>Bacillus subtilis</i>	FeIII	carboxyl	2:1	(Beveridge and Murray, 1980)
<i>Bacillus subtilis</i>	K	carboxyl	1:1	(Beveridge and Murray, 1980)
<i>Bacillus subtilis</i>	Mg	carboxyl	1:2	(Beveridge and Murray, 1980)
<i>Bacillus subtilis</i>	Na	carboxyl	1:1	(Beveridge and Murray, 1980)
<i>Bacillus subtilis</i>	Nd	carboxyl	1:1	(Fein et al., 2001)
<i>Bacillus subtilis</i>	Ni	carboxyl	1:1	(Fein et al., 2001)
<i>Bacillus subtilis</i>	Pb	carboxyl -phosphate	1:1	(Fein et al., 1997)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Pb	carboxyl -phosphate	1:1	(Daughmey et al., 1998)
<i>Bacillus subtilis</i>	Pb	carboxyl -phosphate	1:1	(Fowle and Fein, 1999)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Pb	carboxyl -phosphate	1:1	(Fowle and Fein, 1999)
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Sr	ND	1:1	(Small et al., 1999)
<i>Shewanella alga</i>	Sr	ND	1:1	(Small et al., 1999)
<i>Bacillus subtilis</i>	Sr	carboxyl	1:1	(Fein et al., 2001)
<i>Bacillus subtilis</i>	Sr	1 site ND	1:2	(Yee et al., 2004)
<i>Bacillus subtilis</i>	UO <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	carboxyl -phosphate (neutre)	1:1	(Fowle et al., 2000)
<i>Bacillus subtilis</i>	UO <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	carboxyl -phosphate (neutre)	1:1	(Kelly et al., 2002)
<i>Bacillus subtilis</i>	Zn	carboxyl	1:1	(Fein et al., 2001)
<b>Algues</b>				
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Cd	carboxyl	1:1	(Seki et al., 2000)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Cd	phosphate	1:1	(Seki et al., 2000)
<i>Ecklonia</i>	Cr <sup>3+</sup>	carboxyl	1:3	(Yun et al., 2001)
<i>Ecklonia</i>	CrOH <sup>2+</sup>	carboxyl	1:2	(Yun et al., 2001)
Plancton marin	Cu	ND	1:1	(Hunt and Fitzgerald, 1983)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Cu	carboxyl	1:1	(Xue et al. 1988)
Plancton marin	Mg	ND	1:1	(Hunt and Fitzgerald, 1983)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Pb	carboxyl	1:1	(Seki et al., 2000)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Pb	phosphate	1:1	(Seki et al., 2000)

Tableau 2 : Rapports métal : ligand pour diverses surfaces biologiques et métaux

### E. Influence de la concentration et la nature de l'électrolyte

Dans de nombreux cas la force ionique de la solution a un effet important sur l'adsorption des métaux à la surface des microorganismes (DAUGHNEY and FEIN, 1998a). L'effet engendré peut être une réaction de compétition causée par l'adsorption des ions de l'électrolyte sur les groupes de la paroi cellulaire ou des changements dans les propriétés électrostatiques de la surface avec, pour conséquence, un comportement d'adsorption différent. Dans certains cas il a même été montré que la présence de certains métaux divalents favorisait l'adsorption d'autres éléments. C'est le cas pour  $\text{Ca}^{2+}$  qui permet une meilleure adsorption de  $\text{Cd}^{2+}$  par modification de la structure de la paroi cellulaire des bactéries étudiées (PLETTE et al., 1996).

D'une manière générale, les parois cellulaires des bactéries Gram négatives sont moins sensibles à l'effet de la force ionique que les bactéries Gram positives lors des titrages acido-basiques (MARTINEZ et al., 2002).

Certaines espèces de microorganismes vivant dans des eaux à force ionique variable, comme dans le cas des estuaires, ont développés des mécanismes d'adaptation. Ils sont ainsi très peu sensibles aux changements de force ionique lors de l'adsorption métallique comme cela a été montré lors de l'adsorption du cadmium sur l'algue *Chlorella marina* (ROLLEMBERG et al., 1999).

### F. Cinétique d'adsorption et d'incorporation

L'absorption des métaux par les cellules des microorganismes est la plupart du temps décrite comme un processus comportant deux étapes (XUE et al., 1988; ROLLEMBERG et al., 1999; ROLLEMBERG et SIMOES GONCALVES, 2000 ; CETINKAYA DONMEZ et al., 1999):

1) La première étape est une complexation rapide sur les sites surfaciques. Celle-ci se produit en quelques minutes. Il s'agit d'une adsorption réversible qui peut donc être décrite à l'aide d'un modèle de complexation surfacique.

Pour les diatomées *Thalassiosira weissflogii* et *Phaeodactylum tricornutum*, GONZALEZ-DAVILA et al. (2000) ont mis en évidence une diminution rapide de la teneur

de  $\text{Cu}^{2+}$  en solution durant les 15 premières minutes d'exposition qui correspond au processus d'adsorption. Chez l'algue verte *Dunaliella tertiolecta* cette étape a lieu dans les 10 premières minutes qui suivent l'exposition au métal (SANTANA-CASIANO et al., 1995). Pour *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis*, l'adsorption de Cd est totale au bout de 30 à 45 minutes d'exposition (DAUGHNEY et al., 1998). Chez *Escherichia coli* l'équilibre est atteint en 4 heures (YEE and FEIN, 2001). En général, les vitesses d'adsorption et désorption des métaux sur les bactéries Gram négatives sont inférieures à celles sur les espèces Gram positives : la diffusion des métaux est plus lente dans les parois cellulaires des bactéries Gram négatives et le métal met plus de temps pour atteindre les sites fonctionnels des peptidoglycanes (YEE and FEIN, 2001). Ce sont des différences de structure de la paroi cellulaire qui expliquent les différentes vitesses d'adsorption des métaux par les microorganismes.

2) La seconde étape est la diffusion lente d'une partie des métaux complexés à la surface vers l'intérieur de la cellule. Ce mécanisme met plus de temps à être détecté bien que certains travaux spécifiques ont démontré l'existence de l'internalisation dans les premières 14 minutes d'exposition (SMIEJAN et al., 2003). Ce processus de diffusion au travers des membranes plasmiques suit en général une pente de concentration égale à la racine carrée du temps sauf pour les solutions faiblement concentrées en métal pour lesquelles l'adsorption suit un régime linéaire (SMIEJAN et al., 2003). Cette décroissance suivant la racine carré du temps a été montré pour l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* (XUE et al., 1988), pour les diatomées *Thalassiosira weissflogii* et *Phaeodactylum tricornutum* à partir de 15 minutes d'exposition (GONZALEZ-DAVILA et al., (2000).

Différentes études se sont particulièrement intéressées aux mécanismes qui régissent les flux d'internalisation (SLAVEYKOVA and WILKINSON, 2002; MIRIMANOFF and WILKINSON, 2000). Des transporteurs métalliques ont pu ainsi être mis en évidence lors de l'internalisation de Cd avec la bactérie *Rhodospirillum rubrum* (SMIEJAN et al., 2003) et l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (KOLA and WILKINSON, 2005).

Entre deux métaux différents, les vitesses d'adsorption sur les microorganismes peuvent être très éloignées. Par exemple, la macroalgue *Ulva lactuca L.* a une vitesse d'adsorption de Pd pouvant être jusqu'à 27 fois plus rapide que celle de Pt (COSDEN et al., 2003).

## V. PRODUCTION D'EXUDATS

Les algues, y compris les diatomées, ont tendance à relarguer de nombreux exudats solubles dans le milieu extérieur (SMIEJAN et al., 2003 ; MIRIMANOFF and WILKINSON, 2000). Ces exudats, souvent des polysaccharides (GRASSI and MINGAZZINI, 2001), assurent plusieurs fonctions :

- ils peuvent servir à rendre davantage disponible des éléments que l'on retrouve à très faible concentration en solution. C'est le cas des sidérophores qui complexent le fer en solution, augmentant ainsi considérablement son taux d'absorption par la cellule (BRAUN and BRAUN, 2002). Bien qu'on soupçonne que ces mécanismes soient courants, ils n'ont été mis en évidence que dans le cas des sidérophores. Récemment, des molybdophores ont été aussi mis en évidence (LIERMANN et al., 2005).

- Les exudats sont aussi impliqués dans les processus de détoxification et de protection en complexant les éléments toxiques afin de les rendre non-disponibles pour la cellule (GONZALEZ-DA VILA (1995);GONZALEZ-DA VILA et al. (2000)). Une étude menée sur des algues macroscopiques a montré que la nature des exudats libérés (VASCONCELOS and LEAL, 2001) variait en fonction de la nature du métal (dérivés de la cystéine-glutathione pour Cu, dérivés de la cystéine pour Pb, dérivés de la glutathione pour Cd).

Ces exudats ont des compositions chimiques très différentes en fonction des espèces et les propriétés de complexation métalliques qui leur sont associées sont elles aussi très hétérogènes. Même pour deux algues du genre *Chlorella*, les polysaccharides produits contiennent une proportion différente d'acide uroniques, avec pour conséquence des propriétés de complexation du cuivre distinctes (KAPLAN et al., 1988).

XUE et al. (1988) ont montrés que les exudats produits par l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (10 à 20 mg C.g<sup>-1</sup> en poids sec d'algue) avaient la possibilité de complexer Cu(II) et Cd(II). Cependant ses capacités de complexation sont inférieures d'au moins un ordre de grandeur à celles des cellules de *Chlamydomonas reinhardtii*. D'autres espèces d'algues comme *Dunaliella tertiolecta* produisent des exudats de très forte affinité pour les métaux, avec des constantes de complexation du même ordre de grandeur que celles des sites forts présents à la surface des algues (SANTANA-CASIANO et al., 1995). Chez l'algue verte *Selenastrum capricornutum*, les hydroxyles primaires des polysaccharides

▪

produits sont responsables de la complexation extra-cellulaire de Cd (GRASSI and MINGAZZINI, 2001). A l'inverse aucun complexe entre cadmium et exudats n'a été détecté chez *Chlorella marina* (ROLLEMBERG et al., 1999). Il existe bien, selon les espèces, une diversité importante dans l'affinité chimique des exudats pour les métaux.

Espèce	Modélisation	Groupes surfaciques	Densité sites	constantes acidité (log K <sub>a</sub> )	métaux (log K)	Référence
<i>Bacillus subtilis</i>	Donnan Potential et FOCUS pKa distribution method			pK <sub>a1</sub> = 3.59± 0.38 pK <sub>a2</sub> =4.33± 0.57 pK <sub>a3</sub> =5.94± 0.66 pK <sub>a4</sub> =8.64± 0.57		Martinez et al. (2002)
<i>Escherichia coli</i>	Donnan Potential et FOCUS pKa distribution method			pK <sub>a1</sub> = 3.73 ± 0.44 pK <sub>a2</sub> = 4. ± 0.71 pK <sub>a3</sub> = 6.56 ± 0.64 pK <sub>a4</sub> = 8.7 ± 0.62		Martinez et al. (2002)
<i>Klebsiella pneumonia</i>				pK <sub>a1</sub> = 4.7 pK <sub>a2</sub> = 7.8		Goncalves et al. (1987)
<i>Mircococcus lysodeikticus</i> (parois cellulaires)		Carboxylic groups Amino groups	Proportion 144 : 90			Carstensen & Marquis (1968)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> (parois cellulaire)	Donnan-type model	groupes carboxyliques (1) groupes phosphatiques (2) groupes amines (3)	(1)50.3.10 <sup>-5</sup> ±1.5mol/g <sub>humide</sub> (2)19.3.10 <sup>-5</sup> mol/g <sub>humide</sub> (3)23.5.10 <sup>-5</sup> ±0.7mol/g <sub>humide</sub>	pK <sub>a1</sub> = 4.62 0.02 pK <sub>a2</sub> =7.83± 0.13 pK <sub>a3</sub> =9.96± 0.08		Plette et al. (1995)
<i>Bacillus subtilis</i> (vivante)	LPM (Mathlab)	groupes carboxyliques (1) groupes phosphodiester (2) groupes phosphoriques (3) groupes amines (4) groupes hydroxyyles(5)	(1) 0.17 mmol/mg (2) 0.02 mmol/mg (3) 0.05 mmol/mg (4) 0.03 mmol/mg (5) 0.18 mmol/mg	pK <sub>a1</sub> = 5.2 pK <sub>a2</sub> =5.9 pK <sub>a3</sub> =6.8 pK <sub>a4</sub> =8.15 pK <sub>a5</sub> =9.6		Cox et al. (1999)
<i>Shewanella putrefaciens</i> (vivante)	LPM (Mathlab)	Groupe carboxylique	0.45 µmol/mg	pK <sub>int</sub> = 4.95		Sokolov et al. (2001)
<i>Bacillus subtilis</i> (phase exponentielle)	CCM : 8 F/m <sup>2</sup>	groupes carboxyliques (1) groupes phosphates (2) groupes hydroxyyles(3)		pK <sub>a1</sub> = 5.3 pK <sub>a2</sub> =7.2 pK <sub>a3</sub> =9.3		Daughney et al. (2001)
<i>Bacillus licheniformis</i>	CCM : 8 F/m <sup>2</sup>	groupes carboxyliques (1) groupes phosphates (2) groupes hydroxyyles(3)	(1) 6.7.10 <sup>-3</sup> mol/g <sub>humide</sub> (2) 9.7.10 <sup>-3</sup> mol/g <sub>humide</sub> (3) 5.4.10 <sup>-4</sup> mol/g <sub>humide</sub>	pK <sub>a1</sub> = 4.65 pK <sub>a2</sub> =6.2 pK <sub>a3</sub> =9.8		Daughney & Fein (1998)
<i>Bacillus subtilis</i> (phase stationnaire-métaboliquement inactive)	FITEQL 2.0 CCM : 8 F/m <sup>2</sup>	groupes carboxyliques (1) groupes phosphates (2) groupes hydroxyyles(3)	(1) 1.2.10 <sup>-4</sup> mol/g <sub>humide</sub> (2) 4.4.10 <sup>-3</sup> mol/g <sub>humide</sub> (3) 6.2.10 <sup>-5</sup> mol/g <sub>humide</sub>	pK <sub>a1</sub> = 4.8±0.14 pK <sub>a2</sub> =6.9±0.5 pK <sub>a3</sub> =9.4±0.6	Cd: pK <sub>1</sub> =3.4 pK <sub>2</sub> =5.4 Pb: pK <sub>1</sub> =4.2 pK <sub>2</sub> =5.6 Cu pK <sub>1</sub> =4.4 pK <sub>2</sub> =6.0 Al pK <sub>1</sub> =5.0	Fein et al. (1997)
Spores of marine <i>Bacillus sp. SG-1</i>			Densité de charge: 2.29 mmol/g <sub>sec</sub>			He & Tebo (1998)
<i>Bacillus subtilis</i>	FITEQL pas de paramètre électrostatique			pK <sub>a1</sub> = 3.2 pK <sub>a2</sub> =4.8 pK <sub>a3</sub> =6.8 pK <sub>a4</sub> =9.1	Cd: (lavage acide) log K <sub>2</sub> =4.22 log K <sub>3</sub> =5.51 (pas de lavage acide) log K <sub>2</sub> =3.43 log K <sub>3</sub> =4.59	Borrok et al. (2004b)
<i>Bacillus subtilis</i>	FITEQL pas de paramètre électrostatique			pK <sub>a1</sub> = 3.2 pK <sub>a2</sub> =4.8 pK <sub>a3</sub> =6.8 pK <sub>a4</sub> =9.1	Co: (lavage acide) log K <sub>2</sub> =3.75 log K <sub>3</sub> =4.20 (pas de lavage acide) log K <sub>2</sub> =3.14 log K <sub>3</sub> =3.91	Borrok et al. (2004b)

Tableau 3: Caractérisations des surfaces bactériennes

Espèce	Modélisation	Groupes surfaciques	Densité sites	constantes acidité (log K <sub>a</sub> )	métaux (log K)	Référence
<i>Bacillus subtilis</i>	FITEQL pas de paramètre électrostatique	groupes ? (1) groupes ? (2) groupes ? (3) groupes ?(4)		pK <sub>a1</sub> = 3,2 pK <sub>a2</sub> =4,8 pK <sub>a3</sub> =6,8 pK <sub>a4</sub> =9,1	Co: (lavage acide) log K <sub>2</sub> =3,75 log K <sub>3</sub> =4,20 (pas de lavage acide) log K <sub>2</sub> =3,14 log K <sub>3</sub> =3,91	Borrok et al. (2004b)
<i>Pseudomonas mendocina</i>	FITEQL pas de paramètre électrostatique	groupes ? (1) groupes ? (2) groupes ? (3) groupes ?(4)		pK <sub>a1</sub> = 3,4 pK <sub>a2</sub> =4,7 pK <sub>a3</sub> =6,5 pK <sub>a4</sub> =9,4	Cd: (lavage acide) log K <sub>2</sub> =4,42 log K <sub>3</sub> =5,41 (pas de lavage acide) log K <sub>2</sub> =3,76 log K <sub>3</sub> =4,46	Borrok et al. (2004b)
Bactéries de sol naturel non-contaminé	FITEQL pas de paramètre électrostatique	groupes ? (1) groupes ? (2) groupes ? (3) groupes ?(4)	(1)6,65.10 <sup>-5</sup> ±1,96mol/g <sub>humide</sub> (2)6,78.10 <sup>-5</sup> ±2,65mol/g <sub>humide</sub> (3)3,68.10 <sup>-5</sup> ±1,71mol/g <sub>humide</sub> (4)4,47.10 <sup>-5</sup> ±2,19mol/g <sub>humide</sub>	pK <sub>a1</sub> =3,12± 0,13 pK <sub>a2</sub> =4,70±0,11 pK <sub>a3</sub> =6,57±0,17 pK <sub>a4</sub> =8,99±0,21	Cd: pK <sub>1</sub> =2,83± 0,30 pK <sub>2</sub> =2,70±0,47 pK <sub>3</sub> =3,95±0,22 pK <sub>4</sub> =5,22±0,40	Borrok et al. (2004a)
Bactéries de sol naturel contaminé	FITEQL pas de paramètre électrostatique	groupes ? (1) groupes ? (2) groupes ? (3) groupes ?(4)	(1)8,48.10 <sup>-5</sup> ±1,96mol/g <sub>humide</sub> (2)9,37.10 <sup>-5</sup> ±2,32mol/g <sub>humide</sub> (3)7,04.10 <sup>-5</sup> ±1,25mol/g <sub>humide</sub> (4)6,71.10 <sup>-5</sup> ±1,48mol/g <sub>humide</sub>	pK <sub>a1</sub> =3,30± 0,17 pK <sub>a2</sub> =4,77±0,13 pK <sub>a3</sub> =6,60±0,13 pK <sub>a4</sub> =9,05±0,14	Cd: Site 1 protoné pK=6,05± 0,31 pK <sub>1</sub> =3,24± 0,32 pK <sub>2</sub> =3,33±0,37 pK <sub>3</sub> =4,37±0,48 pK <sub>4</sub> =5,76±0,56	Borrok et al. (2004a)
<i>Bacillus subtilis</i>	CCM : 8 F/m <sup>2</sup>	groupes carboxyliques (1) groupes phosphates (2) groupes hydroxyles(3)	(1)12.10 <sup>-5</sup> ±1,0mol/g <sub>humide</sub> (2)4,4.10 <sup>-5</sup> ±0,2mol/g <sub>humide</sub> (3)6,2.10 <sup>-5</sup> ±0,2mol/g <sub>humide</sub>	pK <sub>a1</sub> =4,8± 0,1 pK <sub>a2</sub> =6,9±0,3 pK <sub>a3</sub> =9,4±0,3	Cd: pK <sub>1</sub> =2,67 pK <sub>2</sub> =4,19 Pb: pK <sub>1</sub> =3,41 pK <sub>2</sub> =5,06 Cu: pK <sub>1</sub> =3,55 pK <sub>2</sub> =4,94	Daughney and Fein (1998)
<i>Bacillus subtilis</i>	CCM : 8 F/m <sup>2</sup>	groupes carboxyliques (1) groupes phosphates (2) groupes hydroxyles(3)	(1)12.10 <sup>-5</sup> ±1,0mol/g <sub>humide</sub> (2)4,4.10 <sup>-5</sup> ±0,2mol/g <sub>humide</sub> (3)6,2.10 <sup>-5</sup> ±0,2mol/g <sub>humide</sub>	pK <sub>a1</sub> =4,8± 0,1 pK <sub>a2</sub> =6,9±0,3 pK <sub>a3</sub> =9,4±0,3	Cd: pK <sub>1</sub> =2,93 pK <sub>2</sub> =2,39 Pb: pK <sub>1</sub> =3,00 pK <sub>2</sub> =4,36 Cu: pK <sub>1</sub> =3,20 pK <sub>2</sub> =4,36	Daughney and Fein (1998)
<i>Bacillus licheniformis</i>	CCM : 3 F/m <sup>2</sup>	groupes carboxyliques (1) groupes phosphates (2) groupes hydroxyles(3)	(1)8,88.10 <sup>-5</sup> ±3,8mol/g <sub>humide</sub> (2)8,34.10 <sup>-5</sup> ±4,6mol/g <sub>humide</sub> (3)12,7.10 <sup>-5</sup> ±6,8mol/g <sub>humide</sub>	pK <sub>a1</sub> =5,15± 0,3 pK <sub>a2</sub> =7,47±0,4 pK <sub>a3</sub> =10,17±0,5	Cd: pK <sub>1</sub> =3,87 pK <sub>2</sub> =5,06 Pb: pK <sub>1</sub> =4,40 pK <sub>2</sub> =5,67 Cu: pK <sub>1</sub> =4,73 pK <sub>2</sub> =5,70	Daughney and Fein (1998)
<i>Bacillus licheniformis</i>	CCM : 3 F/m <sup>2</sup>	groupes carboxyliques (1) groupes phosphates (2) groupes hydroxyles(3)	(1)8,88.10 <sup>-5</sup> ±3,8mol/g <sub>humide</sub> (2)8,34.10 <sup>-5</sup> ±4,6mol/g <sub>humide</sub> (3)12,7.10 <sup>-5</sup> ±6,8mol/g <sub>humide</sub>	pK <sub>a1</sub> =5,15± 0,3 pK <sub>a2</sub> =7,47±0,4 pK <sub>a3</sub> =10,17±0,5	Cd: pK <sub>1</sub> =3,36 pK <sub>2</sub> =4,24 Pb: pK <sub>1</sub> =3,41 pK <sub>2</sub> =6,32 Cu: pK <sub>1</sub> =3,93 pK <sub>2</sub> =5,51	Daughney and Fein (1998)
<i>Bacillus licheniformis</i>	CCM : 3 F/m <sup>3</sup>	groupes carboxyliques (1) groupes phosphates (2) groupes hydroxyles(3)	(1)8,88.10 <sup>-5</sup> ±3,8mol/g <sub>humide</sub> (2)8,34.10 <sup>-5</sup> ±4,6mol/g <sub>humide</sub> (3)12,7.10 <sup>-5</sup> ±6,8mol/g <sub>humide</sub>	pK <sub>a1</sub> =5,15± 0,3 pK <sub>a2</sub> =7,47±0,4 pK <sub>a3</sub> =10,17±0,6	Cd: pK <sub>1</sub> =3,9±0,5 pK <sub>2</sub> =4,4±0,7 Pb: pK <sub>1</sub> =4,7±0,3 pK <sub>2</sub> =5,7±0,7 Cu: pK <sub>1</sub> =4,9±0,4 Al: pK <sub>1</sub> =5,8±0,3	Daughney et al. (1998)

Tableau 3 : Caractérisations des surfaces bactériennes (continu)

Espèce	Modélisation	Groupes surfaciques	Densité sites	constantes acidité (log K <sub>a</sub> )	métaux (log K)	Référence
<i>Bacillus subtilis</i>	FITEQL 2.0 CCM : 8 F/m <sup>2</sup>	groupes carboxyliques (1) groupes phosphates (2) groupes hydroxyles(3)	(1) 1.2.10 <sup>4</sup> mol/g <sub>humide</sub> (2) 4.4.10 <sup>-5</sup> mol/g <sub>humide</sub> (3) 6.2.10 <sup>-5</sup> mol/g <sub>humide</sub>	pK <sub>a1</sub> = 4,8±0,14 pK <sub>a2</sub> =6,9±0,5 pK <sub>a3</sub> =9,4±0,6	Zn: pK <sub>1</sub> =3,4±0,2 pK <sub>2</sub> =4,9±0,3 Co: pK <sub>1</sub> =3,5±0,4 Nd: pK <sub>1</sub> =5,1±0,2 Ni: pK <sub>1</sub> =3,4±0,3 Sr: pK <sub>1</sub> =2,6±0,3	Fein et al. (2001)
<i>Bacillus subtilis</i>	Pas de modèle électrostatique		(1) 7.5.10 <sup>-5</sup> mol/g (2) 9.6.10 <sup>-3</sup> mol/g (3) 3.1.10 <sup>-3</sup> mol/g (4) 7.5.10 <sup>-5</sup> mol/g	pK <sub>a1</sub> =3,3 pK <sub>a2</sub> =4,7 pK <sub>a3</sub> =6,8 pK <sub>a4</sub> =8,9		Fein et al. (2005)
<i>Bacillus subtilis</i>	CCM FITEQL	groupes carboxyliques (1) groupes phosphates (2) groupes hydroxyles(3)	(1) 1.2.10 <sup>4</sup> mol/g <sub>humide</sub> (2) 4.4.10 <sup>-5</sup> mol/g <sub>humide</sub> (3) 6.2.10 <sup>-5</sup> mol/g <sub>humide</sub>	pK <sub>a1</sub> = 4,8±0,14 pK <sub>a2</sub> =6,9±0,5 pK <sub>a3</sub> =9,4±0,6	PbOH+: pK <sub>1</sub> =5,8± 0,1 CuOH+: pK <sub>1</sub> =6,4± 0,1 Ca <sup>2+</sup> : pK <sub>1</sub> =2,8±01	Fowle and Fein (1999)
<i>Bacillus licheniformis</i>	CCM FITEQL	groupes carboxyliques (1) groupes phosphates (2) groupes hydroxyles(3)	(1)8,88.10 <sup>-5</sup> ±3,8 mol/g <sub>humide</sub> (2)8,34.10 <sup>-5</sup> ±4,6 mol/g <sub>humide</sub> (3)12,7.10 <sup>-5</sup> ±6,8 mol/g <sub>humide</sub>	pK <sub>a1</sub> =5,15± 0,3 pK <sub>a2</sub> =7,47±0,4 pK <sub>a3</sub> =10,17±0,6	PbOH+: pK <sub>1</sub> =6,6± 0,8 CuOH+: pK <sub>1</sub> =6,1± 0,9	Fowle and Fein (1999)
<i>Bacillus subtilis</i>	FITEQL 3.1 CCM : 8 F/m <sup>2</sup>	groupes carboxyliques (1) groupes phosphates (2) groupes hydroxyles(3)	(1) 1.2.10 <sup>4</sup> mol/g <sub>humide</sub> (2) 4.4.10 <sup>-5</sup> mol/g <sub>humide</sub> (3) 6.2.10 <sup>-5</sup> mol/g <sub>humide</sub>	pK <sub>a1</sub> = 4,8±0,14 pK <sub>a2</sub> =6,9±0,5 pK <sub>a3</sub> =9,4±0,6	UO <sub>2</sub> <sup>2+</sup> : pK <sub>1</sub> =5,4± 0,2 pK <sub>1</sub> =11,8± 0,2	Fowle et al. (2000)
<i>Enterobacteriaceae</i> (Gram négative)	FITEQL 4 CCM : 8 F/m <sup>2</sup>	groupes carboxyliques (1) groupes phosphates (2) groupes hydroxyles/aminés(3)	(1) 5±0,7.10 <sup>-4</sup> mol/g <sub>sec</sub> (2) 2,2±0,6.10 <sup>-5</sup> mol/g <sub>sec</sub> (3) 5,5±2,2.10 <sup>-5</sup> mol/g <sub>sec</sub>	pK <sub>a1</sub> =4,3±0,2 pK <sub>a2</sub> =6,9±0,5 pK <sub>a3</sub> =8,9±0,5	Zn: pK <sub>1</sub> =3,3±0,1 pK <sub>2</sub> =5,1±0,1 Pb: pK <sub>1</sub> =3,9±0,8 pK <sub>2</sub> =5,0±0,9 Cu pK <sub>1</sub> =4,4±0,2	Ngwenya et al. (2003)
9 Bactéries Gram + et Gram -	FITEQL CCM	groupes carboxyliques (1) groupes phosphates (2) groupes hydroxyles(3)	(1) 2,0±0,8.10 <sup>-3</sup> mol/g <sub>sec</sub> (2) 0,8.10 <sup>-3</sup> mol/g <sub>sec</sub> (3) 1,7.10 <sup>-3</sup> mol/g <sub>sec</sub>	pK <sub>a1</sub> =5,0±0,2 pK <sub>a2</sub> =7,2 pK <sub>a3</sub> =9,7	Cd: pK <sub>1</sub> =4,0±0,3	Yee and fein (2001)
<i>Bacillus subtilis</i>	Donnan Potential model				Ca(II): log K <sub>1</sub> =5,9±0,3 Sr(II): log K <sub>1</sub> =6,0±0,2 Ba(II): log K <sub>1</sub> =6,2±0,2	Yee et al. (2004)
<i>Sphaerotilus natans</i>	Isotherme Langmuir / Freundlich / Redlich-Peterson	Phosphate (1) carboxyles (2)	5 mequiv/g pour H+ Cu binding 1,81 mequiv/g Cd binding 0,78 mequiv/g	pK <sub>a1</sub> =7,8 pK <sub>a2</sub> =4,9		Esposito et al. (2001)

Tableau 3 : Caractérisations des surfaces bactériennes (continu)

pHiep	modélisation	Groupes surfaciques	Densité sites	constantes acidité (log $K_a$ )	métaux (log K)	Référence
<i>Dunaliella tertiolecta</i> (algue verte)	Langmuir - Scatchard			$pK_{a1}=10,06$ $pK_{a2}=6,18$ $pK_{a3}=4,92$	Pb: log $K_1=8,4$ Pb: log $K_2=7,2$	Gonzalez-Davila et al. (1994)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (algue verte)		groupes aminés (1) >COOH (2)		$pK_{a1}=9,0$ $pK_{a2}=4,5$		Xue et al (1988)
<i>Sargassum fluitans</i> (algue brune)	MINEQL+	groupes carboxyliques (1) groupes sulfates (2)		log $K_{a1}=-4,8$ log $K_{a2}=-2,5$	Cd: log $K_1=4,9$ log $K_2=2,9$ Cu log $K_1=5,3$ log $K_2=3,57$ Zn: log $K_1=4,0$ log $K_2=2,7$	Schiewer and Volesky (1995)
<i>Sargassum hemiphyllum</i> (algue brune)	Donnan avec un isotherme d'échange ionique		2.6 mequiv/g	$pK_a=2,7$		Schiewer and Wong (2000)
<i>Colpomenia sinuosa</i> (algue brune)	Donnan avec un isotherme d'échange ionique		1.5 mequiv/g	$pK_a=3,6$		Schiewer and Wong (2000)
<i>Petalonia fascia</i> (algue brune)	Donnan avec un isotherme d'échange ionique		2.9 mequiv/g	$pK_a=3,1$		Schiewer and Wong (2000)
<i>Ulva fascia</i> (algue verte)	Donnan avec un isotherme d'échange ionique		1.1 mequiv/g	$pK_a=3,9$		Schiewer and Wong (2000)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (algue verte)	Isotherme Langmuir	>RNH <sub>2</sub> (1) >COOH (2)	capacité d'échange H <sup>+</sup> : 9,1e-4 M	$pK_{a1}=9,0$ $pK_{a2}=4,9$	Cu: log K=11,3+/-0,2 à pH=6,9	Kiefer et al., 1997, EST
<i>Chlorella vulgaris</i>	Isotherme Langmuir		Pb binding sites: 6,6±1,10-10 mol/cm <sup>2</sup>	à pH = 6 $K_{pb} = 10^{5,04} M^{-1}$		Slaveykova and Wilkinson, 2002
<i>Sargassum fluitans</i>	Isotherme Langmuir		maximum capacité: 150mg/g qm(mmol/g)=0,701		uranyl K(L/mmol) = 0,233	(Yang and Volesky, 1999)
<i>Sargassum fluitans</i>	Isotherme Langmuir		maximum capacité: 330mg/g qm(mmol/g)=1,215		uranyl K(L/mmol) = 0,084	(Yang and Volesky, 1999)
<i>Sargassum fluitans</i>	Isotherme Langmuir		maximum capacité: 560mg/g qm(mmol/g)=2,40		uranyl K(L/mmol) = 0,1695	(Yang and Volesky, 1999)
<i>Ecklonia</i>		> COOH (1) >ND (2) >OH (3)	(1) 2,2.10-3 mol/g (2) 1,2.10-3 mol/g (3) 1,6.10-3 mol/g	$pK_{a1}=4,6±0,1$ $pK_{a2}=7,2±0,4$ $pK_{a3}=10,0±0,3$	Cr <sup>3+</sup> K= 179,5±1,6 L/mmol CrOH <sup>2+</sup> +K= 9,6±1,3 L/mmol	(Yun et al., 2001)
<i>Durvillaea potatorum</i>	Isotherme Langmuir		Qmax (mmol/g). (1) 2,2.10-3 mol/g (2) 1,2.10-3 mol/g (3) 1,6.10-3 mol/g (4) 1,2.10-3 mol/g (5) 1,6.10-3 mol/g		Cd : K (L/mmol): (1) 6,15 (2) 5,69 (3) 4,70 (4) 0,85 (5) 0,21	(Matheickal et al., 1999)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Metal binding model	carboxyle (1) phosphate (2) amine (3)	(1) 1,79.10-3 mol/gsec (2) 0,70.10-3 mol/gsec (3) 2,79.10-3 mol/gsec	$pK_{a1}=3,90$ $pK_{a2}=6,64$ $pK_{a3}=9,51$	Cd: log $K_1=2,36$ log $K_2=4,47$ Pb: log $K_1=2,89$ log $K_2=5,53$	(Seki et al., 2000)
<i>P. tricornutum</i>	modèle de Stumm: pK vs charge surfacique	amines primaires (chitine) (1) groupes a-aminés (2) >COOH (protéines) (3)		$pK_{a1}=9,12$ $pK_{a2}=6,68$ $pK_{a3}=3,77$		Gonzalez-Davila et al. (2000)
<i>T. weissflogii</i>	modèle de Stumm: pK vs charge surfacique	amines primaires (chitine) (1) groupes a-aminés (2) >COOH (protéines) (3)		$pK_{a1}=9,14$ $pK_{a2}=6,72$ $pK_{a3}=3,96$		Gonzalez-Davila et al. (2000)
<i>Cyclotella cryptica</i>	Isotherme Langmuir	>RNH <sub>2</sub> (1) >COOH (2)	capacité d'échange H <sup>+</sup> : 9,7e-4 M	$pK_{a1}=9,8$ $pK_{a2}=3,2$	Cu: log K=11,9+/-0,2 à pH=6,9	Kiefer et al., 1997, EST
<i>Thalassiosira spp.</i>	Isotherme Langmuir				coef. Partage avec MeHg: log K = 6,72±0,21	(Miles et al., 2001)

Tableau 4: Caractérisations des surfaces d'algues et de diatomées

CHAPITRE 3  
METHODES

## I. CULTURE DES CELLULES

Les espèces de diatomées étudiées ont toutes été élevées en cultures monospécifiques au LEESA, Laboratoire d'Ecotoxicologie de l'Université de Bordeaux 1, localisé à Arcachon.

Les souches axéniques, c'est-à-dire exemptes de tout germe bactérien ou parasites, d'AMIN et de NMIN proviennent du FDCC (Freshwater Diatom Culture Collection) de l'Iowa aux Etats-Unis. Ces diatomées ont été cultivées à 20°C dans un milieu nutritif stérile DAUTA (DAUTA, 1982) de pH d'environ 7,7. Les cultures ont été effectuées dans des Erlenmeyers de 2,5 L placés dans une chambre thermorégulée sous une intensité lumineuse de 30 mmol de photon.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> suivant un cycle jour/nuit de 14/10 heures. La concentration moyenne des cellules était d'environ 107 cellules/L. Les cultures ont été maintenues sous aération continue pour éviter tout changement de pH du à l'activité photosynthétique des diatomées. Les souches des deux espèces marines, TW et SC, proviennent du CREMA (Centre de Recherche en Ecologie Marine et Aquaculture) situé à l'Houmeau (Charente Maritime). Les conditions de cultures sont les mêmes que celles utilisées pour AMIN et NMIN à l'exception du milieu nutritif qui est un milieu nutritif standard f/2 (GUILLARD, 1975), adapté à la croissance des espèces marines (milieu synthétique reproduisant les conditions marines) avec un pH situé autour de 8.0.

Le temps d'incubation moyen est de deux à quatre semaines. Durant la croissance des cultures, des prélèvements hebdomadaires de cellules ont été effectués pour permettre leur repiquage dans des milieux nutritifs neufs. Ce procédé a permis d'accroître la vitesse de croissance et d'augmenter la quantité de biomasse disponible. Les diatomées ont été récoltées pendant la phase stationnaire et conservées à 4°C dans le noir jusqu'à utilisation. Afin d'éviter les contaminations par des organismes extérieurs, le matériel de culture a été systématiquement autoclavé avant usage. Toutes les manipulations (notamment les étapes de repiquage) réalisées après lavage du plan de travail à l'alcool à 90°C, ont été conduites à proximité d'une flamme. Malgré toutes ces précautions il est arrivé que certains Erlenmeyers aient été contaminés, principalement par des algues vertes. Dans ce cas, la production de diatomées est rejetée.

Certaines expériences, notamment celles impliquant l'analyse des métaux par spectroscopie d'absorption X (XAFS), ont nécessité une modification du protocole de culture

décrit ci-dessus. Afin d'obtenir dans les cellules une teneur en zinc suffisante, la concentration de Zn dans le milieu nutritif a été maintenue constante par addition périodique de solution nutritive fraîche et contrôle de concentration en zinc dans la suspension au cours de la croissance des cellules.

## II. PREPARATION DES DIATOMEES

### A. Détermination de la concentration

Plusieurs méthodes ont été mises en oeuvre :

1) *Comptage du nombre de cellules.* Celui-ci a été effectué à l'aide d'une cellule Nageotte qui est constituée d'une lame de verre divisée en 2 x 40 sections rectangulaires, ou champs, pouvant contenir chacune un volume de 1.25 µl de solution. Le comptage du nombre de cellules dans chaque rectangle se fait à l'aide d'un microscope optique. Un volume de 100 µl d'une solution diluée de diatomées, contenant environ 100 cellules par champs, est déposé sur la cellule de comptage. Au moins 10 comptages de chaque solution stock sont effectués et la moyenne des résultats est faite puis ramenée à une concentration en cellules par litre. Le nombre de diatomées par unité de volume est connu avec une incertitude d'environ 10-20%.

2) *Mesure de la densité optique de la suspension.*

Elle est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 400nm. Une corrélation linéaire est observée entre la densité lumineuse et la concentration de cellules en suspension dans la gamme de concentration  $2 \cdot 10^8$ - $2 \cdot 10^9$  cellules/L.

3) *Pesée des cellules.*

Elle est effectuée sur des cellules séparées du milieu de culture par centrifugation (20 minutes à 2500 g). Ces cellules sont ensuite pesées. La masse mesurée est ensuite normalisée au volume initial de solution prélevée afin d'obtenir une concentration en gramme de cellules par litre. Cette concentration se définit par la mention poids humide puisque la cellule reste

hydratée. Après centrifugation l'eau représente encore 90% du poids de la cellule.

#### 4) *Pesée des cellules lyophilisées.*

Un volume donné de solution contenant des diatomées est prélevé et lyophilisé. Les cellules lyophilisées sont ensuite pesées et la masse est normalisée au volume initialement prélevé. Dans ce cas la concentration en cellules lyophilisées porte la mention poids sec.

### B. Prélèvement et lavage

Du fait que les diatomées sont cultivées dans des solutions riches en éléments nutritifs, il est possible qu'elles conservent des métaux et des exudats adsorbés à leur surface. Il est nécessaire d'enlever ces adsorbats afin d'éviter de possibles artefacts lors des expériences de titrages acido-basiques et d'adsorption de métaux. Ce lavage préliminaire est une étape quasi-obligatoire dans toutes les expériences de caractérisation physico-chimique de la surface des microorganismes, qu'il s'agisse de diatomées marines (GONZALEZ-DAVILA et al., 2000), d'algues vertes (KIEFER et al., 1997) ou de bactéries (MARTINEZ et al., 2002). Dans notre étude, les diatomées sont rincées trois fois avant chaque expérience dans une solution de même composition chimique (NaCl ou NaNO<sub>3</sub> à la même force ionique) que l'électrolyte utilisé lors de l'expérience de titration ou de sorption. Les cellules sont ensuite séparées de la solution par centrifugation à 2200g (~ 400 mL de solution de lavage pour 1 g humide de biomasse).

Il est toutefois important de remarquer que certains lavages peuvent être néfastes au maintien de l'intégrité de la paroi cellulaire. C'est le cas des solutions trop acides ou trop basiques qui peuvent cliver les fonctions organiques des molécules présentes à la surface des microorganismes. BORROK et al., (2004b) ont montré, en effet, que le lavage ou le stockage de bactéries (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mendocina*) avec une solution acide aboutissaient à la dégradation de la paroi cellulaire.

### C. Séparation du frustule de la cellule

La stratégie la plus simple pour séparer le frustule du reste de la cellule consiste à

attaquer sélectivement la matière organique. Celle-ci est beaucoup plus sensible que le frustule siliceux aux réactions d'oxydations. Dans cette étude les frustules ont été extraits en mettant une suspension de cellules (20g humide/L) au contact d'une solution oxydante (5% HNO<sub>3</sub>+5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durant six heures à 105°C. Après plusieurs rinçages de cette suspension à l'eau MQ, les frustules sont séparés par centrifugation. Des analyses FT-IR et MEB sur les frustules démontrent la disparition de la quasi-totalité de la matière organique.

Cependant, plusieurs auteurs (KROGER and WETHERBEE, 2000; SCALA and BOWLER, 2001) ont mis en évidence à la surface des diatomées plusieurs types de protéines (silaffines et pleuralines) qui ne sont extractibles que par dissolution du frustule par l'acide fluorhydrique. Cela suggère que certaines classes de molécules intimement liées à la structure du frustule ne sont pas forcément détruites par oxydation à l'eau oxygénée.

### III. MESURES DE SURFACE SPECIFIQUE

#### A. Mesures au BET

La méthode BET a été utilisée pour déterminer la surface spécifique des frustules. Ces mesures qui impliquent un chauffage de l'échantillon à des températures supérieures à 150°C, ne peuvent pas être réalisées sur des organismes biologiques. Les surfaces ont été déterminées par adsorption de N<sub>2</sub> (trois points) et Kr (multipoint). Une bonne correspondance ( $\pm 10\%$ ) est observée entre les deux méthodes.

#### B. Mesures SAXS

La structure fine et la porosité des diatomées et des frustules ont été estimées par SAXS (Small Angle X-ray Scattering Spectroscopy). Lorsqu'un faisceau de rayon X traverse un échantillon, une intensité dispersée autour de la direction centrale du faisceau est produite par les hétérogénéités de l'échantillon. La variation de l'intensité dispersée en fonction de l'angle de dispersion avec le faisceau incident donne la transformée de Fourier spatiale des hétérogénéités dans l'échantillon. Dans le cas de la dispersion des RX aux petits angles, on détecte les hétérogénéités de densité électronique dans l'échantillon à très petite échelle (de quelques Angstroms au micromètre). Les échantillons étudiés peuvent être des solides cristallisés ou amorphes, des solutions ou encore des boues. Une bonne analogie avec le SAXS est fournie par la formation d'une couronne autour de la lune suite à la dispersion de sa

lumière par les gouttelettes d'eau de l'atmosphère qui se produit durant les nuits brumeuses mais sans nuages.

Dans un système mono dispersif, où toutes les particules du volume de dispersion ont les mêmes tailles, formes et structures internes, les figures de dispersion fournissent des informations sur ces propriétés. Dans un système polydispersif, l'information donnée par la dispersion est très convoluée, mais on peut obtenir des données sur la distribution des tailles si on fait des hypothèses sur la forme des particules.

### C. Problèmes de mesures de surfaces spécifiques

Les mesures de surface spécifique n'ont pu être effectuées avec précision que sur les frustules pour lesquels nous avons obtenu un bon accord entre les mesures BET et SAXS. En raison de la structure tridimensionnelle des parois organiques des organismes unicellulaires, une sous-estimation de la surface spécifique, probablement supérieure à un ordre de grandeur, est faite si on considère la surface mesurée sur les frustules ou si on fait une estimation géométrique de la surface.

Cette difficulté à quantifier les surfaces spécifiques pour les cellules entières peut générer des problèmes lors de l'utilisation de modèles thermodynamiques puisque c'est en général un des paramètres d'entrée. Par exemple, le logiciel de modélisation FITEQL, utilisé dans le cadre d'un modèle de potentiel surfacique à capacitance constante, prend en compte une valeur de capacitance en F/L. C'est le produit de la valeur de la surface spécifique (en  $\text{m}^2/\text{g}$ ) avec la valeur de la capacitance (en F/g) et la concentration en sorbant (en g/L).

HE et TEBO (1998) ont utilisé l'adsorption du bleu de méthylène pour mesurer la surface spécifique de spores de bactéries. La géométrie et la surface de cette molécule organique sont connues ( $S = 0,55 \cdot 10^{-18} \text{ m}^2$ ). En mesurant le nombre de moles de bleu de méthylène adsorbées sur les spores, il est alors possible d'estimer la surface spécifique en faisant l'approximation d'une couverture complète de la surface par une seule couche de bleu de méthylène. Cette méthode a été essayée sur les surfaces de diatomées sans succès, les résultats n'étant pas reproductibles.

## IV. TITRAGES ACIDO-BASIQUES

Deux différents protocoles de titrages acido-basiques ont été utilisés dans ce travail. Le premier, largement utilisé lors des études sur les oxydes et les parois cellulaires rigides de bactéries, consiste à effectuer l'ensemble de la titration sur un même échantillon mis en suspension dans un réacteur fermé. Cette méthode induisant une dégradation pendant la titration du film organique qui recouvre le frustule, nous avons mis au point un second protocole, qui, grâce à l'utilisation d'un réacteur à temps de résidence court, permet de préserver l'intégrité des diatomées pendant leur titration. Dans cette partie nous présenterons tout d'abord le principe des titrages acido-basiques puis nous recenserons les différents artefacts pouvant intervenir lors des titrages acido-basiques et les expériences d'adsorption métalliques. Enfin, une description détaillée des protocoles utilisés sera présentée.

### A. Principe

La détermination de la concentration des charges présentes à la surface des diatomées se fait par titrage acido-basique de deux solutions d'un même électrolyte, l'une avec et l'autre sans diatomées. La comparaison des valeurs de pH, mesurées dans les deux solutions pour un même ajout de HCl ou de NaOH, permet de déterminer la quantité de protons ou d'hydroxyles adsorbés à la surface des diatomées au jème point de titrage selon la relation :

$$[H^+]_S = (C_{aj}(\text{suspension}) - C_{aj}(\text{référence})) - (C_{bj}(\text{suspension}) - C_{bj}(\text{référence}))$$

où  $C_{aj}$  et  $C_{bj}$  sont les concentrations d'acide et de base pour la j<sup>ème</sup> addition de solution titrante. Dans le cas du titrage de l'électrolyte sans diatomées  $C_{aj}(\text{référence})$  est égale à la concentration en  $H^+$  libres dans le système.

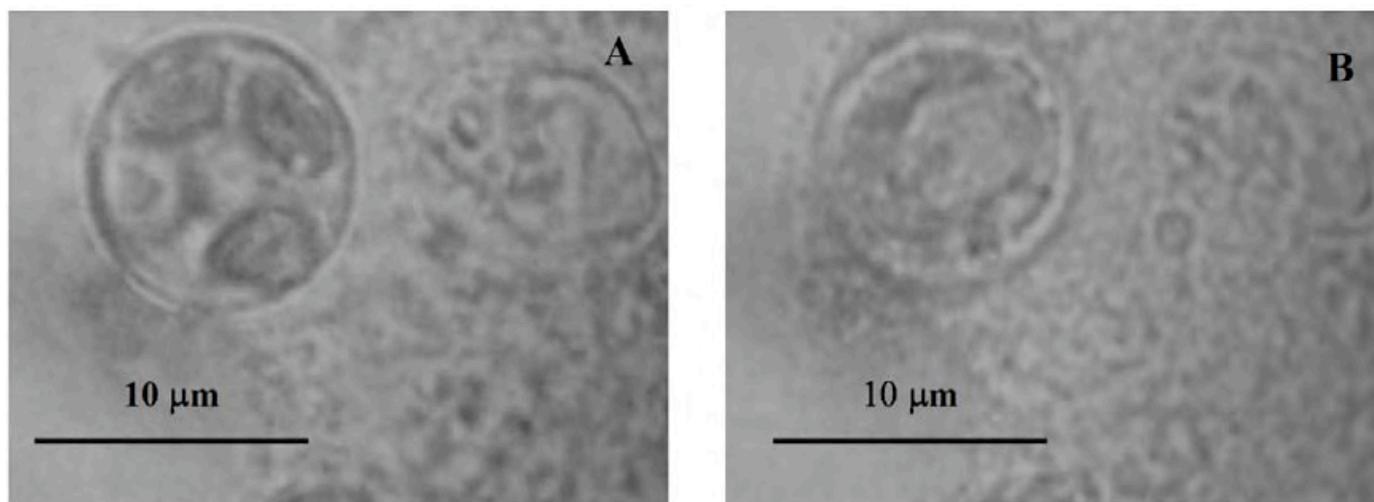
La comparaison des courbes de titrage ainsi obtenues met en évidence une consommation de protons par les diatomées en milieu acide et au contraire une libération de protons en conditions alcalines. Bien entendu, il doit être admis pour les titrations que le changement de milieu (choc osmotique) durant les expérimentations ne modifie pas la physiologie des cellules (COX et al., 1999).

## B. Artefacts intervenants lors du titrage

### 1. Dégradation cellulaire

Dans des conditions acides ou basiques, la paroi cellulaire subit une dégradation rapide. Il est bien connu que des conditions très acides et basiques peuvent entraîner le clivage des fonctions amides, principalement au niveau des protéines, et des fonctions ester, largement représentées dans les polysaccharides comme liaisons entre ses différents constituants. Cette dégradation cellulaire implique une surconsommation de protons ou d'hydroxyles lors des processus de clivage et une surestimation de la charge surfacique.

Ce phénomène de dégradation est illustré sur la figure 10 qui représente une microphotographie de la cellule de TW après une exposition de 1 et 10 min à une solution basique de pH ~ 10,5.



**Figure 10 : Cellule de *Thalassiosira weissflogii* à pH=10.5 à 1 minute d'exposition (A) et après 10 minutes d'exposition (B).**

Ce phénomène de dégradation n'a pas été rapporté pour d'autres microorganismes comme les bactéries. Avec *Bacillus subtilis* (FEIN et al., 1997) ou *Bacillus licheniformis* (DAUGHNEY et al., 1998), pour lesquelles un titrage inverse (ajout d'acide) a été effectuée après le titrage direct (ajout de base), aucune différence notable entre les deux titrages n'a été

mise en évidence, ce qui suggère qu'il ne s'est pas produit de dégradation cellulaire significative. Il a, cependant, été montré que le lavage acide préliminaire à ces expériences causait une altération de la paroi cellulaire des bactéries (BORROK et al., 2004). L'exposition à une solution acide pendant le lavage ou même le stockage des cellules bactériennes entraîne la désorption irréversible de  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  adsorbés à la surface des bactéries. La dégradation partielle de la structure de la paroi cellulaire qui s'ensuit, induit des artefacts de mesure importants lors d'expériences d'adsorption de métaux sur ces bactéries. FEIN et al. (2005) reportent aussi une dégradation des cellules dans les solutions fortement alcalines ( $\text{pH} > 10$ ).

L'observation des organismes au microscope optique après titration est un des moyens les plus utilisés pour vérifier l'intégrité des cellules. DAUGHNEY et al. (1998) ont observé la présence d'exudats organiques dissous ou de fragmentation de la paroi cellulaire après leurs titrages acido-basiques sur des cellules de *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis*. De plus, les mêmes auteurs ont montré que les rinçages successifs (eau distillée ou 0.1 M  $\text{NaNO}_3$ ) effectués sur ces bactéries n'ont pas entraînés de changements dans la courbe de titrage ce qui permet de conclure que les effets osmotiques induits par les lavages sont négligeables. Enfin, en comparant le poids sec des bactéries avant et après les titrages, DAUGHNEY et FEIN (1998) ont pu vérifier que la masse de bactéries restait constante.

## 2. Libération d'exudats

Lorsqu'ils sont soumis à un stress extérieur (par exemple : une forte concentration de métal), beaucoup d'organismes unicellulaires ont tendance à libérer des exudats pour se protéger (figure 11).

De nombreuses études ont été effectuées sur des algues afin de mettre en évidence leurs mécanismes de détoxification (VASCONCELOS and LEAL, 2001; ROLLEMBERG et al., 1999; SANTANA-CASIANO et al., 1995) au nombre desquels figure, par exemple, la production d'exudats destinée à complexer les métaux présents à l'extérieur de la cellule ou l'émission de complexes organométalliques de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule. Cette production active de matière organique par les diatomées s'accompagne d'une production passive résultant de la dégradation cellulaire évoquée plus haut. Dans les deux cas, la matière organique produite peut induire des artefacts lors de la caractérisation des propriétés de la

surface des cellules par titrage acido-basique.

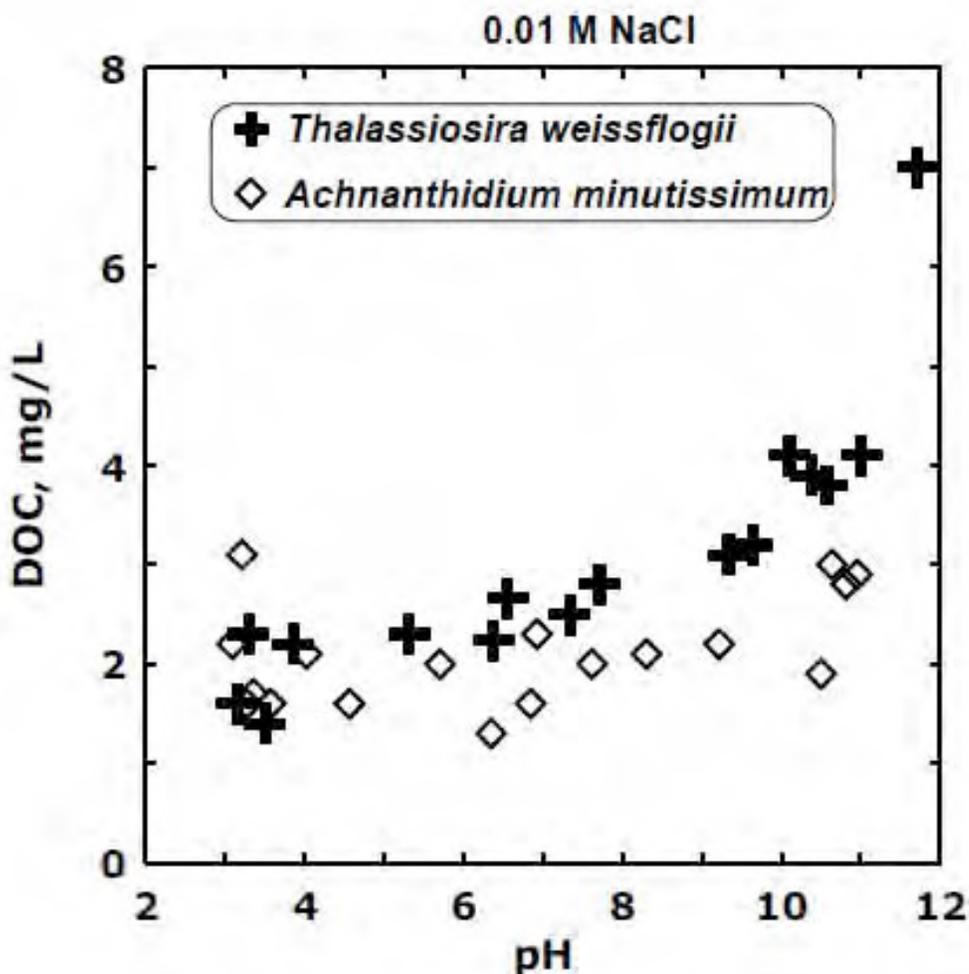


Figure 11 : Carbone organique dissous (COD) libéré en fonction du pH et du temps lors du titrage de TW et AMIN (ce travail).

### 3. Incorporation des protons et des métaux dans la paroi cellulaire

La membrane plasmique des cellules est considérée comme perméable à divers éléments chimiques. Plusieurs mécanismes et constituants des organismes contribuent à ce transport (voir chapitre 1). La réversibilité des processus d'adsorption étant une condition importante à l'élaboration d'un modèle de complexation surfacique, il est nécessaire de contrôler qu'aucun élément adsorbé n'est sorti du système d'étude par internalisation à travers la membrane plasmique. Lors de notre étude, aucun phénomène significatif d'incorporation des protons et des métaux n'a été mis en évidence (figure 12).

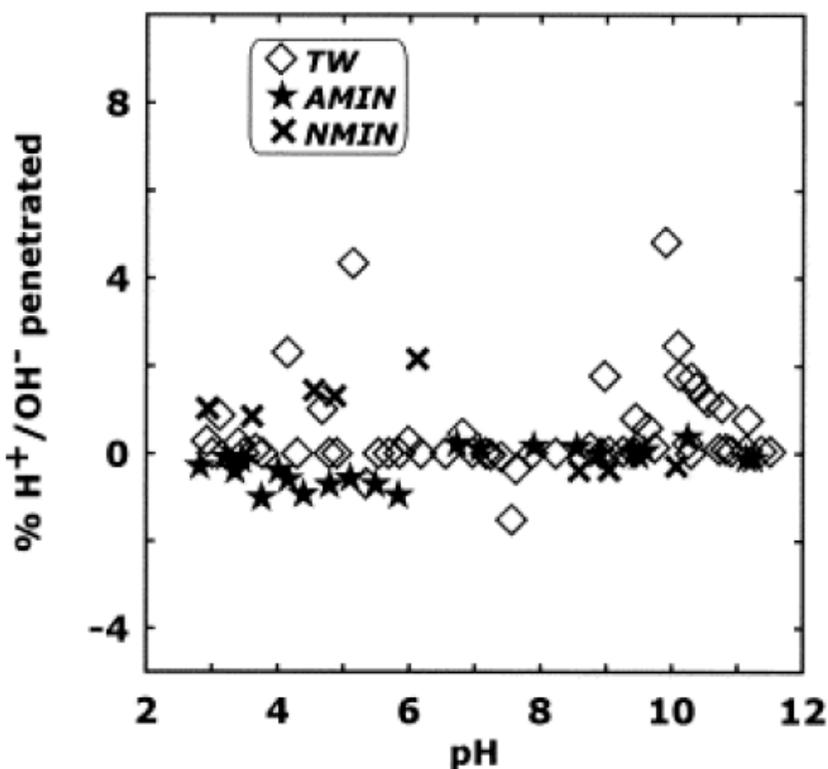


Figure 12 : Incorporation non réversible vers l'intérieur de la cellule des protons et hydroxydes en fonction du pH pour trois espèces de diatomées (ce travail).

### C. Protocoles utilisés

#### **1. Titrage en réacteur fermé**

Ce protocole, largement utilisé pour les oxydes minéraux ou certains types de bactéries comportant une paroi cellulaire suffisamment rigide implique un temps d'exposition élevé aux solutions titrantes de l'ordre de plusieurs heures au total.

La suspension de diatomées est placée dans un bécher fermé en verre, thermostaté à  $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$  (Figure 13). Le pH de la solution est mesuré à l'aide d'une électrode de verre combinée insérée dans le couvercle du réacteur. Un tube de verre muni d'un diffuseur permet de faire buller en permanence de l'azote afin d'éliminer le  $\text{CO}_2$  de la solution. Les titrages sont effectués avec des solutions standards de NaOH et HCl, et le volume total d'acide ou

base ajouté ne dépassant jamais 10% du volume initial de la suspension. On commence par la partie alcaline du titrage. Après chaque addition d'un volume connu de soude, à l'aide d'une pipette automatique, le pH est mesuré lorsque la variation du potentiel est inférieure à 2 mV/min (typiquement au bout de 7 minutes d'exposition). Puis on procède à une nouvelle addition de soude. Lorsque le pH de la solution atteint une valeur de 10, on procède à des injections d'acide afin de réaliser le titrage inverse jusqu'à pH~5.

Avec ce protocole, nous avons constaté que la courbe de titrage inverse, réalisée avec l'acide, ne se superposait pas à la courbe directe, conduite avec la soude (Fig.14). Cette divergence est imputée à la dégradation de la paroi cellulaire à pH élevé. Pour limiter les artefacts de titrage induits par la dégradation des cellules, il convient de réduire au maximum la durée de titrage. Pour ce faire, nous avons utilisé un réacteur ouvert, à temps de résidence court, qui permet de minimiser le temps d'exposition des cellules aux conditions de stress importantes et ainsi d'éviter que les phénomènes précédents se produisent ou de minimiser leur influence.

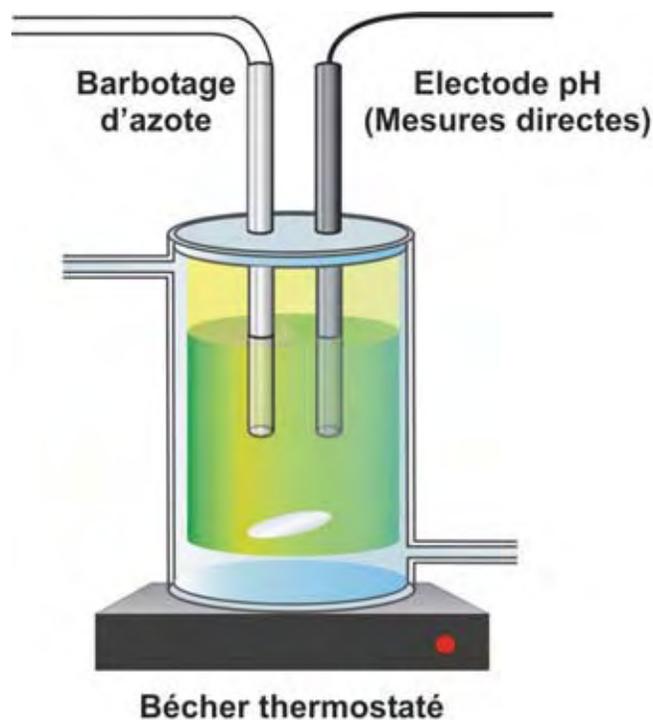


Figure 13: Schéma du réacteur de titrage fermé

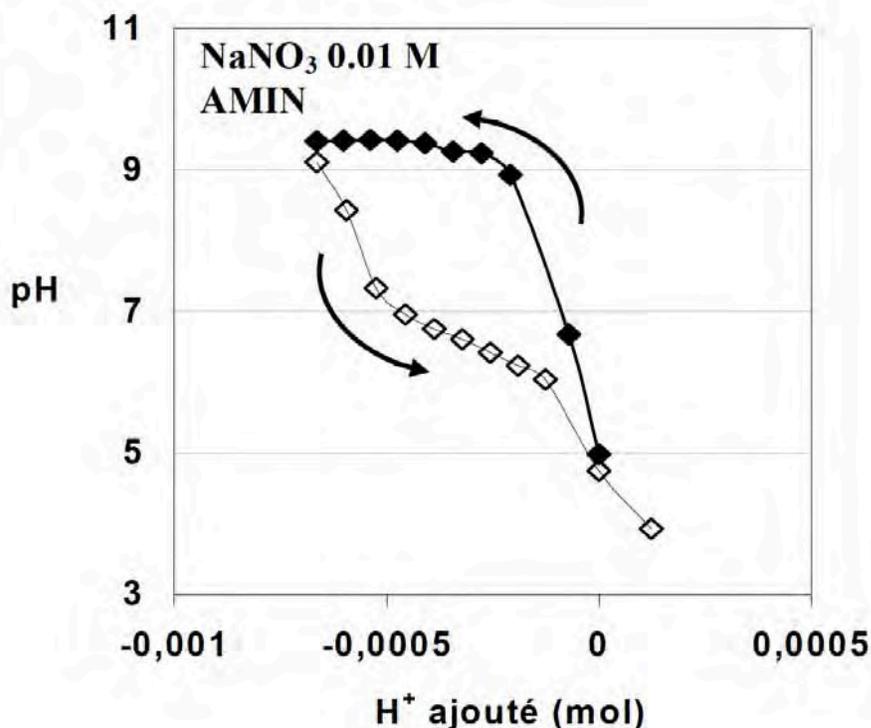


Figure 14 : Titrage continu de *Achnantes minutissimum* (ce travail)

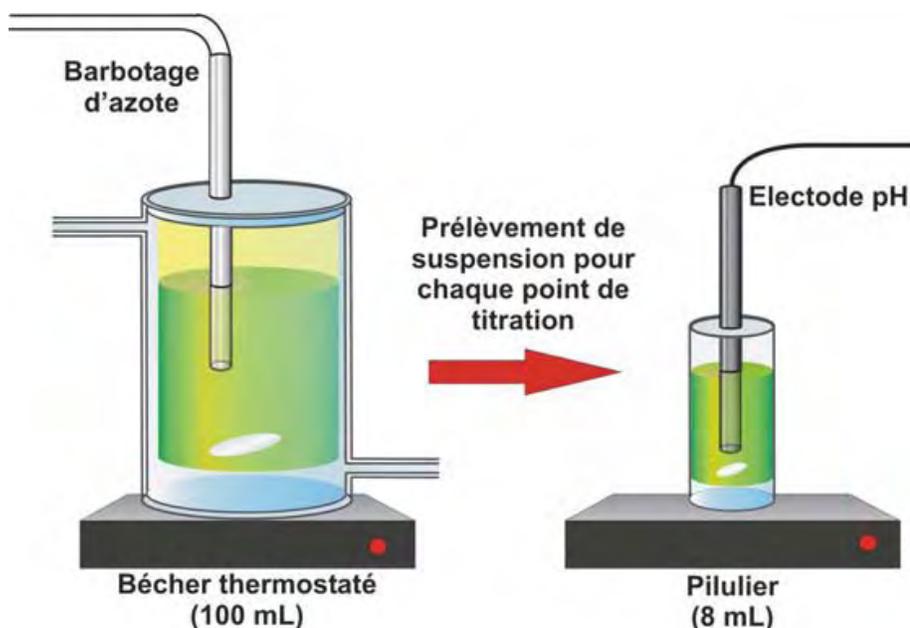
## 2. Titrage en réacteur à temps de résidence limité

Ce type de titrage met en œuvre deux réacteurs.

Une suspension « mère » de diatomées est contenue dans un bécher fermé thermostaté à 25°C et soumis en permanence à un barbotage d'azote (Figure 15). On laisse cette suspension s'équilibrer sous agitation continue à 25°C pendant une heure dans le noir, afin de limiter toute activité photosynthétique. Pour chaque point de titrage, une petite quantité de cette suspension mère (environ 5g) est prélevée à l'aide d'une pipette et transférée dans un pilulier stérile en polypropylène de 8 ml de volume. Le titrage de la suspension est alors effectuée dans ce pilulier en ajoutant en une seule fois un volume connu de solution titrante basique ou acide. Le pH est relevé, puis on procède à l'acquisition d'un nouveau point de titrage en injectant dans un pilulier propre de 8 ml un nouveau prélèvement de la solution mère. Cette opération est répétée jusqu'à ce que toute la gamme de pH choisie soit couverte. Cette technique qui limite le temps de résidence des diatomées dans le réacteur de titrage à moins de 6 minutes, permet ainsi de réduire la dégradation de leur paroi cellulaire ainsi que la

quantité d'exudats produits. Des observations au microscope optique effectuées avant et après titrage n'ont pas permis de détecter des dégradations des parois cellulaires.

Quatre espèces de diatomées ont été titrées selon ce protocole dans des solutions allant de 0.001M à 1 M NaCl ou NaNO<sub>3</sub>, dans une gamme de pH comprise entre 3 et 11. Les courbes obtenues sont celles qui ont été utilisées pour la modélisation.



**Figure 15: Schéma du réacteur à temps de résidence limité**

### 3. Titration du surnageant

Afin de corriger la titration de l'éventuelle libération d'exudats par les cellules, il est nécessaire de quantifier la quantité de protons ou d'hydroxydes consommée par ces exudats pendant le titrage. Pour ce faire, de petits volumes de suspension mère sont prélevés pendant le titrage à intervalles de temps réguliers et centrifugés. Le surnageant est alors récupéré et titré de la même manière que la suspension de diatomées (Figure 16). La courbe obtenue, qui sert de blanc, est soustraite à la courbe de titrage de la suspension de diatomées.

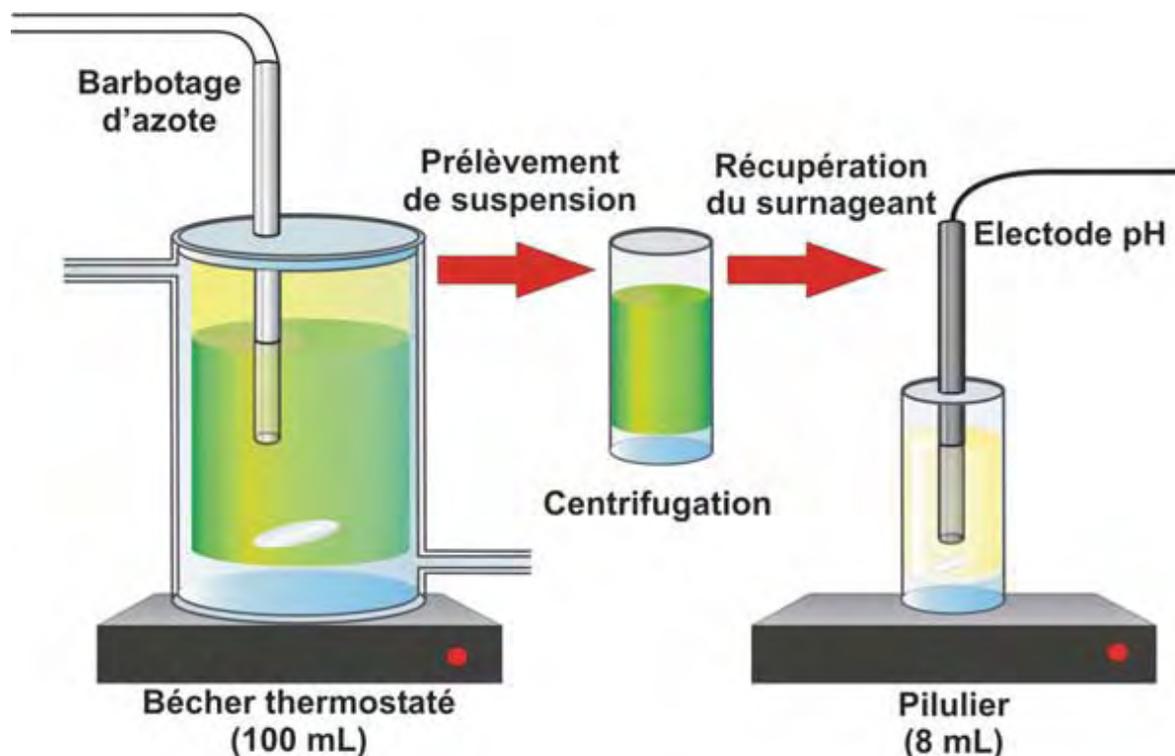


Figure 16: Protocole de titrage du surnageant

## V. EXPERIENCES D'ADSORPTION DES METAUX

### A. Principe

Les expériences d'adsorption des métaux par les surfaces des diatomées ont pour but la détermination des constantes de stabilité des complexes formés par ces métaux à la surface des diatomées. Deux types d'expériences ont été effectués :

1) adsorption du métal à pH constant en fonction de sa concentration dans la solution (isotherme d'adsorption). 2) adsorption en fonction du pH à concentration initiale en métal fixe.

Afin de mieux contraindre le système, les expériences ont été réalisées pour plusieurs valeurs des paramètres extérieurs comme la force ionique, la concentration de biomasse, l'intensité lumineuse, la température et le temps d'exposition.

Il est à signaler que toutes les expériences ont été effectuées dans des solutions sous-

saturées par rapport aux oxydes, hydroxydes et carbonates métalliques susceptibles de précipiter. L'index de saturation des solutions par rapport aux phases solides a été calculé à l'aide du programme MINTEQA2 (ALLISON et al., 1991).

## B. Protocole utilisé

Les expériences d'adsorption ont été effectuées à 5 et  $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$  dans une suspension de diatomées sous agitation continue. Les électrolytes utilisés ont été  $\text{NaNO}_3$  ou  $\text{NaCl}$  avec une force ionique allant de 0.001 à 1 M. Selon les expériences, la concentration en cellules a varié entre 8 à 70 ghumide/L soit  $((2 - 4) \times 10^9$  cellules/L).

Le temps d'exposition varie, selon les expériences, entre 15 minutes et 140 heures mais a été généralement fixée à 3 heures pour les expériences d'adsorption de zinc et de cadmium. Dans le cas du Pb, le temps d'exposition est soit d'une heure soit d'une semaine pour différents essais effectués sur l'espèce AMIN.

### **1. Isothermes d'adsorption**

Les mesures d'adsorption du zinc à la surface des diatomées indiquent que la majorité du métal est adsorbé dans les premières 10-100 minutes d'exposition en accord avec les résultats des travaux sur la sorption des métaux à la surface des bactéries ((FEIN et al., 1997 ; NGWENYA et al., 2003)) et des algues (XUE et al., 1988; GONZALEZ-DAVILA et al., 2000). Les expériences ont été conduites avec des concentrations initiales en métal dissous comprises entre 0,05 et 50 mg/L pour le zinc et entre 0,5 à 50 mg/L pour le plomb. Le pH a été ajusté à la valeur souhaité en utilisant  $\text{NaOH}$  ou  $\text{HNO}_3$  ( $\text{HCl}$  quand  $\text{NaCl}$  était l'électrolyte). Une solution tampon d'HEPES (4-(2-hydroxyethyl) pipérazine-1-ethanesulfonic acid sodium salt), qui est connu pour ne pas complexer les cations métalliques divalents, (MIRIMANOFF et WILKINSON, 2000), a été utilisée à la concentration de 0.003 M pour conserver un pH constant pendant les isothermes d'adsorption. Dans toutes les expériences, de l'eau déionisée (MilliQ, 18 m $\Omega$ ), purgée de  $\text{CO}_2$  par un barbotage au  $\text{N}_2$ , a été utilisée. A la fin de chaque expérience, la suspension a été centrifugée et le surnageant a été filtré au travers d'un filtre Nylon de 0.22  $\mu\text{m}$ , acidifié avec une solution ultra pure d'acide nitrique et conservé au réfrigérateur, à l'obscurité, jusqu'à l'analyse. La concentration de métal adsorbé dans chaque pilulier a été calculée en soustrayant la concentration en métal mesurée dans le surnageant de celle initialement ajoutée dans la suspension.

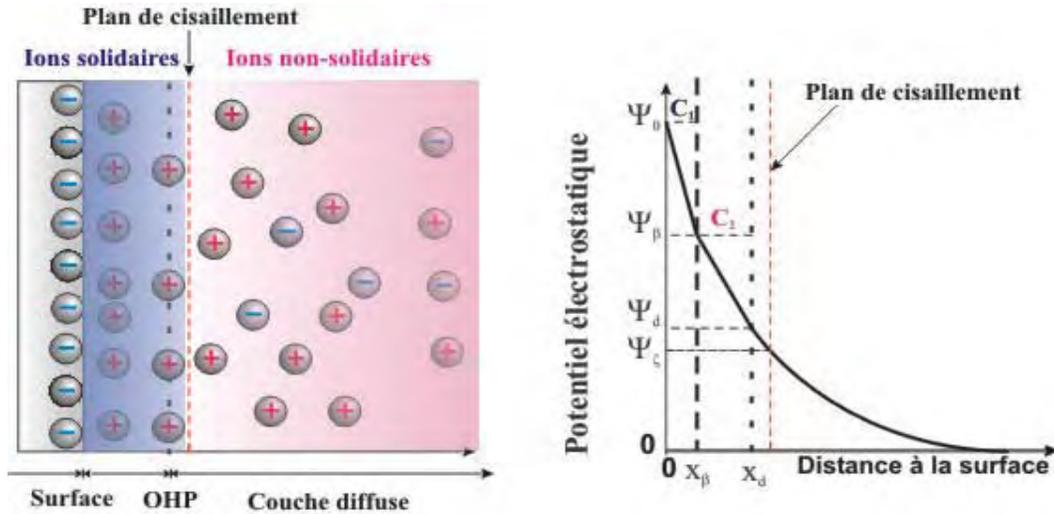
Toutes les expériences ont été corrigées à l'aide d'un blanc obtenu par application du même protocole sur une suspension d'où ont été retirées les diatomées. L'adsorption du métal sur la paroi du pilulier et sur les éventuels exudats produits par les diatomées est prise en compte de cette manière.

## 2. Adsorption en fonction du pH

Des essais d'adsorption des métaux en fonction du pH ont été effectués. Ils ont été conduits sous agitation permanente à  $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$  avec une suspension de diatomée composée d'une solution de  $\text{NaNO}_3$  ou de  $\text{NaCl}$  et de force ionique comprise dans la gamme 0.001 M à 1 M. Le temps d'exposition a été de 3 heures et les expériences ont été effectuées dans le noir pour éviter toute activité métabolique de la part des cellules. Le pH a été ajusté en utilisant des solutions concentrées de  $\text{NaOH}$  ou  $\text{HNO}_3$  ( $\text{HCl}$  quand  $\text{NaCl}$  était l'électrolyte). Pour chaque essai, le pH a été relevé avant l'étape de centrifugation. Le prélèvement du surnageant pour analyse s'effectue suivant le même protocole que pour les mesures d'isothermes d'adsorption.

## VI. MESURES ELECTROKINETIQUES

On sait qu'à proximité de surfaces chargées électriquement, une charge opposée se développe en solution ; les molécules d'eau s'orientent en rapport avec la charge dipolaire. Lorsque une particule solide en solution est soumise avec un champ électrique, cette double couche électrique se clive en deux zones distinctes avec les ions fortement liés à la surface qui accompagnent la particule lors de son mouvement dans le champ électrique tandis que les autres ions de la couche, faiblement liés, se séparent progressivement de la particule. Le plan délimitant ces deux zones s'appelle le plan de cisaillement et il est souvent considéré comme étant très proche du plan correspondant au début de la couche diffuse (plan externe de Helmholtz). Les mesures électrocinétiques permettent de déterminer la charge développée au niveau de ce plan (figure 17). Le potentiel à la surface de la particule n'est pas accessible par mesure directe et il doit être déduit de la mesure expérimentale du potentiel zêta.



**Figure 17: Modèle simplifié de la double couche à proximité d'une surface chargée.**

Ces propriétés électrocinétiques des surfaces de particules sont utilisées dans plusieurs techniques de mesures : potentiel d'écoulement, potentiel de sédimentation, électrosmose et électrophorèse (méthode utilisée ici).

### A. Principe des mesures

Lorsqu'elle est soumise à un champ électrique, une particule chargée se déplace vers l'électrode de charge opposée à une vitesse proportionnelle à sa charge électrique résiduelle, c'est-à-dire la charge existant au niveau du plan de cisaillement. La mesure de la vitesse d'une particule permet de déterminer sa mobilité électrophorétique  $u_E$  qui est définie comme étant le rapport entre la vitesse  $v$  de la particule et le champ électrique  $E$  appliqué :

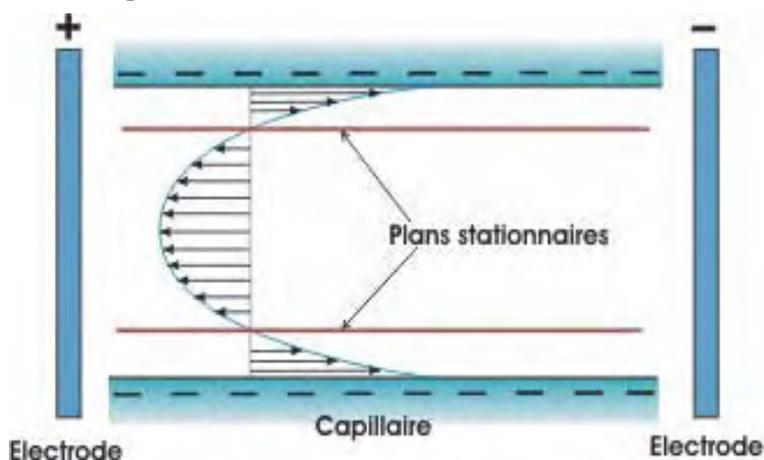
$$u_E = \frac{v_E}{E} \quad (\text{m.s}^{-1}.\text{V}^{-1})$$

La valeur de la mobilité électrophorétique est dépendante de la force ionique de la solution qui a pour effet de plus ou moins exprimer la double couche.

### B. Phénomène d'électrosmose

Les expériences de microélectrophorèse sont réalisées dans une cellule en quartz dont

les parois deviennent chargées lors de l'application d'un champ électrique. Du fait de cette charge, le fluide contenu à l'intérieur de la cellule entre en mouvement et entraîne une circulation du fluide dans toute la cellule suivant un profil parabolique (figure 18). Ce mouvement de fluide à l'intérieur de la cellule de mesure pourrait induire des erreurs lors du calcul de la mobilité électrophorétique des particules étudiées. Cependant il existe deux plans appelés plans stationnaires pour lesquels la vitesse de fluide est nulle. Afin de s'affranchir du phénomène d'électroosmose la mesure de la mobilité électrophorétique doit se faire au niveau de ces plans. Ainsi la mobilité mesurée est uniquement dépendante de la charge au niveau du plan de cisaillement de la particule.



**Figure 18: mouvement de fluide à l'intérieur de la cellule d'électroosmose.**

### C. Calcul du potentiel $\zeta$

La valeur du potentiel zêta est calculée à partir de la mobilité électrophorétique. Pour ce faire, on peut utiliser plusieurs équations qui ont des domaines de validité différents, notamment en fonction de la forme de la particule et de la double couche. La forme de cette dernière est fréquemment estimée à l'aide de la valeur «  $\kappa a$  » qui représente le rapport entre le rayon de courbure de la particule (souvent son rayon) et la longueur de Debye  $\kappa^{-1}$ , souvent assimilée à l'épaisseur de la double couche. Etant donné la forme particulière et la taille de nos diatomées, le potentiel zêta n'a pas été calculé et les résultats des expériences de microélectrophorèse ont été exprimés en mobilité électrophorétique.

## D. Protocole de mesure

La mesure de la mobilité électrophorétique est faite à partir de l'analyse des trajectoires des particules à l'aide d'un microscope et d'un logiciel d'analyses d'images. Les mesures de mobilité électrophorétique ont été réalisées avec un zétaphoremètre IV'' Z 4000 de la société CAD instrumentation. L'appareil est constitué d'un microscope optique muni d'un laser de 2mW He/Ne et surmonté d'une caméra vidéo CCD. Celle-ci est reliée à une unité centrale qui permet l'analyse des images des particules illuminées par le laser. La cellule de mesure est en quartz et munie d'électrodes en Pd à chaque extrémité. Un appareillage électronique permet d'imposer le champ électrique au niveau des deux électrodes. Le champ électrique créé est de 80 V/cm alternativement dans les deux directions.

### **1. Réglages préliminaires de l'appareil**

#### **a) Plan stationnaire/Electroosmose**

Lors de nos expériences, toutes les mesures ont été effectuées au niveau du plan stationnaire supérieur. Afin de pouvoir se positionner au niveau correspondant dans la cellule de mesure, une solution diluée de lait est introduite pour déterminer la position de la paroi supérieure du capillaire. Les lipoprotéines du lait ont tendance à se fixer sur les parois et sont parfaitement visibles par diffusion de la lumière du laser. Lorsque des molécules se sont fixées au niveau de la paroi, elles restent immobiles même lorsque est imposé un courant dans la cellule de mesure. La mise au point du microscope sur ces molécules immobiles, permet de déterminer la hauteur de la paroi supérieure grâce au capteur de hauteur situé sur la plateforme mobile. Une fois cette valeur entrée dans le logiciel de calibration, celui-ci donne par calcul géométrique la hauteur correspondante au plan stationnaire supérieur. La hauteur de la plateforme doit alors être alignée sur cette valeur.

#### **b) Calibration de la conductivité**

Lors des mesures de mobilité électrophorétique, la conductivité de la solution est aussi mesurée. L'étalonnage s'effectue en début d'expérience avec une solution de  $10^{-2}$  M de KCl.

### **2. Mesures de mobilité électrophorétique**

#### **a) Mesures en fonction du pH**

Les mesures de mobilité électrophorétiques ont été effectuées pour différentes forces ioniques et pH allant, respectivement, de 0.001 à 0.1 M NaCl et de 1 à 11. Le protocole de mesure est le même que dans le cas des titrages acido-basiques à temps de résidence courts. Le prélèvement de 3x8mL de suspension de diatomées est ajusté au pH souhaité par ajout de HNO<sub>3</sub> ou de NaOH sans modifier la force ionique de la solution. Le volume mort de la cellule et des tuyaux est de 8mL environ. Trois mesures ont effectuées pour chaque pH en renouvelant la solution pour chaque point de mesure. Les incertitudes sont données par la dispersion des points expérimentaux. Elles sont de 5% en moyenne, mais elles peuvent atteindre jusqu'à 20% à proximité du point isoélectrique.

### **b) Mesures avec exposition aux métaux**

Deux techniques sont utilisées pour mesurer le potentiel zêta en présence des métaux Pb et Zn: la mesure en continu et la mesure dans un réacteur à temps de résidence limité. Dans les deux cas, le pH est maintenu constant. Mesure en continu : Elle consiste à préparer une solution mère contenant 100 mL d'AMIN à 1g/L + NaNO<sub>3</sub> (8 mL à la concentration voulue) + HEPES (5,4 mL à 2,25 mmol/L) à laquelle des quantités de métal sont ajoutées successivement en maintenant le pH constant. Avec cette méthode, les cellules de diatomées restent jusqu'à 3 heures en contact avec le métal, ainsi, une partie de celui-ci peut pénétrer à l'intérieur de la cellule. Mesure dans un réacteur à temps de résidence limité: Elle consiste à préparer 400mL d'une suspension d'AMIN dans NaNO<sub>3</sub> à 0,01M + 21 mL de HEPES. 24,9 mL de cette solution sont prélevés dans un pilulier à laquelle est ajoutée la quantité choisie de métal. Cette solution est analysée par microélectrophorèse. Dans un autre pilulier est ensuite préparée une nouvelle solution avec une concentration en métal différente. Ce protocole est répété pour toutes les concentrations en métal investiguées. Ainsi, le temps d'exposition des diatomées au métal lors de chaque mesure n'est que de 5 minutes, ce qui ne permet pas la pénétration dans la cellule de quantités significatives de métal.

## VII. SPECTROSCOPIE DE PHOTOELECTRONS-X (ESCA OU XPS)

La spectroscopie des photoélectrons qui est aussi connue sous le nom d'ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analyses) est une méthode qui consiste à analyser l'énergie des photoélectrons émis par la surface d'un solide sous l'effet d'un faisceau incident de rayons X. L'analyse des photoélectrons peut être utilisée, entre autre, pour déterminer l'analyse chimique et le statut chimique des éléments de la surface ou de la sub-surface superficielle des solides (voir par exemple HOCELLA, (1988) pour une description détaillée de l'XPS). L'analyse est basée sur la relation fondamentale des photoélectrons (Rutherford, 1914) :

$$E_k = hv - E_b$$

dans laquelle  $E_k$  est l'énergie d'un photoélectron,  $hv$  l'énergie des photons incidents et  $E_b$  l'énergie avec laquelle le photoélectron était lié à son atome père. La mesure de  $E_k$  permet de remonter à la concentration chimique de l'atome père dans le solide analysé tandis que la détermination de  $E_b$  fournit des informations sur le statut et l'environnement chimique de cet atome. La profondeur d'analyse par XPS dépend uniquement de la distance qu'un électron, dans le domaine d'énergie des photoélectrons, peut parcourir sans subir de collision inélastique avec d'autres électrons. Cette distance est très faible, généralement inférieure à une centaine d'angströms, ce qui explique l'utilisation de l'XPS pour analyser les régions à proximité de la surface des solides. Appliqué traditionnellement à l'étude des surfaces inorganiques, elle fournit également des informations précieuses sur les surfaces biologiques. Contrairement à l'EXAFS et à l'IR elle permet d'analyser la seule paroi cellulaire.

### A. Précautions à l'utilisation de matériel organique

L'analyse par XPS s'effectuant sous vide, les échantillons biologiques doivent être lyophilisés avant leur analyse. Cette étape permet d'enlever l'eau des cellules (qui représente dix fois la masse des cellules de diatomées) afin d'éviter qu'elle ne dégrade la cellule quand elle passera de l'état liquide (pression ambiante) à gazeux (vide poussé). Ce traitement pose le problème de la représentativité des échantillons analysés sous forme lyophilisée

(MARSHALL et al., 1994), l'enlèvement de l'eau pouvant entraîner une modification de la structure de la paroi cellulaire. Durant l'exposition aux rayons X, l'éclatement de la cellule et la migration de composants intracellulaires peuvent être écartée mais la réorganisation des polymères de surface peut se produire (DENGIS et al., 1995) avec apparition de groupes C-(C,H) et disparition de groupes C-(O,N) par exemple. Afin de vérifier la fiabilité des résultats obtenus par cette méthode quelques études ont comparés les résultats obtenus par XPS avec ceux d'autres méthodes chimiques. Ainsi, les travaux de DUFRENE et al. (1997) sur les bactéries ont permis de vérifier que les résultats XPS sont en bon accord avec les analyses biochimiques de la surface de leur bactéries au niveau des protéines mais aussi corrélées avec les propriétés hydrophobes des surfaces considérant que celles-ci découlent directement de la proportion de lipides à la surface de la cellule.

Des dégradations significatives (9 % par heure pour un spot de 600 $\mu$ m de diamètre et pour le pic C1s) d'échantillons organiques (levures) ont été constatées après exposition aux rayons X. Dans le cas de temps d'accumulation longs, il est conseillé de déplacer l'échantillon pendant l'analyse afin d'éviter que le faisceau n'atteignent pas toujours l'échantillon au même endroit et ne le dégrade.

Finalement ce sont l'hétérogénéité d'un même échantillon et les opérations de lyophilisation et de séchage qui sont les principales sources d'incertitudes attachées aux données. Les contaminations induites par l'analyse XPS sont minimales (< 10%).

## B. Informations fournies par les analyses XPS

La spectroscopie XPS peut fournir trois types d'informations : 1) sur la nature des éléments présents à la surface des cellules, 2) sur leur structure (environnement chimique et état d'oxydation) et 3) sur une caractérisation quantitative des différents groupes.

### **1. Analyse qualitative**

Les configurations et énergies de chaque élément chimique étant uniques, le spectre des photoélectrons de chaque élément est lui aussi unique et il n'y a ainsi aucune ambiguïté dans l'identification par XPS de n'importe quel élément détectable. La limite de détection est généralement de 0.1% d'élément par rapport à l'ensemble de la surface de l'échantillon. De plus, en raison des sections efficaces relatives de photoionisation, le spectre XPS de la plupart

des éléments ne contient que 5 ou 6 pics intenses, ce qui limite les superpositions de pics dans le cas de matériaux ayant une composition complexe.

## 2. Structure et états d'oxydation

La position exacte d'un pic XPS est indicative de l'environnement chimique ou structural de l'élément ainsi que de son degré d'oxydation. Ceci permet donc d'utiliser l'XPS pour essayer de caractériser le statut chimique d'un élément à proximité de la surface d'un solide. Les déplacements des pics XPS d'un même élément dans différents composés atteignent généralement 1 à 3 eV mais peuvent être bien plus grands pour certains éléments. Par exemple le pic S<sub>2p<sub>3/2</sub>,1/2</sub> du soufre a une énergie de liaison respectivement de 160.5 eV dans la galène (PbS) et de 168.5 eV dans l'anglésite (PbSO<sub>4</sub>).

Par ailleurs il est difficile de mesurer des déplacements de pics s'ils sont inférieurs à environ 1/3 de la largeur du pic étudié. Des logiciels de déconvolution des pics permettent de reconnaître les différentes contributions à un pic brut.

## 3. Analyse quantitative

L'intensité des pics photoélectriques permet en principe de remonter directement à l'analyse semi quantitative ou quantitative de régions chimiquement homogènes à proximité de la surface d'un matériau (voir par exemple HOCELLA, (1988)). Cette analyse est particulièrement délicate dans le cas de matériaux biologiques lyophilisés. Il est possible, toutefois, d'utiliser l'intensité des pics ou leur aire comme paramètre analytique, par comparaison avec des étalons internes donnant le rapport signal/concentration. C'est ce que nous avons fait dans cette étude où les concentrations élémentaires ont été normalisées à celle du carbone à la surface du matériau étudié. Les résultats sont ainsi donnés sous forme de rapport élémentaire, par exemple C/N ou O/N.

## 4. Traitement des données

L'analyse XPS nous a permis de déterminer la contribution de chacun des grandes familles de molécules organiques présentes à la surface des cellules : les polysaccharides, les peptides et les lipides qui, chacune, présente des compositions C/N/O différentes. Par exemple, (DUFRENE et al., 1997) ont estimés les rapports élémentaires suivants pour les différentes classes de molécules, polysaccharides (PS), peptides (PE) et lipides (HC), de la

surface de bactéries Gram positives :

$$(N/C)_{\text{obs}} = 0.279 (C_{\text{PE}}/C)$$

$$(O/C)_{\text{obs}} = 0.325 (C_{\text{PE}}/C) + 0.833 (C_{\text{PS}}/C)$$

$$(C/C)_{\text{obs}} = (C_{\text{PE}}/C) + (C_{\text{PE}}/C) + (C_{\text{HC}}/C) = 1$$

Par résolution de ce système à 3 équations et 3 inconnues, il est possible d'obtenir la proportion des différents constituants de la paroi cellulaire des cellules si l'on connaît les rapports élémentaires mesurés par XPS.

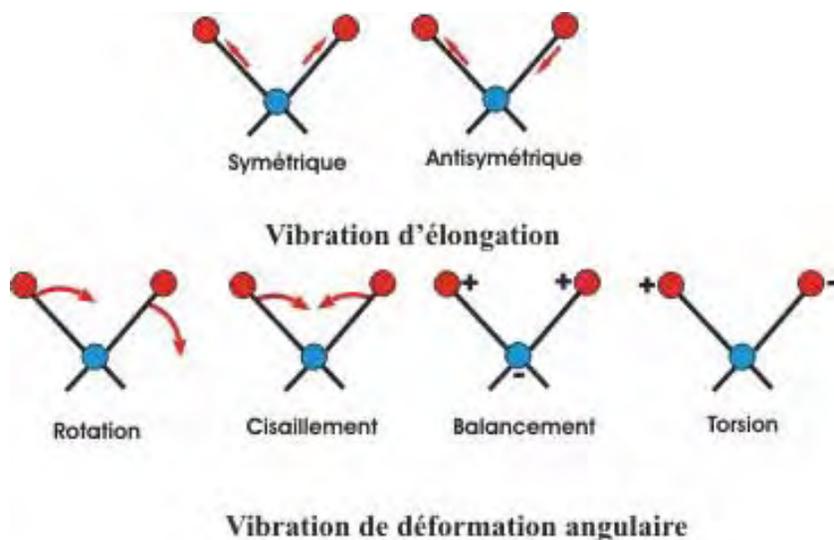
### C. Protocole utilisé

Afin d'évaluer le taux de contamination de nos échantillons, le sorbitol (un sucre de structure simple et bien connue) a été analysé suivant le protocole établi par DENGIS et al. (1995). Les diatomées AMIN et TW ont été séparées du surnageant, lavées dans une solution de NaNO<sub>3</sub> 0,01M (AMIN) ou NaCl 0.7M (TW), centrifugées et congelées à -20°C pendant une nuit. Elles ont ensuite été lyophilisées et rapidement analysées par XPS. Les analyses ont été faites sur un spectromètre ESCA VG 220i-XL avec des rayons X non monochromatiques Al K $\alpha$  ( $h\nu = 1486.6$  eV) et une énergie d'excitation de 200 Watts. Les rapports atomiques des éléments à la surface des diatomées ont été déterminés à partir de la mesure de la surface des pics Si<sub>2p</sub>, C<sub>1s</sub>, O<sub>1s</sub>, S<sub>2p</sub>, Cd<sub>3d5</sub>, N<sub>1s</sub> obtenus et des facteurs de sensibilité de Scofield.

## VIII. ANALYSES INFRAROUGES

### A. Principe de l'analyse

Les spectroscopies vibrationnelles comme la spectroscopie infrarouge impliquent l'utilisation de la lumière pour examiner le comportement vibrationnel des systèmes moléculaires, grâce à des expériences d'absorption ou de dispersion de la lumière. L'énergie vibrationnelle des molécules et des cristaux se situe approximativement dans le domaine d'énergie 0-60 kJ/mol, soit 0-5000  $\text{cm}^{-1}$  ce qui correspond à l'énergie de la lumière dans la région infrarouge du spectre. Une expérience d'absorption infrarouge consiste donc en l'absorption directe de lumière par les vibrations moléculaires. Cette technique concerne principalement les espèces moléculaires pour lesquelles il existe un moment dipolaire. Les liaisons chimiques animées d'un mouvement de vibration ou de rotation permettent de faire varier légèrement leur moment dipolaire, ce phénomène induit alors la création d'un champ variable qui peut interagir avec le champ électrique de l'onde infrarouge incidente (figure 19). Dans le cas où la fréquence de l'onde incidente est exactement égale à la fréquence de vibration ou de rotation de la molécule, un transfert d'énergie se produit avec pour effet une modification de l'amplitude de la vibration moléculaire et l'absorption de l'onde infrarouge. Les vibration permettant une analyse par infrarouge peuvent être classées en deux grandes catégories : les vibrations d'élongation et les vibrations de déformation angulaire.



**Figure 19 : Modes de vibration moléculaire. Le signe « + » signifie un mouvement vers le dessus de la feuille, le signe « - » un mouvement vers le dessous de la feuille.**

Les pics d'adsorption peuvent donc être associés à la présence de groupes structuraux particuliers dans l'échantillon. En ce qui concerne les molécules organiques ou biologiques, l'analyse IR présente l'avantage, par rapport aux autres techniques de ne perturber que très peu l'environnement chimique de la cellule en limitant les manipulations de l'échantillon et donc l'introduction de nouveaux artefacts (GIORDANO et al., 2001).

Dans notre travail l'analyse infrarouge a été utilisée pour caractériser d'un point de vue qualitatif les groupes organiques présents à la surface ou à l'intérieur des cellules de diatomées.

Au cours des mesures infrarouges sur les diatomées, plusieurs problèmes peuvent se présenter. La principale difficulté est, comme l'XPS, la représentativité des résultats analytiques obtenus sur des cellules séchées puisque la plupart des techniques d'analyse infrarouge se font avec un échantillon sec dilué dans une poudre de KBr. Certains dispositifs permettent l'analyse directe en solution mais il faut alors utiliser d'autres solvants que l'eau qui présente une forte absorption infrarouge. La seconde difficulté est plus spécifique à nos recherches puisqu'elle concerne la profondeur d'analyse durant les mesures. En effet, il est important de ne pouvoir analyser que la surface des diatomées et non pas les différents organites présents à l'intérieur de la cellule. Ainsi, trois techniques d'analyses ont été effectuées, toutes avec leur spécificité et leur profondeur d'analyse : en transmission (FT-IR), par mesure de la réflexion diffuse (DRIFT) et réflexion totale atténuée (ATR).

## B. Protocoles utilisés

Les mesures Infrarouges ont été effectuées en collaboration avec les chercheurs du Laboratoire d'Environnement et Minéralogie de l'INP de Nancy (J. Mielczarski et O. Barres).

### **1. Mesures en transmission (FT-IR)**

Ce genre d'appareillage, qui utilise un traitement par les transformées de Fourier permet d'obtenir un rapport signal/bruit environ dix fois supérieur à celui des appareils dispersifs, plus anciens. Avec ce dispositif le calcul des longueurs d'onde, effectué avec une grande précision, permet la comparaison de spectres, de plus la résolution est constante sur tout le domaine étudié. Les mesures avec les spectromètres à transformée de Fourier se caractérisent notamment par la présence d'un interféromètre (souvent de type Michelson)

remplaçant le monochromateur placé entre la source et l'échantillon. Dans cette étude, les mesures ont été effectuées avec un Bruker IFS88.

L'échantillon à analyser se présente sous la forme d'une pastille de KBr contenant les cellules séchées de diatomées. Le KBr a la propriété de fluer à froid lorsqu'il est soumis à une pression suffisante et de former une pastille transparente ou translucide. Etant un composé ionique, il n'absorbe par le rayonnement infrarouge.

Cette technique a été appliquée à la détermination de la composition chimique globale des diatomées. L'analyse portant sur la totalité des cellules, l'information obtenue concerne à la fois les groupements surfaciques, ceux qui nous intéressent, mais aussi sur les groupements présents à l'intérieur de la cellule, constitutifs des différents organites de la diatomée. Les données obtenues, si elles nous donnent une indication sur les groupes fonctionnels présents, ne permettent toutefois pas d'être directement exploitées dans notre étude et des techniques plus adaptées à l'analyse exclusive des surfaces sont nécessaires.

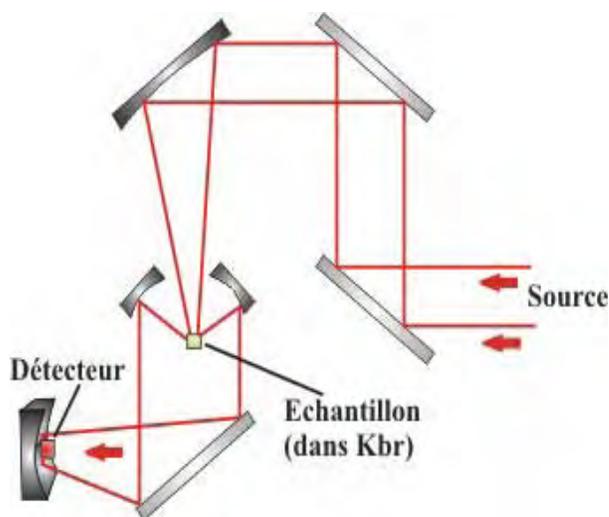
## **2. DRIFT (Réflexion diffuse)**

La spectrométrie infrarouge par transformée de Fourier à réflexion diffuse s'effectue sur un échantillon sous forme de poudre. L'utilisation des mesures de réflexion diffuse s'est généralisée à partir des années 1970 avec l'apparition des appareils à transformée de Fourier car le signal réfléchi par la poudre est très faible. La réflexion diffuse se produit lorsque le rayonnement frappe la surface d'une poudre finement divisée. En raison du grand nombre de grains et de l'orientation aléatoire de leurs surfaces, le rayonnement est réfléchi dans toutes les directions. Plusieurs modèles ont été développés pour tenter de décrire quantitativement l'intensité du rayonnement diffus réfléchi. Le modèle le plus utilisé est celui de Kubelka et Munk (KUBELKA, 1948).

Cette technique d'analyse consiste à collecter, au moyen de miroirs plans et elliptiques, une grande partie de la lumière diffusée par l'échantillon contenu dans une pastille de KBr en poudre.

Le seul rayonnement analysé étant celui réfléchi par la surface de l'échantillon (voir la figure 20), cette technique est ainsi mieux adaptée à la caractérisation des surfaces de diatomées que l'Infrarouge classique en transmission.

Les spectres ont été obtenus à l'aide d'un spectrophotomètre Bruker IFS88 équipé d'un détecteur MCT (Mercure Cadmium Tellurium) qui consiste en une cellule photoélectrique refroidie à l'azote. La chambre du spectrophotomètre est purgée à l'air sec sans CO<sub>2</sub>. Pour effectuer une mesure, un échantillon est prélevé dans la suspension de diatomées, puis les diatomées sont séparées par décantation et placées sur un filtre en papier afin d'enlever l'excès de solution. Ensuite, 50 mg des diatomées semi sèches ainsi obtenues sont mélangées à 350 mg de KBr et placées dans la chambre de mesure. Les spectres sont acquis avec une résolution de 4 cm<sup>-1</sup> dans la région de 4000 à 500 cm<sup>-1</sup>. Ils sont obtenus en faisant le rapport de la réflectance de l'échantillon à celle du système. On notera que les spectres sont automatiquement corrigés pour la présence éventuelle d'eau atmosphérique.



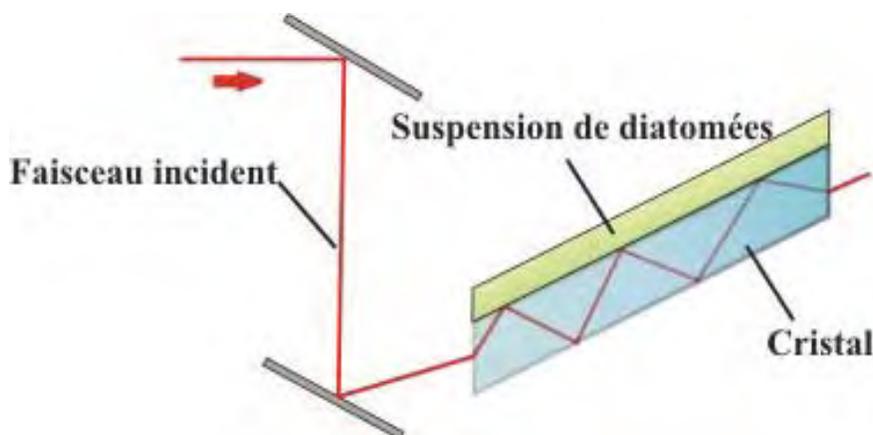
**Figure 20: Schéma de l'appareillage utilisé lors de mesures de réflexion diffuse**

### 3. ATR (Réflexion Totale Atténuée)

Cette méthode d'analyse est basée sur les propriétés de réflexion des ondes (ici Infrarouges) au passage d'une interface. A partir d'un angle particulier d'incidence la réflexion du rayonnement est totale. Au cours de ce phénomène, le rayonnement pénètre légèrement dans le milieu le moins dense avant que la réflexion ne se produise. La profondeur de pénétration dépend alors de trois facteurs : l'indice de réfraction des deux matériaux en présence, l'angle du faisceau incident et la longueur d'onde du rayonnement. Si le matériau du milieu le moins dense a des propriétés d'absorption en Infrarouge, on observe alors une atténuation du faisceau aux longueurs d'onde des pics d'absorption. Ce sont ces atténuations qui vont permettre d'établir le spectre Infrarouge du matériau le moins dense (figure 21).

Les spectres d'ATR ont été obtenus sur un appareil FT-IR Bruker IFS88 équipé d'un détecteur MCT (Mercure Cadmium Tellurium) à l'aide d'un module ATR. Le spectromètre est purgé avant les mesures avec de l'air sec sans CO<sub>2</sub> (filtre Balston) dans une pièce à environ 25°C. Les spectres ont été effectués avec une précision de 4 cm<sup>-1</sup> sur environ 200 accumulations dans la région d'infrarouge moyen : 4000-500 cm<sup>-1</sup>. L'unité d'intensité a été défini comme étant égale à  $-\log(R/R_0)$  où R et R<sub>0</sub> sont la réflectivité du système avec et sans échantillon respectivement. L'élément réflecteur est constitué d'un cristal de germanium ou de ZnSe avec un angle d'incidence de 45° par rapport à la chambre contenant la suspension de diatomées. Lors des analyses, le cristal est maintenu en contact direct avec la suspension de diatomées grâce à une chambre externe étanche. L'utilisation de deux réflecteurs différents pendant les mesures a permis de faire varier la profondeur de pénétration du rayon incident à la surface des diatomées : de 0.6 à 1.3 μm pour ZnSe et de 0.2 à 0.6 μm pour Ge. L'incertitude sur les profondeurs de pénétration est d'environ 30%.

L'avantage de cette méthode par rapport à l'Infrarouge classique est de permettre d'analyser seulement les premières centaines de nanomètres de la surface des diatomées vivantes: le spectre infrarouge n'est donc plus effectué sur la totalité de la diatomée mais seulement sur les groupements surfaciques organiques qui contrôlent les réactions acido-basiques et d'adsorption des métaux. De plus ces mesures peuvent être réalisées in situ sur une suspension de diatomées en solution. Les concentrations des suspensions de diatomées analysées dans ce travail étaient comprises entre 50 à 100ghumide/L. On notera que si la spectroscopie ATR a déjà été appliquée, dans plusieurs travaux, à l'étude des surfaces de bactéries, c'est la première fois qu'elle est appliquée aux diatomées.



**Figure 21 : Schéma de l'appareillage utilisé lors de mesures de réflexion totale atténuée**

### C. Informations fournies par les mesures Infrarouge

Actuellement de nouvelles applications techniques permettent l'identification de microorganismes avec une grande précision comme les observations par MET (microscopie électronique en transmission) couplées avec d'autres techniques (Gérard et al., 2005). Les mesures Infrarouge permettent elles aussi d'effectuer l'identification d'organismes comme les bactéries ou encore de différencier certaines espèces contenant une signature infrarouge particulière comme *Bacillus subtilis* (FILIP et al., 2004). Diverses structures, telles que les capsules polypeptidiques et les endospores, ont pu être identifiées par cette technique à la surface des bactéries *Bacillus* (HELM and NAUMANN, 1995).

Il est en théorie possible d'effectuer des mesures quantitatives en infrarouge mais en pratique divers problèmes se posent (écarts à la loi de Beer, recouvrement des pics d'adsorption).

Parmi les problèmes que l'on rencontre spécifiquement lors de l'analyse des diatomées, il est à noter que la bande correspondant à la silice peut parfois masquer les bandes de phosphates (notamment au niveau des acides nucléiques) et les bandes C-O des saccharides (autour de 1150 à 1000  $\text{cm}^{-1}$ ).

## IX. DETERMINATION DES RAPPORTS ISOTOPIQUES

Des expériences de fractionnement isotopique de  $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$  ont été effectuées sur des cellules vivantes et sur des frustules afin d'estimer la possibilité d'utilisation de ces rapports comme traceur des processus géochimiques.

Le zinc a cinq isotopes stable de masse 64, 66, 67, 68 et 70 pour lesquelles les abondances moyennes sont 48.63%, 27.90%, 4.10%, 18.75% et 0.62%, respectivement.

Trois types d'expériences ont été effectués pour déterminer les processus de fractionnement isotopique du zinc lors de son adsorption sur les diatomées :

1) Exposition à long terme pour pouvoir étudier l'effet de l'incorporation du métal à l'intérieur de la cellule. Ces expériences ont été effectuées dans le milieu nutritif Dauta sur des diatomées en culture pour les quatre espèces étudiées.

2) Exposition à court terme sur les AMIN et NMIN dans le milieu nutritif Dauta pour déterminer l'effet seul de l'adsorption (sans incorporation).

3) Exposition du Zn à des frustules de NMIN pour déterminer la participation de la silice aux processus de fractionnement. Cette étude a été effectuée en fonction du pH dans une solution de 0.01 M NaNO<sub>3</sub>. L'analyse isotopique a été effectuée sur des cellules entières dans le cas de l'expérience 1) et sur les solutions filtrées pour les expériences 2) et 3). De plus la filtration du surnageant dans les expériences 2) et 3) n'a pas affecté les coefficients de fractionnement puisqu'il a été vérifié que la filtration de la solution stock initiale n'a pas modifié le  $\delta^{66}\text{Zn}$  (avec une incertitude de  $\pm 0.05$  ‰). Cette vérification a été effectuée par a) ICP-MS, sur l'échantillon précédent après purification par colonne ionique ; et b) par AAS (absorption atomique), où  $100 \pm 1\%$  de  $[\text{Zn}]_{\text{aq}}$  ont été retrouvés dans les solutions standard filtrées à pH=6-7.

### A. Protocole d'attaque

Avant chaque analyse, les diatomées sont séparées du milieu nutritif ou du milieu d'expérience par centrifugation à 2500 g et séchées à 80°C. La totalité de la préparation est effectuée en salle blanche pour éviter les contaminations éventuelles en métaux.

Cent milligrammes de la poudre vert-brune obtenue subissent alors une attaque à l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + HNO<sub>3</sub>). Le milieu oxydant ainsi formé et porté à chaud (~70°C) a la propriété de détruire la quasi-totalité de la matière organique. Lorsque toute la matière organique a été dégradée, la suspension prend une teinte blanchâtre.

Afin de détruire le frustule en silice, une attaque acide (HNO<sub>3</sub> + HF) est ensuite réalisée. L'attaque est répétée jusqu'à dissolution complète des frustules. La totalité de la solution est alors laissée évaporée et le résidu obtenu est repris dans une solution concentrée de HNO<sub>3</sub>.

## B. Contamination

En parallèle à la préparation des échantillons, des tests de blancs ont été effectués pour déterminer le niveau de contamination au zinc inhérent au protocole utilisé. Il s'agit d'effectuer les mêmes manipulations que lors de la préparation. Ces tests ont indiqués que le niveau de contamination a toujours été inférieur à 0.2%.

Le géostandard international SRM 1515 (Apple Leaves, de NIST, USA) a été utilisé pour tester la validité et la reproductibilité de l'attaque acide et des analyses ICP-MS. La différence relative entre nos mesures et les valeurs certifiées ont été proches de 5%.

## C. Purification par colonne échangeuse d'ions

La purification est une étape nécessaire et préliminaire à la détermination des rapports isotopiques du zinc, du cuivre ou du fer. Elle permet de purifier l'échantillon et d'éviter ainsi les interférences pouvant se produire lors des mesures à L'ICP-MS. Cependant, les colonnes ioniques sont susceptibles d'induire un fractionnement en retenant préférentiellement certains isotopes (Marechal and Albarède, 2002). Afin de s'affranchir des incertitudes éventuelles provoquées par le passage des échantillons dans les colonnes, il est nécessaire de retrouver la totalité du zinc après les procédures de purification. Les rendements de colonne calculés sont proches de 100% (en incluant les incertitudes de mesures de l'ordre de 5%) pour la totalité des échantillons analysés.

Seul les échantillons ayant donné un rendement de 100%, en incluant les incertitudes de mesures, ont été analysés.

La purification a été effectuée sur la résine échangeuse d'ions AGMP-1(Bio-Rad, USA) en suivant le protocole de Maréchal et al. (1999). Un aliquot d'environ 300 ng de Zn est chargé sur la colonne contenant 1.6 mL de résine.

## D. Mesures

La composition isotopique en zinc a été mesurée à Lyon (Ecole Normale Supérieure) sur le P54 MC-ICP-MS (VG Elemental) (expérience 1)) et à Toulouse (LMTG) sur le

Neptune MC-ICP-MS (ThermoFinnigan) (expériences 2) et 3)).

Le signal de  $^{62}\text{Ni}$  a été déterminé simultanément aux mesures en zinc afin de pouvoir évaluer l'interférence isobarique provoquée par le  $^{64}\text{Ni}$  sur le signal de  $^{64}\text{Zn}$ .

Le fractionnement en masse de l'instrument a été corrigé suivant la méthode décrite par Maréchal et al. (1999). Dans chaque fraction de Zn purifié correspondant aux échantillons, un standard de Cu (NIST 976) a été ajouté de manière à avoir  $C_{\text{Cu}}/C_{\text{Zn}} \approx 1$  et une solution de Cu (NIST 976) et Zn (JMC 3-0749L), avec  $C_{\text{Cu}}/C_{\text{Zn}} \approx 1$ , a été utilisée comme standard de « bracketing ». La rapport des facteurs de fractionnement pour Cu et Zn ( $f_{\text{Cu}}/f_{\text{Zn}}$ ) est resté constant durant chaque session analytique à la fois pour les mesures réalisées sur P54 et sur Neptune. Cependant, comme mentionné par Maréchal et al. (1999) et Pichat et al. (2003) ce rapport ne reste pas constant d'un jour sur l'autre.

### E. Traitement des données

La pente de la droite de fractionnement pour la solution standard (Cu + Zn) dans un repère d'axes  $\ln(^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn})$  et  $\ln(^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu})$  a servi à corriger les données pour les échantillons de Zn additionnés du standard en Cu. Les résultats obtenus ont été présentés en notation delta pour les rapports  $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$  (Albarède et al., 2004):

$$\delta^{66}\text{Zn} = [((^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn})_s / (^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn})_{\text{JMC}}) - 1] * 1000 \text{ (en ‰)}$$

où  $s$  est l'échantillon et JMC le standard Zn JMC 3-0749L. Il est à signaler que la solution JMC 3-0749L n'est pas un matériel référencé mais une solution standard élémentaire utilisée dans de nombreux laboratoires.

Les  $\delta^{67}\text{Zn}$  et  $\delta^{68}\text{Zn}$  ont été calculés afin de vérifier la validité des mesures et l'alignement des différents isotopes du zinc sur une droite théorique de fractionnement dépendant de la masse. Les incertitudes de mesures pour  $\delta^{66}\text{Zn}$  sont comprises entre 0.05 et 0.10‰.

Les expériences 2) et 3) ayant été effectuées dans des systèmes fermés, la signature isotopique de la phase solide ( $\delta^{66}\text{Zn}_{\text{solide}}$ ) a été calculée à partir de l'équation de balance de

masse en utilisant le rapport isotopique mesuré pour la phase aqueuse ( $\delta^{66}\text{Zn}_{\text{aq}}$ ), le pourcentage de métal adsorbé sur les cellules ou les frustules (A, %) et la composition isotopique de la solution initiale ( $\delta^{66}\text{Zn}_{\text{initiale}}$ ) :

$$\delta^{66}\text{Zn}_{\text{solid}} = \{100 \cdot A - (100 - A) \cdot \delta^{66}\text{Zn}_{\text{aq}}\} / A$$

Le décalage isotopique entre le Zn en solution et le Zn adsorbé ou incorporé dans les cellules de diatomées ou les frustules a été défini suivant :

$$\Delta^{66}\text{Zn}(\text{solid-solution}) = \delta^{66}\text{Zn}_{\text{solid}} - \delta^{66}\text{Zn}_{\text{aq}}$$

Pour l'expérience 1), le décalage isotopique a été déterminé comme étant la différence entre le  $\delta^{66}\text{Zn}$  mesuré dans les cellules et celui du sel de zinc utilisé pour préparer le milieu nutritif.

## X. STRATEGIES DE MODELISATION

Il existe de nombreuses approches théoriques et semi-empiriques pour interpréter les données de titrage potentiométrique et d'adsorption métallique sur les surfaces biologiques. Par exemple, COX et al. (1999) utilisent, pour modéliser la charge de bactéries en fonction du pH, un modèle à cinq sites et à valeurs discrètes mais qui ne prend pas en compte les formes électrostatiques, appelé LPM (linear programming method) (BRASSARD et al., 1990); MARTINEZ et al. (2002) se servent du modèle de Donnan pour prendre en compte les interactions électrostatiques en utilisant des valeurs continues pour les constantes de protonation de groupes surfaciques (FOCUS : fully optimized continuous pKa distribution method) ; (XUE et al., 1988) ont couplé l'approche classique par les isothermes de Langmuir avec un modèle à capacitance constante pour décrire les interactions électrostatiques ; FEIN et al. (1997) décrivent leurs données de titrage potentiométrique à l'aide d'un modèle classique double couche à capacitance constante ; BORROK et al. (2004a) ont utilisé une approche très semblable sans prise en compte du terme électrostatique.

Tous ces travaux s'appuient sur deux grands types de modèles que l'on retrouve dans les études des surfaces des oxydes. Ce sont d'une part les modèles empiriques, qui généralement ne prennent pas en compte les interactions électrostatiques et ne sont

applicables qu'à des systèmes très spécifiques (pH, force ionique). D'autre part, ce sont des modèles thermodynamiques de complexation surfaciques qui décrivent de manière rigoureuse les processus de sorption sur les surfaces.

### A. Modèles non-électrostatiques

Ces modèles empiriques sont les modèles les plus simples. Ils sont caractérisés par une approche suivant des isothermes d'adsorption, c'est-à-dire que la quantité de métal adsorbé est représentée en fonction de sa concentration de métal en solution. Les plus simples (Langmuir) font l'hypothèse qu'il existe un seul type de site d'adsorption et de sorbant et ils permettent de déterminer la capacité maximale d'adsorption et la constante d'équilibre de la réaction d'adsorption (STUMM and MORGAN, 1996). D'autres approches existent pour prendre en compte les interactions latérales à la surface ou encore l'hétérogénéité des propriétés de la surface (isothermes de Frumkin ou de Freundlich, par exemple), Freundlich ou de simples coefficients de partage. De part leur nature empirique, l'application de ces modèles est restreinte aux conditions (pH, force ionique, électrolyte, par exemple) auxquelles les paramètres ont été déterminés. Aucune extrapolation des résultats n'est donc possible (DE LURDES et al., 1987). Cependant, leur utilisation est rapide et ne nécessite pas une compréhension approfondie du système étudié. C'est pourquoi ce type de modèle a longtemps dominé la caractérisation des propriétés d'adsorption de la biomasse, compte tenu de la complexité de l'étude des surfaces biologiques.

De plus, il faut noter que de nombreuses thématiques ne nécessitent pas une compréhension détaillée des processus d'adsorption. C'est le cas de la biorémédiation qui s'attache essentiellement à définir des capacités maximum d'adsorption en fonction de paramètres environnementaux peu variables et bien définis (par exemple, pH et force ionique des solutions plus ou moins fixes comme dans le cas d'effluents industriels). Devant les nombreuses applications de cette technique, il existe beaucoup d'études qui comparent les capacités d'adsorption de divers biosorbants (LEDIN et al., 1999; KLIMMEK et al., 2001).

Cependant, certains modèles empiriques permettent d'aboutir à une description convenable de milieux naturels bien définis. C'est, par exemple, le cas pour l'adsorption de  $Sr^{2+}$  sur les bactéries Gram négatives *Shewanella alga* et *Shewanella putrefaciens*, en présence et en absence d'oxydes de fer, qui a été modélisée suivant le formalisme de

Langmuir (SMALL et al., 1999). Dans les conditions de l'étude, ce modèle a permis de mettre en évidence une capacité d'adsorption des bactéries deux ordres de grandeur supérieure à celles des oxydes de fer. Certaines études ont complété les informations fournies par ces modèles empiriques avec des informations expérimentales supplémentaires comme, par exemple, la charge surfacique (HE and TEBO, 1998).

Enfin il existe des modèles d'isothermes qui permettent d'accéder à des informations précises. Par exemple, MIRIMANOFF and WILKINSON (2000) font la distinction entre les traitements de Langmuir qui prennent en compte la capacité totale maximale des ligands et ceux de Michaelis-Menten qui prennent en compte seulement les ligands spécifiques.

D'autres modèles non-électrostatiques, les modèles d'échanges ioniques, ont été utilisés pour décrire l'adsorption des métaux à la surface des algues (CRIST et al., 1988 ; CRIST et al., 1990 ; CRIST et al., 1992 ; CRIST et al., 1994) et bactéries. Ces modèles considèrent que pour un métal divalent adsorbé, deux charges positives doivent être libérées (deux H<sup>+</sup> ou deux Na<sup>+</sup>, par exemple). Ces modèles, par conséquent, considèrent pratiquement toujours la formation de complexes métalliques bidentates. Cependant plusieurs études récentes, grâce à la caractérisation de l'environnement chimique des métaux par spectroscopie d'absorption des RX (XAFS) ou la mise en œuvre de modèles de complexation surfacique, ont montré que ce sont des complexes monodendates qui sont le plus souvent formés. C'est pour cette raison que ces modèles d'échange ionique sont aujourd'hui peu utilisés.

### B. Modèles de complexation surfacique

Un modèle de complexation surfacique est un modèle thermodynamique qui applique le formalisme des réactions de complexation des ions en solution aux réactions d'adsorption sur les surfaces. L'adsorption des métaux sur les différents sites de surfaces inorganiques, organiques ou biologiques est décrite au moyen d'un ensemble de lois d'actions de masse et d'équations de conservation de la masse et des charges électriques. Ces modèles sont élaborés à partir d'expériences réalisées sous différentes conditions (variation du rapport surface/métal, du pH, de la force ionique). Puisqu'il s'agit d'une description thermodynamique de la surface (notamment dans la prise en compte de ses propriétés électrostatiques), ils permettent, à la différence des modèles de partage évoqués plus haut, de décrire l'état de la surface et de prédire la spéciation des éléments pour un grand nombre de conditions autre que celles

utilisées dans le laboratoire (par exemple force ionique ou électrolyte différents).

Afin de décrire les propriétés physico-chimiques des surfaces, il est nécessaire de déterminer un set de paramètres: la densité de sites surfaciques, leur constantes de protonation respectives, les constantes de complexation avec les métaux, les propriétés électrostatiques de l'interface.

Ce type de modèles a été appliqué avec succès à la description des surfaces de bactéries et de quelques types d'algues, bien que dans ce dernier cas il soit assez peu répandu. Cependant, plusieurs formalismes différents permettent de prendre en compte le paramètre électrostatique de la surface.

### **1. Prise en compte de la charge électrique de surface**

Les constantes de formation des complexes de surface sont dépendantes de la charge de surface du solide (répulsion et attraction par les groupes de surface chargés). Il est donc essentiel de pouvoir modéliser la charge électrique de surface qui se développe lorsqu'un solide est mis au contact d'un solvant polaire comme l'eau. Cette charge résulte le plus souvent de réactions chimiques (déprotonation de groupe fonctionnels en fonction du pH par exemple), d'imperfections de la surface pour des cristaux ou encore d'adsorption d'espèces hydrophobes. Cette charge électrique surfacique a pour effet d'influencer de manière importante la distribution des ions à proximité de l'interface solide-solution. Ainsi les ions de charge opposée (appelés contre-ions) de la solution sont attirés par la surface alors qu'à l'inverse les ions de même charge (co-ions) sont repoussés. Le potentiel électrique créé par la surface est alors compensé par les contre-ions de la solution. Ce phénomène, en association avec l'agitation thermique, conduit à la formation d'une double couche électrique. Différents modèles ont été successivement élaborés pour représenter la variation du potentiel électrique à proximité en fonction de la distance à l'interface. Nous décrivons ici les modèles pris en compte par le logiciel FITEQL :

- le modèle de HELMHOLTZ (1879) à capacité constante
- le modèle de GOUY-CHAPMAN (1910 et 1913) à couche diffuse
- le modèle de STERN (1924)
- le modèle de STERN-GRAHAME (1947) à triple couche

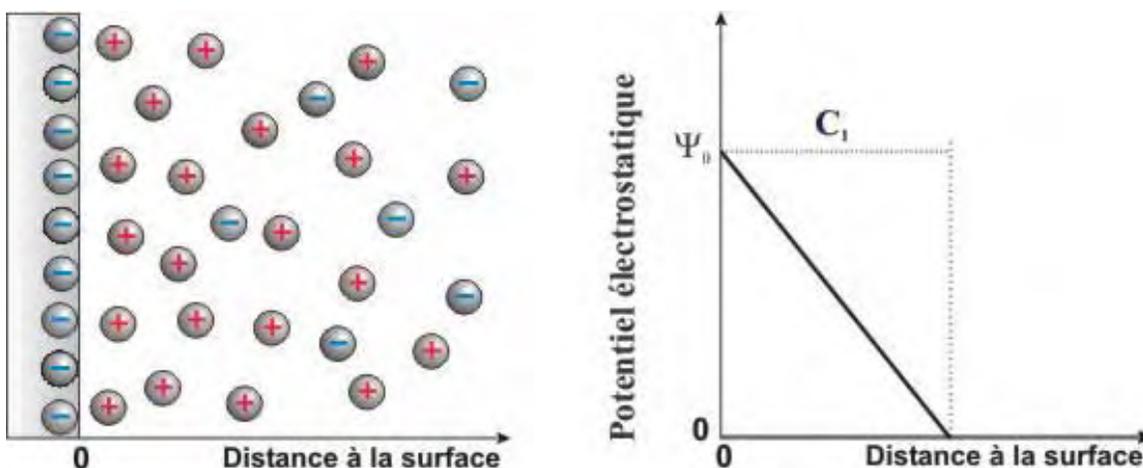
### a) Modèle à capacitance constante (CCM)

Il s'agit du modèle de description des surfaces le plus simple. Développé par Helmholtz à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, il est encore utilisé pour la description des surfaces au contact de solutions de force ionique élevée. Dans ce modèle, on admet que les ions ayant des charges opposées se trouvent dans une couche fixe à une distance déterminée de la surface. Le plan de la surface et le plan constitué par les contre-ions constituent alors un condensateur plan pour lequel le potentiel électrostatique diminue linéairement jusqu'à devenir nul suffisamment loin de la surface (figure 22). Plusieurs hypothèses sont faites dans ce modèle :

Dans le CCM, seuls les ions adsorbés en complexes de sphère interne sont pris en compte ; les ions comme  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  sont estimés inertes par rapport à la surface.

La relation entre la charge et le potentiel électrostatique de surface est donnée par :  $\sigma_0 = C_1 \cdot \Psi_0$  avec  $C_1$  la capacitance, en  $\text{Farad} \cdot \text{m}^{-2}$ , de l'interface surface-solution (souvent appelée double couche).

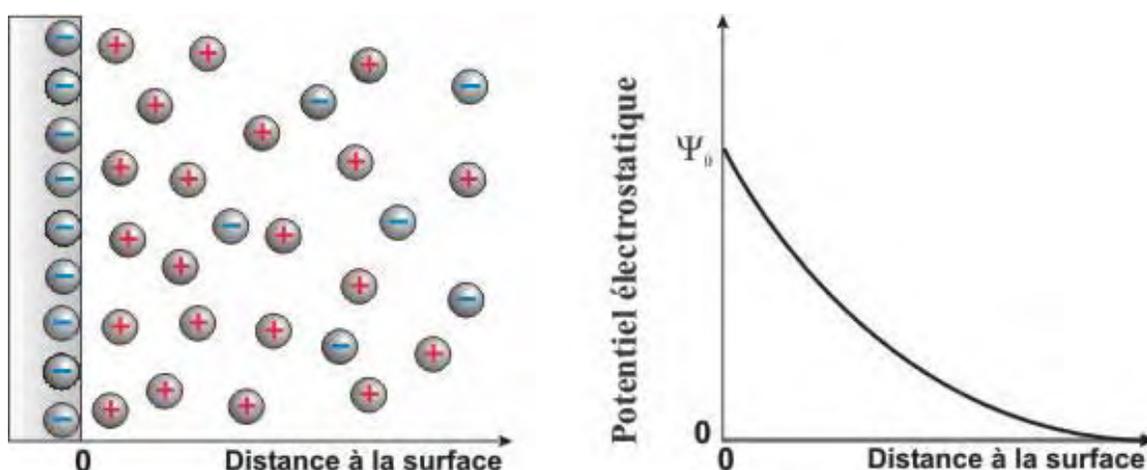
La capacitance est considérée constante pour un électrolyte de force ionique donnée. Ainsi les paramètres estimés à l'aide d'un CCM, notamment la valeur de la capacitance, ne sont valables que pour la force ionique utilisée, il s'agit de paramètres conditionnels.



**Figure 22 : Modèle à capacitance constante**

### b) Modèle à couche diffuse (DLM)

Ce modèle a été développé initialement par Gouy (1910) et Chapman (1913) et tient compte à la fois des forces électrostatiques et des mouvements thermiques des ions en solution. Il en résulte une distribution diffuse d'ions de charges opposées dans la double couche. Dans la couche diffuse, le potentiel  $\psi$  diminue de manière exponentielle jusqu'à la distance dite « longueur de Debye » à partir de laquelle  $\psi$  devient nul avec des concentrations en ions identiques à celles dans la masse de la solution (figure 23). L'équation de Poisson-Boltzmann permet de décrire cette décroissance du potentiel électrique en fonction de la distance à la surface. Dans ce modèle les ions sont considérés comme ponctuels et le solvant comme un continuum diélectrique, ce qui n'est pas toujours vérifié.



**Figure 23 : Modèle de Gouy-Chapman. Description de l'interface avec présence d'une « double couche ».**

La longueur de Debye (notée  $\kappa^{-1}$ ), dépend de la force ionique de la solution ; elle diminue lorsque la force ionique augmente (la compensation du potentiel de surface est plus rapide du fait d'une concentration de contre-ions aux abords de la surface plus importante).

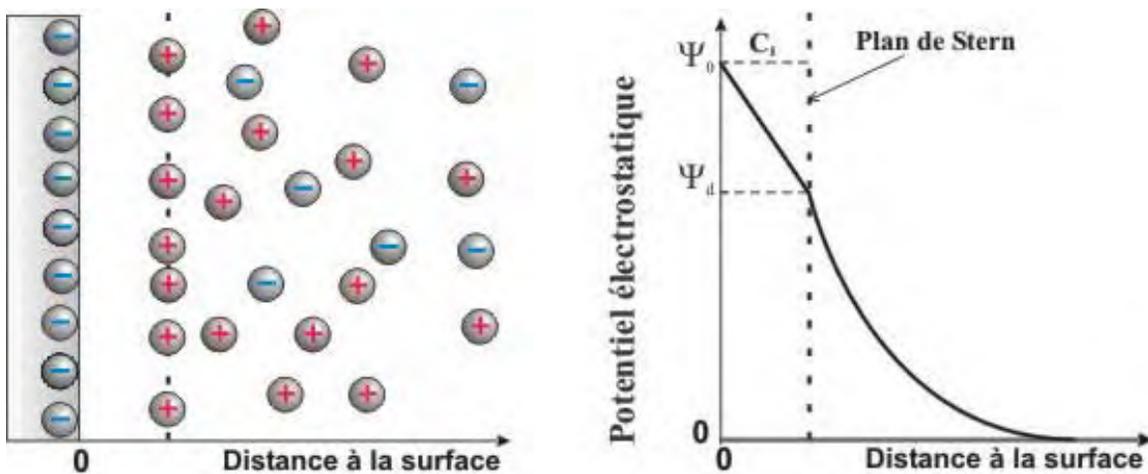
L'expression de la longueur réciproque de Debye est :

$$\kappa = \sqrt{\frac{\sum_i \rho_i^\infty e^2 z_i^2}{\epsilon \epsilon_0 kT}} \text{ en m}^{-1}$$

où  $\rho_i^\infty$  est la concentration en ions dans le réservoir et  $z_i$  est la charge de l'ion  $i$ .

### c) Modèle de Stern

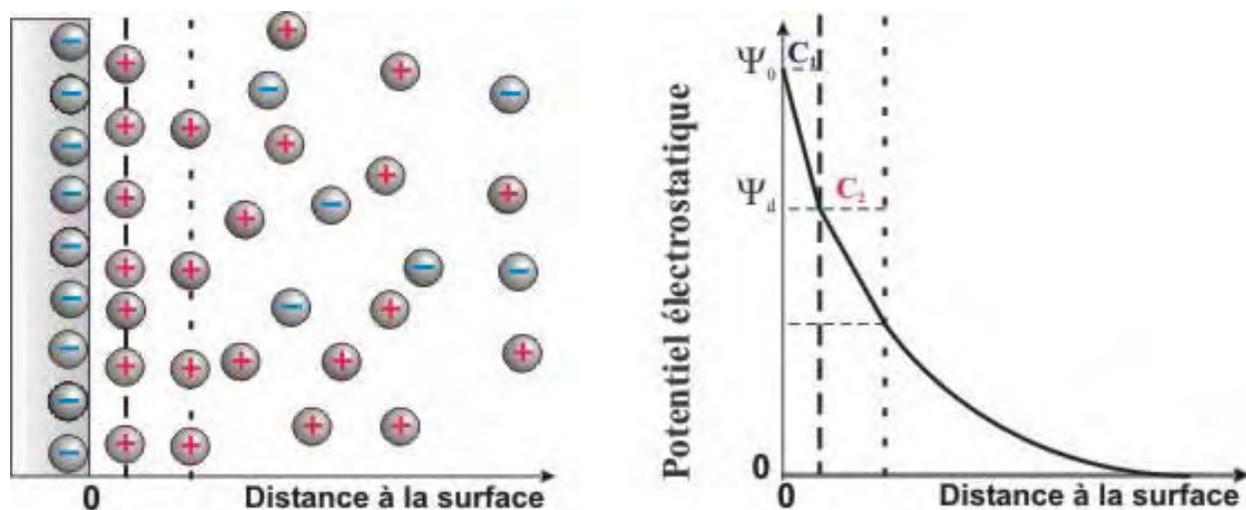
Le modèle de Gouy-Chapman fonctionne mal à proximité de la surface (faible valeur du produit  $\kappa \times$  distance) lorsque le potentiel de surface est fort. La concentration des ions près de la surface devient beaucoup trop grande parce que les ions sont considérés comme des charges ponctuelles. Pour résoudre ce problème, Stern, en 1924, a suggéré que la double couche soit divisée en deux parties (figure 24). La première couche est dite « compacte » et son épaisseur reflète la distance minimum d'approche des ions, ce qui permet de prendre en compte l'adsorption de ceux-ci à la surface (en complexes de sphère interne ou externe). Les ions dont le centre est situé en dehors de la couche de Stern constituent la couche diffuse. Le potentiel varie linéairement de  $\Psi_0$  à  $\Psi_d$  dans la couche de Stern, équivalent à un condensateur de capacité  $C_1$  comme dans le cas du modèle CCM, puis de  $\Psi_d$  à 0 dans la couche diffuse, de la même manière que le modèle de « couche diffuse » en remplaçant  $\Psi_0$  par  $\Psi_d$ . Ainsi, pour des forces ioniques faibles, le modèle de Stern correspond au DLM alors que pour des forces ioniques élevées il correspond au CCM. Contrairement au CCM, ce modèle est valable à différentes forces ioniques. Il faut noter que dans ce modèle  $H^+$  et  $OH^-$  sont incorporés dans le solide. Dans le cas où aucune adsorption d'ions sur la surface ne se produit, la densité de charge sur le plan de Stern et à la surface sont égales.



**Figure 24 : Modèle de Stern dans le cas d'une adsorption d'ions à la surface. Il existe une première couche compacte jouant le rôle d'un condensateur de capacité  $C_1$  et une couche diffuse comme dans le modèle de Gouy-Chapman.**

#### d) Modèle à triple couche

Ce modèle, développé en 1947, divise la couche de Stern en deux parties (figure 25). La première se situe entre la surface et le plan interne de Helmholtz (IHP) et représente les ions adsorbés sous forme de complexes de sphère interne, c'est-à-dire fortement lié à la surface avec perte partielle ou totale de leur sphère d'hydratation. La seconde est localisée entre le plan interne de Helmholtz et le plan externe de Helmholtz (plan de Stern) et prend en considération les ions adsorbés sous forme de complexe de sphère externe. Les couches ainsi décrites se comportent chacune comme un condensateur de capacité  $C_1$  et  $C_2$ . Après le plan de Stern le potentiel électrostatique décroît suivant les propriétés de la couche diffuse.



**Figure 25 : Modèle « triple couche ». Description de l'interface avec présence de deux condensateurs de capacité  $C_1$  (complexes de sphère interne) et  $C_2$  (complexes de sphère externe) associé à une couche diffuse.**

## 2. Valeurs discrètes et valeurs continues des constantes de dissociation surfacique

Les titrages acido-basiques des surfaces biologiques peuvent être interprétés dans le cadre de deux formalismes différents, celui appliqué aux oxydes qui considère des valeurs discrètes des constantes de protonation / déprotonation et celui qui suppose une variation continue de ces constantes et leur distribution sous la forme d'une gaussienne.

### a) Valeurs discrètes

Cette méthode, la plus couramment utilisée, consiste à considérer l'existence à la

surface d'un nombre fini de différents groupes fonctionnels et d'affecter à chacun des valeurs propres de leur constantes de protonation / déprotonation caractéristiques de leur structure (électronégativité des atomes, influence des fonctions voisines, encombrement stérique). DAUGHNEY et al. (1998) ont montré que pour deux espèces de bactéries Gram positives (*Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis*) les groupement carboxyliques sont suffisamment éloignés les uns des autres pour ne pas avoir d'influence de déprotonation d'un site par rapport à un autre. Cela signifie, par exemple, que pour une surface biologique donnée, une seule valeur est nécessaire pour décrire l'hydrolyse des groupes carboxyliques dans l'hypothèse où ils sont tous équivalents chimiquement.

### **b) Valeurs continues**

Une approche différente, d'abord utilisée pour les acides humiques, consiste à considérer que les valeurs des constantes de protonation des groupes fonctionnels dépendent de leur environnement. Une illustration simple de ce processus peut être fournie par les valeurs différentes des constantes de dissociation des fonctions carboxyliques de l'acide citrique. Deux des trois groupes carboxyliques sont équivalents (même environnement chimique) mais ils présentent deux constantes de protonation différentes. Il s'agit dans ce cas de la déprotonation du *premier groupe* carboxylique (premier  $pK_a$ ) et ensuite du *second groupe* (second  $pK_a$ ). Ce phénomène s'explique par un changement dans les propriétés électro-donneuses (donneuses d'électrons) du premier groupe carboxylique lorsqu'il se déprotone ; la charge négative localisée sur son oxygène déprotoné va influencer la structure électronique du second groupe carboxylique par effet donneur d'électrons, et celui-ci aura tendance à être déprotoné à plus haut pH. Pour modéliser ces influences relatives dans une molécule beaucoup plus complexe comme un acide humique, on peut envisager l'existence d'un continuum de  $pK_a$  répartis autour d'un  $pK_a$  central. MARTINEZ et al. (2002) ont utilisés cette approche pour mettre en évidence les sites surfaciques de protonation pour deux espèces de bactéries.

## **C. Modèle utilisé dans ce travail**

### **1. Choix du modèle**

Afin de décrire rigoureusement les interactions entre les surfaces des diatomées et les métaux, les données expérimentales ont été modélisées suivant un modèle de complexation

■ surfacique avec prise en compte des interactions électrostatiques suivant le formalisme de la double couche à capacitance constante. Ce type de modèle a été appliqué avec succès à la description des surfaces de bactéries (FEIN et al., 1997 ; DAUGHNEY et al., 1998) et présente l'avantage d'être simple et réaliste.

Les modèles électrostatiques décrits précédemment s'appliquent à des surfaces planes comme c'est le cas pour les oxydes. Comme nous l'avons vu précédemment la paroi cellulaire des diatomées ne peut pas être considérée comme une surface plane ; il s'agit plutôt d'un arrangement tridimensionnel des multiples constituants organiques recouvrant un frustule siliceux. Aussi, l'application de ces modèles électrostatiques aux surfaces de diatomées doit être fait avec la plus grande prudence, comme cela a été suggéré pour les surfaces de bactéries (POORTINGA et al., 2002). Les modèles les plus complexes ne décrivent pas forcément mieux le potentiel surfacique des microorganismes et leur utilisation n'est donc pas justifiée. Ainsi, DAUGHNEY et FEIN (1998a) ont montré que le modèle à capacitance constante produit des meilleurs résultats que le modèle de Stern pour l'adsorption des métaux sur les bactéries. Afin de prendre en compte l'épaisseur de la surface chez les microorganismes, certains groupes ont tentés d'appliquer le modèle Donnan aux surfaces biologiques (YEE et al., 2004 ; SCHIEWER and WONG, 2000 ; PLETTE et al., 1995 ; MARTINEZ et al., 2002). Dans ce type de modèle la paroi cellulaire est assimilée à un volume poreux pour les ions. La déprotonation des groupes fonctionnels de la paroi cellulaire induit alors un potentiel électrique qui se développe à travers la membrane jusqu'à l'interface et qui peut être calculé à l'aide du modèle de Donnan.

La théorie du modèle de Donnan a été développée pour les gels qui sont des milieux très perméables aux ions. Elle a ensuite été appliquée avec succès à la quantification du potentiel de surface des acides fulviques et humiques. Cependant, les microorganismes ont une paroi cellulaire qui n'est pas aussi perméable aux ions que dans le cas des gels, avec des couches organiques qui sont souvent assez bien organisées et qui contiennent des polymères denses chez les algues (DAVIS et al., 2003) comme chez les bactéries, avec le peptidoglycane. Le modèle de Donnan semble donc difficilement applicable à la majorité des surfaces biologiques, c'est la raison pour laquelle nous ne l'avons pas choisi pour décrire le potentiel de surface des diatomées.

## 2. Le logiciel FITEQL

Nous avons utilisé le logiciel FITEQL de la complexation surfacique comme outil de modélisation dans le cadre des interactions entre les métaux et les surfaces des diatomées.

Ce type de logiciel permet de placer des contraintes quantitatives sur la densité de site et les valeurs des constantes de protonation, puisque ces valeurs sont introduites comme paramètres. Il permet donc de déterminer, en fonction du pH, la proportion de sites surfaciques déprotonés et ainsi, de déterminer la quantité de sites impliqués dans l'adsorption des métaux à un pH donné. Les constantes de protonation et de stabilité des complexes métalliques sont considérées comme étant des valeurs discrètes.

Ainsi, la déprotonation d'un acide s'effectue suivant :



L'association avec un métal  $\text{Me}^{m+}$  se fait sur un site déprotoné suivant la réaction :



avec x et y qui représentent les coefficients stoechiométriques. Le modèle peut prendre en compte tous les groupes fonctionnels qui sont impliqués dans la complexation d'un métal. L'influence du potentiel électrique sur les coefficients d'activité des espèces surfaciques est décrit par la relation :

$$\mathbf{K} = \mathbf{K}_{\text{Intrinsic}} \exp(-\Delta Z F \Psi / RT)$$

où F et R sont les constantes de Faraday et des gaz parfaits, T est la température absolue,  $K_{\text{Intrinsic}}$  est la constante d'équilibre de la réaction considérée ramenée à une charge surfacique nulle, K est la constante d'équilibre apparente de la même réaction,  $\Psi$  est le potentiel électrique de la surface de la bactérie, et  $\Delta Z$  est le changement de la charge des espèces de surface pour la réaction considérée. Les coefficients d'activité des espèces chargées en solution sont calculés à l'aide de l'équation de Davis.

Une des conditions nécessaires à l'application du modèle de complexation surfacique est la réversibilité des réactions (1) et (2). Cette réversibilité a été démontrée par plusieurs études portant sur les systèmes métaux-bactéries (DAUGHNEY and FEIN, 1998a ;

DAUGHNEY et al., 1998 ; FOWLE and FEIN, 2000). Elle doit cependant être vérifiée au cas par cas en fonction de l'espèce biologique considérée, de l'élément chimique utilisé et des conditions expérimentales (la lumière, par exemple, peut induire des processus métaboliques chez les cellules photosynthétiques).

FOWLE and FEIN (1999) ont montré que les paramètres utilisés lors de la modélisation de l'adsorption d'un seul métal et sur une seule espèce de bactéries pouvaient être appliqués directement à des systèmes contenant plusieurs types de métaux et de bactéries. Cela illustre le fait que les paramètres d'un modèle de complexation surfacique sont en théorie applicables à des systèmes plus complexes.

### **3. Procédure de modélisation utilisée**

Le logiciel FITEQL permet d'ajuster les paramètres de modélisation par itérations successives. Pour cela, il cherche la solution mathématique qui minimise la distance pondérée entre valeurs calculées et données expérimentales. Lorsque le logiciel trouve une valeur qui réponds à ce critère on dit que le modèle converge. Les paramètres autorisés à varier, c'est-à-dire ajustables par le logiciel, sont les concentrations de sites et les valeurs des constantes thermodynamiques. En revanche, FITEQL ne permet pas de fitter la capacitance de la surface.

Certains problèmes peuvent survenir lors de la procédure de fittage : - Il peut arriver que le code converge « trop tôt », au niveau d'un minimum local. Il donnera alors un résultat qui ne correspondra pas aux paramètres réels du système étudié. C'est pourquoi il faut comparer entre eux les résultats des modélisations relatives à un même type de matériel (la même espèce de diatomées par exemple), nous reviendrons ultérieurement sur ce point. Dans la mesure du possible, il faut choisir différents paramètres à ajuster de manière alternative pour un même lot de données à modéliser ; quand un paramètre présente un minimum local, cela n'implique pas forcément que les autres paramètres du système aient des minimums locaux dans la même zone.

En général, le logiciel peut difficilement ajuster simultanément un grand nombre de paramètres (le nombre maximum est généralement de 4). Lorsque l'ajustement simultané de tous les paramètres n'est pas possible, il faut alterner et, si possible, commencer par fixer les

paramètres dont on connaît approximativement la valeur vraie.

Lors de cette étude, chaque set de donnée, correspondant à des conditions particulières de force ionique ou de concentration en métal par exemple, a été modélisé séparément. Il n'a pas été utilisé de « master curve » qui regroupe les différentes données à modéliser au sein d'une courbe unique, moyenne de toutes les autres. Les mêmes données expérimentales peuvent être décrites par différents sets de paramètres dont un seul est correct. Normalement, si les paramètres d'un modèle sont corrects (densités de sites, constantes d'équilibre, capacitance), ce set de paramètres doit être applicable à toutes les expériences impliquant le même matériel. La comparaison des valeurs des différents paramètres de modélisation générées pour toutes les expériences effectuées sur un même matériel permet de détecter les résultats de modélisation ou d'expérimentation anormaux. C'est l'avantage conféré par la modélisation séparée des courbes par rapport à l'approche utilisant la « master curve ».

Dans cette étude, à cause de la complexité de notre système, deux paramètres au maximum ont été fittés à la fois. Dans certains cas le modèle n'est pas autorisé à fitter s'il donne des valeurs aberrantes des paramètres. La modélisation est alors effectuée sans ajustement de paramètres par le logiciel. Ceux-ci sont modifiés manuellement au niveau des paramètres d'entrée jusqu'à obtenir une bonne correspondance entre données expérimentales et valeurs calculées. C'est le protocole que nous avons adopté lors de la modélisation des données de titrage potentiométrique. Ensuite les sets de paramètres corrects pour chaque expérience de sorption sont regroupés et les valeurs correspondant à des conditions expérimentales proches (même espèce de diatomée dans notre cas) sont comparées. Les valeurs de densité de sites et de capacitance de la double couche, une fois normalisées par rapport à la concentration en diatomées, ainsi que les constantes d'équilibres, doivent être assez proches d'une expérience à l'autre. Les modélisations aboutissant à des valeurs ayant des paramètres trop éloignés de la moyenne sont alors recommencées. Cela permet d'éviter les artefacts comme la convergence autour d'un minimum local.

L'estimation de la qualité de la modélisation est effectuée par le logiciel à la fin de chaque procédure de fittage. Un calcul de distance pondéré par le nombre de composants chimiques pour lesquels la concentration est connue, le nombre de points expérimentaux et le nombre de paramètres ajustables permet de déterminer la valeur de  $V(Y)$ . En général, une valeur de  $V(Y)$  inférieure à 20 correspond à un bon fit (HERBELIN and WESTALL, 1996).

Cependant, certains auteurs préfèrent juger graphiquement de la qualité de leur fit plutôt que d'utiliser un calcul numérique (GUNNERIUSSON and SJOBERG, 1993). Ceci est justifié par le fait qu'une bonne correspondance graphique, donc un bon fit puisse dans certains cas (par exemple, à cause de la présence de points aberrants) donner un  $V(Y)$  élevé et, qu'à l'inverse, un  $V(Y)$  bas n'implique pas forcément une bonne correspondance entre données expérimentales et valeurs modélisées.

#### 4. Sensibilité du modèle aux valeurs des paramètres

Ce paragraphe a pour but d'illustrer la sensibilité des résultats de la modélisation aux valeurs des différents paramètres d'entrée. Pour cela, les données expérimentales correspondant à l'adsorption de Zn en fonction du pH ou à ses isothermes de Langmuir sur les diatomées AMIN ont été comparées aux résultats de modélisation. Les valeurs de chaque paramètre important (capacitance, nombre de sites carboxyliques, la constante de stabilité des complexes carboxyl- $Zn^+$ , silanol- $Zn^+$  et carboxyl-Na) ont été modifiées successivement, un seul paramètre variant à la fois avec tous les autres paramètres fixés. Le logiciel FITEQL a été utilisé pour calculer la spéciation du zinc à chaque nouveau set de paramètres. Les résultats sont représentés sur les figures 26 et 27.

La dispersion des courbes est importante dans le cas de la variation de la capacitance, (mais avec une large gamme de valeurs choisie comprises entre 1 et 62 qui correspond aux écarts maximum que nous avons rencontrés lors de notre étude pour une même espèce), et du nombre de sites carboxyliques. Le modèle est moins sensible aux valeurs de  $\log KCOOZn$  et  $\log KCOONa$  et pas du tout aux valeurs de  $\log KSiOZn$ .

Ces représentations permettent de faire une première estimation des gammes de valeurs des paramètres qui permet de décrire correctement la courbe expérimentale. Ces gammes de valeurs des différents paramètres corrects pour l'exemple considéré sont compilées dans le tableau 5.

Paramètre :	Capacitance	Densité de sites >COOH	log $K_{COOZn}$	log $K_{SiOZn}$	log $K_{COONa}$
Largeur de la gamme de valeurs correctes (estimée):	12±3 F/g	39±2 μmol/g	5.05±0.1	ND	1.25±0.1

Tableau 5 : Estimation des gammes de valeurs correctes dans l'exemple étudié.

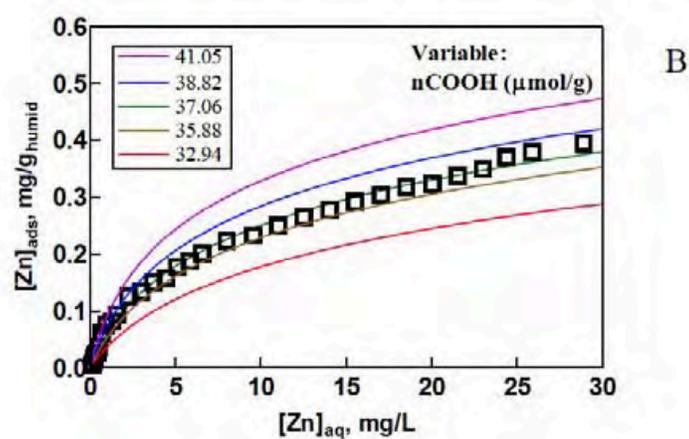
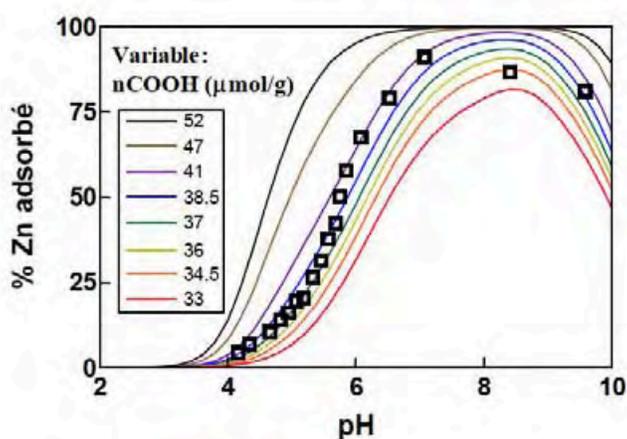
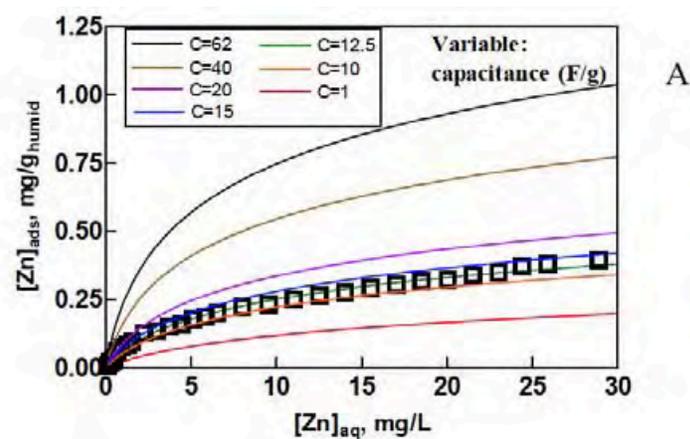
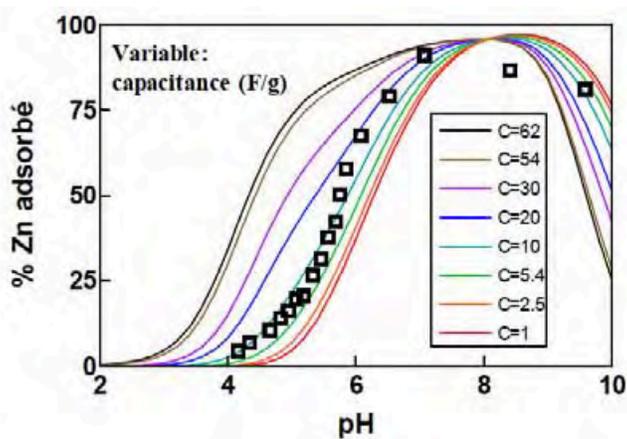


Figure 26 : Sensibilité du modèles aux paramètres : A) capacitance et B) densité de sites carboxyliques

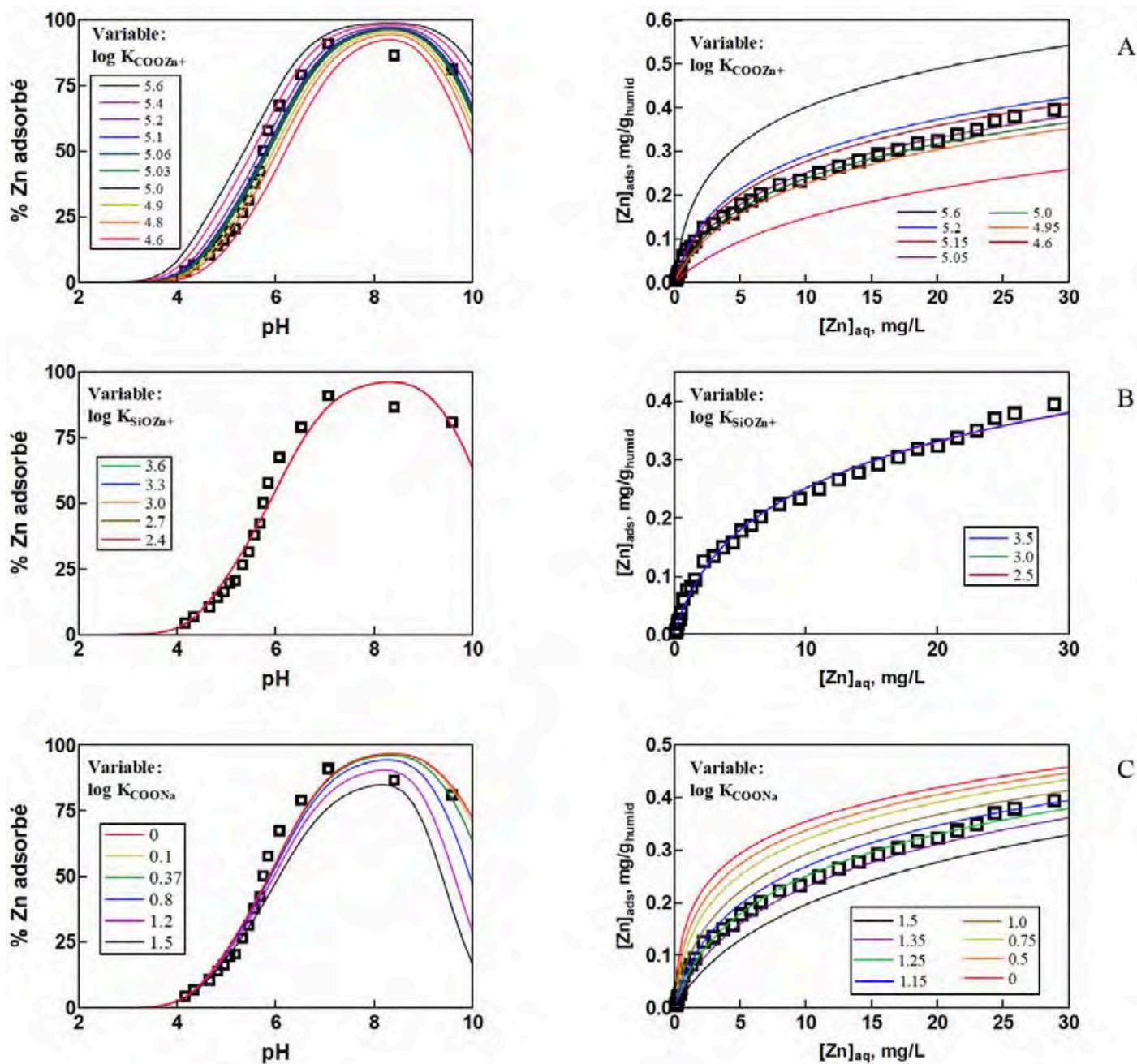


Figure 27 : Sensibilité du modèles aux paramètres : A)  $\log K_{\text{COOZn}^+}$  ; B)  $\log K_{\text{SiOZn}^+}$  et C)  $\log K_{\text{COONa}}$ .

CHAPITRE 4  
CARACTERISATION PHYSICO-  
CHIMIQUE DES SURFACES DE  
DIATOMEES

## I. INTRODUCTION

La prise en compte de la biomasse dans la description de nombreux milieux naturels, ainsi que ses implications dans les processus de dépollution, ont suscité de nombreuses études consacrées à la caractérisation des interactions entre les surfaces d'organismes biologiques et de nombreuses espèces chimiques comme les métaux ou divers polluants organiques. La description rigoureuse de ces interactions exige une connaissance précise des caractéristiques physico-chimiques des surfaces investiguées. De nombreux travaux y ont été consacrés, dont la majeure partie traite des surfaces des bactéries. Au cours de ces études, différentes techniques traditionnellement appliquées aux surfaces inorganiques, comme les oxydes, ont été mises en œuvre : titrage acido-basiques, mesures électrocinétiques, essais d'adsorption des métaux ou analyses chimiques de parois cellulaires, accompagnés de plusieurs types d'analyses spectroscopiques telles que la spectroscopie Infrarouge ATR, la microscopie électronique en transmission, la résonance magnétique nucléaire (RMN), la microscopie à force atomique (EFM et AFM), la spectroscopie des photoélectrons (XPS) et la spectroscopie d'adsorption des RX (XAFS).

Cependant, une telle approche physico-chimique n'a jamais été appliquée à l'étude des diatomées. L'essentiel des travaux consacrés aux diatomées concernaient la biodisponibilité des métaux (Cd, Cu, Zn, Pb, Fe, Mn, Co, Ni), les phénomènes de compétition et de substitution lors de l'incorporation des métaux et leur influence sur la croissance des populations. Seules quelques études physico-chimiques macroscopiques, effectuées sur les diatomées et les algues marines, ont mis en évidence l'importance de la spéciation des métaux en solution pour leur incorporation dans les cellules vivantes, ainsi que les rôles de plusieurs groupes surfaciques (par exemple les groupes carboxyles et amines) caractérisés par titration et adsorption de métaux sur des diatomées planctoniques.

Dans ce travail, nous avons effectué une caractérisation physico-chimique de la surface de quatre espèces de diatomées afin d'élaborer un modèle thermodynamique qui puisse servir de base à des études ultérieures décrivant les interactions diatomées-métaux. Pour ce faire, nous avons tenté, pour la première fois, de combiner plusieurs méthodes macro et microscopiques, chacune avec ses spécificités, et nous avons recoupé les différentes informations obtenues en vue d'élaborer un modèle physico-chimique rigoureux de l'interface diatomées-solution.

## II. RESUME EN FRANÇAIS DE L'ARTICLE : "STUDY OF DIATOM/AQUEOUS SOLUTION INTERFACE. I. ACID-BASE EQUILIBRIA AND SPECTROSCOPIC OBSERVATION OF FRESHWATER AND MARINE SPECIES"

Comme nous l'avons vu, de nombreux travaux ont mis en œuvre différentes techniques pour caractériser les surfaces organiques. Cependant, peu d'entre eux se sont attachés à confronter et intégrer les différents types d'informations obtenus en vue d'une description plus précise et rigoureuse des interfaces étudiées.

L'originalité de l'approche utilisée dans ce travail réside dans le fait qu'elle combine plusieurs techniques de caractérisation différentes, tant macroscopiques que microscopiques, analytiques ou spectroscopiques, en vue d'obtenir plusieurs niveaux d'informations pour la description de la surface des diatomées. Une description rigoureuse des paramètres physiques pour les quatre espèces étudiées (forme, taille de la surface spécifique, poids sec, poids humide) a été préalablement effectuée ainsi qu'une caractérisation spectroscopique de leur surface à l'aide des techniques Infrarouge et XPS. En parallèle, des mesures macroscopiques de titration acido-basiques et de mobilité électrophorétique ont servi à déterminer les paramètres thermodynamiques des groupes chimiques présents à la surface des diatomées. Enfin, les informations obtenues ont ensuite été compilées et confrontées en vue de l'élaboration d'un modèle de complexation surfacique à l'aide du logiciel FITEQL3.2.

### A. Observations spectroscopiques

Les observations spectroscopiques ont été effectuées par mise en œuvre des spectroscopies ESCA et Infrarouge. Elles ont permis l'identification et, dans une certaine mesure, la quantification des principales structures organiques présentes à la surface des diatomées.

Les mesures de spectroscopie Infrarouge ont été effectuées suivant trois protocoles différents : FT-IR classique, DRIFT et ATR. A fin d'illustration, les spectres DRIFT de trois espèces de diatomées et d'un frustule sont représentés sur la figure 28. Elle permet l'identification des zones des spectres correspondant aux différents groupes fonctionnels

déTECTÉS par cette technique.

Les mesures Infrarouges effectuées suivant le protocole ATR fournissent les résultats les plus précis pour la description des interfaces biologiques. Ils ont permis de mettre en évidence, à la surface des diatomées, des fonctions carboxyliques et aliphatiques ainsi que les groupes fonctionnels caractéristiques de structures polysaccharidiques, protéiniques et siliciques. Des groupes hydroxyles sont également visibles mais ils subissent l'interférence de l'eau présente dans les échantillons. Les analyses Infrarouges ont permis l'identification des principales structures biologiques présentes dans la plupart des algues: protéines, polysaccharides et lipides (marqués par la présence des groupes aliphatiques). Elles ont aussi permis de déterminer les épaisseurs du revêtement organique qui varient considérablement suivant l'espèce de diatomée, de plus de 1500nm chez SC à 400±200 nm et 150±50 nm respectivement chez TW et AMIN et NMIN.

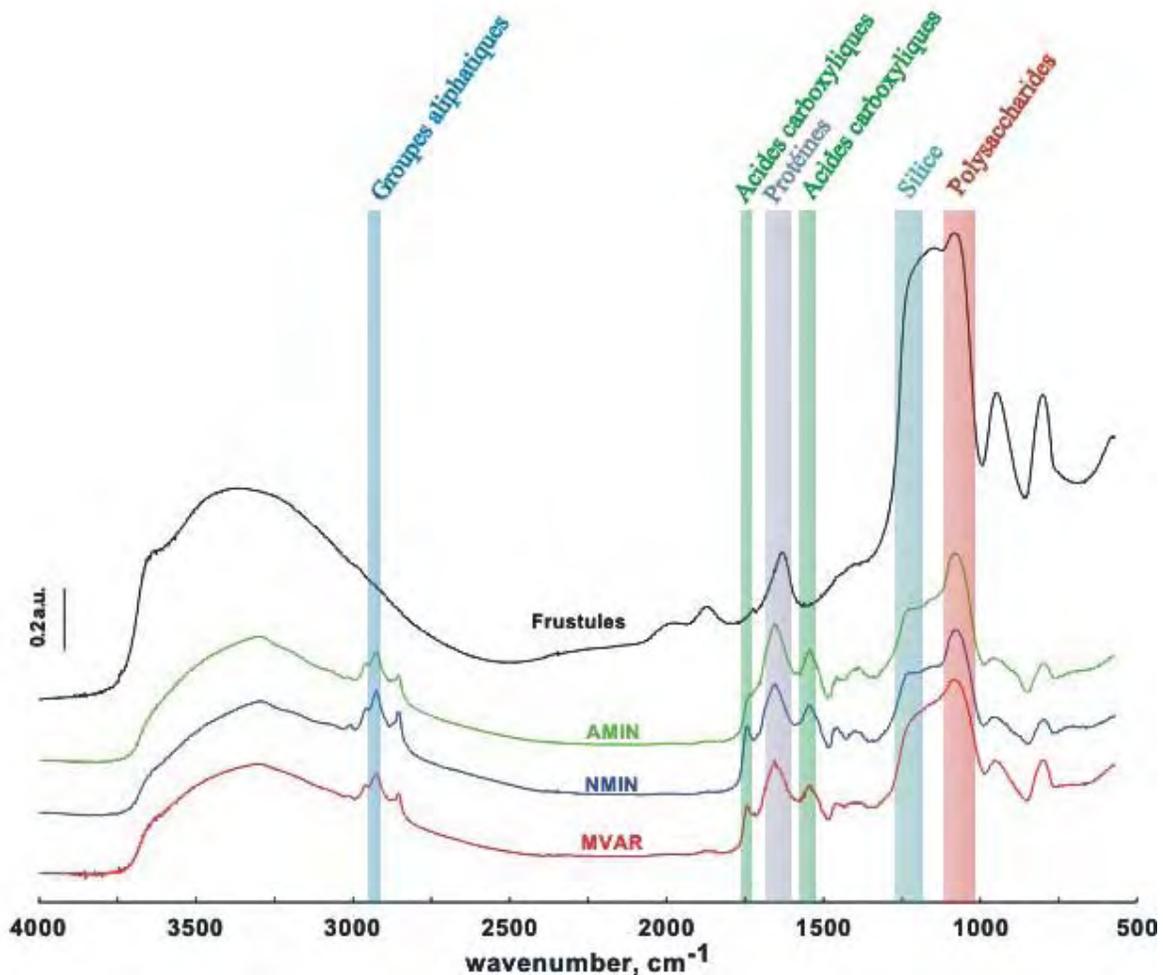


Fig. 28. Spectre DRIFT de AMIN, NMIN, MVAR (espèce fluviatile) et de frustule.

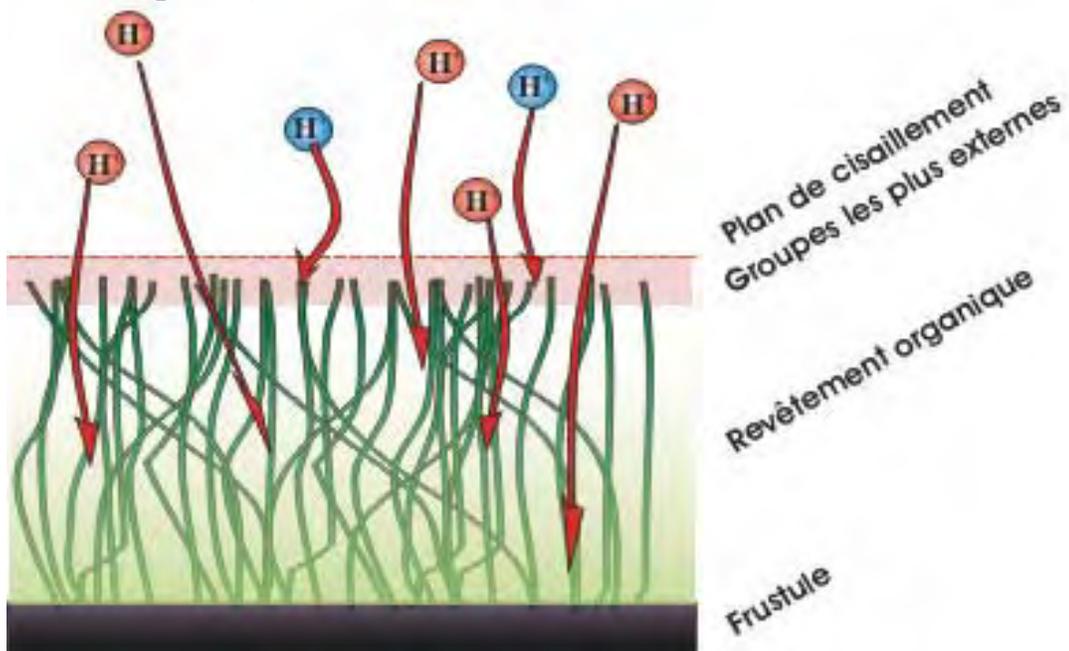
Nous avons ensuite effectué des analyses par spectroscopie XPS pour accéder à la composition élémentaire de la surface des diatomées. De faibles quantités de phosphore, de soufre et de potassium ont été mises en évidence à la surface des diatomées étudiées, contrairement aux surfaces de certaines bactéries qui possèdent une grande quantité de phosphates provenant principalement de l'acide téichoïque (PLETTE et al., 1995; DAUGHNEY et al., 1998; FEIN et al., 2005) ou à certaines algues qui contiennent des groupes sulfonates (FOUREST and VOLESKY, 1996). Seuls l'oxygène, le carbone, l'azote et le silicium sont présents en quantités importantes à la surface (premières dizaines de nanomètres) des diatomées. La déconvolution des pics du carbone et la connaissance des rapports moyens élémentaires dans les grandes classes de molécules biologiques (protéines, lipides, polysaccharides) ont permis d'estimer le pourcentage des différents types de molécules présentes à la surface.

Les deux méthodes spectroscopiques mises en oeuvre indiquent que les principaux groupes organiques présents à la surface des diatomées sont, comme dans le cas de beaucoup d'algues et de bactéries, les groupes carboxyliques, aminés et aliphatiques. En revanche des groupes sulfhydriles ou phosphates n'ont pas été détectés par ces techniques. Les valeurs des rapports Si/C donnés par ESCA ainsi que les bandes Si-O-Si des spectres Infrarouges sont en accord avec les valeurs des rapports massiques frustule/cellule déduits des paramètres physiques des quatre espèces. En particulier, les diatomées fluviales périphtiques ont un taux de silice environ 5 fois plus élevé que celui des espèces marines planctoniques, ce qui confirme la tendance générale entre ces deux types d'espèces (CONLEY and KILHAM, 1989).

## B. Observations macroscopiques

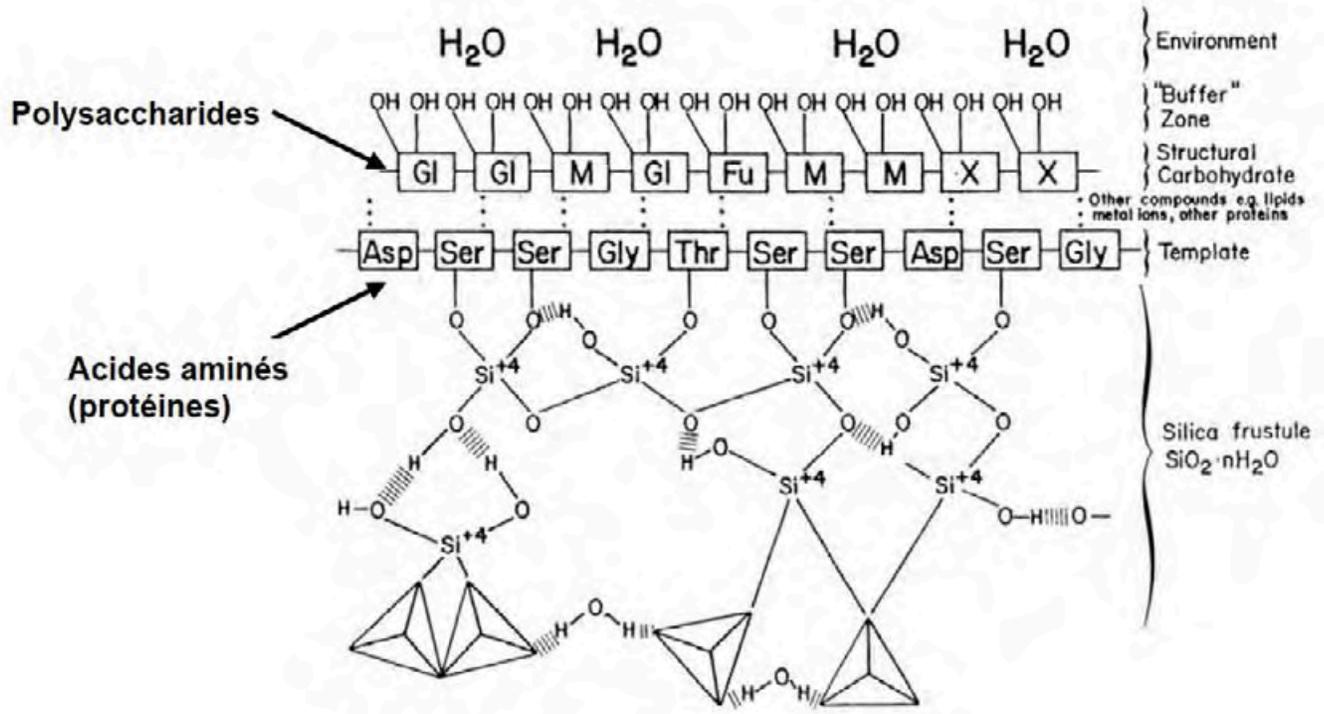
L'adsorption surfacique des protons a été mesurée par titrage potentiométrique en utilisant des réacteurs à temps de résidence limité. Les expériences ont été effectuées à 25°C, dans la gamme de pH 3 à 11 et pour des forces ioniques comprises entre 0.001M et 1.0 M. Les résultats obtenus indiquent que les protons et hydroxyles sont adsorbés par les surfaces des diatomées. Ce phénomène découle des propriétés acido-basiques des trois grands types de groupes fonctionnels présents au niveau de la paroi cellulaire des diatomées et révélés par les analyses spectroscopiques (groupes carboxyliques, aminés et silanols du frustule). Le point de charge nulle pour les quatre espèces étudiées est situé dans la zone de pH : 6-9.

Les données électrocinétiques révèlent que le potentiel surfacique au niveau du plan de cisaillement est négatif à partir de pH 1 à 2. Ces mesures montrent ainsi que la surface des diatomées des 4 espèces étudiées a un pH du point isoélectrique,  $pH_{iep} = 1-2$ , une valeur commune à de nombreuses surfaces biologiques, notamment les bactéries (HARDEN and HARRIS, 1953; VAN DER WAL et al., 1997a ; HAYASHI et al., 2001; SHASHIKALA and RAICHUR, 2002; YEE et al., 2004). La forme de la courbe de mobilité électrophorétique en fonction du pH pour les cellules de NMIN entières qui possèdent le revêtement organique le plus fin, est différente de celle de leurs frustules, ce qui indique que la charge des diatomées n'est pas contrôlée par leur frustule mais par leur revêtement organique. La différence marquée, plus de cinq ordres de grandeur, entre point isoélectrique et point de charge nulle démontre que des parties différentes de la paroi cellulaire sont analysées par titrage acido-basique et mesures électrocinétiques. Lors des titrages acido-basiques, les protons pénètrent en profondeur dans les couches de la paroi cellulaire, c'est-à-dire dans tout le revêtement organique (figure 29), alors que la charge électrocinétique, déterminée au niveau du plan de cisaillement est gouvernée par la charge des groupes les plus externes de la paroi cellulaire (zone rosée de la figure 29).



**Figure 29** : Représentation schématique des zones investiguées respectivement lors des titrages acido-basiques (prise en compte de l'adsorption des protons, en bleu et orange, sur toute l'épaisseur de la paroi cellulaire) et des mesures électrocinétiques (seuls sont pris en compte l'adsorption des protons, en bleus, sur les groupes les plus externes de la surface).

L'organisation de la paroi cellulaire des diatomées en plusieurs couches est similaire à la structure proposée par HECKY et al.(1973) (figure 30) selon qui la couche la plus externe est constituée de polysaccharides qui recouvrent les acides aminés directement attachés à la silice du frustule (figure 30). Les groupes carboxyliques sont concentrés en surface et responsables de la charge négative des diatomées. Il peut s'agir des groupes carboxyliques terminaux des protéines comme l'a proposé GONZALEZ-DAVILA et al. (2000).



**Figure 30 : Arrangement des différentes couches organiques de la paroi cellulaire des diatomées (d'après HECKY et al., 1973).**

Les courbes correspondant aux différents titrages acido-basiques ont été modélisées indépendamment les unes des autres à l'aide du logiciel FITEQL3.2 en décrivant le potentiel électrique de surface dans le cadre d'un modèle de double couche à capacitance constante. Cette modélisation des courbes de titrage a été conduite en respectant les contraintes déduites des analyses spectroscopiques et électrocinétiques, notamment en ce qui concerne les proportions relatives des groupes fonctionnels. Afin d'établir un modèle de complexation surfacique pour chacune des quatre espèces étudiées, les résultats de chaque modélisation prises individuellement ont été comparés et rassemblés.

Les rapports des trois sites surfaciques principaux {>COOH}: {>NH<sub>3</sub>}: {>SiOH} sont de 1:1:0.1, 1:10:0, 1:1:0.4 et 1:1:0.3 pour TW, SC, AMIN et NMIN, respectivement (tableau 6). Le nombre total de sites surfaciques varie entre 1 (NMIN) et 9 (SC) mmol/g poids sec soit, après normalisation à la surface spécifique de chaque frustule, entre 0.3 (NMIN) et 0.9 mmol/m<sup>2</sup> (SC). Ces valeurs sont un ordre de grandeur supérieures au nombre de sites disponibles à la surface de la silice amorphe pure, impliquant ainsi que les propriétés surfaciques des diatomées sont gouvernées par la couche organique surmontant frustule.

	>COOH conc sites 10 <sup>13</sup> mol/cel l	>NH <sub>3</sub> conc sites 10 <sup>13</sup> mol/cell	>SiOH conc sites 10 <sup>13</sup> mol/cell	>COOH pKa				>NH <sub>3</sub> pKa				>SiOH pKa			
				1 M	0.1 M	0.01 M	0.00 1 M	1 M	0.1 M	0.01 M	0.00 1 M	1 M	0.1 M	0.01 M	0.00 1 M
TW	4.26 ± 0.08	4.55 ± 0.05	0.48 ± 0.25	-4.9 ± 0.4	-4.2± 0.1	-5± 0.1	-4.9± 0.1	10.15 ± 0.35	9.7± 0.1	9.8± 0.1	10.1	-7.35 ± 0.15	-7± 0.1	-7.5± 0.1	-7.5± 0.1
SC	2.74 ± 1.4	32 ± 3	0	-4.7± 0.1	-4.7± 0.1	-4.7± 0.1	ND	8.2± 0.1	8.2± 0.1	8.0v	ND	ND	ND	ND	ND
AMIN	0.96 ± 0.13	1.04 ± 0.15	0.38 ± 0.31	ND	-4± 0.1	-3.5 ± 0.1	ND	ND	9.8± 0.1	10.5 ± 0.3	ND	ND	-7.2± 0.1	-6.8 ± 0.1	ND
NMIN	3.9 ± 0.2	4.3 ± 0.1	1.3 ± 0.3	-3.2± 0.1	ND	-3.5± 0.1	ND	8.5± 0.1	ND	10.1± 0.1	ND	-6.5± 0.1	ND	-7± 0.1	ND

**Tableau 6 : Modèle de spéciation surfacique des interfaces de quatre diatomées**

III. STUDY OF DIATOM/AQUEOUS SOLUTION INTERFACE I. ACID-BASE EQUILIBRIA, SURFACE CHARGE AND SPECTROSCOPIC OBSERVATION OF FRESHWATER AND MARINE SPECIES



doi:10.1016/j.gca.2004.01.011

## Study of diatoms/aqueous solution interface. I. Acid-base equilibria and spectroscopic observation of freshwater and marine species

 A. GÉLABERT,<sup>1</sup> O. S. POKROVSKY,<sup>1,\*</sup> J. SCHOTT,<sup>1</sup> A. BOUDOU,<sup>2</sup> A. FEURTET-MAZEL,<sup>2</sup> J. MIELCZARSKI,<sup>3</sup> E. MIELCZARSKI,<sup>3</sup>  
 N. MESMER-DUDONS,<sup>2</sup> and O. SPALLA<sup>4</sup>
<sup>1</sup>Géochimie: Transferts et Mécanismes, UMR 5563, CNRS-OMP-Université Paul Sabatier, 14, Avenue Edouard Belin, 31400 Toulouse, France

<sup>2</sup>LEESA, UMR CNRS 5805, Université de Bordeaux 1, Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France

<sup>3</sup>LEM, UMR 7569 CNRS, INPL-ENSG, B.P. 40, 54501, Vandoeuvre-les-Nancy, France

<sup>4</sup>CEA DRECAM/SCM/Groupe Chimie de la Matière Ultradrivée 91191 Gif sur Yvette, France

(Received August 1, 2003; accepted in revised form January 13, 2004)

**Abstract**—This work reports on a concerted study of diatom-water interfaces for two marine planktonic (*Thalassiosira weissflogii*= TW, *Skeletonema costatum*= SC) and two freshwater periphytic species (*Achnanthes minutissimum*= AMIN, *Navicula minima*= NMIN). Proton surface adsorption was measured at 25°C, pH of 3 to 11 and ionic strength of 0.001 to 1.0 M via potentiometric titration using a limited residence time reactor. Electrophoretic mobility of living cells and their frustules was measured as a function of pH and ionic strength. Information on the chemical composition and molecular structure of diatoms surfaces was obtained using FT-IR (in situ attenuated total reflectance) and X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS). The surface area of living cells and their frustules in aqueous solutions was quantified using Small Angle X-ray Scattering Spectroscopy (SAXS).

These observations allowed us to identify the nature and to determine the concentration of the major surface functional groups (carboxyl, amine and silanol) responsible for the amphoteric behavior of cell surfaces in aqueous solutions. Taking into account the relative proportion of surface sites inferred from XPS and FT-IR measurements, a surface complexation model of diatom-solution interfaces was generated on the basis of surface titration results. The cell-normalized ratios of the three major surface sites {>COOH}: {>NH<sub>3</sub>}: {>SiOH} are 1:1:0.1, 1:10:0, 1:1:0.4 and 1:1:0.3 for TW, SC, AMIN and NMIN, respectively. The total amount of proton/hydroxyl active surface sites for investigated species ranges from 1 (NMIN) to 9 (SC) mmol/g dry weight. Normalization of these site densities to the area of siliceous skeleton yields values between 0.3 (NMIN) and 0.9 mmol/m<sup>2</sup> (SC) which are an order of magnitude higher than corresponding values for organic-free frustules or amorphous silica. This suggests that the amphoteric properties and possibly the affinity for metal adsorption of diatom cultures are essentially controlled by the 3-D organic layers covering the silica frustule. Copyright © 2004 Elsevier Ltd

### 1. INTRODUCTION

Diatoms, unicellular photosynthetic algae enclosed in an external siliceous skeleton called frustule, are largely widespread in marine and freshwater environments. They constitute an important organic carbon reservoir providing more than a quarter of the primary production on the earth. Diatoms are known to exhibit a strong affinity for a wide range of dissolved trace elements. As a result, they exert a strong control on the transfer of heavy metals along the water column up to the sediments, thereby regulating the concentration of dissolved metal ions. This binding capacity of the diatom surfaces and their frustules can also be used for various technological applications, for example, to remove toxic metals from polluted environments (Volesky and Holan, 1995; Csogor et al., 1999; Vrieling et al., 1999; Schmitt et al., 2001). From an ecotoxicological point of view, diatoms being at the beginning of the trophic chains, they play a major role in heavy metals (i.e., Zn, Cd) bioaccumulation and bioamplification along the food webs. Various diatom species are also used for detection of changes in water quality due to their specific sensitivity to metal pollution (Gold et al., 2002, 2003). Numerous studies have been

devoted to metal uptake by diatoms (Fisher, 1986; Fisher and Reinfelder, 1995; Sunda and Huntsman, 1998), excretion of ligands in response to metal stress (Fisher and Fabris, 1982; Zhou and Wangersky, 1989; Morel et al., 1994; Ahner et al., 1997; Pistocchi et al., 2000), and diatom growth limitation by trace elements (Anderson et al., 1978; Brand et al., 1986; Morel et al., 1991; Sunda and Huntsman, 1995, 1998). Since biosorption involves a set of both active and passive transport mechanisms whose first step is the interaction of the metal ion with the cell wall, the surface of the cells is likely to play a predominant role in the binding of heavy metals. However, rigorous understanding and modeling of the interactions between trace elements and diatoms surfaces are still lacking which prevents to quantitatively assess the role diatoms play in the regulation of metal transport in surficial aquatic environments. This study is a part of concerted efforts initiated by our group and aimed at the thermodynamic characterization of diatoms/ aqueous solution interfaces.

Diatom frustule is covered by an organic coat, composed of organic molecules such as polysaccharides, amino acids and glycoproteins, tightly associated with silica (Kates and Volcani, 1968; Hecky et al., 1973; Swift and Wheeler, 1992; Kroger et al., 1994). The numerous functional groups present on the surface of cell walls can be proton active within the acidity range of natural waters and their protonation/deprotonation is

\* Author to whom correspondence should be addressed (oleg@lmtg.obs-mip.fr).

Table 1. Physical characteristics of diatom cultures.

Species	Shape and size	Weight of humid diatoms (g/cell)	Weight of lyophilized diatoms (g/cell)	Weight of dry frustules (g/cell)	BET N <sub>2</sub> surface of dry frustules (m <sup>2</sup> /g)	SAXS surface of dry frustules (m <sup>2</sup> /g)	SAXS surface of viable cells (m <sup>2</sup> /cell)
AMIN	Pennate, 12 × 4 μm	3.7 × 10 <sup>-9</sup>	2.1 × 10 <sup>-10</sup>	1.0 × 10 <sup>-10</sup>	12.8	13	≥6.0 × 10 <sup>-10</sup>
NMIN	Pennate, 7 × 3 μm	1.0 × 10 <sup>-8</sup>	9.95 × 10 <sup>-10</sup>	4.3 × 10 <sup>-10</sup>	7.7	6	≥4.0 × 10 <sup>-10</sup>
TW	Centric, 10 μm	1.8 × 10 <sup>-8</sup>	1.4 × 10 <sup>-9</sup>	3.6 × 10 <sup>-11</sup>	74.3	44	2.4 × 10 <sup>-9</sup>
SC	Centric, 10 μm	2.3 × 10 <sup>-9</sup>	3.7 × 10 <sup>-10</sup>	2.4 × 10 <sup>-11</sup>	156	67	2.8 × 10 <sup>-9</sup>

responsible for the amphoteric properties of diatom surfaces in aqueous solution. The goal of this work is the identification of the functional groups present on diatom surfaces and the quantification of their concentrations and protonation/deprotonation constants. For this purpose, we used a multiple experimental approach which combined conventional macroscopic techniques (surface titration, electrophoresis) and surface spectroscopic observations. Over the last decade, significant amount of work has been devoted to the characterization of bacterial and algal surfaces in aqueous solutions via potentiometric titrations (Crist et al., 1981, 1988, 1990, 1992; Plette et al., 1995, 1996; van der Wal et al., 1997b; Daughney and Fein, 1998; He and Tebo, 1998; Martinez et al., 2002), adsorption experiments (Goncalves et al., 1987; Goncalves and Lopez da Conceicao, 1989; Ledin, 2000), electrophoresis (Richmond and Fisher, 1973; Bayer and Sloyer, 1990; Kijlstra and van der Wal, 1995; van der Wal et al., 1997a; Ulberg and Marochko, 1999; Boonaert and Rouxhet, 2000) and spectroscopic observations (Busscher et al., 1990; Naumann et al., 1991; Rouxhet and Genet, 1991; Dufrene et al., 1997; Keifer et al., 1997). These studies allowed comprehensive understanding of the thermodynamic and chemical properties of bacterial surfaces and their affinities for metal ions (Beveridge, 1988; Beveridge et al., 1995, 1997; Fein et al., 1997). In contrast, with the exception of a few studies on marine diatoms (Gonzalez-Davila, 1995; Gonzalez-Davila et al., 1995, 2000), little attention has been devoted until now to the physico-chemical properties of diatoms surfaces. In this study, we retained four representative diatom species, two planktonic, *Skeletonema costatum* (marine) and *Talassiosira weissflogii* (estuarine) and two freshwater periphytic (i.e., linked to submerged support), *Achnanthes minutissimum* and *Navicula minima*, to elaborate a thermodynamic model of their surfaces in aqueous solutions and predict metal-diatoms interactions.

## MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Culture Processes and Characterization of Diatoms

#### 2.1.1. Diatoms Culture Conditions

Monospecific diatom cultures were developed from laboratory strains to produce biomass of four species: marine planktonic *Talassiosira weissflogii* (abbreviated TW), *Skeletonema costatum* (SC), freshwater periphytic *Achnanthes minutissimum* (AMIN) and *Navicula minima* (NMIN). Axenic strains of AMIN and NMIN were obtained from FDCC (Freshwater Diatom Culture Collection), Iowa, U.S.A. Periphytic diatoms were cultured at 20°C in sterile Dauta medium (Dauta, 1982) at pH ~ 7.7 using 2500 mL Erlenmeyer flasks placed in a thermo-regulated chamber under a light intensity of 30 μmol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> on a 14:10-light:dark cycle to concentration of ~10<sup>7</sup> cell/L. Continuous aeration of the culture was insured to prevent pH from increasing due to photosynthetic activity. The same culture conditions

were used for *Talassiosira weissflogii* and *Skeletonema costatum* given by CREMA (Centre de Recherche en Ecologie Marine et Aquaculture), L'Hourmeau, France, but in a standard nutrient medium f/2 (Guillard, 1975) at pH ~ 8.0. Typical incubation time was 2–4 weeks. During diatoms production process, weekly transfers of aliquots of each culture in a new medium allowed us to increase growth speed of each strain and to collect high amounts of biomass. Diatoms were harvested from the stationary growth phase and kept at 4°C until use. Before all experiments described below, algae were rinsed in appropriate (0.001–1 mol/L) NaCl or NaNO<sub>3</sub> aqueous solutions.

#### 2.1.2. Physical Characterization and SAXS Measurements

Concentration of diatom cell suspension was quantified by: 1) cells counting using a Nageotte cell under light microscopy (at least 10 counts of approx. 80–100 cells were performed and the average value with a typical uncertainty of 10–20% was taken); 2) measurement of the optical density of suspensions using a spectrophotometer at 400 nm wavelength (good linear correlation between the optical density and cell number was obtained in the range 2 × 10<sup>8</sup>–2 × 10<sup>9</sup> cell/L); 3) weighing the wet centrifuged pellets (20 min at 2500 g); and 4) freeze-drying the centrifuged pellets. Diatom frustules were obtained after HNO<sub>3</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> digestion of cell biomass during 6 h on a sand bath at 220°C. Specific surface area of frustules was measured by N<sub>2</sub> (3 points) and Kr (multipoint) adsorption using the BET method. Agreement within ±10% between these methods was found. The humid and dry weights of cells and their frustules together with specific surface area of each species are given in Table 1. The size and geometric area of viable cells were assessed from high-resolution environmental SEM and TEM images taken by a Scanning Electron Microscope Philips 515 and a Transmission Electron Microscope Philips CM 10, respectively. Representative images of the diatom species are given in Figure 1. It can be seen from TEM images that the thickness of the organic layer coating silica frustule varies from 100–200 nm for AMIN to 400 ± 100 nm for TW.

Surface fine structure and porosity of diatom frustules and viable cells were estimated via Small Angle X-ray Scattering Spectroscopy (SAXS). For this purpose, two home-made X-ray scattering cameras were used. The first one is a Bonse-Hart setup specially designed to perform high resolution (ultra-SAXS) and very low angle measurements (Lambard et al., 1992). The second apparatus is a pinhole camera having very high sensitivity for weak scattering systems such as diluted diatom suspensions (Zemb et al., 2003). The measurements were performed in aqueous solution for viable cells and in the air for frustules. The X-ray scattering comes from the scattering length density contrast between two phases. In the case of viable cells in solution, the contrast is taken between the silica skeleton and the organic material layer (which is close to water in term of scattering length density). For dry frustules, the contrast is taken between the silica skeleton and air. Therefore, SAXS cannot resolve the 3-D organic structures on the diatom surface but can be useful for characterizing the specific pores distribution of both dry frustules and viable cultures. The accuracy of pore volume determination is 10%. For the surface determined by the Porod plateau (Spalla, 2003), it can be estimated as 30%.

For diatom frustules in the air, in agreement with SEM images of marine species, a fine porous structure is observed at around 63 nm corresponding to fine pores ≥60 nm in diameter. The signal at large scattering angle is decaying with the fourth power of the angle, which is characteristics of a smooth interface between two materials (Porod

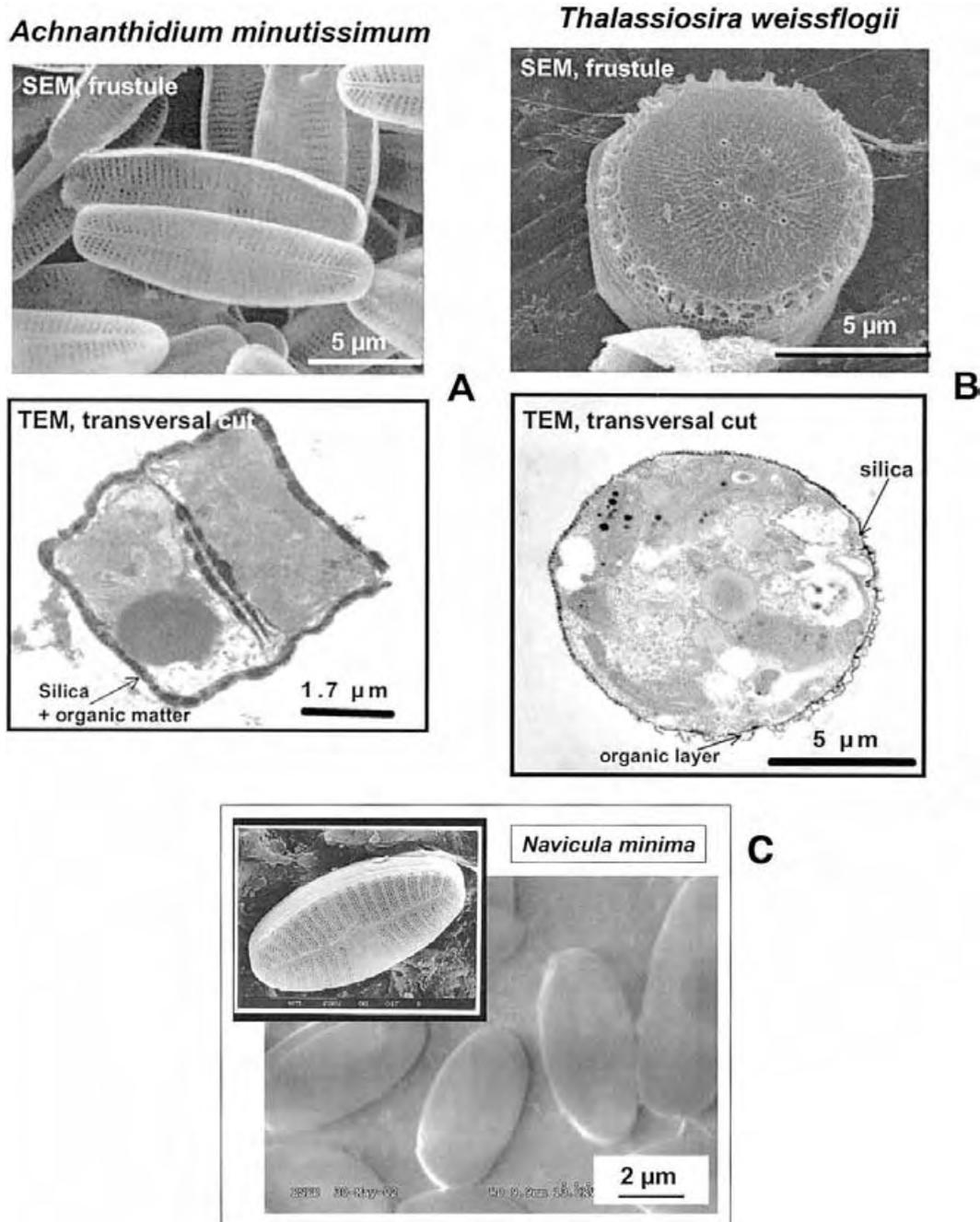


Fig. 1. Representative images of studied diatoms (A) *Achnantheidium minutissimum* (SEM image of frustules and TEM thin section); (B) *Thalassiosira weissflogii* (SEM image of frustules and TEM thin section); (C) Scanning electron micrographs (SEM) of the freshwater periphytic species *Navicula minima*. Upper left: diatom frustule after acid treatment to destroy the organic layer. Main photo: diatoms observed with the variable pressure SEM technique, to preserve the organic layer.

regime, Spalla, 2003). This allows to quantify frustules specific surface areas (in  $\text{m}^2/\text{cell}$ ) as listed in Table 1. The total net surface associated with these structures is  $44 \text{ m}^2/\text{g}$  for TW and  $67 \text{ m}^2/\text{g}$  for SC which is about twice lower than those values obtained by BET  $\text{N}_2$  measurements. The specific surface area of NMIN and AMIN frustules quantified by SAXS (6 and  $13 \text{ m}^2/\text{g}$ , respectively) are comparable with values of BET  $\text{N}_2$  surface measurements (Table 1). The freshwater

species AMIN presents a first Porod plateau at 250 nm corresponding to the thickness of the silica shell as also shown by MET images (Fig. 1a). The second Porod plateau at 13 nm corresponds to the surface associated with small size pores on the skeleton visible via SEM. Small size pores ( $<50 \text{ nm}$ ) have been recently identified in various diatom frustules using small and wide angle X-ray scattering techniques (Vrieling et al., 2000).

Table 2. Experimental conditions of diatom surface titrations in a limited residence time reactor.

Exp. No.	Species	Concentration	Electrolyte	pH range
13	TW	$1.1 \times 10^9$ cell/L	0.01 M NaCl	3.7–10.0
9, 10	TW	$1.1 \times 10^9$ cell/L	0.7 M NaCl	3.7–10.6
12	TW	$1.1 \times 10^9$ cell/L	0.1 M NaCl	3.7–10.4
22	TW	$9.3 \times 10^9$ cell/L	1 M NaCl	3.0–10.3
25	TW	$3.5 \times 10^9$ cell/L	0.001 M NaCl	3.0–10.5
26	TW	$2.2 \times 10^9$ cell/L	1 M NaCl	3.0–10.9
27	TW	$2.2 \times 10^9$ cell/L	0.001 M NaCl	2.7–10.8
28	TW	$2.2 \times 10^9$ cell/L	1 M NaCl	1.7–11.4
	frustules			
17	SC	$3.2 \times 10^9$ cell/L	0.1 M NaCl	3.1–10.3
18	SC	$2.7 \times 10^9$ cell/L	1 M NaCl	2.8–10.4
19	SC	$2.9 \times 10^9$ cell/L	0.01 M NaCl	2.6–11.1
11	AMIN	$1.7 \times 10^9$ cell/L	0.01 M NaNO <sub>3</sub>	4.0–10.0
M11–14	AMIN	$1.0 \times 10^{10}$ cell/L	0.01 M NaNO <sub>3</sub>	3.7–10.4
23	AMIN	$2.1 \times 10^9$ cell/L	0.01 M NaCl	2.8–11.2
30	AMIN	$2.1 \times 10^9$ cell/L	0.1 M NaCl	3.0–11.0
31	AMIN	$8.9 \times 10^9$ cell/L	0.1 M NaCl	2.8–11.0
37	AMIN	$8.9 \times 10^9$ cell/L	0.1 M NaCl	2.6–11.2
	frustules			
20	NMIN	$1.55 \times 10^9$ cell/L	0.01 M NaNO <sub>3</sub>	2.3–11.5
21	NMIN	$1.48 \times 10^9$ cell/L	1 M NaNO <sub>3</sub>	3.0–10.6

The scattering diagrams for live diatom suspensions and dry frustules are very similar. In accord with results obtained on frustules, the specific surface area of viable cells ranges from  $6 \times 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/cell for AMIN to  $4 \times 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/cell for NMIN which is ~10 times lower than corresponding values for marine planktonic species (Table 1). For periphytic species having low surface area, the accuracy is much lower than for marine ones, in fact, only the bottom value of specific surface area for viable cells can be estimated.

## 2.2. Surface Titration

Because of the fragility of diatom cell walls and their fast degradation under acid or basic conditions accompanied by release of exudates, conventional batch reactors widely used for the titration of inert mineral oxides or rigid bacterial cell walls are not suitable for diatoms. Preliminary titrations of AMIN, NMIN and TW cells in a batch reactor showed important hysteresis of acid and alkaline titration legs and yield irreproducible results. Besides, the level of dissolved organic carbon (DOC) progressively increases in the course of titration thus making impossible the interpretation of these experiments in terms of net proton adsorption. To overcome these difficulties, a modified limited residence time reactor system (LRT) used for titration of highly reactive solids (Pokrovsky et al., 1999; Pokrovsky and Schott, 2004) was used.

Diatom species were titrated at  $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$  in 0.001 M to 1 mol/L NaCl or NaNO<sub>3</sub> solutions and pHs of 3 to 11 (Table 2). Each titration comprised between 20 and 40 data points; altogether, 4, 9, 5 and 2 experiments were performed for SC, TW, AMIN and NMIN species, respectively. The cells were removed from culture media by centrifugation during 10–15 min at 2500 g, rinsed four times with the electrolyte solution and stored during 1 h at  $25^\circ\text{C}$  in the dark under N<sub>2</sub> atmosphere and continuous stirring before the titration. For each titration point, a small weighed amount (~5 g) of this homogeneous diatom suspension was transferred to a 8 mL sterile polypropylene vial in which a known amount of titrating solution (standardized NaOH or HCl) was added; pH was recorded once steady state conditions were achieved ( $\Delta E/\Delta t \leq 0.5$  and 1 mV/min in the acid and alkaline region, respectively). An aliquot of the solution was filtered for DOC analysis and the remaining part was discarded. This operation was repeated in the whole range of pH chosen. The time of each titrating point acquisition never exceeded 6 min. Optical microscopic inspection of diatoms before and after both the washing and titration runs showed no significant change in the diatoms population. The cells and chloroplasts remained intact and undeformed, and no cell fragments can be detected.

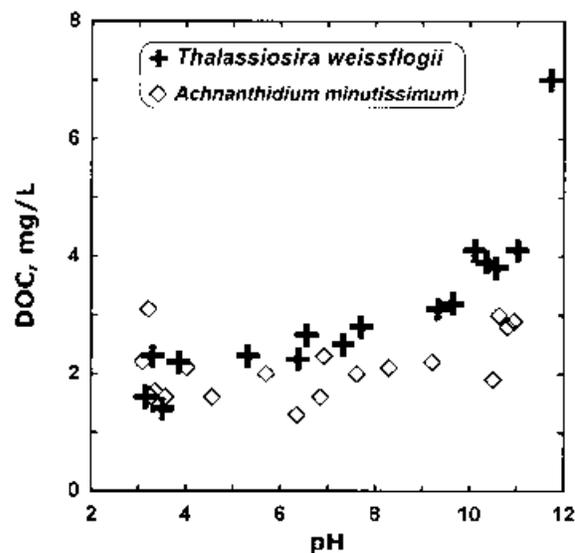


Fig. 2. DOC concentration as a function of pH during diatoms surface titrations. TW = *Thalassiosira weissflogii*; AMIN = *Achnanthydium minutissimum*.

The excess surface proton concentration  $[\text{H}^+]_s$  at each pH<sub>j</sub> titration point (j) was calculated as

$$[\text{H}^+]_s = (C_{aj}(\text{suspension}) - C_{aj}(\text{reference})) - (C_{bj}(\text{suspension}) - C_{bj}(\text{reference})) \quad (1)$$

where  $C_{aj}$  and  $C_{bj}$  correspond to concentrations of base and acid for the jth addition of titrant. For background electrolyte (i.e., NaNO<sub>3</sub> or NaCl)  $C_{aj}(\text{reference}) = [\text{H}^+]_j$ , free proton concentration in the system, and Eqn. 1 transforms into usual equation used for surface charge calculation from titration data (Cox et al., 1999; Martinez et al., 2002). However, in the case of cell supernatant,  $C_{aj}(\text{reference}) \geq [\text{H}^+]_j$  and  $C_{bj} \geq [\text{OH}^-]_j$  because of protons and hydroxyls consumption by cell exudates and organic breakdown products in the titrated solution. Therefore, the net surface proton consumption should be corrected for the blank. For this, small volumes of stock suspensions were regularly sampled and centrifuged. The resulting supernatant was titrated under the same conditions as the diatoms suspension and the obtained titration curve was used as a blank allowing the determination of  $C_{aj}(\text{ref})$  and  $C_{bj}(\text{ref})$  in Eqn. 1. This blank was always subtracted to calculate the net proton adsorption at each pH value. The procedure of surface proton concentration measurements used in this study postulates the "proton condition," i.e., the pH of aqueous suspensions equilibrated with diatom cultures before the titration correspond to zero net proton adsorption or pH<sub>PZC</sub> (Sposito, 1998).

To assess the degree of cell degradation and the contribution of cell exudates to proton/hydroxyl consumption, the concentration of dissolved organic carbon (DOC) was monitored in the course of titration. Examples of DOC concentration as a function of pH are given in Figure 2. For three diatoms species (AMIN, NMIN and TW), [DOC] remains constant at 2–3 mg/L in the pH range 3–10 thus reflecting a weak degradation of cell walls during titration. *Skeletonema costatum*, in contrast, released an initial amount of DOC ten times higher which further increased during acid titration.

The total amount of protons/hydroxyls consumed during diatoms titration is the sum of H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup> sunk due to 1) reversible adsorption of H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup> on the surface layers; 2) irreversible penetration of protons and hydroxyls through the membrane inside the cells; 3) hydrolysis and degradation of the diatom cell wall composites releasing organic compounds in solution, and 4) protonation/deprotonation of initially present dissolved diatom exudates and cell degradation products. If the third and fourth processes can be quantified by measuring DOC evolution during titration as well as performing blank supernatant titration, the

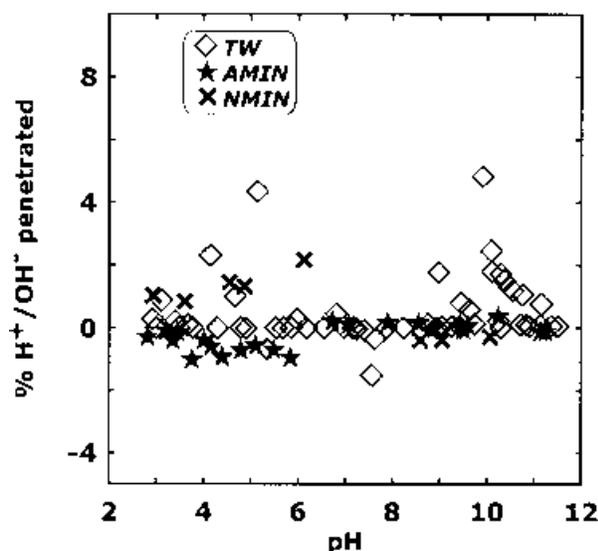


Fig. 3. Proportion of penetrated protons or hydroxyls compared to their total consumption during diatom titrations. TW = *Thalassiosira weissflogii*, AMIN = *Achnanthydium minutissimum*, NMIN = *Navicula minima*.

assessment of  $H^+$  penetration inside the cells required additional experiments. Charge reversibility measurements were performed from stock suspension of each diatom species using the same limited residence time reactor technique, i.e., by adding sequentially, in the 3 to 11 pH range, an equivalent amount of acid or base to each titration vial. The difference between the initial and final pH values taken at  $\sim 5$  min intervals allowed us to account for the amount of protons incorporated inside the cells according to the equation:

$$[H^+]_{\text{incorporated}} = ([H^+]_{\text{added}} - 10^{-\text{pH}(\text{initial})/\gamma_{H^+}}) - ([OH^-]_{\text{added}} - 10^{-\text{pH}(\text{final})/\gamma_{H^+}})$$

where  $[i]$  stands for the concentration of proton or hydroxyl and  $\gamma_{H^+}$  is the activity coefficient of aqueous proton. Proportion of incorporated protons or hydroxyls compared to their total consumption during diatom titrations is illustrated in Figure 3. Negligible  $H^+ / OH^-$  penetration inside the cells (i.e.,  $\sim 10^{-7}$  M or  $\leq 2\%$ ) was observed for AMIN, NMIN and TW. In contrast, *S. costatum* undergoes important penetration of protons and hydroxyls (up to 30–50% of total consumption) which is consistent with its high apparent total charge and elevated DOC concentration measured in the course of titration (not shown).

### 2.3. Electrophoretic Measurements

Microelectrophoresis is a powerful technique for characterization of the electric double layer (EDL) of microbial cell surfaces (see Richmond and Fisher, 1973) and Van der Wal et al. (1997a) for principles and discussions). In this study, the electrophoretic mobilities of live diatom cells were measured using a microelectrophoremeter ("Zeta-phoremeter IV" Z 4000, CAD Instrumentation). Compared to LRT surface titration, the time of contact between aqueous solution and cells in the course of measurements is shorter (up to 1 min) which allows characterization of surface potentials in "extreme" alkaline or acid solutions. The measurements were performed in a quartz channel connecting two Pd electrode chambers. The cells particles were illuminated by a 2 mW He/Ne laser. During the measurements, an electric field of  $80 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$  was applied in each direction and the cells movement images were transmitted to a computer via a CCD camera. The electrophoretic mobility of the cells was measured by timed image analysis. Experiments were performed in solutions of ionic strength and pH ranging from 0.001 to 0.1 mol/L (NaCl, HCl) and 1 to 11, respectively. Three replicates were carried out and each of them was performed with a renewed diatoms suspension. The uncertainty attached to

electrophoretic mobilities ranged from 5 to 20%, the highest being near the isoelectric point.

### 2.4. Analytical Methods

Solution pH was measured using a combination glass electrode (Mettler Toledo) calibrated on activity scale with NIST buffers (pH 4.006, 6.865 and 9.18 at  $25^\circ\text{C}$ ). Precision of pH measurements was  $\pm 0.002$  U (0.1 mV). Aqueous silica concentration was determined colorimetrically using the molybdate blue method with an uncertainty of 2% and a detection limit of  $3 \cdot 10^{-7}$  M. DOC was analyzed using a Carbon Total Analyzer (Shimadzu TOC-5000) with an uncertainty better than 3% and a detection limit of 0.1 ppm.

### 2.5. X-ray Photoelectron Spectroscopy

X-ray photoelectron spectroscopy is a widespread method for the chemical analyses of solid surfaces. Due to the shallow depth of X-ray beam penetration inside the material (up to 10 nm), this technique allows quantitative elementary analysis of the cell wall layers without interference from the inner compartments of the cell. Nevertheless, XPS has been rarely applied for the analyses of cell surfaces. This may be imputed to difficulties encountered during sample preparation (Marshall et al., 1994); for example, washing of cells in deionized water (MilliQ system) before the analysis may lead to an osmotic shock for marine species (*T. weissflogii* and *S. costatum*). Moreover, due to the high vacuum required for measurements, the sample has to be freeze-dried before analyses which can provoke cell wall breaking during the freezing phase. Note that the pertinence of analyses performed under high vacuum compared to the normal hydrated state of the cell wall can be also questioned. For a review and discussions of validity of XPS measurements for bacterial surfaces, see the works of Dufrene et al. (1997), Rouxhet and Genet (1991) and van der Mei et al. (2000). Note, however, these authors found good agreement between XPS and classical biochemical analyses and good internal reproducibility. In this study, we applied, for the first time, XPS to diatom cell wall characterization. Compared to bacteria, diatoms present a better opportunity of cell walls characterization because, upon lyophilization and preparation in vacuum, they are likely to conserve outermost organic layers covering the silica frustule and thus the volume changes accompanying the "collapse" of organic compounds should be minimal. To account for possible cell breakdown during the preparation procedure, we compared the transmission and diffuse reflectance FT-IR spectra of freeze-dried and semidry (almost viable) cells and did not detect any principle differences in band position and intensities.

Each diatom species was rinsed four times in MilliQ water and centrifuged during 20 min at 2500 g; the resulting pellet was frozen and freeze-dried for 24 h. Reference organic compounds (xylose, saccharose, glycine and sorbitol) were subjected to freeze drying together with diatoms samples. Two independent series of measurements were performed for each species. Analyses were conducted on an ESCALAB VG 220i-XL spectrometer. A nonmonochromatic twin Al  $K_{\alpha}$  X-ray radiation ( $h\nu = 1486.6 \text{ eV}$ ) was used as the excitation source at a power of 200 Watts. Analyzing pass energy of 20 eV with a step size of 0.10 eV was used. The reproducibility of measured atomic ratios for diatom surfaces was better than 10% allowing to quantitatively measure the surface concentrations of carbon, oxygen, nitrogen and silicon.

### 2.6. FT-IR Spectroscopy

In situ Attenuated Total Reflection (ATR) was employed in this study for diatom surface characterization. Complementary to XPS, this technique allows semiquantitative identification of the chemical nature of organic and inorganic moieties present on the surface of viable cells in aqueous solution (Naumann et al., 1991; Schmitt and Flemming, 1998).

The spectra were recorded on a Bruker IFS88 FTIR spectrometer with a MCT detector by means of an ATR attachment. All the accessories were from Harrick Scientific Co. The spectrometer was purged with  $\text{CO}_2$ -free dry air (Balston Filter) in a chamber at  $\sim 25^\circ\text{C}$ . The spectra were taken at  $4 \text{ cm}^{-1}$  resolution by coadding up to 200 scans in the  $4000\text{--}500 \text{ cm}^{-1}$  region. The unit of intensity was defined as  $-\log(R/R_0)$  where  $R_0$  and  $R$  are the reflectivities of the system without and with the investigated medium, respectively. The spectra of cell

Table 3. Penetration depth of evanescent wave in water ( $\mu\text{m}$ ) for two types of reflection elements at reflection angle of  $45^\circ$ . Optical constants of water in the infrared are from Downing and Williams (1975).

Wave number ( $\text{cm}^{-1}$ )	n H <sub>2</sub> O	Ge	ZnSe
2920	1.415	0.223	0.579
1700	1.242	0.368	0.807
1000	1.214	0.623	1.338

supernatant in the background electrolyte ( $\text{NaNO}_3$ ) or MQ water were always subtracted. ATR spectra were recorded using ZnSe and Ge reflection elements at an incidence angle of  $45^\circ$  on the diatom suspension. The use of two different detectors allowed us to account for the change of identity and relative proportion of organic groups depending on depth of beam penetration in the cell surface in suspensions: 0.6 to 1.3  $\mu\text{m}$  and 0.2 to 0.6  $\mu\text{m}$  for the ZnSe and Ge reflection elements, respectively (Table 3). An approximation of the refraction index of the organic layers between 1.3 and 1.5 yields the overall uncertainties on our estimation of depth penetration at  $\sim 30\%$ . Spectra were recorded for concentrated diatom suspension ( $\sim 50$ – $100$  g humid/L) at pH around 7. The spectra of the different generations of diatom species prepared in the same solution conditions showed very good reproducibility of surface composition.

### 3. RESULTS

#### 3.1. Spectroscopic Observations

##### 3.1.1. ATR

Infrared spectra allowed us to detect the following organic groups: carboxyl ( $3400$ ,  $1740$  and  $1400$   $\text{cm}^{-1}$ ), aliphatic ( $1455$ ,  $2850$ ,  $2930$  and  $2960$   $\text{cm}^{-1}$ ), protein ( $1640$ ,  $1540$   $\text{cm}^{-1}$ ), hydroxyl ( $3400$  and  $1540$   $\text{cm}^{-1}$  with interference of water at these particular wavelengths), silica ( $1250$ – $1100$   $\text{cm}^{-1}$ , in particular  $1072$   $\text{cm}^{-1}$ ) and polysaccharide ( $1086$   $\text{cm}^{-1}$ ) (Table 4).

ATR spectra brought together in Figures 4, 5, and 6 exhibit the most important differences for absorbance bands at  $\sim 1072$   $\text{cm}^{-1}$  assigned to the stretching vibration of the Si-O-Si group of diatom frustules. For *Skeletonema costatum*, a very low intensity of this band was observed even when using the ZnSe reflection element that has a penetration depth of 1.3  $\mu\text{m}$ . This indicates that SC has a very thick outermost organic layer which precludes interaction of the evanescent wave with the silica skeleton. In contrast, the outermost organic layer of AMIN and NMIN is very thin and the reflected radiation interacts very strongly with the silica skeleton even when using the germanium reflection element (Fig. 4). For *Talassiosira weissflogii*, the outermost organic layer has an intermediate thickness which results in the most significant differences in the intensities of the absorbance bands recorded with germanium and ZnSe reflection elements (spectra b in Fig. 4). Taking into account the spectral observations obtained with both reflection elements and the calculated values of penetration depths at different frequencies listed in Table 3, it could be estimated that the thickness of TW organic layer is  $\sim 400 \pm 200$  nm which is consistent with TEM observations of this study. The outermost organic layer of *S. costatum* has a thickness  $> 1500$  nm whereas that for AMIN and NMIN is around  $150 \pm 50$  nm. It should be noted that infrared reflection spectra of frustules for all four diatom species are very similar and resemble that of amorphous silica (spectra not shown). The relative proportions of silanol moieties inferred from ATR observations as  $1072$   $\text{cm}^{-1}$  peak height in Figure 4A (i.e.,  $\text{SC} \ll \text{TW} \ll \text{AMIN} < \text{NMIN}$ ) are consistent with values of frustule/whole cell ratios

Table 4. Results of diatoms analysis by FT-IR. Band attributions were made according to Bellamy (1975) and Colthup et al. (1975).

Functional groups	Band (wavelength, $\text{cm}^{-1}$ ) at $25^\circ\text{C}$ , $\pm 5$ $\text{cm}^{-1}$	Corresponding structure
Aliphatic	2960	$\text{CH}_3$ asymmetric stretching
	2925	$\text{CH}_2$ asymmetric stretching
	2850	$\text{CH}_3$ symmetric stretching
Proteins	1455	C-H bending in $\text{CH}_2$
	1650	$>\text{C}=\text{O}$ stretching for primary amids
Carboxylic acids	1545	N-H bending in amids
	$\sim 3400$	O-H stretching
	1405	C-O stretching in carboxylates
Polysaccharides	1735	$>\text{C}=\text{O}$ stretching of ester or fat acids
	1086	Ring vibration corresponding to C-O stretching of esters
Hydroxyles	$\sim 3400$	O-H stretching
	$\sim 1540$	O-H bending
Silica	Several bands at 1250–1100, 1070, and at 940, 790	Si-O-Si stretching

(Table 1) measured in this study: 0.24, 0.4, 1 and 4 pmol of Si per cell for SC, TW, AMIN and NMIN, respectively.

Important differences in the chemical composition of the surface organic layers have been also observed for the four diatom species. *N. minima* displays a significant amount of carboxyl groups with two characteristic bands at  $1742$  and  $1709$   $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 5, spectrum C). These bands are almost invisible for AMIN (Fig. 5, spectrum D). The band position at  $1742$   $\text{cm}^{-1}$  could suggest the presence of carboxyl groups in form of ester and/or aldehyde (Bellamy, 1975; Colthup et al., 1975). The absorbance bands at  $\sim 1640$  and  $1540$   $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 5) can be assigned to two characteristic vibrations of the amide functional groups known as amide I and amide II bands, respectively (Bellamy, 1975). One can observe differences in these bands intensities, shapes and positions. Changes in band positions suggest different protein and/or amines compositions between diatom species investigated in this study. The amount of proteins is highest in the case of NMIN while it is the same for the three others diatoms. Only in the case of *S. costatum* it is possible to observe characteristic absorbance bands of the organic outermost layer without overlap with the strong absorbance from the silica skeleton (Fig. 6). In this frequency region ( $900$ – $1700$   $\text{cm}^{-1}$ ), known as the fingerprint of the investigated sample, bands assignments are most difficult. There are three clearly visible absorbance bands at  $\sim 1150$ ,  $1076$  and  $\sim 1015$   $\text{cm}^{-1}$ . These bands could be tentatively assigned to the C-O (the first two bands) and P-O-C molecular groups vibrations. Amine and amide deformation vibrations could be other possible assignments. Detailed spectroscopic chemical characterization of these and other diatom species and their skeletons will be the subject of another report.

##### 3.1.2. XPS

These analyses allow to approximate the concentrations of carbon, oxygen, nitrogen and silicon at the surface of diatoms.

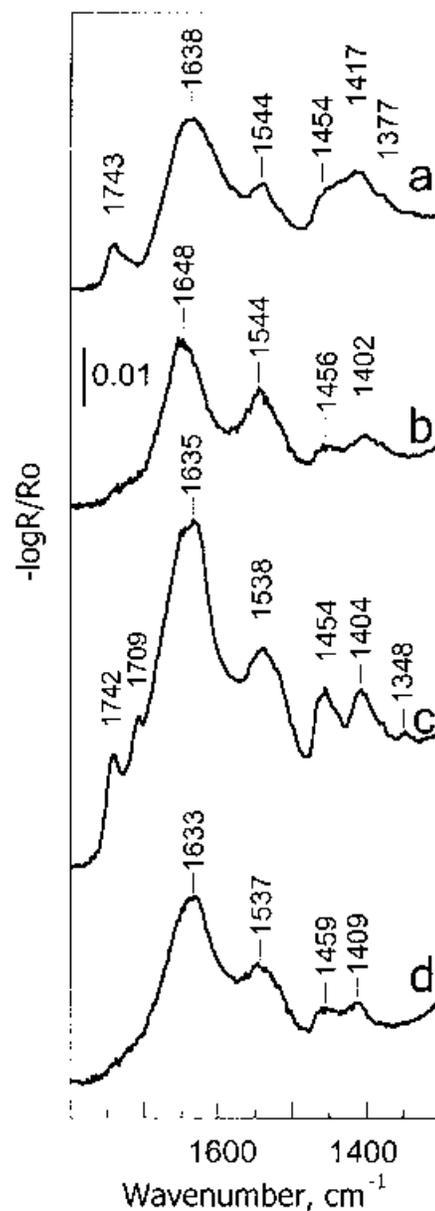
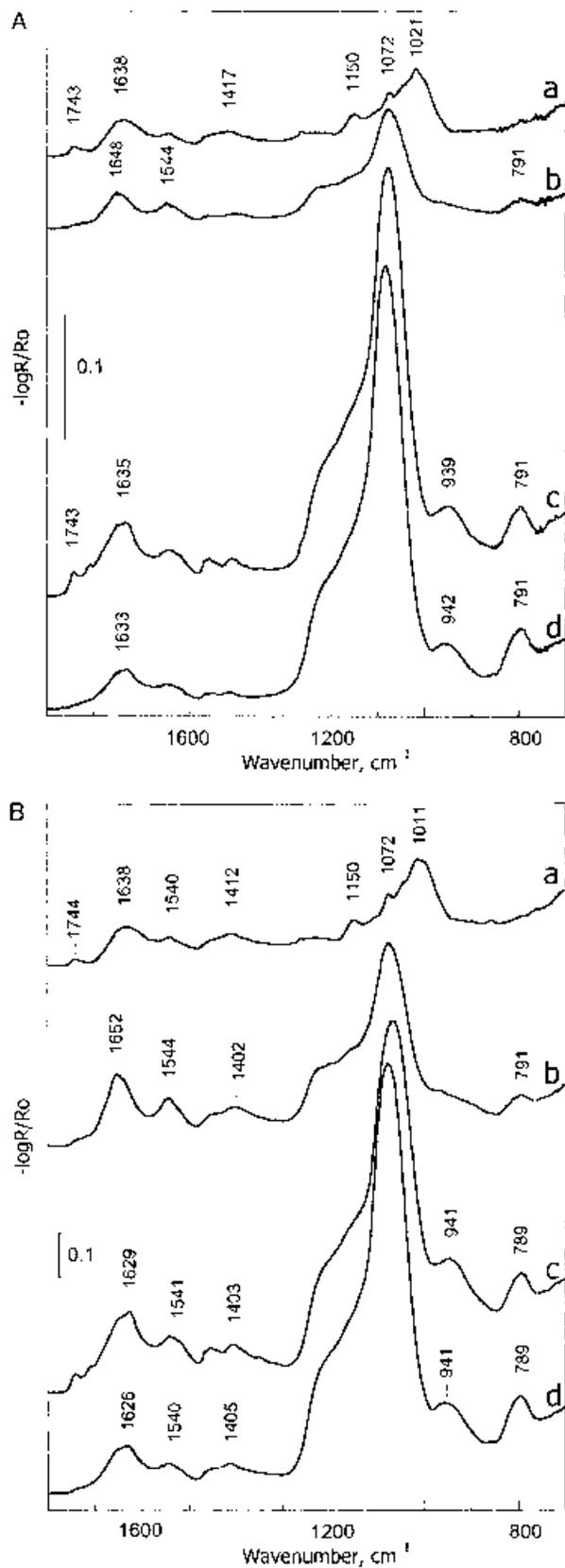


Fig. 5. IR ATR spectra of diatom species recorded with Ge reflection element in the region of carboxyl and amid/amin group vibrations. a = *Skeletonema costatum*, b = *Thalassiosira weissflogii*, c = *Navicula minima* and d = *Achnantheidium minutissimum*.

XPS peaks corresponding to P, S and K were occasionally found but they were too weak to allow concentration measurements. The shape of carbon peak was found to be quite similar among different contrasted diatom species (Fig. 7). The surface composition of diatom species as measured by XPS is given in Table 5 which provides the tentative atomic percentage of the

Fig. 4. IR ATR spectra of diatom species recorded with Ge (A) and ZnSe (B) reflection elements. a = *Skeletonema costatum*, b = *Thalassiosira weissflogii*, c = *Navicula minima* and d = *Achnantheidium minutissimum*.

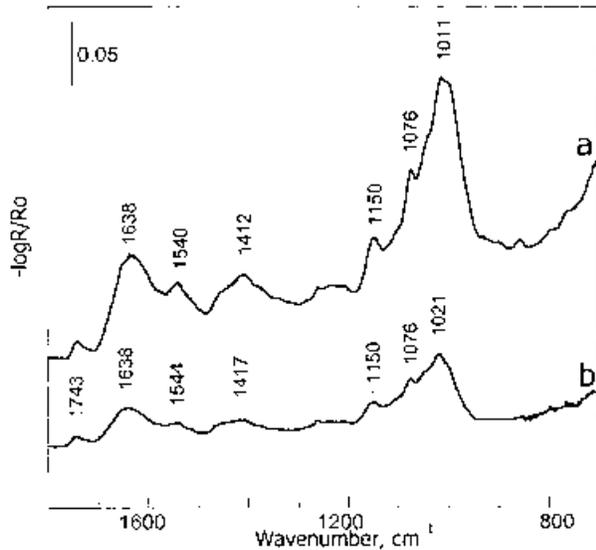


Fig. 6. IR ATR spectra of *Skeletonema costatum* recorded with ZnSe (a) and Ge (b) reflection elements.

four major elements. The principal constituents of the diatom cell walls are peptidoglycan, polysaccharides, (lipo)polysaccharides, lipids and proteins (Hecky et al., 1973). The surface composition of diatom cell walls can therefore be modeled in terms of three classes of basic constituents: proteins, polysaccharides and hydrocarbon-like compounds. Cell wall molecular composition was computed from elemental concentration ratios using the method developed for bacteria surfaces by Dufrière and Rouxhet (1996) and Dufrière et al. (1997):

$$\begin{aligned} (N/C)_{\text{observed}} &= 0.279 (C_{PE}/C) \\ (O/C)_{\text{observed}} &= 0.325 (C_{PE}/C) + 0.833 (C_{PS}/C) \\ (C/C)_{\text{observed}} &= (C_{PE}/C) + (C_{PS}/C) + (C_{HC}/C) = 1 \end{aligned}$$

where N/C and O/C are nitrogen and oxygen to carbon atomic ratios, and PS, PE and HC stand for polysaccharides, peptides

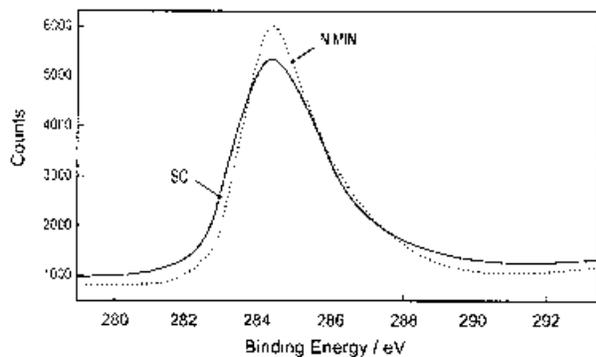


Fig. 7. XPS spectra of carbon for the two most contrasted species. The shape of carbon peak is quite similar for NMIN and SC and very different from the phospholipids of bacterial cell envelopes (Rouxhet and Genet, 1991; Rouxhet et al., 1994; Dufrière et al., 1997) due to the presence of phospholipids in these latter.

Table 5. Atomic percentage of elements in diatoms cell walls as measured by XPS.

Species	C	O	N	Si
SC	72.2	22.3	1.85	2.8
TW	65.7	24.9	5.6	2.4
NMIN	63.3	24.5	4.1	7.6
AMIN	62.15	26.8	2.35	8.15

and hydrocarbon-like compounds, respectively. The resolution of XPS analyses allows quantification of the proportion of these organic molecules for each diatom species (Fig. 8). The validity of this approach was checked by analyzing several reference organic compounds (glycine  $C_2H_5NO_2$ , aspartic acid  $C_4H_7NO_4$ , sorbitol  $C_6H_{14}O_6$  and xylose  $C_5H_{10}O_5$ ). The difference between measured and calculated concentrations of organic molecules for these compounds never exceeds  $\pm 10\%$ . Another method for approximating cell walls chemical composition is the deconvolution of the XPS carbon peak into the contributions corresponding to the three different environments met by carbon: C-(O,N) at 286.3 eV for alcohol, ether, amine and amide; C=O at 287.8 eV for acetal, amide, carboxylate and carbonyl; and C-(C,H) at 284.8 eV for hydrocarbon-like compounds which is used as a reference to calculate the binding energy of all other peaks (Rouxhet et al., 1994; Dengis et al., 1995). For all four species studied, a good agreement within 15% was obtained between the percentage of proteins, amide and aliphatic groups derived from the two above methods.

### 3.2. Electrokinetic Measurements

The values of diatom electrophoretic mobilities (EM) determined by microelectrophoresis are listed in Appendix A1 and illustrated by Figure 9. All species exhibit negative mobilities at  $pH > 2$  as it is the case for most bacteria and organic

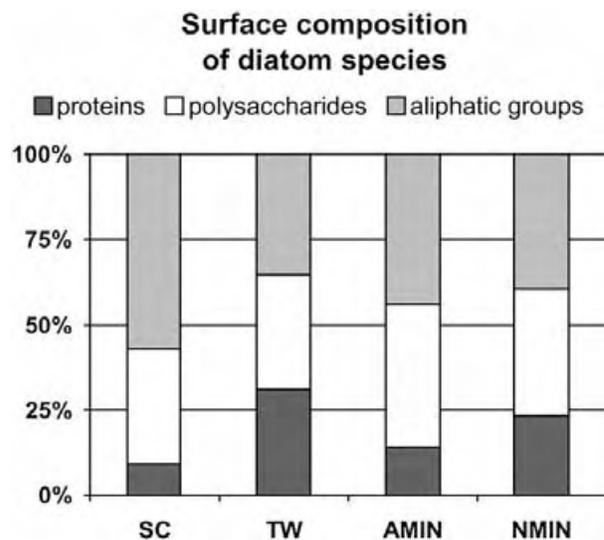


Fig. 8. Surface composition of diatom species expressed in terms of the three major organic compounds measured by XPS.

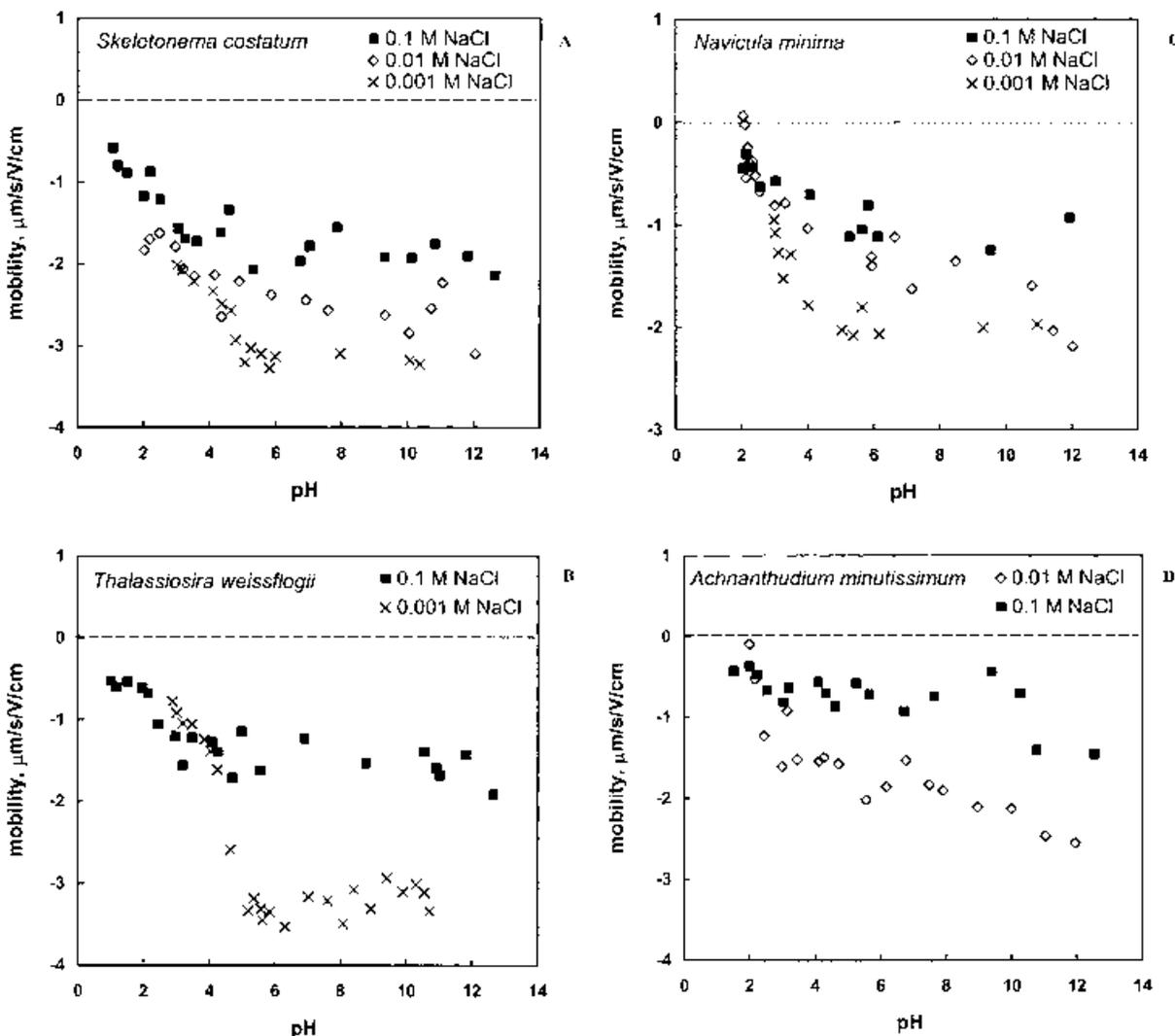


Fig. 9. Electrophoretic mobilities of diatom species. (A) *Skeletonema costatum*; (B) *Thalassiosira weissflogii*, (C) *Navicula minima*, and (D) *Achnantheidum minutissimum*.

surfaces (Richmond and Fisher, 1973; Hayashi et al., 2001). Freshwater diatoms (AMIN and NMIN) exhibit lower EM values compared to the marine species. All four species exhibit similar pH of isoelectric point ( $\text{pH}_{\text{IEP}} = 1-2$ ) and EM dependence on pH and ionic strength. EM and  $\zeta$ -potential of NMIN, TW and SC decrease with pH at  $\text{pH} < 5$  and stay constant at  $5 \leq \text{pH} \leq 11$ . For AMIN in 0.01 mol/L NaCl, continuous decreases of EM as a function of pH is observed (Fig. 9D). This behavior of diatoms is similar to that of bacteria (Van der Wal et al., 1997a; Hayashi et al., 2001; Shashikala and Raichur, 2002) indicating the presence on the outermost layer of organic groups, such as carboxyls, bearing negative charges. The pH dependences of electrophoretic mobilities for *N. minima* whole cells and their frustules are different: whereas the frustule mobilities decrease semilinearly with pH as it is expected for  $\text{SiO}_2$  (Kosmulski et al., 2002), the whole cells mobilities exhibit only a weak dependence on pH at  $4 < \text{pH} < 9$  (Fig. 10).

### 3.3. Surface Titration

Results of all diatoms titration experiments are listed in Appendix A2. Examples of diatom titrations at different ionic strengths and cell concentrations are presented in Figures 11 and 12. Freshwater diatoms exhibit similar shape of titration curves and close values of their  $\text{pH}_{\text{PZC}}$  ( $6.4 \pm 0.1$  for AMIN vs.  $6.3 \pm 0.15$  for NMIN). In contrast, the pH dependence of  $[\text{H}^+]_{\text{s}}$ , surface proton concentration, is very different for TW and SC and their  $\text{pH}_{\text{PZC}}$  are equal to  $8.2 \pm 0.1$  and  $9.3 \pm 0.1$ , respectively. In alkaline solutions, the effect of ionic strength is the most pronounced for NMIN (Fig. 11C). This observation is consistent with a much higher concentration of silanol surface groups for freshwater species compared to marine diatoms and the strong dependence of surface silanol deprotonation on ionic strength (Sverjensky and Sahai, 1996). High uncertainty, up to 30%, can be attributed to  $[\text{H}^+]_{\text{s}}$  at  $\text{pH} < 3$  and  $\text{pH} > 10.5$ . This is due to the competition between protonation/deprotonation of

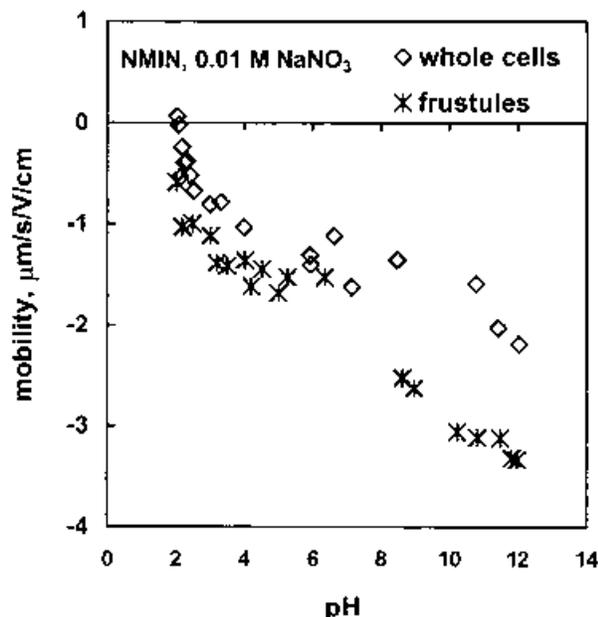


Fig. 10. Comparison between the electrophoretic mobilities of the whole cells *Navicula minima* and their frustules.

dissolved organic ligands (diatom exudates and degradation products of the cell walls) and acid/base reactions on surface groups. The proton consumption associated with frustules, close to zero at  $\text{pH} < 9$ , is much lower than that of the whole cells. This is illustrated in Figure 12 that presents the pH-dependence of  $[\text{H}^+]_s$  for the whole TW and AMIN cells and that for the same concentration (i.e.,  $2.2 \times 10^9$  and  $8.9 \times 10^9$  cell/L, respectively) of their frustules.

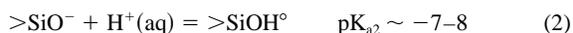
### 3.4. Surface Proton Adsorption Modeling

It follows from our spectroscopic results that carboxyl, amine and silanol moieties are the three major proton-active surface sites. As a result, the following reactions have been postulated to control the charge at diatoms/aqueous solution interface:

- 1) protonation of carboxyl groups



- 2) protonation of silanol groups



- 3) protonation of amine groups



To provide a first-pass description of diatom surface proton adsorption, we have fitted our data using the surface stoichiometries of the active groups derived from XPS measurements. In agreement with previous studies on bacteria and algae, the  $\text{pK}_a$  of intrinsic surface stability constants for reactions 1–3 were initially fixed as 4.5, 7.5 and 10, respectively. This choice relies on the well-known analogy between surface and solution complexation reactions (Schindler and Stumm, 1987). After this preliminary modeling, either surface stability constants or

site densities were allowed to vary by not more than 0.5 log units and 30%, respectively, from initial values to provide a best fit of the experimental dependence of  $[\text{H}^+]_s$  on pH. When small variations of surface stability constants were not sufficient to provide acceptable fit, they were allowed to vary up to 1 logarithm unit.

Results of surface proton adsorption modeling using FITEQL 3.2 (Herbelin and Westall, 1996) are presented as solid lines in Figures 11 and 12 whereas SCM parameters for the four diatom species are listed in Table 6. Because of high dispersion of experimental titration data points obtained in LRT reactor, the goodness of fit (overall variance  $V(Y)$ ) remained very low, around 100. For the same reason, the fit with open site concentrations and  $\text{pK}$  values was not possible. In contrast, the  $V(Y)$  parameter for fitting diatoms titrations performed in batch reactors does not exceed 4, however, the interpretation of batch surface titration data for diatoms is not straightforward due to important artifacts affecting proton consumption and titration legs hysteresis (see section 2.2). Therefore, only LRT titration data were used for the fitting procedure. We found that, for AMIN, NMIN and TW, a 3-sites model was a good fit to the data and the addition of new sites (i.e., phosphate or hydroxyl) did not improve the goodness of fit. Two-sites or one-site models could not provide the convergence of fit. For SC, including the silanol groups in surface titration modeling did not allow any better description of data, i.e., two- and three-sites models provided equally good fit.

It can be seen in Figures 11 and 12 that there is a good adherence to experimental data of predicted  $[\text{H}^+]_s$  as a function of pH. The surface complexation model generated in this study assumes a constant capacitance of the electric double layer, similar to that developed for bacterial surfaces (Fein et al., 1997; Daughney and Fein, 1998; Daughney et al., 1998). In this model, the surface potential is independent of ionic strength; as a result, charge modeling requires a different set of surface protonation constants for each ionic strength investigated. We did not observe a systematic trend in variation of surface groups dissociation reactions constants with ionic strength or this trend is masked by the uncertainties of measurements.

The EDL capacitance value,  $C$ , which could not be fitted by FITEQL, was fixed initially for each species and once the other parameters were determined, it was allowed to vary within 30–50% to test the sensitivity of the model to  $C$ . The values used for surface proton adsorption modeling are  $2500 \pm 300$ ,  $730 \pm 100$ ,  $350 \pm 50$  and  $5400 \pm 400$   $\text{F/g}_{\text{dry}}$  for AMIN, NMIN, TW and SC, respectively. These values are within the range reported for bacteria (Fein et al., 1997; Daughney and Fein, 1998). Normalization of EDL capacitances to specific surface area of silica skeletons yields values between  $\sim 200$  (NMIN) and  $\sim 500$  (SC)  $\text{F/m}^2$ . Such high capacitances are likely to originate from the multilayer structure of organic constituents of diatom cell walls capable of accommodating high charge densities within relatively short distances. In this regard,  $C$  values for porous multilayer diatoms cell walls can be considered as purely adjustable parameters without rigorous physical meaning (i.e., Lützenkirchen, 1999).

The relative proportion of functional groups is nearly the same for the two freshwater species but significantly different for TW and SC. The cell number-normalized ratios of the

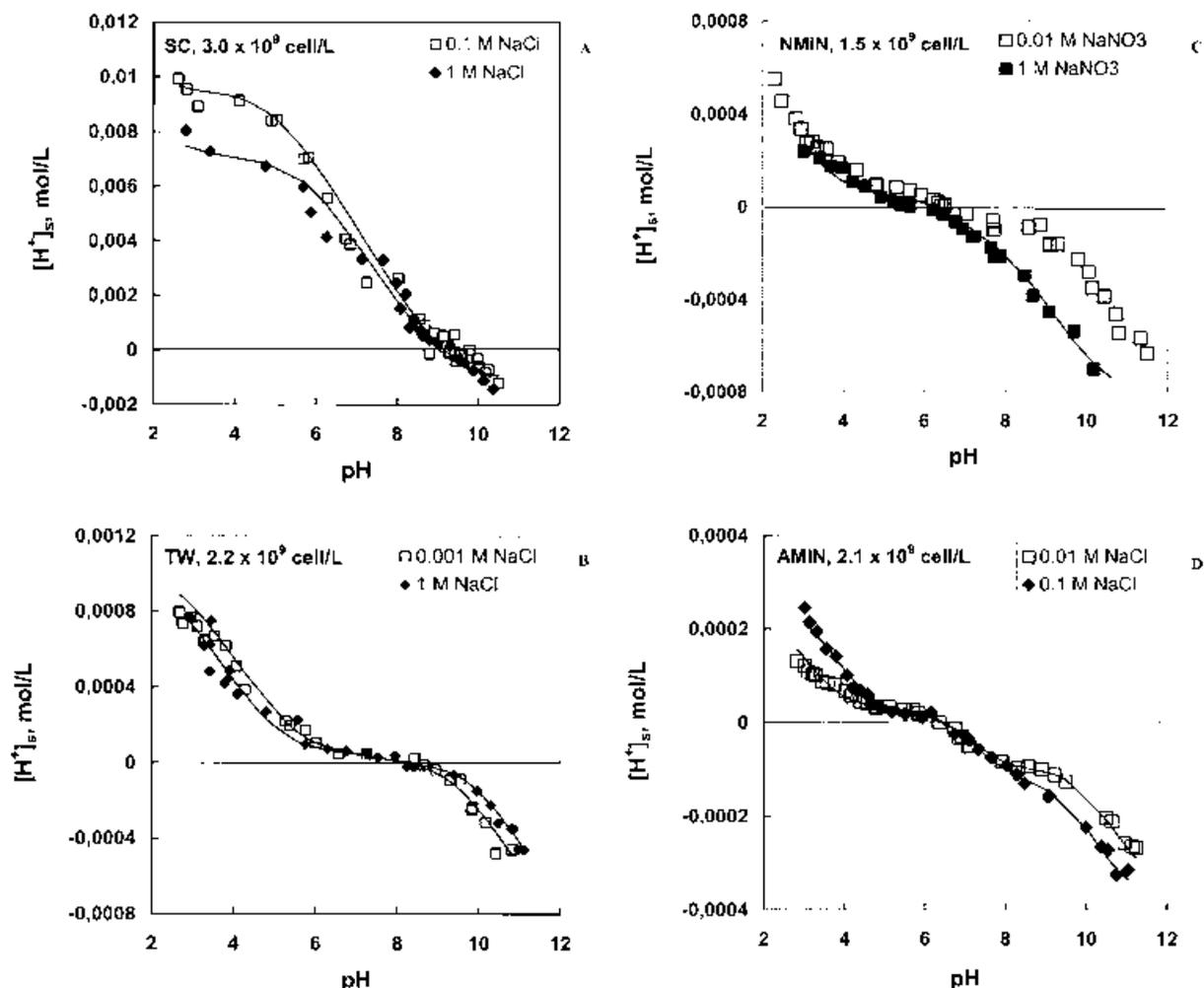


Fig. 11. The excess surface protons concentration of diatom species (mol/L) as a function of pH for *Skeletonema costatum* (A), *Thalassiosira weissflogii* (B), *Navicula minima* (C), and *Achnantheidium minutissimum* (D). The symbols represent results of our experimental titrations, but the curves were generated from the surface complexation model (SCM) proposed in this study using values of sites densities and thermodynamic parameters listed in Table 6.

three major surface sites  $\{>\text{COOH}\}$ :  $\{>\text{NH}_3\}$ :  $\{>\text{SiOH}\}$  are 1:1:0.1, 1:10:0, 1:1:0.4 and 1:1:0.3 for TW, SC, AMIN and NMIN, respectively. The total amount of proton/hydroxyl active surface sites ranges from 1 to 9 mmol/g dry weight for NMIN and SC species, respectively. Note that modeling of AMIN titration at biomass concentration of 8.5 and 35 g/L and fixed ionic strength (Figs. 11D and 12B, respectively), can be performed with the same cell weight-normalized concentration of surface functional groups and almost identical set of surface stability constants.

#### 4. DISCUSSION

The combination of the various spectroscopic and macroscopic techniques employed in the present study provides important insights on the three dimensional structure and chemistry of diatom cell walls. However, because different

techniques probe different depth in different ways, their comparison cannot be straightforward and only qualitative correlations between results of different methods are possible.

#### 4.1. Surface Spectroscopy

This study presents the first attempt to use FT-IR and XPS techniques for characterizing diatom surface chemistry. In accord with the scarce data available for algal surfaces (Keifer et al., 1997), algal-dominated biofilms and bacteria (Naumann et al., 1991; Schmitt and Flemming, 1998), carboxylic, aliphatic and amino moieties are the main reactive surface organic groups identified in this study by the ATR technique. Investigated diatoms do not exhibit any XPS-measurable amount of phosphorus on their surfaces as they contain very low amount of phospholipids on their cell walls compared to amino acids and polysaccharids. This is also confirmed by the shape of the

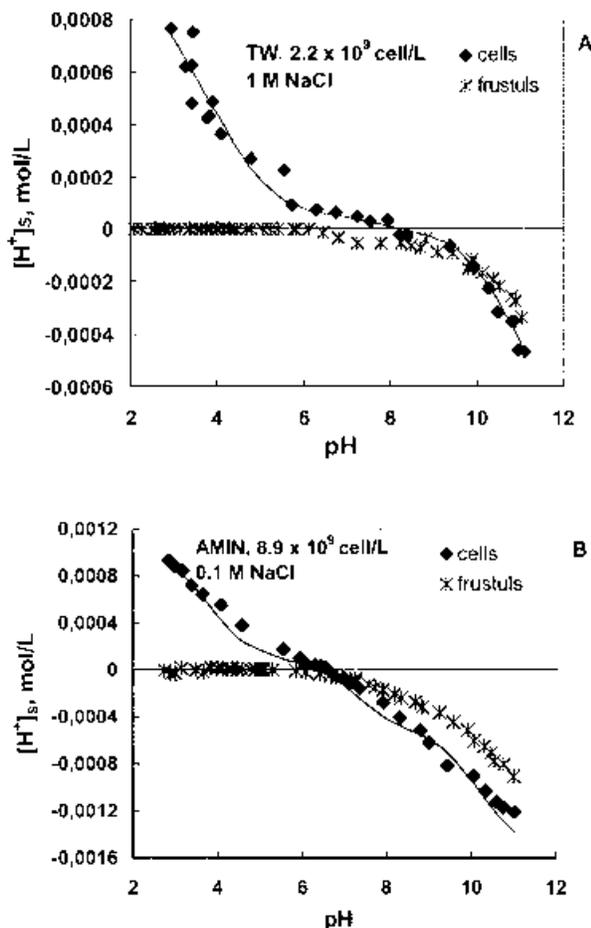


Fig. 12. Quantitative comparison of excess surface proton concentration associated with whole cells and their frustules for equal concentration of cells for TW, I = 1 mol/L NaCl (A) and AMIN, I = 0.1 mol/L NaCl (B). The curves represent the SCM fit to the experimental data.

carbon XPS peak of diatoms (Fig. 7) that is quite similar for the four investigated species but is different from that of bacteria (Rouxhet and Genet, 1991; Rouxhet et al., 1994; Dufrière et al., 1997) whose cell wall comprises a significant amount of phospholipids.

The Si/C ratios measured by XPS (Table 5) and the relative intensity of Si-O-Si bands estimated from the ATR spectra of studied diatoms (Figs. 4 and 5) are in good agreement with frustule/whole cells mass ratios measured in the present work (Table 1) and reported in literature (Conley et al., 1989). In particular, cell walls of planktonic diatoms contain ~5 times less silica than those of periphytic species. A quantitative comparison between surface groups concentration determined by spectroscopic techniques and modeling of surface charge data can be assessed in Figure 13 where the percentage of >SiOH, >COOH and >NH<sub>2</sub> groups obtained from SCM is correlated with the percentage of Si and proteins in diatoms cell walls determined by XPS. A positive correlation is observed suggesting the consistency between different methods of surface characterization.

Table 6. Surface speciation model of four diatom-water interfaces.<sup>a</sup>

Species	>COOH sites conc. (10 <sup>13</sup> mol/cell)	>NH <sub>3</sub> sites conc. (10 <sup>13</sup> mol/cell)	>SiOH sites conc. (10 <sup>13</sup> mol/cell)	Total sites (mmol/cell)	Total sites (mmol/g dry cell)	Total sites (mmol/m <sup>2</sup> frustules)	EDL capacitance (μF/cell)	>COOH pK <sub>a1</sub>			>NH <sub>3</sub> pK <sub>a3</sub>			>SiOH pK <sub>a2</sub>				
								1 M	0.1 M	0.001 M	0.01 M	0.001 M	0.01 M	0.1 M	1 M	0.001 M	0.01 M	0.1 M
TW	4.26 ± 0.08	4.55 ± 0.05	0.48 ± 0.25	9.3 × 10 <sup>-10</sup>	0.66	0.346	0.49 ± 0.07	-4.9 ± 0.4	-4.2 ± 0.1	-5 ± 0.1	-4.9 ± 0.1	10.15 ± 0.35	9.7 ± 0.1	9.8 ± 0.1	10.1	-7.35 ± 0.15	-7 ± 0.1	-7.5 ± 0.1
SC	2.7 ± 1.4	32 ± 3	0	3.5 × 10 <sup>-9</sup>	9.5	0.94	2.0 ± 0.35	-4.7 ± 0.1	-4.7 ± 0.1	-4.7 ± 0.1	ND	8.2 ± 0.1	8.2 ± 0.1	8.0 ± 0.1	ND	ND	ND	ND
AMIN	0.96 ± 0.13	1.04 ± 0.15	0.38 ± 0.31	2.4 × 10 <sup>-10</sup>	1.14	0.187	0.52 ± 0.075	ND	-4 ± 0.1	-3.5 ± 0.3	ND	9.8 ± 0.1	10.5 ± 0.3	ND	ND	-7.2 ± 0.1	-6.8 ± 0.2	ND
NMIN	3.9 ± 0.2	4.3 ± 0.1	1.3 ± 0.3	9.5 × 10 <sup>-10</sup>	0.95	0.28	0.73 ± 0.1	-3.2 ± 0.1	ND	-3.5 ± 0.1	ND	8.5 ± 0.1	ND	10.1 ± 0.1	ND	-6.5 ± 0.1	-7.0 ± 0.1	ND

<sup>a</sup> ND = not determined.

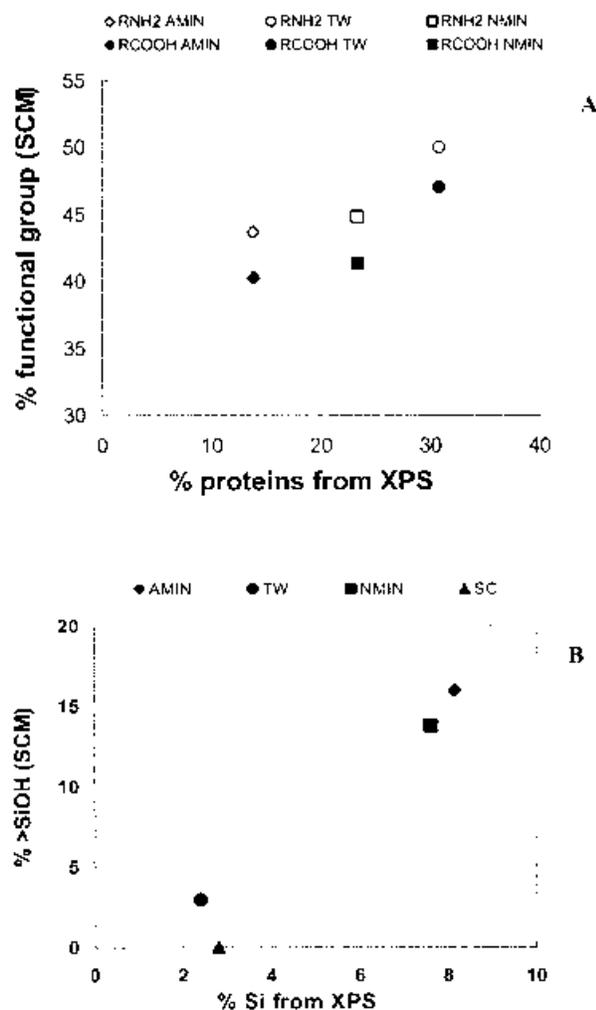


Fig. 13. Comparison between surface groups concentration determined by XPS and obtained from surface titrations modeling. (A) Correlation between protein content in the cell walls measured by XPS and percentage of proteins functional groups obtained from SCM; (B) Correlation between atomic percentage of Si measured by XPS and relative proportion of  $>SiOH^{\circ}$  groups deduced from SCM.

#### 4.2. Surface Complexation Model

Diatom surface proton adsorption dependence on pH and weight-normalized surface site densities determined in the present study are similar to those previously reported for marine diatom species (Gonzalez Davila et al., 1995, 2000), spores of marine bacteria (He and Tebo, 1998), freshwater algae (Xue et al., 1988; Keifer et al., 1997), and whole bacteria and their cell walls (Plette et al., 1995; Martinez et al., 2002; Phoenix et al., 2002). Note, however, the important shift between the pH of isoelectric point ( $pH_{IEP}$ ) measured by electrophoresis and the pH of zero charge point ( $pH_{PZC}$ ) determined by surface titration (1–2 vs. 6–9). This difference can be understood in view of diatoms cell wall structure proposed by Hecky et al. (1973) based on their chemical analysis. According to this model, the amino groups attached to silica templates are covered by a polysaccharide layer bearing negatively charged

carboxylic groups. Reversible protonation/deprotonation of deeper located amine groups is responsible for the high concentration of surface proton excess measured during titration experiments. These groups are situated far from the shear plane and thus cannot contribute to the zeta potential development. The weak proportion of dissociated  $>COO^{-}$  groups on the surface ( $pK = 4$ ) even at pH 2 is enough to provide a negative zeta potential. The carboxylic groups dominating the outermost surface layer are fully deprotonated at  $pH > 4-5$  thus yielding constant surface potential and pH-independent zeta potential. Note that a two pH units difference between  $pH_{IEP}$  and  $pH_{PZC}$  for bacterium *Rhodococcus erythropolis* has been ascribed to the presence of a thin polysaccharide layer on its surface (Van der Wal et al., 1997a,b). For diatoms, it follows that the thicker the organic layer, the larger the difference between  $pH_{IEP}$  and  $pH_{PZC}$ . Indeed, this shift is twice lower for AMIN and NMIN compared to marine planctonic species (see sections 2.1.2. and 3.1.1 for cell wall thickness discussion).

In accord with previous data on bacteria (Plette et al., 1995, 1996; Daughney and Fein, 1998), the protonation constant of carboxylic and amine groups determined in this study ranges from 4 to 6 and 8 to 10, respectively. Fitted values for deprotonation constants of freshwater and marine diatom silanol groups (6.5–7.5) are within the range reported for diatom frustules (Dixit and Van Cappellen, 2002), quartz (Duval et al., 2002) and amorphous silica (Sverjensky and Sahai, 1996). Freshwater periphytic diatoms present close values of protonation constants and surface concentrations for the three functional groups (Table 6). The surface stability constant for TW carboxylic groups is lower than that for freshwater species whereas the amino groups protonation constants are quite similar. Silanol groups concentration on TW is  $\sim 5$  times lower than that on AMIN, in qualitative agreement with XPS and FT-IR results. *S. costatum* presents a quite different surface chemistry. The amino groups protonation constant is significantly lower than that for the periphytic species whereas  $>NH_2$  concentration is much higher. Within the resolution of our surface titrations, the silanol groups concentration on SC is insignificant. Apparently, for SC, a thick layer of proteins/carboxylic acids governs the surface proton adsorption and prevents the silica frustule from contact with the external solution. Unlike for the three other diatom species, proton adsorption on SC is not fully reversible (see section 2.2), as a result, values of site densities and surface stability constants listed in Table 6 for this species should be considered as rough estimates and will not be used for further discussion.

The total concentration of proton- and hydroxyl-active functional groups on AMIN, NMIN and TW surfaces ( $\sim 1$  mmol/g dry weight, Table 6) is comparable with that reported for bacterial cell walls based on numerous surface titrations (0.5–5 mmol/g, Plette et al., 1995; Fein et al., 1997; van der Wal et al., 1997b; Daughney and Fein, 1998; He and Tebo, 1998; Cox et al., 1999; Daughney et al., 2001; Sokolov et al., 2001; Yee and Fein, 2001). Normalization of the total sites density to the B.E.T. surface area of siliceous skeletons yields values between 0.3 and 0.9 mmol/m<sup>2</sup>. These numbers are one order of magnitude higher than the maximal surface sites densities for diatom frustules (Dixit and Van Cappellen, 2002) and amorphous silica (Sverjensky and Sahai, 1996). Therefore, the acid-base properties and, possibly, the affinity for metals of diatom cultures are essentially governed by the organic layers covering the silica frustule.

## 5. CONCLUSIONS

This study reports on a concerted multitechnical approach for characterizing diatoms surface chemistry in aqueous solutions. Following the tracks developed earlier for bacteria, we demonstrate, using a set of conventional macroscopic (surface titration, electrophoresis) and spectroscopic (SEM, TEM, FT-IR and XPS) techniques, that a quantitative thermodynamic approach can be successfully applied to describe chemical equilibria at the diatoms/solution interfaces. This approach allowed us to elucidate important differences in terms of surface charge and surface chemical composition between marine and estuarine planktonic (*T. weissfloggi*, *S. costatum*) and freshwater peryphytic (*A. minutissimum*, *N. minima*) species. In particular, the relative proportion of silica in the cell wall of diatoms is much lower for planktonic than for peryphytic species whereas the polysaccharidic outermost layer is much thicker in marine species. Use of four different species allowed us to correlate the results of spectroscopic (XPS) measurements with surface complexation modeling.

Comparison of  $\text{pH}_{\text{IEP}}$  measured by electrophoresis ( $\leq 2$  and  $< 1$  for peryphytic and planktonic species, respectively) and  $\text{pH}_{\text{PZC}}$  obtained by surface titrations (6 and 8 for peryphytic and planktonic species, respectively) suggests that different parts of surface layers participate in surface charge and  $\zeta$ -potential developments. Such a multilayer organization of the surface structure is also confirmed by surface sites densities measured for diatoms in this study that exceed by more than one order of magnitude the number of sites available on the surface of silica frustules. This suggests the preeminent role of the organic coating in determining the amphoteric properties and the affinity to metals of diatom cell walls.

In natural settings, bacteria degrade the organic membrane of diatoms after their death thus progressively exposing the underlying silica frustules to the aquatic environment. This is accompanied by a dramatic shift in metal binding properties and surface reactivity. For example, up to 90% of totally trapped metals, located in the proton-binding sites of organic coatings (Pokrovsky et al., 2002) are likely to be released in the environment during diagenesis of diatom cells. Moreover, the surface properties of diatom shells (i.e., adsorption of pollutants and dissolution kinetics) are strongly affected by their high surface area and nanoscale porosity. These parameters are likely to considerably evolve in the course of the diagenetic transformations of freshly formed shells into compact diatomite. It is expected that the results of the present study can allow to establish the thermodynamic and structural bases for understanding the molecular mechanisms of metal and toxicant interactions with diatom surfaces and their frustules.

*Acknowledgments*—We are grateful to J. Fein, H.L. Dong and two anonymous reviewers whose insight and thorough reviews greatly improve the manuscript. This work was supported by the French National Program for Basic Research ACI "Eau et Environnement." We thank B. Etcheverria for invaluable help during diatoms culture process. J.-C. Harrichoury and A. Castillo are thanked for careful technical assistance and BET specific surface area measurements.

Associate editor: J. B. Fein

## REFERENCES

- Ahner B. A., Morel F. M. M., and Moffett J. W. (1997) Trace metal control of phytochelatin production in coastal waters. *Limnol. Oceanogr.* **42**, 601–608.
- Anderson M. A., Morel F. M. M., and Guillard R. R. L. (1978) Growth limitation of a coastal diatom by low zinc ion activity. *Nature* **276**, 70–71.
- Bayer M. E. and Sloyer J. L. (1990) The electrophoretic mobility of Gram-negative and Gram-positive bacteria: An electrokinetic analysis. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 867–874.
- Bellamy L. J. (1975) *The Infrared Spectra of Complex Molecules*. Chapman and Hall.
- Beveridge T. J. (1988) The bacterial surface: General consideration towards design and function. *Can. J. Microbiol.* **34**, 363–372.
- Beveridge T. J., Schulze-Lam S. and Thompson J. B. (1995) Detection of anionic sites on bacterial walls, their ability to bind toxic heavy metals and form sedimentable flocs and their contribution to mineralization in natural freshwater environments. In *Metal Speciation and Contamination of Soil* (eds. H. E. Allen, C. P. Huang, G. W. Bailey and A. R. Bowers), pp. 183–205. Lewis.
- Beveridge T. J., Hughes M. N., Lee H., Leung K. T., Poole R. K., Savvaidis I., Silver S., and Trevors J. T. (1997) Metal-microbe interactions: Contemporary approaches. *Adv. Microbiol. Physiol.* **38**, 177–243.
- Boonaert C. J. P. and Rouxhet P. G. (2000) Surface of lactic acid bacteria: Relationships between chemical composition and physico-chemical properties. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2548–2554.
- Brand L. E., Sunda W. G., and Guillard R. R. L. (1986) Reduction of marine phytoplankton reproduction rates by copper and cadmium. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **96**, 225–250.
- Busscher H. J., Bellon-Fontaine M.-N., Mozes van der Mei H. C., et al. (1990) An interlaboratory comparison of physico-chemical methods for studying the surface properties of microorganisms—Application to *Streptococcus thermophilus* and *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Microbiol. Methods* **12**, 101–115.
- Colthup N. B., Daly L. H., and Wiberley S. E. (1975) *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*. Academic Press.
- Conley D. J., Kilham S. S., and Theriot E. (1989) Differences in silica content between marine and freshwater diatoms. *Limnol. Oceanogr.* **34**, 205–213.
- Cox J. S., Smith S., Warren L. A., and Ferris F. G. (1999) Characterizing heterogeneous bacterial surface functional groups using discrete affinity spectra for proton binding. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 4514–4521.
- Crist R. H., Oberholser K., Shank N., and Nguyen M. (1981) Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls. *Environ. Sci. Technol.* **15**, 1212–1217.
- Crist R. H., Oberholser K., Schwartz D., Marzoff J., Ryder D., and Crist D. R. (1988) Interactions of metals and protons with algae. *Environ. Sci. Technol.* **22**, 750–766.
- Crist R. H., Martin J. R., Guptill P. W., Eslinger J. M., and Crist D. R. (1990) Interaction of metals and protons with algae. 2. Ion exchange in adsorption and metal displacement by protons. *Environ. Sci. Technol.* **24**, 337–342.
- Crist R. H., Oberholser K., McGarrity J., Crist D. R., Johnson J. K., and Brittsan J. M. (1992) Interaction of metals and protons with algae. 3. Marine algae, with emphasis on lead and aluminium. *Environ. Sci. Technol.* **26**, 496–502.
- Csogor Z., Melgar D., Schmidt K., and Posten C. (1999) Production and particle characterization of the frustules of *Cyclotella cryptica* in comparison with siliceous earth. *J. Biotechnol.* **70**, 71–75.
- Daughney C. J. and Fein J. B. (1998) The effect of ionic strength on the adsorption of  $\text{H}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ , and  $\text{Cu}^{2+}$  by *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*: A surface complexation model. *J. Coll. Interface Sci.* **198**, 53–77.
- Daughney C. J., Fein J. B., and Yee N. (1998) A comparison of the thermodynamics of metal adsorption onto two common bacteria. *Chem. Geol.* **144**, 161–176.
- Daughney C. J., Fowle D. A., and Fortin D. E. (2001) The effect of growth phase on proton and metal adsorption by *Bacillus subtilis*. *Geochim. Cosmochim. Acta* **65**, 1025–1035.

- Dauta A. (1982) Conditions de développement du phytoplancton: Etude comparative du comportement de huit espèces en culture. I. Détermination des paramètres de croissance en fonction de la lumière et de la température. *Ann. Limnol.* **18**, 217–262.
- Dengis P. B., Gerin P. A., and Rouxhet P. G. (1995) X-ray photoelectron spectroscopy analysis of biosurfaces: Examination of performances with yeast cells and related model compounds. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **4**, 199–211.
- Dixit S. and Van Cappellen P. (2002) Surface chemistry and reactivity of biogenic silica. *Geochim. Cosmochim. Acta* **66**, 2559–2568.
- Downing H. D. and Williams D. (1975) Optical constants of water in the infrared. *J. Geophys. Res.* **80**, 1656–1661.
- Dufrène Y. F. and Rouxhet P. G. (1996) X-ray photoelectron spectroscopy analysis of the surface composition of *Azospirillum brasilense* in relation to growth conditions. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **7**, 271–279.
- Dufrène Y., van der Wal A., and Rouxhet P. G. (1997) XPS analysis of isolated walls and whole cells of five Gram-positive strains. *J. Bacteriol.* **179**, 1–6.
- Duval Y., Mielczarski J. A., Pokrovsky O. S., Mielczarski E., and Ehrhardt J. J. (2002) Evidence of the existence of three types of species at the quartz-aqueous solution interface at pH 0–10: XPS surface group quantification and surface complexation modeling. *J. Phys. Chem. B* **106**, 2937–2945.
- Fein J. B., Daughney C. J., Yee N., and Davis T. A. (1997) A chemical equilibrium model for metal adsorption onto bacterial surfaces. *Geochim. Cosmochim. Acta* **61**, 3319–3328.
- Fisher N. S. (1986) On the reactivity of metals for marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* **31**, 443–449.
- Fisher N. S. and Fabris J. G. (1982) Complexation of Cu, Zn, and Cd by metabolites excreted from marine diatoms. *Mar. Chem.* **11**, 245–255.
- Fisher N. S. and Reinfelder J. R. (1995). The trophic transfer of metals in marine systems. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems* (eds. A. Tessier and D. R. Turner), pp. 363–406. Wiley.
- Gold C., Feurtet-Mazel A., Coste M., and Boudou A. (2002) Field transfer of periphytic diatom communities to assess short-term structural effects of metals (Cd, Zn) in rivers. *Water Res.* **36**, 3654–3664.
- Gold C., Feurtet-Mazel A., Coste M., and Boudou A. (2003) Effect of cadmium stress on periphytic diatom communities in indoor artificial streams. *Freshwater Biol.* **48**, 316–328.
- Goncalves M. L. S., Sigg L., Reutlinger M., and Stumm W. (1987) Metal ion binding by biological surfaces: Voltametric assessment in the presence of bacteria. *Sci. Total Environ.* **60**, 105–119.
- Goncalves M. L. S. and Lopez da Conceicao A. C. (1989) Metal ion binding of copper(II), zinc(II), and lead(II) by the algae *Selenastrum capricornutum* Printz. *Sci. Total Environ.* **38**, 155–166.
- Gonzalez-Davila M. (1995) The role of phytoplankton cell on the control of heavy metal concentrations in seawater. *Mar. Chem.* **48**, 215–236.
- Gonzalez-Davila M., Santana-Casiano J. M., Perez-Pena J., and Millero F. J. (1995) Binding of Cu(II) to the surface and exudates of the alga *Dunaliella tertiolecta* in seawater. *Environ. Sci. Technol.* **29**, 289–301.
- Gonzalez-Davila M., Santana-Casiano J. M., and Laglera L. M. (2000) Copper adsorption in diatom cultures. *Mar. Chem.* **70**, 161–170.
- Guillard R. R. L. (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In *Culture of Marine Invertebrate Animals* (eds. W. L. Smith and M. H. Chanley), pp. 26–60. Plenum Press.
- Hayashi H., Tsuneda S., Hirata A., and Sasaki H. (2001) Soft particle analysis of bacterial cells and its interpretation of cell adhesion behaviors in terms of DLVO theory. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **22**, 149–157.
- He L. M. and Tebo B. M. (1998) Surface charge properties of and Cu(II) adsorption by spores of the marine *Bacillus* sp. strain SG-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1123–1129.
- Hecky R. E., Mopper K., Kilham P., and Degens E. T. (1973) The amino acid and sugar composition of diatom cell-walls. *Mar. Biol.* **19**, 323–331.
- Herbelin A. L. and Westall J. C. (1996) FITEQL version 3.2, a computer program for determination of chemical equilibrium constants from experimental data. Department of Chemistry, Oregon State University, Corvallis.
- Kates M. and Volcani B. E. (1968) Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in diatoms. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* **60**, 19–29.
- Keifer E., Sigg L., and Schosseler P. (1997) Chemical and spectroscopic characterization of algae surfaces. *Environ. Sci. Technol.* **31**, 759–764.
- Kijlstra J. and van der Wal A. (1995) Electrokinetic behaviour of bacterial suspensions. *Bioelectrochem. Bioenergetics* **37**, 149–151.
- Kosmulski M., Maczka E., Janusz W., and Rosenholm J. B. (2002) Multiinstrumental study of the electrophoretic mobility of quartz. *J. Coll. Interface Sci.* **250**, 99–103.
- Kroger N., Bergsdorf Ch., and Sumper M. (1994) A new calcium binding glycoprotein family constitutes a major diatom cell wall component. *EMBO J.* **13**, 4676–4683.
- Lambard J., Lesieur P., and Zemb Th. (1992) A triple axis double crystal multiple reflexion camera used for small angle X-ray scattering. *J. Physique I France* **1192**, 1191–1213.
- Ledin M. (2000) Accumulation of metals by microorganisms—Processes and importance for soil systems. *Earth-Sci. Rev.* **51**, 1–31.
- Lützenkirchen J. (1999) The constant capacitance model and variable ionic strength: An evaluation of possible applications and applicability. *J. Coll. Interface Sci.* **217**, 8–18.
- Marshall K. C., Pembrey R., and Schneider R. P. (1994) The relevance of X-ray photoelectron spectroscopy for analysis of microbial cell surfaces: A critical view. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2**, 371–376.
- Martinez R. E., Smith D. S., Kulczycki E., and Ferris G. F. (2002) Determination of intrinsic bacterial surface acidity constants using a Donnan shell model and a continuous pK<sub>a</sub> distribution method. *J. Coll. Interface Sci.* **253**, 130–139.
- Morel F. M. M., Hudson R. J. M., and Price N. M. (1991) Limitation of productivity by trace metals in the sea. *Limnol. Oceanogr.* **36**, 1742–1755.
- Morel F. M. M., Reinfelder J. R., Roberts S. B., Chamberlan C. P., Lee J. G., and Yee D. (1994) Zinc and carbon colimitation of marine phytoplankton. *Nature* **269**, 740–742.
- Naumann D., Helm D., and Labischinski H. (1991) Microbial characterization by FTIR spectroscopy. *Nature* **351**, 81–82.
- Phoenix V. R., Martinez R. E., Konhauser K. O., and Ferris G. G. (2002) Characterization and implications of the cell surface reactivity of *Calothrix* sp. Strain KC97. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4827–4834.
- Pistocchi R., Mormile A. M., Guerrini F., Isani G., and Boni L. (2000) Increased production of extra- and intracellular metal-ligands in phytoplankton exposed to copper and cadmium. *J. Appl. Phycol.* **12**, 469–477.
- Plette A. C. C., van Riemsdijk W. H., Benedetti M. F., and van der Wal A. (1995) pH dependent charging behavior of isolated cell walls of a gram-positive soil bacterium. *J. Coll. Interface Sci.* **173**, 354–363.
- Plette A. C. C., Benedetti M. F., and van Riemsdijk W. H. (1996) Competitive binding of protons, calcium, cadmium, and zinc to isolated cell walls of a gram-positive soil bacterium. *Environ. Sci. Technol.* **30**, 1902–1910.
- Pokrovsky O. S., Schott J., and Thomas F. (1999) Processes at the magnesium-bearing carbonates/solution interface. I. A surface speciation model of magnesite. *Geochim. Cosmochim. Acta* **63**, 863–880.
- Pokrovsky O. S., Gelabert A., Viers J., Schott J., Boudou A., and Feurtet-Mazel A. (2002) Study of diatoms/aqueous solution interface. II. Interaction of trace metals (Zn, Cu, Cd, Pb, Cr, Al) with freshwater and marine diatoms (abstract 15A). *Geochim. Cosmochim. Acta* **66** (Suppl.), A609.
- Pokrovsky O. S. and Schott J. (2004) Experimental study of brucite dissolution and precipitation in aqueous solutions: Surface speciation and chemical affinity control. *Geochim. Cosmochim. Acta* **68**, 31–45.
- Richmond D. V. and Fisher D. J. (1973) The electrophoretic mobility of micro-organisms. *Adv. Microbiol. Physiol.* **9**, 1–27.
- Rouxhet P. G. and Genet M. J. (1991) Chemical composition of the microbial cell surface by X-ray photoelectron spectroscopy. In *Microbial Cell Surface Analysis: Structural and Physicochemical*

- Methods* (eds. N. Mozes, P. S. Handley, H. J. Busscher and P. G. Rouxhet), pp. 173–220. VCH.
- Rouxhet P. G., Mozes N., Dengis P. B., Dufrene Y. F., Gerin P. A., and Genet M. J. (1994) Application of X-ray photoelectron spectroscopy to microorganisms. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2**, 347–369.
- Schindler P. W. and Stumm W. (1987) The surface chemistry of oxides, hydroxides and oxide minerals. In *Aquatic Surface Chemistry* (ed. W. Stumm), pp. 337–365. Wiley.
- Schmitt J. and Flemming H.-C. (1998) FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *Int. Biodeteriorat. Biodegrad.* **41**, 1–11.
- Schmitt D., Muller A., Csogor Z., Frimmel F. H., and Posten C. (2001) The adsorption kinetics of metal ions onto different microalgae and siliceous earth. *Water Res.* **35**, 779–785.
- Shashikala A. R. and Raichur A. M. (2002) Role of interfacial phenomena in determining adsorption of *Bacillus polymyxa* onto hematite and quartz. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **24**, 11–20.
- Sokolov I., Smith D. S., Henderson G. S., Gorby Y. A., and Ferris F. G. (2001) Cell surface electrochemical heterogeneity of the Fe(III)-reducing bacteria *Shewanella putrefaciens*. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 341–347.
- Spalla O. (2003) General theorems in small-angle scattering. In *Neutrons, X-rays and Light* (eds. P. Lindner and Th. Zemb), pp. 49–71, North-Holland Delta Series, Elsevier.
- Sposito G. (1998) On points of zero charge. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 2815–2819.
- Sunda W. G. and Huntsman S. A. (1995) Regulation of copper concentration in the oceanic nutrient cycle by phytoplankton uptake and regeneration cycles. *Limnol. Oceanogr.* **40**, 135–137.
- Sunda W. G. and Huntsman S. A. (1998) Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: Phytoplankton as model systems. *Sci. Total Environ.* **219**, 165–181.
- Sverjensky D. and Sahai N. (1996) Theoretical prediction of single-site surface-protonation equilibrium constants for oxides and silicates in water. *Geochim. Cosmochim. Acta* **60**, 3773–3797.
- Swift D. M. and Wheeler A. P. (1992) Evidence of an organic matrix from diatom biosilica. *J. Phycol.* **28**, 202–209.
- Ulberg Z. R. and Marochko L. G. (1999) The electrophoretic properties and stability of the cell suspensions. *Colloids Surf. A. Physicochem. Engng Asp.* **159**, 513–518.
- van der Mai H. C., de Vries J., and Busscher H. J. (2000) X-ray photoelectron spectroscopy for the study of microbial cell surfaces. *Surface Sci. Rep.* **39**, 1–24.
- van der Wal A., Minor M., Norde W., Zehnder A. J. B., and Lyklema J. (1997a) Electrokinetic potential of bacterial cells. *Langmuir* **13**, 165–171.
- van der Wal A., Norde W., Zehnder A. J. B., and Lyklema J. (1997b) Determination of the total charge in the cell walls of Gram-positive bacteria. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **9**, 81–100.
- Volesky B. and Holan Z. R. (1995) Biosorption of heavy metals. *Biotechnol. Prog.* **11**, 235–250.
- Vrieling E. G., Beelen T. P. M., Van Santen R. A., and Gieskes W. W. C. (1999) Diatom silicon biomineralization as an inspirational source of new approaches to silica production. *J. Biotechnol.* **70**, 39–51.
- Vrieling E. G., Beelen T. P. M., van Santen R. A., and Gieskes W. W. C. (2000) Nanoscale uniformity of pore architecture in diatomaceous silica: A combined small and wide angle X-ray scattering study. *J. Phycol.* **36**, 146–159.
- Xue H.-B., Stumm W., and Sigg L. (1988) The binding of heavy metals to algal surfaces. *Water Res.* **22**, 917–926.
- Yee N. and Fein J. (2001) Cd adsorption onto bacterial surfaces: A universal adsorption edge? *Geochim. Cosmochim. Acta* **65**, 2037–2042.
- Zemb Th., Taché O., Né F., and Spalla O. (2003) Improving sensitivity of a small angle X-ray scattering camera with pinhole collimation using separated optical elements. *Rev. Sci. Instrum.* **74**, 2456–2462.
- Zhou X. and Wangersky P. J. (1989) Production of copper-complexing organic ligands by the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* in a cage culture turbidostat. *Mar. Chem.* **26**, 239–259.

Appendix 1. Summary of electrophoretic measurements performed in NaCl solutions.

I,M	pH	Mobility ( $\mu\text{m/S/V/cm}$ )	Diatoms/frustules
0.001 M	3.02	-2.01	SC
0.001 M	3.18	-2.07	SC
0.001 M	3.53	-2.21	SC
0.001 M	4.11	-2.33	SC
0.001 M	4.38	-2.49	SC
0.001 M	4.80	-2.93	SC
0.001 M	5.57	-3.09	SC
0.001 M	5.09	-3.20	SC
0.001 M	4.66	-2.56	SC
0.001 M	5.25	-3.03	SC
0.001 M	5.82	-3.27	SC
0.001 M	6.00	-3.13	SC
0.001 M	10.37	-3.22	SC
0.001 M	10.07	-3.18	SC
0.001 M	7.97	-3.10	SC
0.01 M	2.03	-1.83	SC
0.01 M	2.19	-1.69	SC
0.01 M	2.49	-1.62	SC
0.01 M	2.97	-1.79	SC
0.01 M	3.21	-2.06	SC
0.01 M	3.55	-2.15	SC
0.01 M	4.17	-2.13	SC
0.01 M	4.37	-2.64	SC
0.01 M	4.90	-2.21	SC
0.01 M	5.88	-2.37	SC
0.01 M	12.05	-3.10	SC
0.01 M	10.72	-2.54	SC
0.01 M	7.61	-2.56	SC
0.01 M	6.93	-2.44	SC
0.01 M	11.06	-2.23	SC
0.01 M	10.05	-2.84	SC
0.01 M	9.32	-2.62	SC
0.1 M	1.06	-0.58	SC
0.1 M	1.22	-0.80	SC
0.1 M	1.50	-0.89	SC
0.1 M	2.00	-1.17	SC
0.1 M	2.20	-0.88	SC
0.1 M	2.51	-1.22	SC
0.1 M	3.06	-1.56	SC
0.1 M	3.27	-1.69	SC
0.1 M	3.62	-1.72	SC
0.1 M	4.34	-1.62	SC
0.1 M	4.59	-1.34	SC
0.1 M	5.32	-2.07	SC
0.1 M	7.03	-1.78	SC
0.1 M	12.63	-2.14	SC
0.1 M	11.82	-1.90	SC
0.1 M	10.83	-1.75	SC
0.1 M	10.12	-1.93	SC
0.1 M	7.86	-1.56	SC
0.1 M	6.75	-1.97	SC
0.1 M	9.30	-1.92	SC
0.001 M	2.89	-0.78	TW
0.001 M	3.01	-0.92	TW
0.001 M	3.21	-1.05	TW
0.001 M	3.49	-1.06	TW
0.001 M	3.87	-1.25	TW
0.001 M	4.04	-1.39	TW
0.001 M	4.25	-1.62	TW
0.001 M	4.65	-2.59	TW
0.001 M	5.84	-3.35	TW
0.001 M	5.36	-3.18	TW
0.001 M	5.58	-3.31	TW
0.001 M	5.64	-3.45	TW
0.001 M	5.19	-3.34	TW
0.001 M	7.02	-3.16	TW
0.001 M	6.31	-3.53	TW

Appendix 1. (Continued)

I,M	pH	Mobility ( $\mu\text{m/S/V/cm}$ )	Diatoms/frustules
0.001 M	10.71	-3.34	TW
0.001 M	10.56	-3.11	TW
0.001 M	10.30	-3.01	TW
0.001 M	9.42	-2.94	TW
0.001 M	7.61	-3.21	TW
0.001 M	8.93	-3.31	TW
0.001 M	8.41	-3.08	TW
0.001 M	8.08	-3.49	TW
0.001 M	9.91	-3.10	TW
0.1 M	1.00	-0.53	TW
0.1 M	1.17	-0.61	TW
0.1 M	1.52	-0.53	TW
0.1 M	1.95	-0.61	TW
0.1 M	2.15	-0.68	TW
0.1 M	2.45	-1.06	TW
0.1 M	2.98	-1.21	TW
0.1 M	4.26	-1.40	TW
0.1 M	4.99	-1.15	TW
0.1 M	3.20	-1.56	TW
0.1 M	3.49	-1.23	TW
0.1 M	4.10	-1.28	TW
0.1 M	5.55	-1.62	TW
0.1 M	12.65	-1.92	TW
0.1 M	11.81	-1.43	TW
0.1 M	10.91	-1.60	TW
0.1 M	4.71	-1.72	TW
0.1 M	6.90	-1.23	TW
0.1 M	10.54	-1.40	TW
0.1 M	11.02	-1.69	TW
0.1 M	8.78	-1.54	TW
0.001 M	2.98	-0.95	NMIN
0.001 M	3.02	-1.08	NMIN
0.001 M	3.12	-1.27	NMIN
0.001 M	3.27	-1.52	NMIN
0.001 M	3.50	-1.29	NMIN
0.001 M	4.01	-1.78	NMIN
0.001 M	5.40	-2.08	NMIN
0.001 M	5.04	-2.02	NMIN
0.001 M	5.65	-2.08	NMIN
0.001 M	10.95	-1.97	NMIN
0.001 M	9.31	-2.00	NMIN
0.001 M	6.17	-2.07	NMIN
0.01 M	3.32	-0.79	NMIN
0.01 M	4.00	-1.03	NMIN
0.01 M	3.01	-0.81	NMIN
0.01 M	2.55	-0.67	NMIN
0.01 M	2.42	-0.52	NMIN
0.01 M	2.34	-0.38	NMIN
0.01 M	2.25	-0.39	NMIN
0.01 M	2.19	-0.24	NMIN
0.01 M	2.14	-0.54	NMIN
0.01 M	2.10	-0.02	NMIN
0.01 M	2.05	0.07	NMIN
0.01 M	10.79	-1.59	NMIN
0.01 M	8.48	-1.36	NMIN
0.01 M	6.64	-1.12	NMIN
0.01 M	12.03	-2.19	NMIN
0.01 M	11.43	-2.03	NMIN
0.01 M	7.15	-1.62	NMIN
0.01 M	5.94	-1.31	NMIN
0.01 M	5.95	-1.40	NMIN
0.1 M	2.04	-0.46	NMIN
0.1 M	2.14	-0.31	NMIN
0.1 M	2.34	-0.44	NMIN
0.1 M	2.56	-0.62	NMIN
0.1 M	3.04	-0.58	NMIN
0.1 M	4.07	-0.71	NMIN
0.1 M	5.26	-1.11	NMIN

Appendix 1. (Continued)

I,M	pH	Mobility ( $\mu\text{m/S/V/cm}$ )	Diatoms/frustules
0.1 M	5.65	-1.05	NMIN
0.1 M	5.83	-0.81	NMIN
0.1 M	11.94	-0.93	NMIN
0.1 M	9.54	-1.25	NMIN
0.1 M	6.12	-1.12	NMIN
0.01 M	2.03	-0.59	frust NMIN
0.01 M	2.21	-1.03	frust NMIN
0.01 M	2.50	-1.00	frust NMIN
0.01 M	3.02	-1.12	frust NMIN
0.01 M	3.20	-1.39	frust NMIN
0.01 M	3.51	-1.41	frust NMIN
0.01 M	4.02	-1.36	frust NMIN
0.01 M	4.21	-1.62	frust NMIN
0.01 M	4.53	-1.45	frust NMIN
0.01 M	5.01	-1.68	frust NMIN
0.01 M	5.27	-1.53	frust NMIN
0.01 M	11.97	-3.33	frust NMIN
0.01 M	10.82	-3.11	frust NMIN
0.01 M	8.64	-2.53	frust NMIN
0.01 M	6.36	-1.53	frust NMIN
0.01 M	11.82	-3.32	frust NMIN
0.01 M	11.49	-3.12	frust NMIN
0.01 M	10.24	-3.06	frust NMIN
0.01 M	8.97	-2.63	frust NMIN
0.01 M	2.00	-0.10	AMIN
0.01 M	2.16	-0.53	AMIN
0.01 M	2.45	-1.23	AMIN
0.01 M	2.99	-1.61	AMIN
0.01 M	3.16	-0.92	AMIN
0.01 M	3.46	-1.52	AMIN
0.01 M	4.12	-1.54	AMIN
0.01 M	4.27	-1.50	AMIN
0.01 M	4.72	-1.58	AMIN
0.01 M	5.57	-2.02	AMIN
0.01 M	11.95	-2.56	AMIN
0.01 M	11.03	-2.47	AMIN
0.01 M	9.99	-2.13	AMIN
0.01 M	7.49	-1.84	AMIN
0.01 M	6.78	-1.54	AMIN
0.01 M	6.18	-1.86	AMIN
0.01 M	8.96	-2.11	AMIN
0.01 M	7.91	-1.91	AMIN
0.1 M	1.51	-0.43	AMIN
0.1 M	2.01	-0.37	AMIN
0.1 M	2.23	-0.47	AMIN
0.1 M	2.54	-0.67	AMIN
0.1 M	3.04	-0.82	AMIN
0.1 M	3.20	-0.63	AMIN
0.1 M	4.09	-0.57	AMIN
0.1 M	4.33	-0.70	AMIN
0.1 M	4.60	-0.87	AMIN
0.1 M	5.27	-0.58	AMIN
0.1 M	5.65	-0.72	AMIN
0.1 M	12.54	-1.45	AMIN
0.1 M	9.40	-0.44	AMIN
0.1 M	9.40	-0.44	AMIN
0.1 M	7.65	-0.74	AMIN
0.1 M	6.73	-0.93	AMIN
0.1 M	10.27	-0.70	AMIN

Appendix 2. Summary of surface titration experiments performed in a modified limited residence time reactor.

I,M	Electrolyte	Conc. cell/L	Diatoms	pH	$[\text{H}^+]_s$ , M
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	10.51	-1.20E-03
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	10.25	-7.07E-04
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	10.18	-8.11E-04
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	10.01	-5.93E-04
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	9.98	-3.15E-04
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	9.79	0.00E+00
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	9.58	-1.61E-04
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	9.44	-3.81E-04
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	9.42	-8.82E-05
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	9.41	5.66E-04
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	9.29	-1.06E-04
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	9.13	5.29E-04
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	8.92	6.28E-04
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	8.80	-1.42E-04
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	8.70	9.31E-04
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	8.56	1.16E-03
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	8.04	2.64E-03
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	7.25	2.48E-03
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	6.83	3.88E-03
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	6.73	4.08E-03
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	6.72	4.08E-03
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	6.27	5.58E-03
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	5.82	7.05E-03
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	5.68	7.00E-03
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	5.02	8.43E-03
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	4.90	8.40E-03
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	4.11	9.15E-03
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	3.09	8.93E-03
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	2.82	9.55E-03
0.1	NaCl	2.3E+09	SC	2.60	9.94E-03
1	NaCl	2.3E+09	SC	10.38	-1.42E-03
1	NaCl	2.3E+09	SC	10.13	-1.10E-03
1	NaCl	2.3E+09	SC	9.90	-7.42E-04
1	NaCl	2.3E+09	SC	9.67	-4.64E-04
1	NaCl	2.3E+09	SC	9.54	-3.23E-04
1	NaCl	2.3E+09	SC	9.31	1.74E-04
1	NaCl	2.3E+09	SC	9.00	2.55E-04
1	NaCl	2.3E+09	SC	8.80	3.84E-04
1	NaCl	2.3E+09	SC	8.64	5.32E-04
1	NaCl	2.3E+09	SC	8.58	7.09E-04
1	NaCl	2.3E+09	SC	8.41	1.15E-03
1	NaCl	2.3E+09	SC	8.32	8.31E-04
1	NaCl	2.3E+09	SC	8.22	2.06E-03
1	NaCl	2.3E+09	SC	8.09	1.54E-03
1	NaCl	2.3E+09	SC	7.98	2.47E-03
1	NaCl	2.3E+09	SC	7.66	3.32E-03
1	NaCl	2.3E+09	SC	7.14	3.34E-03
1	NaCl	2.3E+09	SC	6.26	4.15E-03
1	NaCl	2.3E+09	SC	5.87	5.05E-03
1	NaCl	2.3E+09	SC	5.69	5.99E-03
1	NaCl	2.3E+09	SC	4.76	6.74E-03
1	NaCl	2.3E+09	SC	3.39	7.28E-03
1	NaCl	2.3E+09	SC	2.80	8.05E-03
0.001	NaCl	2.2E+09	TW	10.80	-4.60E-04
0.001	NaCl	2.2E+09	TW	10.42	-4.78E-04
0.001	NaCl	2.2E+09	TW	10.16	-3.16E-04
0.001	NaCl	2.2E+09	TW	9.82	-2.47E-04
0.001	NaCl	2.2E+09	TW	9.84	-2.37E-04
0.001	NaCl	2.2E+09	TW	9.55	-8.82E-05
0.001	NaCl	2.2E+09	TW	9.29	-9.04E-05
0.001	NaCl	2.2E+09	TW	8.93	-3.84E-05
0.001	NaCl	2.2E+09	TW	8.65	-1.11E-05
0.001	NaCl	2.2E+09	TW	8.43	2.50E-05
0.001	NaCl	2.2E+09	TW	7.26	4.48E-05
0.001	NaCl	2.2E+09	TW	6.57	4.67E-05
0.001	NaCl	2.2E+09	TW	6.01	1.04E-04
0.001	NaCl	2.2E+09	TW	5.77	1.71E-04

Appendix 2. (Continued)

I,M	Electrolyte	Conc. cell/L	Diatoms	pH	[H <sup>+</sup> ] <sub>s</sub> , M
0.001	NaCl	2.2E+09	TW	5.38	1.96E-04
0.001	NaCl	2.2E+09	TW	5.27	2.20E-04
0.001	NaCl	2.2E+09	TW	4.28	3.86E-04
0.001	NaCl	2.2E+09	TW	4.06	5.10E-04
0.001	NaCl	2.2E+09	TW	3.81	6.19E-04
0.001	NaCl	2.2E+09	TW	3.52	6.71E-04
0.001	NaCl	2.2E+09	TW	3.31	6.49E-04
0.001	NaCl	2.2E+09	TW	3.28	6.39E-04
0.001	NaCl	2.2E+09	TW	3.11	7.22E-04
0.001	NaCl	2.2E+09	TW	2.97	7.69E-04
0.001	NaCl	2.2E+09	TW	2.76	7.36E-04
0.001	NaCl	2.2E+09	TW	2.67	7.96E-04
1	NaCl	2.2E+09	TW	11.12	-4.61E-04
1	NaCl	2.2E+09	TW	10.96	-4.58E-04
1	NaCl	2.2E+09	TW	10.86	-3.51E-04
1	NaCl	2.2E+09	TW	10.80	-3.48E-04
1	NaCl	2.2E+09	TW	10.48	-3.18E-04
1	NaCl	2.2E+09	TW	10.29	-2.24E-04
1	NaCl	2.2E+09	TW	9.96	-1.47E-04
1	NaCl	2.2E+09	TW	9.39	-6.28E-05
1	NaCl	2.2E+09	TW	8.41	-2.38E-05
1	NaCl	2.2E+09	TW	8.24	-2.00E-05
1	NaCl	2.2E+09	TW	7.96	3.74E-05
1	NaCl	2.2E+09	TW	7.54	2.92E-05
1	NaCl	2.2E+09	TW	7.25	5.06E-05
1	NaCl	2.2E+09	TW	6.76	6.36E-05
1	NaCl	2.2E+09	TW	6.30	7.42E-05
1	NaCl	2.2E+09	TW	5.75	9.70E-05
1	NaCl	2.2E+09	TW	5.56	2.26E-04
1	NaCl	2.2E+09	TW	4.80	2.70E-04
1	NaCl	2.2E+09	TW	4.10	3.63E-04
1	NaCl	2.2E+09	TW	3.90	4.86E-04
1	NaCl	2.2E+09	TW	3.83	4.35E-04
1	NaCl	2.2E+09	TW	3.79	4.21E-04
1	NaCl	2.2E+09	TW	3.42	4.83E-04
1	NaCl	2.2E+09	TW	3.44	6.26E-04
1	NaCl	2.2E+09	TW	3.28	6.17E-04
1	NaCl	2.2E+09	TW	3.46	7.52E-04
1	NaCl	2.2E+09	TW	2.96	7.67E-04
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	11.50	-6.33E-04
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	11.33	-5.67E-04
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	10.80	-5.44E-04
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	10.72	-4.63E-04
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	10.43	-3.87E-04
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	10.13	-3.51E-04
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	10.04	-2.81E-04
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	9.79	-2.27E-04
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	9.29	-1.60E-04
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	9.09	-1.59E-04
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	9.09	-1.67E-04
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	8.85	-7.73E-05
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	8.57	-8.78E-05
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	7.71	-9.81E-05
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	7.68	-6.04E-05
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	7.03	-2.99E-05
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	6.50	6.79E-06
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	6.43	3.21E-06
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	6.33	1.77E-05
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	6.21	3.09E-05
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	5.91	5.06E-05
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	5.64	7.01E-05
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	5.30	8.49E-05
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	4.80	9.27E-05
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	4.80	9.61E-05
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	4.31	1.58E-04
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	3.87	1.90E-04
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	3.56	2.51E-04
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	3.34	2.57E-04

Appendix 2. (Continued)

I,M	Electrolyte	Conc. cell/L	Diatoms	pH	[H <sup>+</sup> ] <sub>s</sub> , M
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	3.21	2.81E-04
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	3.09	2.78E-04
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	2.94	3.37E-04
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	2.82	3.80E-04
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	2.47	4.56E-04
0.01	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	2.28	5.52E-04
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	10.61	-1.06E-03
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	10.18	-7.01E-04
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	9.66	-6.42E-04
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	9.06	-4.53E-04
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	9.00	-5.63E-04
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	8.67	-3.84E-04
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	8.67	-3.84E-04
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	8.47	-2.95E-04
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	7.88	-2.12E-04
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	7.72	-2.16E-04
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	7.64	-1.78E-04
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	7.24	-1.26E-04
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	7.16	-1.28E-04
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	6.93	-9.24E-05
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	6.75	-6.42E-05
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	6.45	-3.24E-05
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	6.22	-1.36E-05
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	5.64	3.52E-06
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	5.40	9.78E-06
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	5.23	2.03E-05
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	4.90	4.27E-05
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	4.54	8.99E-05
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	4.20	1.09E-04
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	3.97	1.68E-04
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	3.68	1.75E-04
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	3.41	2.13E-04
1	NaNO <sub>3</sub>	1.5E+09	NMIN	3.01	2.40E-04
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	11.24	-2.67E-04
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	11.14	-2.65E-04
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	10.95	-2.57E-04
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	10.63	-2.11E-04
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	10.50	-2.03E-04
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	9.49	-1.26E-04
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	9.22	-1.12E-04
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	8.89	-1.01E-04
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	8.55	-9.46E-05
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	8.30	-9.80E-05
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	7.90	-8.35E-05
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	7.08	-5.03E-05
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	6.92	-2.96E-05
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	6.84	-3.29E-05
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	6.73	-1.44E-05
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	6.34	-2.79E-07
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	5.83	2.00E-05
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	5.70	2.85E-05
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	5.49	2.85E-05
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	5.10	3.37E-05
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	4.79	3.22E-05
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	4.56	4.05E-05
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	4.39	4.50E-05
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	4.16	5.66E-05
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	4.01	6.82E-05
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	3.75	8.15E-05
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	3.57	8.50E-05
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	3.45	8.72E-05
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	3.27	1.01E-04
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	3.21	1.03E-04
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	3.09	1.09E-04
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	3.01	1.22E-04
0.01	NaCl	2.1E+09	AMIN	2.82	1.31E-04
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	11.04	-3.15E-04
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	10.74	-3.26E-04

Appendix 2. (Continued)

I, M	Electrolyte	Conc. cell/L	Diatoms	pH	$[H^+]_s$ , M
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	10.54	-2.71E-04
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	10.37	-2.64E-04
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	10.00	-2.24E-04
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	9.09	-1.57E-04
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	9.06	-1.59E-04
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	8.47	-1.30E-04
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	8.28	-1.11E-04
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	8.03	-9.18E-05
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	7.65	-7.49E-05
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	7.32	-5.74E-05
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	7.10	-3.80E-05
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	6.97	-2.89E-05
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	6.73	-2.39E-05
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	6.16	2.13E-05
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	5.93	1.04E-05
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	5.51	1.80E-05
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	5.17	2.26E-05
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	4.89	3.01E-05
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	4.64	3.97E-05
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	4.57	5.93E-05
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	4.39	7.03E-05
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	4.19	7.40E-05
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	4.06	1.01E-04
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	3.78	1.42E-04
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	3.54	1.58E-04
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	3.30	1.94E-04
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	3.13	2.15E-04
0.1	NaCl	2.1E+09	AMIN	3.01	2.45E-04
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	11.03	-1.21E-03
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	10.76	-1.17E-03
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	10.59	-1.12E-03
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	10.34	-1.03E-03
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	10.05	-9.03E-04
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	9.45	-8.15E-04
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	9.01	-6.22E-04
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	8.81	-5.12E-04
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	8.32	-4.04E-04
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	7.93	-2.80E-04
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	7.37	-1.56E-04
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	7.36	-1.51E-04
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	7.14	-1.10E-04
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	6.98	-6.91E-05
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	6.74	-3.71E-05
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	6.55	1.89E-05
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	6.45	3.31E-05
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	6.31	4.18E-05
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	6.11	4.19E-05
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	5.95	9.55E-05
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	5.55	1.77E-04
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	4.58	3.83E-04
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	4.08	5.53E-04
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	3.65	6.44E-04
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	3.39	7.17E-04
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	3.18	8.40E-04
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	3.00	8.81E-04
0.1	NaCl	8.9E+09	AMIN	2.84	9.31E-04

CHAPITRE 5  
INTERACTIONS AVEC LE ZINC

## I. INTRODUCTION

Les microorganismes sont connus pour leur capacité à accumuler les métaux si bien que certains d'entre eux sont aujourd'hui utilisés comme biosorbants pour plusieurs éléments toxiques. Parmi ces microorganismes, les diatomées jouent un rôle majeur ; elles sont présentes en grandes quantités dans à peu près tous les systèmes aquatiques et représentent 20 à 25 % de la productivité primaire sur Terre. De ce fait, elles sont potentiellement capables de contrôler la spéciation et le transfert de nombreux métaux dans les systèmes naturels. Parmi ces métaux, le zinc a un statut particulier puisque c'est à la fois un élément essentiel pour la cellule mais aussi un élément toxique si il est présent à fortes teneurs dans le milieu environnant, provoquant alors une inhibition de croissance cellulaire. A faibles concentrations, son rôle est crucial puisqu'il est impliqué dans de nombreux mécanismes biologiques (activité enzymatique, réplication de l'ADN), constituant ainsi le métal présent aux plus fortes teneurs dans les structures intracellulaires. Cependant, la plupart des études consacrées au zinc ont été conduites sur des diatomées marines et se sont souvent focalisées sur leur rôle de régulateur de zinc dans les océans. De plus, les mécanismes d'adsorption au niveau moléculaire n'ont jamais été décrits en détail.

Les deux études complémentaires présentées dans ce chapitre ont pour but de caractériser les interactions entre le zinc et les surfaces de quatre espèces différentes de diatomées, deux marines planctoniques et deux périphytiques fluviatiles, afin de fournir une comparaison entre les espèces marines et les espèces d'eau douce.

La première des deux études présentées dans ce chapitre permet de déterminer, par mise en œuvre de la spectrométrie d'absorption des rayons X (XAFS), la nature des complexes formés par le zinc à la surface des diatomées et à l'intérieur de leur cellule.

La seconde étude a pour but l'élaboration d'un modèle de complexation surfacique du zinc à partir d'expériences de sorption de ce métal à la surface des diatomées en fonction du pH et de sa concentration en solution. Ce modèle de complexation surfacique a été bâti à partir du modèle thermodynamique de l'interface eau/diatomée, décrit dans le chapitre précédent. Pour une compréhension plus fine des mécanismes d'adsorption, le fractionnement isotopique du zinc à la surface des diatomées a été mesuré et interprété en s'appuyant sur la structure des complexes caractérisés par spectroscopie XAFS.

## II. RESUME EN FRANCAIS DE L'ARTICLE: "SPECIATION OF Zn ASSOCIATED WITH DIATOMS USING X-RAY ABSORPTION SPECTROSCOPY"

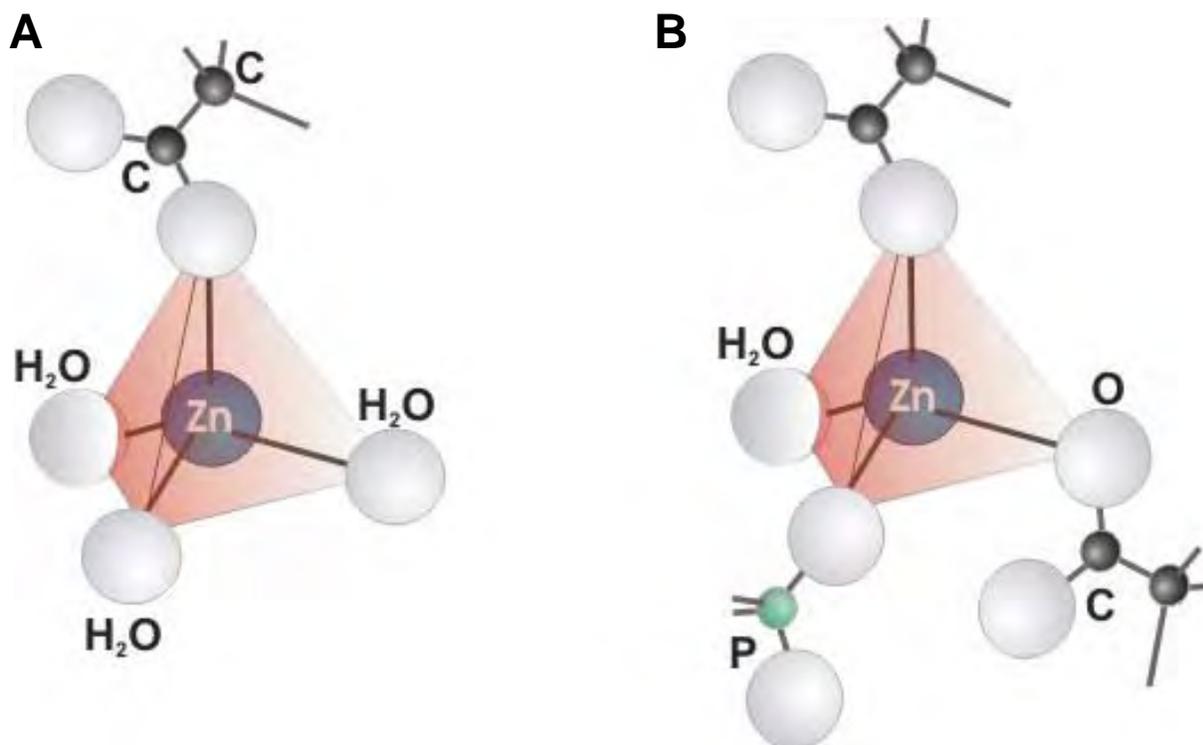
Au cours de ce travail, les interactions entre  $Zn^{2+}$  aqueux et des diatomées marines (*Skeletonema costatum*) et fluviatiles (*Achnanthis minutissimum*, *Navicula minima* et *Melosira varians*) ont été caractérisées en utilisant des techniques macroscopiques conventionnelles (mesure du taux de sorption en fonction du pH, isothermes de Langmuir) alors que la structure locale du zinc adsorbé à la surface ou incorporé dans la cellule a été caractérisée in situ par spectroscopie XAFS au seuil K du zinc sur des échantillons intacts en solution et lyophilisés.

Pour toutes les espèces étudiées, le zinc adsorbé à la surface de la cellule a une configuration tétraédrique avec les atomes d'oxygène situés à une distance de  $\sim 2.00 \pm 0.02 \text{ \AA}$  alors qu'en solution le zinc forme un aquo-ion coordonné à 6 molécules d'eau (avec une distance Zn-O =  $2.09 \text{ \AA}$ ). La comparaison des longueurs de liaison Zn-O mises en évidence pour la diatomée et le frustule siliceux suggère une participation négligeable de ce dernier lors de la sorption du zinc à la surface des diatomées. Aucune précipitation du zinc à la surface des cellules n'a été détectée en dessous de pH=8. Le zinc forme des liaisons monodentates avec un ou deux groupes carboxyliques de la surface, ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans le cadre du modèle de complexation du zinc à la surface des diatomées que nous avons développé (voir article suivant). L'environnement atomique du zinc à la surface des diatomées est indépendant du temps d'exposition et de la concentration initiale en métal. Cela indique qu'il n'y a pas production par la cellule de ligands contenant de la cystéine ou de l'histidine lors du stress métallique.

L'environnement atomique du zinc incorporé à l'intérieur des cellules de diatomées d'eau douce lors de leur croissance est nettement différent de celui adsorbé à la surface des diatomées. Il est encore dominé dans la première sphère de coordination par la présence d'oxygène et/ou d'azote situés à  $1.97 \pm 0.02 \text{ \AA}$  dans une structure tétraédrique, mais un atome de phosphore et deux atomes de carbone sont présents dans la deuxième sphère de coordination (figure 31). Ces résultats suggèrent que le zinc présent à l'intérieur de la cellule peut être associé à des groupements phosphoryles et carboxyles des peptidoglycanes, à des

groupes fonctionnels de chaînes latérales d'acides aminés comme la fonction carboxylique de l'acide glutamique, des enzymes comportant de l'histidine, des polyphosphates, ou encore des acides carboxyliques simples responsables du stockage du zinc dans la cellule.

Aucune différence notable dans la structure des complexes formés par le zinc n'a été détectée entre les trois espèces fluviatiles. Cela suggère que les mécanismes d'interactions avec le zinc pour les diatomées tolérantes aux métaux (AMIN et NMIN) et la diatomée non-tolérante (MVAR) sont les mêmes.



**Figure 31 : Schéma de la structure des complexes tétraédriques formés par le zinc (A) adsorbé à la surface de la diatomée au niveau d'un groupe carboxylique ; et (B) incorporé à l'intérieur de la cellule pour les diatomées d'eau douce et formant un complexe avec deux groupes carboxyliques et un groupe phosphate.**

Pour l'espèce marine *S. costatum*, le zinc incorporé à l'intérieur de la cellule est coordonné à 2 atomes d'oxygène/azote situés à 1.95 Å et 2 atomes de soufre, situés à 2.33 Å. La seconde sphère de coordination contient des atomes de zinc et de soufre. Ces résultats indiquent qu'une partie du zinc peut être associée à des clusters de métallothionéine. D'une

manière plus générale, l'environnement structural du zinc à l'intérieur des cellules de *S. costatum* semble être composé de ligands cystéine et histidine, constituants de nombre d'enzymes intracellulaires.

Les différences de structure des complexes du zinc à l'intérieur des cellules entre *S. costatum* et les espèces fluviales peuvent s'expliquer par une disponibilité plus faible de ce métal dans les eaux marines. Cela a pour conséquence la présence de ligands intracellulaires plus forts chez l'espèce marine. Les constantes d'adsorption et les densités de sites élevées qui ont été calculées par le modèle de complexation surfacique pourraient être la conséquence de la forte affinité de *S. costatum* pour le zinc.

Cette étude, qui confirme que le zinc sorbé à la surface des cellules est principalement lié à des groupements carboxyliques, apporte des informations nouvelles sur son statut chimique à l'intérieur des cellules.

### III. SPECIATION OF Zn ASSOCIATED WITH DIATOMS USING X-RAY ABSORPTION SPECTROSCOPY

## Speciation of Zn Associated with Diatoms Using X-ray Absorption Spectroscopy

OLEG S. POKROVSKY,\*†  
GLEB S. POKROVSKI,†  
ALEXANDRE GÉLABERT,†  
JACQUES SCHOTT,† AND ALAIN BOUDOU‡

*Aqueous and Environmental Experimental Geochemistry Group—LMTG, UMR 5563, CNRS, 14 Avenue Edouard Belin, 31400 Toulouse, France, and Laboratoire d'Ecotoxicologie et d'Ecophysologie des Systèmes Aquatiques (LEESA), UMR CNRS 5805, Université de Bordeaux 1, Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France*

The long- and short-term interactions between zinc, an essential but also toxic element, and freshwater and marine diatoms are not well understood partly because of a lack of information on Zn speciation on the surface and inside the cells. In this work, interactions of aqueous  $Zn^{2+}$  with marine (*Skeletonema costatum*) and freshwater (*Achnanthis minutissimum*, *Navicula minima*, and *Melosira varians*) diatoms were studied using conventional macroscopic techniques, while the local atomic structure of metal ions adsorbed on their surface or incorporated into the cells was characterized by in-situ Zn K-edge X-ray absorption fine structure (XAFS) spectroscopy on both intact and lyophilized samples. At the cell surface for all diatom species studied, Zn was tetrahedrally coordinated with oxygen at  $\sim 2.00 \pm 0.02 \text{ \AA}$  and monodentately bonded to one or two carboxylate groups; these results are consistent with the surface speciation model developed from macroscopic adsorption experiments. The atomic environment of Zn incorporated into freshwater diatoms during long-term growth in normal nutrient media was distinctly different from that of adsorbed Zn: it was dominated by O (and/or N) neighbors in a tetrahedral arrangement at  $1.97 \pm 0.02 \text{ \AA}$  in the first atomic shell, with the presence of 1 phosphorus and 2 carbons in the Zn second shell. Contrasting speciation of intracellular zinc was revealed for the marine species *Skeletonema costatum* in which Zn was coordinated to 2 O/N atoms and 2 sulfur groups in the form of cysteine–histidine complexes and/or zinc thiolate clusters. These new structural data strongly suggest: (i) the predominant  $>R-COO^-$  ligand binding of Zn at the diatom surface; (ii) the nonspecific storage of Zn in the form of carboxylate/phosphate groups inside the cell of freshwater species; and (iii) the highly specific thiol–ligand coordination of intracellular zinc for marine *S. costatum* species.

### Introduction

Marine and freshwater diatoms, unicellular algae encased in a silica skeleton, play a major role in the distribution and

transport of many essential and toxic trace elements in surficial aquatic environments. As a result, numerous studies have been devoted to metal uptake and adsorption by diatoms (1–3), excretion of ligands in response to metal stress, and diatom growth limitation by trace elements (4). Among metals, zinc is particularly interesting because it combines the property of essential nutrient at low concentrations and toxicant at high concentrations (5). The importance of zinc for catalytic activity of diatom enzymes is well-known (6, 7). The mechanisms of diatom cells detoxification may include binding to proteins (8), polyphosphates (9), thiols (10, 11), or phytochelatins (12), but they are still a matter of strong debate. Most of the available information on Zn interactions with diatoms is related to marine species, due to their importance for Zn level regulation in seawater and their potential use as proxies. Interactions of freshwater or periphytic diatoms with metals (including Zn) are much less characterized despite their importance both for metals regulation in river waters (13) and their bioaccumulation and transfer capacities along the food webs (14). Besides, periphytic diatoms are widely used to detect changes in water quality due to their specific sensitivity to organic and metallic pollution (15–17). There is therefore a need of rigorous, molecular-level understanding of metal interactions with diatoms, notably with the organic membrane covering their surface that is responsible for the initiation of biosorption and biouptake processes.

X-ray absorption fine structure (XAFS) spectroscopy is one of the most powerful techniques allowing in-situ resolution of the speciation and chemical environment of metals in organic and inorganic materials. Over the past decade, XAFS methods allowed collection of a considerable amount of information on Zn speciation on mineral surfaces (18, 19), contaminated soils and sediments (20–22), plants, fungi, and bacteria (23–26), and various organic compounds such as enzymes (27, 28) and humic acids (29). Overall, these studies confirmed the extremely versatile nature of zinc chemical status in these materials: while Zn sorbed on minerals stays tetracoordinated with first neighbor bond distances ranging from 1.97 to 2.02  $\text{\AA}$  (18, 19), its speciation in organic compounds is much more diverse. Octahedrally coordinated (N/O) Zn has been observed in humic acids (29) and microbial cells (26), whereas different plants, fungi, and lichens have been found to accumulate Zn phosphate and Zn oxalate in tetrahedral coordination (25). Animals and their enzymes such as carbonic anhydrase exhibit Zn tetracoordinated to histidine and/or cysteine sites (28, 30 and references therein). At the same time, structural understanding of molecular-level interactions between zinc and aquatic organisms such as unicellular algae is still lacking.

The present study is aimed at filling this gap by combining conventional adsorption techniques with in-situ spectroscopic observations of diatoms interaction with zinc. For this purpose, experiments of Zn adsorption on diatom suspensions and diatoms growth in the presence of zinc were conducted under controlled laboratory conditions, and the chemical status of this metal has been investigated using high-resolution XAFS spectroscopy. This allows us to address several open questions concerning the mechanisms of Zn interaction with diatoms: (i) how the speciation of adsorbed Zn depends on exposure time, pH, and Zn concentration in solution? (ii) Are the chemical forms of zinc adsorbed on the surface and incorporated inside the cells different? (iii) Is the Zn chemical environment specific for each diatom species, for example, metal-resistant and metal-sensitive species or for periphytic freshwater and marine planktonic species?

\* Corresponding author phone: +33 5 61 33 26 25; fax: +33 5 61 33 25 60; e-mail: oleg@lmtg.obs-mip.fr.

† Aqueous and Environmental Experimental Geochemistry Group—LMTG.

‡ Université de Bordeaux 1.

(iv) What is the role of diatom frustule (silicious exoskeleton) in zinc binding from solution? It is anticipated that answering these questions would allow better constraining the terrestrial and marine cycle of Zn and defining the factors governing its speciation and thus biological availability in aquatic systems.

## Materials and Methods

**Diatom Growth and Zn Adsorption.** Monospecific diatom cultures were developed from laboratory strains to produce biomass of four species: marine planktonic *Skeletonema costatum* (abbreviated SC), freshwater periphytic *Achnanthes minutissimum* (AMIN), *Navicula minima* (NMIN), and *Melosira varians* (MVAR). Axenic strains of AMIN (pennate shape,  $12 \times 4 \mu\text{m}$ ), NMIN (pennate,  $7 \times 3 \mu\text{m}$ ), and MVAR (centric,  $10 \times 15 \mu\text{m}$ ) were obtained from FDCC (Freshwater Diatom Culture Collection), IA, and SC (centric,  $10 \mu\text{m}$ ) was given by CREMA (Centre de Recherche en Ecologie Marine et Aquaculture), L'Houmeau, France. Diatoms were cultured to concentration of  $\sim 10^7$  cell/L at  $20^\circ\text{C}$  in a sterile EDTA-free Dauta (freshwater) or f/2 (seawater) medium at  $\text{pH} \approx 7.7$ – $8.0$  and  $[\text{Zn}]_{\text{tot}} = 0.2$ – $0.3 \mu\text{M}$  using 2500 mL Erlenmeyer flasks placed in a thermo-regulated chamber under a light intensity of  $30 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$  on a 14:10-light:dark cycle (see details in ref 31). Constant Zn concentration was maintained by periodical additions of fresh nutrient solution and Zn analysis in the course of growth. Typical incubation time was 1–2 weeks. Diatoms were harvested from the late exponential–stationary growth phase and kept at  $4^\circ\text{C}$  until use.

Before the adsorption experiments, algae were rinsed in  $0.01 \text{ M NaNO}_3$  aqueous solutions. Zinc adsorption was performed at  $25^\circ\text{C}$  in continuously agitated diatom suspension ( $8.5 \text{ g humid/L}$  in  $0.01 \text{ M NaNO}_3$  or  $\text{NaCl}$ ) at a Zn initial concentration of  $20$ – $50 \mu\text{M}$  and  $\text{pH}$  of  $3$ – $9$ . The concentration of diatom cell suspension was quantified by weighting humid (centrifuged during 15 min at  $2200 \text{ g}$ ) and dry (lyophilized) biomass. Before the adsorption experiment, diatoms were rinsed three times in  $\text{NaCl}$  or  $\text{NaNO}_3$  electrolyte solution ( $\text{pH} \approx 5$ ) using centrifugation at  $2200 \text{ g}$  ( $\sim 500 \text{ mL}$  of solution for  $1 \text{ g}$  of wet biomass). We avoided specific treatments of cells with acid or EDTA solution to keep the surface of the cells in “native” conditions.

Diatom frustules were extracted from the cell suspension ( $20 \text{ g humid/L}$ ) by acid digestion ( $5\% \text{ HNO}_3 + 5\% \text{ H}_2\text{O}_2$ ) during 6 h at  $105^\circ\text{C}$  followed by thorough rinsing in sterile deionized water using centrifugation. FT-IR, XRD, and SEM analysis of produced solid material revealed only amorphous silica ( $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ) without detectable traces of organic constituents.

For adsorption experiments, the exposure time varied from 3 min to 24 h. Adsorption isotherms at constant  $\text{pH}$  were obtained in  $0.003 \text{ M HEPES}$  buffer, which does not form complexes with divalent metals in aqueous solution (32).  $\text{pH}$ -dependent adsorption edge was studied in  $0.01 \text{ M NaNO}_3$  and  $\text{NaCl}$  for freshwater and marine species, respectively, with additions of  $\text{HNO}_3(\text{HCl})$  or  $\text{NaOH}$ . Nitrogen-saturated sterile deionized water (MilliQ,  $18 \text{ M}\Omega$ ) was used for all adsorption experiments. The typical concentration of adsorbed zinc was  $0.2$ – $0.4 \text{ mmol/g}$  dry biomass, which is 2 orders of magnitude higher than the quantity of Zn initially present in noncontaminated cells ( $1$ – $4 \mu\text{mol/g}$ ). Because EXAFS signal is an “average” of the chemical states of all absorber's atoms in the sample, the contribution of intracellular zinc to the adsorbed zinc (1%) is far below the uncertainty of EXAFS parameters extracted (i.e.,  $>10\%$ ). For low concentrated samples of incorporated zinc, we used a thorough rinsing in electrolyte solution to remove (i.e., desorb) all surface zinc. Preliminary experiments on reversibility of adsorption demonstrated that such a rinsing is largely

enough to remove more than 95% of adsorbed zinc. Therefore, we do not expect that the adsorbed Zn interferes for EXAFS signal of incorporated samples; besides, it has been known for long that the amount of metal bound by surfaces is insignificant when compared to the amount taken up by the energy-requiring processes (33).

At the end of experiment, the  $\text{pH}$  was measured, and the solution was centrifuged and filtered through a  $0.22 \mu\text{m}$  Nylon filter. The filtrate was acidified with ultrapure  $\text{HNO}_3$  and kept in the refrigerator before the analysis. The concentration of metal adsorbed to diatoms in each vessel was calculated by subtracting the concentration of metal in the supernatant from the original amount of zinc added in the solution. Relatively low and stable during the time DOC concentration monitored during adsorption experiments (i.e.,  $4$ – $10 \text{ mg/L}$ ) and rather high Zn and cell biomass concentration ( $0.5$ – $3 \text{ mg/L}$  and  $8$ – $70 \text{ g/L}$ , respectively) allow us to suggest that no cell degradation and exudates release occurs during interaction with Zn and that the diatom surface functional groups rather than dissolved organic ligands are primarily responsible for Zn binding in the studied systems.

The reversibility of adsorption equilibria was tested following a standard method (34) by adding different amounts of acid to a suspension of diatoms with 100% adsorbed zinc. In these experiments, full desorption was observed in less than 1 h of exposure time and it was found that, at  $\text{pH}$  from 3 to 9, the amount of irreversibly adsorbed Zn did not exceed 5%, suggesting an equilibrium adsorption process.

Adsorption experiments on fresh (live) biomass were performed just before the XAFS measurements. Zn concentrations in solutions were measured by flame atomic absorption (Perkin-Elmer 5100) with an uncertainty of  $\pm 1\%$  and a detection limit of  $5 \mu\text{g/L}$ . For Zn concentration lower than  $100 \mu\text{g/L}$ , analyses were performed by ICP-MS on a Perkin-Elmer Elan 6000 with a detection limit of  $0.01 \mu\text{g/L}$  and an uncertainty of  $\leq 5\%$ . The  $\text{pH}$  of suspension was measured at  $25^\circ\text{C}$  using a Mettler Toledo combined electrode, with an uncertainty of  $\pm 0.002$  units.

**Sample Preparation for XAFS Measurements.** The samples investigated in this study are listed in Table 1. The short-term adsorption interaction was carried out as described in the previous section, and the incorporation represents longer term growth in the presence of zinc. For all incorporation experiments (AMIN-4, 5, 6a,b,c; NMIN-3, 4; MVAR and SC-2), Zn concentration was maintained constant within  $\pm 10$ – $20\%$  by adding fresh nutrient solution during the growth. For all adsorption experiments (AMIN-1,2,3; NMIN-1, 2a, 2b; SC-1, FRUST, and  $\text{SiO}_2$ ), the value given in Table 1 represents the initial Zn concentration in solution. The final or equilibrium concentration can be calculated from the percentage of adsorbed Zn.

Two types of material were used for XAFS measurements: lyophilized biomass (for AMIN and NMIN) and wet (live) biomass (for all diatom species). In the first case, after short-term adsorption or long-term incorporation, the cells were harvested by centrifugation during 15 min at  $2500 \text{g}$ , the wet biomass was frozen at  $-80^\circ\text{C}$ , lyophilized, and stored at  $+4^\circ\text{C}$  until the measurement. Freeze-drying was used to preserve the biomass samples between harvest and XAFS analysis and to achieve the highest Zn concentration for XAFS spectra acquisition without increasing the level of initial Zn loading. The effect of this treatment on the chemical status of Zn in our samples appeared to be within the resolution of the XAFS method (see below). This is consistent with results of Sarret et al. (25) who reported a minimal effect of freeze-drying on Zn and Pb speciation in organic material such as lichens. Wet (live) biomass samples were harvested by centrifugation during 15 min at  $2000 \text{g}$  just before the sample scan. Optical microscopic inspection of the diatoms before and after XAFS measurements showed no significant change in the diatom

TABLE 1. Description of Diatom Samples Used for XAFS Studies<sup>a</sup>

sample	diatom species	type of interaction	duration of exposure	pH	[DOC], mg/L (solution)	[Zn], $\mu\text{M}$ (solution)	[Zn] in biomass, $\mu\text{mol/g}$ dry	% Zn adsorbed
AMIN-1	AMIN, freeze-dried	adsorption	15 min	8.61 $\pm$ 0.01	5.0	10 <sup>#</sup>	144	96
AMIN-2	AMIN, freeze-dried	adsorption	15 min	6.95 $\pm$ 0.01	7.0	95 <sup>#</sup>	75	50
AMIN-3	AMIN, wet biomass	adsorption	45 min	7.41 $\pm$ 0.02	7.0	117 <sup>#</sup>	400	62
AMIN-4	AMIN, freeze-dried	incorporation	3 weeks	7.75 $\pm$ 0.25	8.0	0.3 $\pm$ 0.05*	4.3	nd
AMIN-5	AMIN, wet biomass	incorporation	3 weeks	7.75 $\pm$ 0.25	8.0	0.3 $\pm$ 0.05*	4.3	nd
AMIN-6a	AMIN, wet biomass	incorporation	1 day	6.25 $\pm$ 0.10	23.4	25 <sup>#</sup>	nd	nd
AMIN-6b	AMIN, wet biomass	incorporation	1 day	6.80 $\pm$ 0.10	8.3	4.3 <sup>#</sup>	nd	nd
AMIN-6c	AMIN, wet biomass	incorporation	1 week	7.10 $\pm$ 0.10	4.3	43 <sup>#</sup>	nd	nd
NMIN-1	NMIN, freeze-dried	adsorption	30 min	7.55 $\pm$ 0.05	6.5	90 <sup>#</sup>	168	94
NMIN-2a	NMIN, wet biomass	adsorption	120 min	7.40 $\pm$ 0.02	7.0	115 <sup>#</sup>	441	60
NMIN-2b	NMIN, wet biomass	adsorption	3 min	7.41 $\pm$ 0.01	6.5	270 <sup>#</sup>	258	45
NMIN-3	NMIN, freeze-dried	incorporation	3 weeks	7.75 $\pm$ 0.25	8.0	0.3 $\pm$ 0.03*	4.1	nd
NMIN-4	NMIN, wet biomass	incorporation	3 weeks	7.75 $\pm$ 0.25	8.0	0.3 $\pm$ 0.03*	4.1	nd
MVAR	MVAR, wet biomass	incorporation	4 weeks	7.25 $\pm$ 0.25	3.0	0.2 $\pm$ 0.03*	10.0	nd
SC-1	SC, wet biomass	adsorption	55 min	7.49 $\pm$ 0.01	15.0	144 <sup>#</sup>	342	77
SC-2	SC, wet biomass	incorporation	4 weeks	7.95 $\pm$ 0.15	35.0	0.3 $\pm$ 0.05*	1.1	nd
FRUST	frustules of AMIN	adsorption	3 h	6.98 $\pm$ 0.02	<0.5	36 <sup>#</sup>	40	53
SiO <sub>2</sub>	Amorphous SiO <sub>2</sub> ·nH <sub>2</sub> O	adsorption	3 h	7.02 $\pm$ 0.02	<0.5	15 <sup>#</sup>	27	78

<sup>a</sup> *Achnanthisidium minutissimum* = AMIN; *Navicula minima* = NMIN; *Skeletonema costatum* = SC. DOC stands for dissolved organic carbon in solution. All adsorption experiments were performed in 0.01 M NaNO<sub>3</sub> except for SC (sample SC-1) where 0.1 M NaCl was used. All solutions were strongly undersaturated with respect to any individual solid phase of Zn; only AMIN-1 was supersaturated with respect to Zn(OH)<sub>2</sub>. For Zn concentration in solution, \* means that the value was maintained constant within  $\pm 10$ –20% by adding fresh nutrient solution in the course of growth, and # stands for the initial concentration in solution within an uncertainty of 3%. Uncertainty on [DOC] is 10%. nd = not determined.

populations. The cells and chloroplasts remained intact and undeformed, and no cell fragments could be detected.

**XAFS Spectra Acquisition and Reduction.** XAFS spectra (including the X-ray absorption near-edge structure region or XANES, and the extended X-ray absorption fine structure region or EXAFS) of solutions, live suspensions, and freeze-dried cells were recorded at Zn K-edge ( $\sim 9.7$  keV) at ID 26 beamline of the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France). The storage ring was operated at 6 GeV with a  $\sim 200$  mA current. The beam energy was selected using a Si (220) double-crystal monochromator. The beam size on the sample was focused at about  $1.0 \times 0.6$  mm while keeping a high X-ray photon flux ( $\sim 10^{13}$  photons/s) necessary for obtaining a high signal-to-noise spectral signal for our dilute samples. Spectra were collected at ambient temperature ( $20 \pm 2$  °C) in the fluorescence mode using either a Silicon photodiode or 13-element Ge Canberra detector (depending on Zn concentration). Samples were placed in a Teflon cell ( $\sim 0.5$  cm<sup>2</sup>) with two 25- $\mu\text{m}$  Kapton-film windows. From 3 to 10 scans (of  $\sim 20$  min/scan data collection time) for each sample (depending on the signal-to-noise ratio) were collected over the energy range 9.6–11.0 keV. Preliminary experiments showed some physical degradation of wet biomass samples under the intense X-ray beam, which was evidenced by changes in the XANES features of successive scans, and by the appearance of bubbles deteriorating the EXAFS spectra. To avoid sample degradation due to the long exposure time, the beam position on the sample was changed after each scan by moving the cell by a few millimeters perpendicularly to the beam direction. No changes in spectra of all successive scans for each sample were detected when employing this procedure. Besides, a diffuse reflectance FT-IR (DRIFT) spectra comparison between samples of intact diatoms and those subjected to beam exposure did not reveal any measurable difference in band positions and peak intensities of main organic constituents. XAFS data analysis was performed with the Athena and Artemis packages (35) based on IFEFFIT (36) and FEFF (37) programs. The spectra reduction has been processed as in our previous studies (38–40), and additional details are given in the Supporting Information.

## Results and Discussion

**Adsorption Equilibria.** Adsorption of Zn on diatom cultures was studied as a function of pH, [Zn], ionic strength, light intensity, temperature, and exposure time. A full presentation of these results will be the subject of another report. In this study, we will focus on the effect of pH and duration of experiments. The percentage of adsorbed zinc on marine (SC) and freshwater (AMIN) diatom species is plotted as a function of pH in Figure 1a,b. Adsorption of Zn on all diatom surfaces exhibits a pH-dependent adsorption edge with 100% adsorption at pH above 7, which is typical for many divalent cations (34). The concentration of adsorbed Zn as a function of equilibrium Zn concentration in solution at pH = 7.2–7.5 for AMIN and SC species (Langmuirian adsorption isotherm) is presented in Figure 2a,b. Note that at low surface loadings and low Zn concentration in solution (i.e.,  $[\text{Zn}^{2+}]_{\text{aq}} < 1$  mg/L), Zn adsorbed concentration increases with a slope of 1 with respect to its aqueous concentration, indicating a 1:1 stoichiometric interaction between Zn aqueous ions and the surface adsorption sites. A similar conclusion has been achieved from a reciprocal Langmuir plot ( $1/[\text{Zn}]_{\text{ads}}$  vs  $1/[\text{Zn}]_{\text{aq}}$ ), which was found to be linear in the full range of  $[\text{Zn}]_{\text{aq}}$  investigated.

For all species, the value of Zn maximum adsorption is estimated as  $\sim 300$ – $400$   $\mu\text{mol/g}$  dry weight or  $\sim 0.1$  pmol/cell at pH 7–7.5, which is comparable with zinc adsorption densities on yeast and fungus (460 and 310  $\mu\text{mol/g}$ , respectively (41)), different microalgae (100–400  $\mu\text{mol/g}$  dry for 30 different strains, ref 42), and marine diatom (230  $\mu\text{mol/g}$  for *Phaeodactylum tricornerutum*, ref 42).

Our previous macroscopic and spectroscopic measurements (31), in agreement with the model of Hecky et al. (43) for diatom surfaces, suggest that the diatom cell wall structure can be viewed as a layer of amorphous silica (frustule) attached to a protein template from the interior of the cell and covered by a polysaccharide layer bearing negatively charged  $>R\text{-COO}^-$  moieties. Therefore, the metal speciation on the outermost cell walls resulting from short-term adsorption is likely to be controlled by Zn–COO surface complexes. Carboxylate group interaction is widely used for modeling the metal binding by algae (44–47). It is known

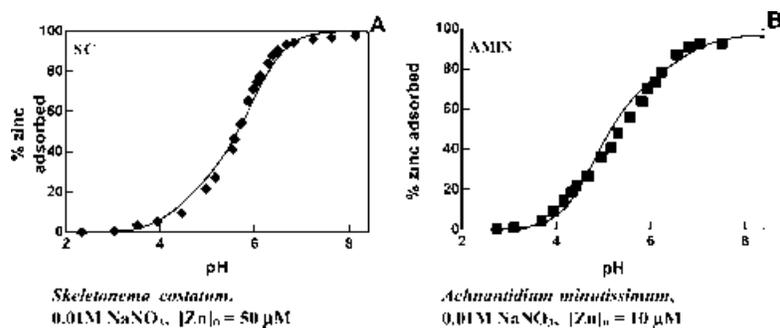


FIGURE 1. Percentage of adsorbed zinc as a function of solution pH for marine (SC, A) and freshwater (AMIN, B) species. Exposure time: 3 h at 25 °C in the dark. The symbols represent the experimental data, and the solid line stays for the FITEQL model fit assuming Zn interaction with carboxylate groups. The overall variance  $V(Y)$  is equal to 1.8 (A) and 3.8 (B).

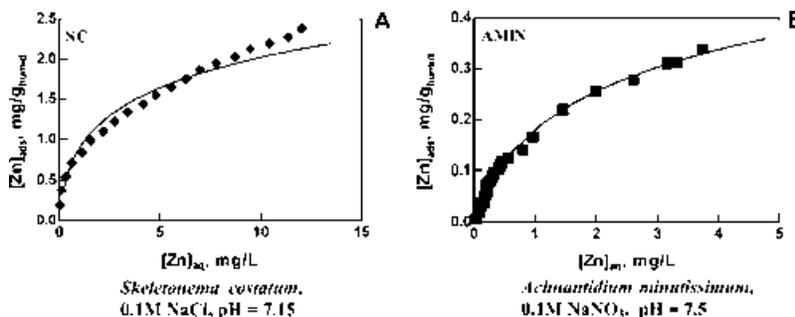


FIGURE 2. Adsorbed Zn concentration as a function of equilibrium zinc concentration in solution (Langmuirian adsorption isotherms) for AMIN and SC species. Exposure time: 3 h at 25 °C in the dark. The symbols represent the experimental data, and the solid line represents the model fit using FITEQL. The overall variance of fit  $V(Y)$  is equal to 26 (A) and 0.9 (B).

TABLE 2. Surface Complexation Model (Constant Capacitance of the Electric Double Layer) Parameters for Zn Adsorption on Diatom Cultures<sup>a</sup>

model parameter	AMIN	NMIN	SC
$>R-COO^- + Zn^{2+}(aq) \rightarrow R-COO-Zn^+(ads)$ , log $K$	$4.3 \pm 0.1$	$4.8 \pm 0.1$	$5.2 \pm 0.1$
carboxylate site density, $\mu\text{mol/g humid}$ , ref 31	$28 \pm 3$	$40 \pm 5$	$117 \pm 7$
EDL capacitance, F/g humid	20–30	7–10	65–85
weight ratio, humid/dry (31)	17.6	10.1	6.2
B.E.T. surface area of frustules, $\text{m}^2/\text{g}$ (31)	12.8	7.7	156

<sup>a</sup> AMIN = *Achnantheidium minutissimum*; NMIN = *Navicula minima*; SC = *Skeletonema costatum*.

that different functional groups are important under different conditions. At relatively high surface coverages studied in the present work, carboxylate groups represent the major part of proton and metal binding sites. It is possible, however, that at low metal concentration (i.e.,  $<0.1-0.01$  mg/L), more specific and selective groups, which are far less abundant, are significant (45). Addition of such specific groups such as phosphoryl ( $>R-PO_4$ ) or sulfhydryl ( $>R-SH$ ) for modeling of Zn surface binding did not improve the quality of the SCM fit, and thus they were not considered in this study.

Results of surface complexation modeling of Zn adsorption on diatom surfaces performed using FITEQL code (48) are represented by solid lines in Figures 1 and 2, and the model parameters are listed in Table 2. This modeling included optimization of zinc complexation constant with carboxylate groups and the EDL capacitance value. Parameters related to “intrinsic” properties of diatom surfaces ( $pK_a$  of  $>R-COOH$ ,  $>R-NH_2$ ,  $>SiOH$ , and their total concentrations) were taken from ref 31. A constant capacitance of the electric double layer has been implied in our surface complexation model following the track developed for metal complexation with bacterial surfaces (34). The range of  $C$  values given in Table 2 represents the optimal parameters necessary to provide the best fit to all collected data. Note that for a porous multilayer diatom cell surface, EDL

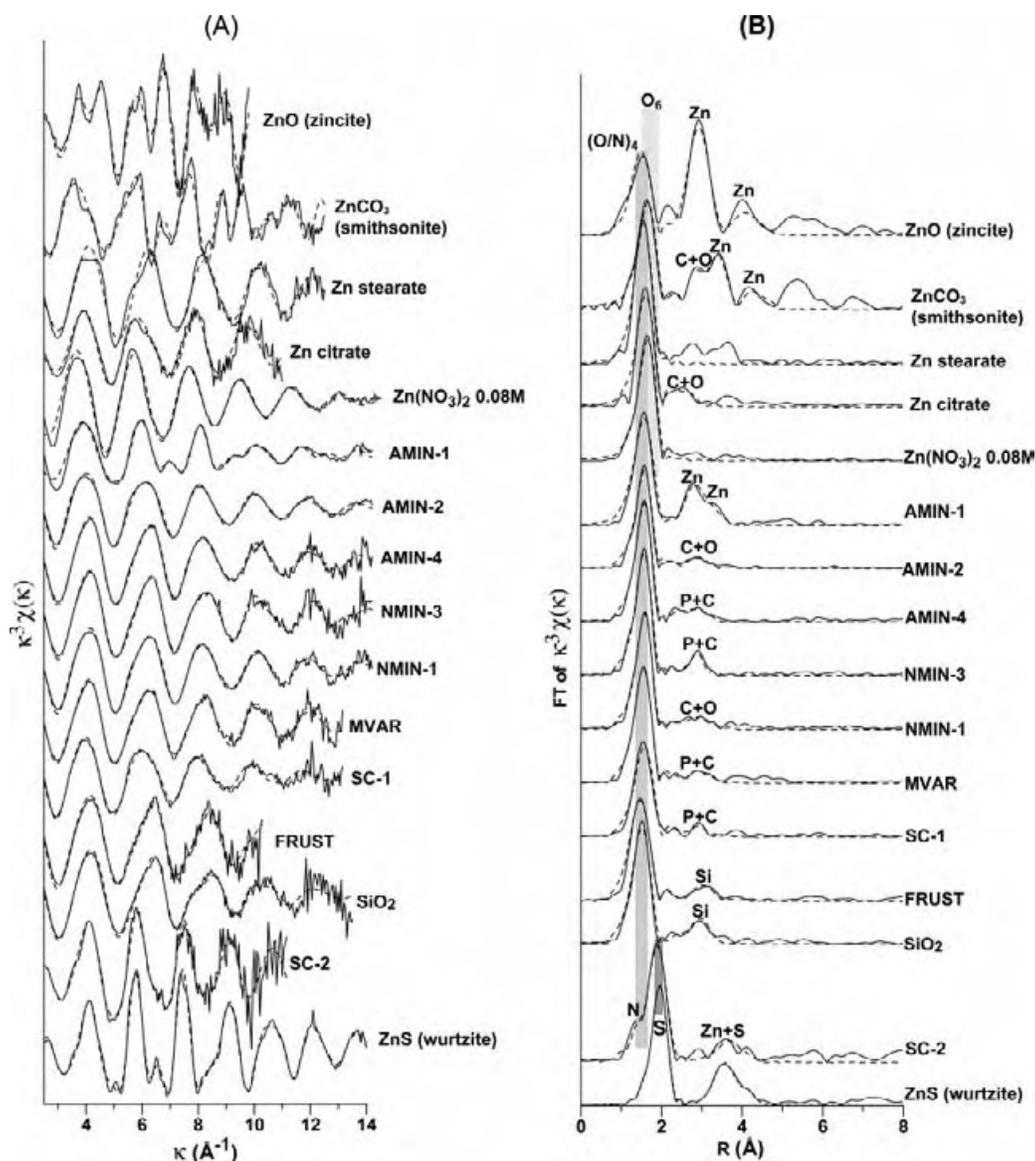
capacitance should be considered as a purely adjustable parameter without rigorous physical meaning. The goodness of model fit to a data set is represented by the overall variance ( $V(Y)$ ) calculated by FITEQL. The overall variances for most experiments presented in Figures 1 and 2 are less than 20, which indicates a good adherence to experimental data of predicted adsorbed concentration.

**Zn Local Atomic Structure in Diatom Cultures.** XANES spectra of freshwater peryphytic species, *Achnantheidium minutissimum* and *Navicula minima*, at pH below 7.75 (not shown) exhibit edge-energy positions at  $9664 \pm 0.6$  eV (Table 3), very close to those of four-coordinated Zn-bearing compounds such as ZnO (see below), Zn acetate, and Zn citrate (see Table 3), suggesting an oxidation state of +2 and a tetrahedral environment for Zn in the diatoms. This is quantitatively confirmed by the EXAFS analysis, which shows that both adsorbed (AMIN-1,2,3; NMIN-1, 2a, 2b) and incorporated (AMIN-4, 5, 6a,b,c; NMIN-3, 4; MVAR) zinc is surrounded by  $4.0 \pm 0.5$  oxygens/nitrogens in the first coordination shell with average Zn–O distances of  $2.00 \pm 0.02$  Å for adsorbed Zn and  $1.97 \pm 0.02$  Å for Zn incorporated inside the cells (Table 3). Because of the strong similarity of O and N backscattering phases and amplitudes, it was impossible to distinguish between these neighbors. Moreover, no first shell splitting (i.e., presence of two distinct Zn–O/N

**TABLE 3. Structural Parameters of the Atomic Environment of Zinc Adsorbed or Incorporated by Diatoms and Selected Reference Solids and Solutions<sup>a</sup>**

sample	$k$ -range ( $\text{\AA}^{-1}$ )	$E^*$ (eV)	scatter	$N$ (atoms)	$R$ ( $\text{\AA}$ )	$\sigma^2$ ( $\text{\AA}^2$ )	$R$ -factor
AMIN-1	3.3–13.0	9663.6	O	4.3 ± 0.7	2.02 ± 0.02	0.011 ± 0.002	0.029
			Zn1	1.8 ± 0.5	3.16 ± 0.02	0.010 ± 0.004	
			Zn2	1.0 ± 0.6	3.60 ± 0.04	0.01f	
AMIN-2	3.4–14.5	9664.1	O	3.5 ± 0.5	1.99 ± 0.01	0.006 ± 0.001	0.031
			C1	2.0 ± 1.0	2.83 ± 0.03	0.01f	
			C2	2.0 ± 1.0	3.80 ± 0.10	0.01f	
AMIN-3	3.3–9.2	9664.1	O	5.0 ± 1.5	2.01 ± 0.02	0.010 ± 0.003	0.032
AMIN-4	3.5–13.5	9663.6	O	3.7 ± 0.3	1.975 ± 0.005	0.006 ± 0.001	0.0050
			P	0.6 ± 0.3	3.09 ± 0.03	0.010 ± 0.005	
			C1	1.0 ± 0.4	2.90 ± 0.05	0.01f	
			±C2	1.0 ± 0.5	3.85 ± 0.10	0.01f	
AMIN-5	3.5–10.8	9663.6	O	3.8 ± 0.5	1.97 ± 0.01	0.006 ± 0.002	0.0090
			C1	2.0 ± 0.5	2.9 ± 0.1	0.01f	
			O2	2.0 ± 0.5	3.3 ± 0.1	0.01f	
			C2	2.0f	3.8 ± 0.1	0.01f	
AMIN-6a	3.5–11.0	9664.1	O	4.9 ± 1.0	1.97 ± 0.02	0.008f	0.033
AMIN-6b	3.4–9.6	9663.6	O	4.7 ± 1.5	1.99 ± 0.02	0.010 ± 0.003	0.037
AMIN-6c	3.5–11.0	9664.1	O	5.0 ± 1	2.02 ± 0.03	0.011f	0.006
NMIN-1	3.5–14.2	9664.1	O	3.5 ± 0.5	1.98 ± 0.01	0.006 ± 0.001	0.0037
			C1	1.5 ± 0.5	2.88 ± 0.03	0.010 ± 0.005	
			C2/O2	1.5 ± 1.0	3.3 ± 0.1	0.01f	
			±C3	1.0f	3.8 ± 0.1	0.01f	
NMIN-2a	3.4–10	9663.6	O	4.3 ± 0.8	2.01 ± 0.02	0.010 ± 0.003	0.026
NMIN-2b	3.4–10.7	9663.6	O	4.1 ± 0.8	2.02 ± 0.02	0.008 ± 0.003	0.037
NMIN-3	3.5–13.5	9663.6	O	3.8 ± 0.3	1.970 ± 0.005	0.006 ± 0.001	0.0063
			P	0.9 ± 0.3	3.15 ± 0.03	0.008 ± 0.003	
			C1	1.0 ± 0.5	2.8 ± 0.1	0.01f	
			±C2	1.0 ± 0.5	3.8 ± 0.1	0.01f	
NMIN-4	3.5–10.8	9663.6	O	3.8 ± 0.8	2.00 ± 0.015	0.009 ± 0.003	0.020
MVAR	3.5–12.5	9663.6	O	3.5 ± 0.5	1.97 ± 0.01	0.005 ± 0.001	0.0043
			C1	2.5 ± 0.5	2.8 ± 0.05	0.015 ± 0.005	
			P	0.5 ± 0.2	3.13 ± 0.05	0.008 ± 0.002	
			±C2	2 ± 1	3.9 ± 0.1	0.015f	
SC-1	3.5–11.8	9664.1	O	4.0 ± 0.6	2.01 ± 0.015	0.009 ± 0.003	0.015
			±C	2 ± 1	2.8 ± 0.1	0.015f	
			±P	1.0 ± 0.5	3.5 ± 0.1	0.01f	
SC-2	3.4–11.0	9662.1	O/N	1.3 ± 0.5	1.95 ± 0.04	0.008 ± 0.003	0.013
			S1	2.6 ± 0.3	2.34 ± 0.01	0.005 ± 0.001	
			±Zn	3.4 ± 1.5	3.85 ± 0.05	0.015f	
			±S2	5 ± 2	4.5 ± 0.05	0.015f	
FRUST	3.5–10.0	9663.6	O	4.1 ± 0.5	1.95 ± 0.02	0.007f	0.020
			Si1	1.0 ± 0.5	3.2 ± 0.1	0.01f	
			Si2	1.0 ± 0.5	3.5 ± 0.1	0.01f	
SiO <sub>2</sub> · <i>n</i> H <sub>2</sub> O (amorphous)	3.5–11.8	9663.6	O	4.0 ± 0.5	1.95 ± 0.01	0.008 ± 0.002	0.015
			Si1	1.5 ± 0.5	3.16 ± 0.05	0.01f	
			Si2	1.5 ± 1.0	3.5 ± 0.1	0.01f	
Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 0.08 and 0.15 M ZnO (zincite)	3.2–14.4	9965.1	O	5.8 ± 0.5	2.09 ± 0.01	0.007 ± 0.001	0.030
			O1	4.0ff	1.94 ± 0.03	0.004 ± 0.003	
			Zn1	12.0ff	3.23 ± 0.03	0.009 ± 0.004	
			Zn2	6.0ff	4.59 ± 0.07	0.009 ± 0.005	
ZnCO <sub>3</sub> (smithsonite)	3.1–11.0	9665.6	O2	9.0ff	3.72 ± 0.09	0.005f	0.030
			O3	6.0ff	4.45 ± 0.15	0.005f	
			O1	6.0ff	2.12 ± 0.01	0.006 ± 0.002	
			C	6.0ff	2.98 ± 0.03	0.003 ± 0.002	
			O2	6.0ff	3.20 ± 0.04	0.008 ± 0.005	
			Zn1	6.0ff	3.70 ± 0.03	0.008 ± 0.002	
ZnS (wurtzite)	3.4–14.7	9662.0	Zn2	6.0ff	4.69 ± 0.04	0.010 ± 0.004	0.0045
			S1	4.0ff	3.345 ± 0.003	0.0049 ± 0.0003	
			Zn1	12.0ff	3.85 ± 0.01	0.014 ± 0.001	
Zn-citrate	2.4–10.3	9664.6	S2	9.0ff	4.52 ± 0.01	0.014 ± 0.002	0.090
			O1	3.4 ± 1.5	2.01 ± 0.03	0.004 ± 0.002	
			C	2.5 ± 1.0	2.86 ± 0.05	0.01f	
Zn-stearate	3.4–11.4	9664.6	O2	2.0 ± 1.0	3.21 ± 0.10	0.01f	0.015
			O	3.9 ± 1.5	1.97 ± 0.05	0.005 ± 0.003	

<sup>a</sup> AMIN = *Achnanthydium minutissimum*; NMIN = *Navicula minima*; SC = *Skeletonema costatum*; MVAR = *Melosira varians*; FRUST = frustules of *Achnanthydium minutissimum*.  $R$  = zinc-backscatter mean distance,  $N$  = backscatter coordination number,  $\sigma^2$  = squared Debye–Waller factor (relative to  $\sigma^2 = 0$  adopted in the calculation of reference amplitude and phase functions by FEFF);  $E^*$  = energy of the maximum of the edge first derivative;  $R$ -factor = sum-of-squares measure of the fractional misfit as described in IFEFFIT (35); f means that parameter was varied in initial fits and then fixed at best value in the final fit; ff means that parameter was fixed to the crystallographic value. Fits were processed in R-space with  $k$ -weighting values of 1, 2, and 3. Triangular multiple scattering paths within the ZnO<sub>4</sub> tetrahedron ( $Zn-O-O$ ,  $R_{ms} \approx 1.82^* R_1$  ( $\text{\AA}$ ), degeneracy = 12) were included in fits of the second shells for diatom samples (see Supporting Information for more details).



**FIGURE 3.** Normalized  $k^3$ -weighted EXAFS spectra at Zn K-edge of selected diatom samples and reference compounds (A), and their corresponding radial structure functions (B, not corrected for phase shift). Solid lines = experimental spectra; dashed lines = least-squares EXAFS fits using the parameters reported in Table 3. Grayed regions denote ranges for first shell Zn–O/N distances for four- and six-coordinated Zn compounds and Zn–S distances for four-coordinated Zn. Element symbols identify the main backscatters in Zn atomic shells.

distances), which might be indicative of the presence of different O- and N-binding groups, could be detected in our samples. The Zn–O/N distances found in this study for diatom samples are close to those for Zn–O<sub>4</sub> in Zn anhydrous acetate (1.95–1.96 Å, ref 49), and Zn-stearate (1.95–1.97 Å, this study and ref 50) in which zinc is monodentately coordinated with 4 carboxylic groups. Note that the Zn–O/N distances found in diatoms are distinctly shorter than those for Zn–O<sub>6</sub> compounds such as ZnCO<sub>3</sub> (2.12 Å, this study), Zn nitrate aqueous solution (2.09 Å, this study), and Zn acetate dihydrate (1.94 Å – 2H<sub>2</sub>O; 2.18–2.19 Å – 4COOH, ref 51), further supporting a tetrahedral environment for Zn in diatoms. Yet they are significantly longer than those for Zn adsorbed on diatom frustules and amorphous silica (SiO<sub>2</sub>·nH<sub>2</sub>O), where Zn is found to be tetrahedrally coordinated with oxygen at 1.94 ± 0.01 Å (Table 3, samples SiO<sub>2</sub> and FRUST). This marked difference suggests a negligible role of silica skeleton in Zn binding from solution by algal biomass.

Spectra of adsorption and incorporation samples of freshwater peryphytic diatoms obtained at pH < 8 from solutions undersaturated with respect to Zn-bearing solids, (samples AMIN 2–6c, NMIN 1–4, and MVAR in Table 1) display only minor second shell features (Figure 3). Their modeling could be carried out unambiguously for certain samples exhibiting high signal-to-noise ratio and thus wide exploitable  $k$ -range (see Table 3). Neither in adsorption (pH < 8) nor in incorporation samples, the Zn–Zn contributions were detected, demonstrating the absence of Zn precipitates at the surface or Zn-bearing minerals in cells grown in high-Zn media. Note, however, that in the second shell of adsorption samples at pH > 8.5 (AMIN-1), surface precipitates have been identified by strong second shell Zn–Zn contributions apparent in both EXAFS spectra and their Fourier transforms (Figure 3, Table 3). The formation of Zn oxyhydroxide polymers at the surface at high pH values is in agreement with equilibrium calculations, indicating that the

Zn-bearing solutions used in these adsorption experiments were slightly supersaturated with respect to Zn oxides and hydroxides (saturation indices were 1.3 and 2.1 for Zn(OH)<sub>2</sub> and ZnO, respectively).

For all adsorption samples of freshwater and marine diatoms at pH < 7.75, both classical EXAFS analyses and wavelet transforms (see Supporting Information Figure 2) indicate the only presence of light scatters, like C, O, or N in the Zn second shell. Robust second shell models for AMIN-2, AMIN-5, and NMIN-1 (Table 3, Supporting Information Figure 1) were obtained with 1 to 2 carbon atoms at about 2.8 Å and ~2 C/O atoms at longer distances ranging from 3.2 to 3.8 Å. Further details about robustness criteria and goodness-of-fit parameters are given in the Supporting Information. Moreover, it was found that the inclusion of triangular multiple scattering paths Zn–O–O–Zn arising within the ZnO<sub>4</sub> tetrahedron significantly improves the goodness of fit and/or diminishes correlations between parameters for the dominant single-scattering paths (see Supporting Information Table 1 for examples of fits statistics). Inclusion of P or Si in models of the second shell of adsorption samples produced unphysical (i.e., either too high or negative) values of structural parameters and unstable fits (i.e., fits strongly depending on initial guess values). The dominant presence of carbon atoms in the next-nearest shell detected by the EXAFS analysis implies Zn binding with carboxyl surface groups, in agreement with our surface complexation model (Figures 1,2, Table 2). The Zn–C distances found in this study (2.8 and 3.8 Å) are very similar to those in zinc acetate where Zn is monodentately bound to the oxygens of carboxylate groups. Note that formation of bi-dentate complexes with carboxylate groups (i.e., oxalate- or citrate-like) is unlikely for tetracoordinated Zn. Such complexes require the establishment of a five-membered ring between a metal and two adjacent carboxylate groups (52). As in the case of many metals, for such a ring to be stable requires an octahedral coordination of the metal and oxygen–metal–oxygen angles around 90°. Consequently, the tetrahedral Zn coordination induces an angular distortion in the formed chelate, which gives rise to strain energy and renders four-coordinated Zn bidentate complexes unstable (52, 53).

The zinc atomic environment described above was found to be independent of both duration and level of exposure and the type of diatom species (samples AMIN-2, 4, 6; NMIN-1, 2a, 2b; SC-1, Table 3). This result is consistent with the surface complexation model of Zn interaction with diatom cell walls presented in the precedent section (Figures 1,2, Table 2) and suggests that reversible adsorption of this metal on marine and freshwater diatom surfaces is not likely to be coupled with cysteine-bearing ligands or Zn–histidine complexes production; rather, fixation of Zn on the outer polysaccharide matrix prevents its further penetration through the cell membrane.

Second-shell features for Zn incorporated into the diatom cells during their growth are also weak, and thus resolvable only for a few spectra (AMIN-4, NMIN-3, MVAR). They are, however, different from those of adsorption samples, and indicate the presence of moderately heavy backscatters such as P, Si, or S (see Supporting Information Figures 1 and 2). It is very difficult to distinguish between these elements solely from an EXAFS analysis because of similarities in the amplitude and phase-shift functions of Zn–P, Zn–S, and Zn–Si waves. Therefore, to interpret these weak and disordered next-nearest contributions, we combined chemistry considerations with independent first shell information. Based on the finding of O and/or N in the first coordination shell of Zn (Table 3), the presence of sulfur in the second shell can be excluded, because Zn–(O/N)–S bonds are not typical for organic structures (54). Bonding of the incorporated Zn via O bridges with silicon of the diatom skeleton is

also unlikely because of the large differences in Zn–O and Zn–Si(P) distances found in first and second shells between Zn adsorbed on frustules or amorphous silica and incorporated during cell growth, respectively (Table 3). Thus, phosphorus is the most likely candidate, and its inclusion into the fit for AMIN, NMIN, and MVAR diatoms grown in the presence of Zn produces robust models for the next-nearest Zn environment consisting of 0.5 to 1 P atom at 3.13 Å and 1 to 2 C at 2.8–2.9 Å. Addition of the Zn–O–O–Zn triple scattering path, as for the adsorbed Zn, and a second C neighbor at ~3.8 Å improves significantly the fit statistics but does not affect within the error the parameters derived for the dominant Zn–P and Zn–C<sub>1</sub> contributions. Our structural model suggests that Zn incorporated into the diatoms may be bound to (i) carboxyl and phosphoryl groups of peptidoglycan of the interior part of cell walls, (ii) functional side chain of amino acid residues in cytoplasm such as carboxylic acid groups from the C-terminal glutamic acid, and (iii) zinc enzymes bearing histidine groups (54). Other possibilities involve the presence of simple carboxylic acids responsible for Zn storage in cytoplasm or vacuoles or Zn-cellular polyphosphate. For example, in plants, low-molecular weight organic compounds such as malic, citric, oxalic, or phytic acids are believed to be involved in intravacuolar Zn<sup>2+</sup> binding rather than phytochelatins (see ref 41 for a review); in cells of algae, polyphosphate bodies act as storage and detoxification sites for trace metals (9, 55, 56).

The similarities in Zn molecular structures of both Zn adsorbed onto all studied types of freshwater and marine diatoms, and Zn incorporated during growth into MVAR, NMIN, and AMIN species strongly suggest that the mechanism of Zn interaction with metal-tolerant (*N. minima*, *A. minutissimum*) and metal-sensitive (*M. varians*) diatoms (57, 58) is essentially the same, and no significant change in the zinc environment in diatom cells occurs as a function of level and duration of exposure.

However, the marine diatom *S. costatum* represents a marked difference with the freshwater species described above. The local structure of intracellular Zn of this diatom involves two sulfur atoms in the first coordination sphere at a distance of  $2.33 \pm 0.02$  Å and two oxygen or nitrogen atoms at  $1.95 \pm 0.04$  Å (sample SC-2, Table 3). These Zn–S and Zn–O/N distances are close to those found in marine diatom carbonic anhydrase (27), Zn-cysteine, and Zn-histidine (23). Moreover, the comparison of its spectrum with that of ZnS (Figure 3) together with quantitative fits (Table 3) suggest the presence of Zn and ±S atoms in the second shell. This implies that a part of the incorporated Zn might reside in metallothioneins (MT) clusters Zn<sub>7</sub>-MT known for animal proteins (28) and MT-like proteins in plants (41) or other marine diatoms (59). The structural environment of Zn found in this study for *S. costatum* is therefore consistent with a mixture of cysteine and histidine ligands, suggesting the presence of intracellular enzymes. There are several possible reasons the Zn environment within the marine diatom might be different from that within the freshwater diatoms. Inherent metal tolerance is one of the first issues to consider because Zn concentration in the open sea and estuarine waters is normally several orders of magnitude lower than that in the river waters. As a result, the need for Zn related to homeostasis requirement in marine species is higher than that in freshwater diatoms, and thus more specific strong ligands are involved in Zn intracellular binding and storage for SC as compared to peryphytic freshwater species. It is also worth noting that the SCM adsorption constants and site densities for *Skeletonema c.* are higher than those for freshwater species, probably reflecting SC stronger affinity to this metal. However, *Skeletonema c.* is less metal tolerant than AMIN, NMIN, or MVAR. This would require stronger measures for detoxification in the form of phytochelatin/metallothioneins.

This study represents only a first-order description of Zn chemical status in diatom cultures. Rigorous quantitative resolution of Zn second shell would require longer acquisition times at low temperatures (30). Nevertheless, because of the ultrasensitive X-ray spectroscopy ID26 beamline, our measurements allowed, for the first time, identification of the nearest Zn neighbors in organic biomass and assessment of their local structure (coordination numbers and interatomic distances). These observations demonstrate that during long-term incorporation into cells and short-term adsorption on diatoms surfaces, zinc reduces its coordination number from six (octahedrally coordinated to H<sub>2</sub>O in bulk solution) to four (oxygen and nitrogen tetracoordinated complexes). Such an important change of metal local environment produces a significant isotopic fractionation of zinc between diatoms and Zn-bearing solution (60). Further work will be devoted to another environmentally important heavy metal, cadmium, which is often considered as a biological analogue of Zn for diatoms and is known to substitute for Zn in some macromolecules (7), activating the phytochelatin and glutathione production (61).

### Acknowledgments

We are grateful to three anonymous reviewers and Associate Editor L. Sigg, whose insight and thorough reviews greatly improved the manuscript. This work was supported by the French National Programs for Basic Research ACI "Eau et Environnement" and ACI-ECCO (Ecodynamique et Ecotoxicologie des Contaminants). We thank the ESRF committee Surfaces & Interfaces for providing beam time and access to the synchrotron facility. We are indebted to L. Alvarez for his great help during the EXAFS session. We thank B. Etcheverria for invaluable help during diatom culture process. Participation of A. Feurtet-Mazel at early stages of this work is equally acknowledged. F. Farges is acknowledged for supplying several Zn reference compounds and for his advice on XAFS spectra interpretation. B. Ravel, M. Newville, and J. Roux provided invaluable assistance in XAFS software installation and use.

### Supporting Information Available

Additional text, tables, and figures on XAFS spectra processing. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

### Literature Cited

- (1) Sunda, W. G.; Huntsman, S. A. Feedback interactions between zinc and phytoplankton in seawater. *Limnol. Oceanogr.* **1992**, *37*, 25–40.
- (2) Sunda, W. G.; Huntsman, S. A. Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: Phytoplankton as model systems. *Sci. Total Environ.* **1998**, *219*, 165–181.
- (3) Gonzalez-Davila, M. The role of phytoplankton cell on the control of heavy metal concentrations in seawater. *Mar. Chem.* **1995**, *48*, 215–236.
- (4) Morel, F. M. M.; Reinfelder, J. R.; Roberts, S. B.; Chamberlan, C. P.; Lee, J. G.; Yee, D. Zinc and carbon colimitation of marine phytoplankton. *Nature* **1994**, *269*, 740–742.
- (5) Fisher, N. S.; Jones, G. L.; Nelson, D. M. Effects of copper and zinc on growth, morphology and metabolism of *Asterionella japonica* (Cleve). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1981**, *51*, 37–56.
- (6) Vallee, B. L.; Auld, D. S. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* **1990**, *29*, 5647–5659.
- (7) Price, N. M.; Morel, F. M. M. Cadmium and cobalt substitution for zinc in a marine diatom. *Nature* **1990**, *344*, 658–660.
- (8) Davies, A. G. In *Pollution Studies with Marine Phytoplankton. Part II. Heavy Metals*; Russell, F. S., Yonge, M., Eds.; Advances Marine Biol. Vol. 15; Academic Press: London, 1978; pp 381–508.
- (9) Bates, S. S.; Tessier, A.; Campbell, P. G. C.; Létourneau, M. Zinc–phosphorus interactions and variation in zinc accumula-

tion during growth of *Chlamydomonas variabilis* (Chlorophyceae) in batch culture. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1985**, *42*, 86–94.

- (10) Stauber, J. L.; Florence, T. M. Mechanism of toxicity of zinc to the marine diatom *Nitzschia closterium*. *Mar. Biol.* **1990**, *105*, 519–524.
- (11) Rijstenbil, J. W.; Sandee, A.; Van Drie, J.; Wijnholds, J. A. Interaction of toxic trace metals and mechanisms of detoxification in the planktonic diatoms *Ditylum brightwellii* and *Thalassiosira pseudonana*. *FEMS Microbiol. Rev.* **1994**, *14*, 387–396.
- (12) Ahner, B. A.; Morel, F. M. M.; Moffett, J. W. Trace metal control of phytochelatin production in coastal waters. *Limnol. Oceanogr.* **1997**, *42*, 601–608.
- (13) Gold, C.; Feurtet-Mazel, A.; Coste, M.; Boudou, A. Field transfer of periphytic diatom communities to assess short-term structural effects of metals (Cd, Zn) in rivers. *Water Res.* **2002**, *36*, 3654–3664.
- (14) Genter, R. B. Ecotoxicology of inorganic chemical stress to algae. In *Algal Ecology of Freshwater Benthic Ecosystems*; Aquatic Ecology Series; Stevenson, R. J., Bothwell, M. L., Lowe, R. L., Eds.; Academic Press: Boston, 1996; pp 404–468.
- (15) Dixit, S. S.; Smol, J. P.; Kingston, J. C.; Charles, D. F. Diatoms: powerful indicators of environmental change. *Environ. Sci. Technol.* **1992**, *26*, 23–33.
- (16) Gold, C.; Feurtet-Mazel, A.; Coste, M.; Boudou, A. Effect of cadmium stress on periphytic diatom communities in indoor artificial streams. *Freshwater Biol.* **2003**, *48*, 316–328.
- (17) Gold, C.; Feurtet-Mazel, A.; Coste, M.; Boudou, A. Impacts of metals (Cd, Zn) on the development of periphytic diatom communities within outdoor artificial streams along a pollution gradient. *Arch. Environ. Toxicol.* **2003**, *44*, 189–197.
- (18) Trainor, T. P.; Brown, G. E., Jr.; Parks, G. A. Adsorption and precipitation of aqueous Zn(II) on alumina powders. *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *231*, 359–372.
- (19) Waychunas, G. A.; Fuller, C. C.; Davis, J. A. Surface complexation and precipitate geometry for aqueous Zn(II) sorption on ferrihydrite I. X-ray absorption extended fine structure spectroscopy analysis. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2002**, *66*, 1119–1137.
- (20) Manceau, A.; Lanson, B.; Schlegel, M.; Hargé, J. C.; Musso, M.; Eybert-Bérard, L.; Hazemann, J.-L.; Chateigner, D.; Lambelle, G. M. Quantitative Zn speciation in smelter-contaminated soils by EXAFS spectroscopy. *Am. J. Sci.* **2000**, *300*, 289–343.
- (21) Sarret, G.; Balesdent, J.; Bouziri, L.; Garnier, J.-M.; Marcus, M. A.; Geoffroy, N.; Panfili, F.; Manceau, A. Zn speciation in the organic horizon of a contaminated soil by micro-X-ray fluorescence, micro- and powder-EXAFS spectroscopy, and isotopic dilution. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 2792–2801.
- (22) Struis, R. P. W. J.; Ludwig, C.; Lutz, H.; Scheidegger, A. M. Speciation of zinc in municipal solid waste incineration fly ash after heat treatment: An X-ray absorption spectroscopy study. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 3760–3767.
- (23) Kelly, R. A.; Andrews, J. C.; DeWitt, J. G. An X-ray absorption spectroscopic investigation of the nature of the zinc complex accumulated in *Datura innoxia* plant tissue culture. *Microchem. J.* **2002**, *71*, 231–245.
- (24) Salt, D. E.; Prince, R. C.; Baker, A. J. M.; Raskin, I.; Pickering, I. J. Zinc ligands in metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 713–717.
- (25) Sarret, G.; Manceau, A.; Cuny, D.; Van Haluwyn, C.; Déruelle, S.; Hazemann, J.-L.; Soldo, Y.; Eybert-Bérard, L.; Menthonnex, J.-J. Mechanisms of lichen resistance to metallic pollution. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*, 3325–3330.
- (26) Webb, S. M.; Gaillard, J.-F.; Jackson, B. E.; Stahl, D. A. An EXAFS study of zinc coordination in microbial cells. *J. Synchrotron Radiat.* **2001**, *8*, 943–945.
- (27) Cox, E. H.; McLendon, G. L.; Morel, F. M. M.; Lane, T. W.; Prince, R. C.; Pickering, I. J.; George, G. N. The active site structure of *Thalassiosira weissflogii* carbonic anhydrase 1. *Biochemistry* **2000**, *39*, 12128–12130.
- (28) Jiang, D. T.; Heald, S. M.; Sham, T. K.; Stillman, M. J. Structures of the cadmium, mercury, and zinc thiolate clusters in metallothionein: XAFS study of Zn<sub>7</sub>-MT, Cd<sub>7</sub>-MT, Hg<sub>7</sub>-MT, and Hg<sub>18</sub>-MT formed from rabbit liver metallothionein 2. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11004–11013.
- (29) Sarret, G.; Manceau, A.; Hazemann, J. L.; Gomez, A.; Mench, M. EXAFS study of the nature of zinc complexation sites in humic substances as a function of Zn concentration. *J. Phys. IV France* **1997**, *7*, C2-799–C2-802.

- (30) Beauchemin, S.; Hesterberg, D.; Nadeau, J.; McGeer, J. C. Speciation of hepatic Zn in trout exposed to elevated waterborne Zn using X-ray absorption spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 1288–1295.
- (31) Gélalbert, A.; Pokrovsky, O. S.; Schott, J.; Boudou, A.; Feurtet-Mazel, A.; Mielczarski, J.; Mielczarski, E.; Mesmer-Dudons, N.; Spalla, O. Study of diatoms/aqueous solution interface. I. Acid–base equilibria, surface charge and spectroscopic observation of freshwater and marine species. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2004**, *68*, 4039–4058.
- (32) Miramanoff, N.; Wilkinson, K. J. Regulation of Zn accumulation by a freshwater Gram-positive bacterium (*Rhodococcus opacus*). *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*, 616–622.
- (33) Gadd, G. M.; Griffiths, A. J. Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microb. Ecol.* **1978**, *4*, 303–317.
- (34) Fein, J. B.; Daughney, C. J.; Yee, N.; Davis, T. A. A chemical equilibrium model for metal adsorption onto bacterial surfaces. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1997**, *61*, 3319–3328.
- (35) Ravel, B. EXAFS analysis software using IFEFFIT. 2003; <http://eff.phys.washington.edu/~ravel/software/exafs/>.
- (36) Newville, M. IFEFFIT: interactive XAFS analysis and FEFF fitting. *J. Synchrotron Radiat.* **2001**, *8*, 322–324.
- (37) Ankudinov, A. L.; Ravel, B.; Rehr, J. J.; Conradson, S. D. Real-space multiple-scattering calculation and interpretation of X-ray-absorption near-edge structure. *Phys. Rev. B* **1998**, *58*, 7565–7576.
- (38) Pokrovski, G. S.; Schott, J.; Hazemann, J.-L.; Farges, F.; Pokrovsky, O. S. An X-ray absorption structure (XAS) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy study of gallium-silica complexes in dilute aqueous solutions: Implications for Al and Ga hydrolysis mechanisms and transport in natural waters. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2002**, *66*, 4203–4322.
- (39) Pokrovski, G. S.; Schott, J.; Farges, F.; Hazemann, J.-L. Iron(III)-silica interactions in aqueous solution: insights from X-ray absorption fine structure spectroscopy. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2003**, *67*, 3559–3573.
- (40) Pokrovsky, O. S.; Pokrovski, G. S.; Schott, J. Gallium adsorption on carbonates and oxides: X-ray Absorption Fine Structure spectroscopy study and surface complexation modeling. *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *279*, 314–325.
- (41) Kotrba, P.; Ruml, T. Heavy metal-binding peptides and proteins in plants. A review. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2000**, *65*, 1205–1247.
- (42) Klimmek, S.; Stan, H.-J.; Wilke, A.; Bunke, G.; Buchholz, R. Comparative analysis of the biosorption of cadmium, lead, nickel, and zinc by algae. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 4283–4288.
- (43) Hecky, R. E.; Mopper, K.; Kilham, P.; Degens, E. T. The amino acid and sugar composition of diatom cell-walls. *Mar. Biol.* **1973**, *19*, 323–331.
- (44) Schiewer, S.; Volesky, B. Modeling of the proton-metal ion exchange in biosorption. *Environ. Sci. Technol.* **1995**, *29*, 3049–3058.
- (45) Kiefer, E.; Sigg, L.; Schosseler, P. Chemical and spectroscopic characterization of algae surfaces. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*, 759–764.
- (46) Fein, J. B.; Martin, A. M.; Wightman, P. G. Metal adsorption onto bacterial surfaces: Development of a predictive approach. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2001**, *65*, 4267–4273.
- (47) Ngwenya, B. T.; Sutherland, I. W.; Kennedy, L. Comparison of the acid–base behaviour and metal adsorption characteristics of a gram-negative bacterium with other strains. *Appl. Geochem.* **2003**, *18*, 527–538.
- (48) Herbelin, A. L.; Westall, J. C. FITEQL version 3.2, a computer program for determination of chemical equilibrium constants from experimental data. Department of Chemistry, Oregon State University, Corvallis, 1996, OR 97331.
- (49) Clegg, W.; Little, I. R.; Straughan, B. P. Monoclinic anhydrous zinc(II) acetate. *Acta Crystallogr.* **1986**, *C42*, 1701–1703.
- (50) Ishioka, T.; Maeda, K.; Watanabe, I.; Kawachin, S.; Harada, M. Infrared and XAFS study on structure and transition behavior of zinc stearate. *Spectrochim. Acta* **2000**, *A56*, 1731–1737.
- (51) Ishioka, T.; Murata, A.; Kitagawa, Y.; Nakamura, K. T. Zinc(II) acetate dihydrate. *Acta Crystallogr.* **1997**, *C53*, 1029–1031.
- (52) Martell, A. E.; Hancock, R. D. *Metal Complexes in Aqueous Solution*; Plenum Press: New York, 1996.
- (53) Pokrovski, G. S.; Schott, J. Experimental study of the complexation of silicon and germanium with aqueous organic species: implication for germanium and silicon transport and Ge/Si ratio in natural waters. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1998**, *62*, 3413–3428.
- (54) Frausto da Silva, J. J.; Williams, R. J. P. *The Biological Chemistry of the Elements*; Oxford University Press: New York, 2001; pp 315–339.
- (55) Jensen, T. E.; Baxter, M.; Rachlin, W.; Jani, V. Uptake of heavy metals by *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae) into cellular components, especially polyphosphate bodies: an X-ray energy dispersive study. *Environ. Pollut., Ser. A* **1982**, *27*, 119–127.
- (56) Torres, E.; Cid, A.; Fidalgo, P.; Herrero, C.; Abalde, J. Long-chain class III metallothioneins as a mechanism of cadmium tolerance in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Aquat. Toxicol.* **1997**, *39*, 231–246.
- (57) Ivorra, N.; Bremer, S.; Guasch, H.; Kraak, M. H. S.; Admiraal, W. Differences in the sensitivity of benthic microalgae to Zn and Cd regarding biofilm development and exposure history. *Environ. Toxicol. Chem.* **2000**, *19*, 1332–1339.
- (58) Medley, C. N.; Clements, W. H. Responses of diatom communities to heavy metals in streams: the influence of longitudinal variation. *Ecol. Appl.* **1998**, *8*, 631–644.
- (59) Braek, G. S.; Malness, D.; Jensen, A. Heavy metal tolerance of marine phytoplankton. IV. Combined effect of zinc and cadmium on growth and uptake in some marine diatoms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1980**, *42*, 39–54.
- (60) Gélalbert, A.; Pokrovsky, O. S.; Pokrovski, G. S.; Viers, J.; Schott, J.; Boudou, A. Zinc interaction with diatom cultures: New insights from XAFS study and stable isotope fractionation. *Suppl. Geochim. Cosmochim. Acta* **2004**, *68/11S*, A366.
- (61) Cobbett, C.; Goldsbrough, P. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2002**, *53*, 159–182.

Received for review December 11, 2004. Revised manuscript received March 31, 2005. Accepted April 7, 2005.

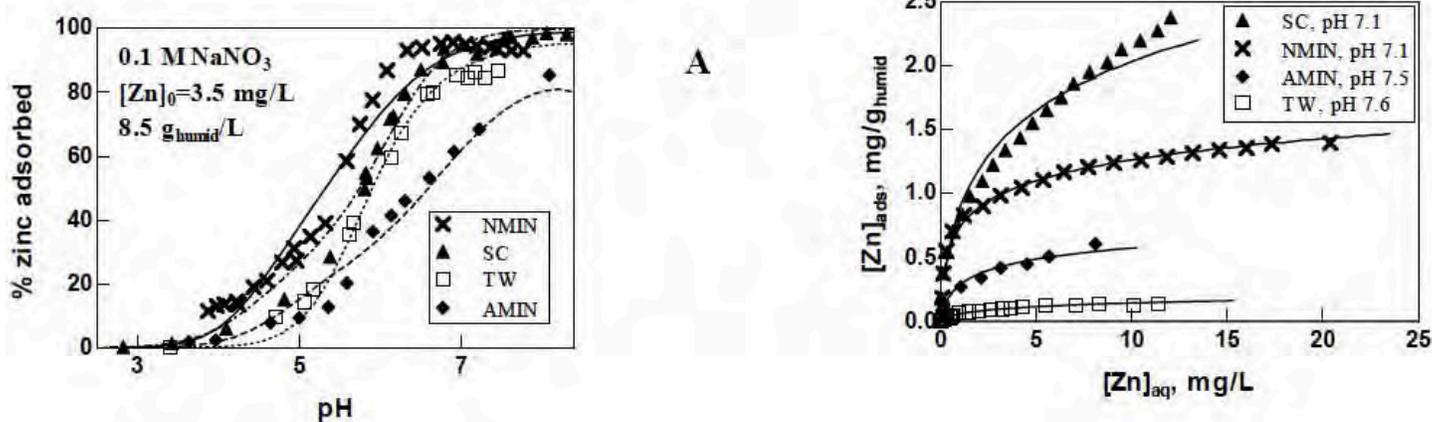
ES0480419

#### IV. RESUME EN FRANCAIS DE L'ARTICLE : "INTERACTION BETWEEN ZINC AND FRESHWATER AND MARINE DIATOM SPECIES : SURFACE COMPLEXATION AND Zn ISOTOPE FRACTIONATION"

Dans cet article ont été caractérisées les interactions en solution aqueuse entre le zinc et quatre espèces de diatomées (deux marines planctoniques *Thalassiosira weissflogii* = TW, *Skeletonema costatum* = SC et deux fluviatiles péryphytiques *Achnanthydium minutissimum* = AMIN, *Navicula minima* = NMIN) en combinant des expériences d'adsorption et de mesures électrocinétiques afin d'élaborer un modèle de complexation surfacique de ce métal et en mesurant le fractionnement isotopique du zinc induit par son adsorption à la surface et lors de son incorporation dans les cellules durant leur croissance dans une solution nutritive.

Les expériences d'adsorption ont été effectuées à 25°C et 5°C en faisant varier le temps d'exposition (de 5 minutes à 140 heures), le pH (de 2 à 10), la force ionique ( $I = 0.001$  à 1.0 M), la concentration de zinc en solution (10 nM à 1 mM) et l'intensité lumineuse. Les expériences d'adsorption de Zn en fonction du pH ont conduit à une remarquable similitude des formes de courbes d'adsorption tandis que les capacités maxima d'adsorption des quatre espèces déduites des isothermes de Langmuir diffèrent d'un ordre de grandeur. Le taux d'adsorption augmente avec la température de 5 à 25°C et ne dépend pas de l'intensité lumineuse. L'adsorption du zinc diminue quand la force ionique augmente ce qui implique une compétition entre le zinc et le sodium pour l'occupation des sites surfaciques. La comparaison entre l'adsorption du zinc sur les frustules et celle sur les cellules entières montre que seul 10 à 20 % de sites fonctionnels du frustules sont impliqués dans la complexation du zinc par la paroi cellulaire.

Les mesures de mobilité électrophorétique montrent que la surface des cellules est chargée négativement dans la gamme de pH ( $pH = 7$ ) et de concentration en zinc considérées (de 0.01 à 50 mg/L). Cependant la valeur absolue de la mobilité électrophorétique diminue pour des concentrations en zinc supérieures à 1 mg/L ce qui suggère une stoechiométrie métal:ligand de 1:1 lors de l'adsorption de  $Zn^{2+}$  à la surface des diatomées.



**Figure 32 : Adsorption de Zn sur les surfaces des quatre espèces de diatomées (A) en fonction du pH ; et (B) en fonction de la concentration de zinc en solution.**

Ces mesures ont permis de décrire l'adsorption du zinc à la surface des diatomées dans le cadre d'un modèle de double couche à capacité constante (tableau 7). L'interaction du zinc avec la surface des diatomées se produit principalement au niveau des groupements carboxyliques et dans une moindre mesure au niveau des groupements silanols.

Bien que les constantes de stabilité des complexes surfaciques formés par le zinc et les groupes carboxyliques soient du même ordre de grandeur pour les quatre espèces, avec des seuils d'adsorption en fonction du pH très proches (figure 32(A)), les capacités maximales d'adsorption varient énormément entre les différentes sortes de diatomées (figure 32(B)). Décrire l'interaction du Zn avec les diatomées au seul moyen de l'adsorption de ce métal en fonction du pH, comme cela a déjà été proposé pour d'autres surfaces biologiques, peut ainsi engendrer des erreurs importantes.

Espèces	$\log K_5$ ( $>R-COOZn^+$ )	$\log K_6$ ( $>SiO-Zn^+$ )	$\log K_7$ ( $>R-COONa^0$ )	[>COOH] ( $\mu\text{mol/g}_{\text{humide}}$ )	Capacité de la couche électrique, F/g
<i>Skeletonema c.</i> (SC)	$5.32 \pm 0.12$	N.D.	$0.24 \pm 0.05$	$136 \pm 34$	$61 \pm 41$
<i>Thalassiosira w.</i> (TW)	$4.70 \pm 0.09$	$2.8 \pm 0.1$	$0.25 \pm 0.15$	$24 \pm 0.4$	$5.0 \pm 4.1$
<i>Achnanthisidium m.</i> (AMIN)	$4.26 \pm 0.03$	$3.2 \pm 0.1$	$0.6 \pm 0.3$	$28 \pm 3$	$27 \pm 9$
<i>Navicula m.</i> (NMIN)	$5.03 \pm 0.03$	$3.0 \pm 0.1$	$0.8 \pm 0.4$	$39 \pm 2$	$26 \pm 28$

**Tableau 7 : Principaux paramètres du modèle d'adsorption du zinc sur les surfaces des diatomées pour les quatre espèces étudiées.**

Les mesures du fractionnement isotopique ( $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ ) ont été effectuées en utilisant une ICP MS à multicollecteur. Elles ont montré que l'incorporation irréversible de zinc dans les cellules de diatomées cultivées induit un enrichissement en isotope lourd par rapport au milieu de culture ( $\Delta^{66}\text{Zn}$  (solide-solution) =  $0.27\pm 0.05$ ,  $0.08\pm 0.05$ ,  $0.21\pm 0.05$ , et  $0.19\pm 0.05$  ‰ pour TW, SC, NMIN et AMIN, respectivement). De même, un enrichissement en isotope lourd ( $\Delta^{66}\text{Zn}$  (solide-solution) =  $0.43 \pm 0.1$  et  $0.27\pm 0.1$  ‰ pour NMIN et AMIN, respectivement) est observé lors des expériences d'adsorption à temps d'exposition court dans un milieu de culture à pH  $\sim 7.8$ . Enfin, les frustules sont enrichis en isotopes lourds par rapport à la solution à pH  $\sim 5.5$  ( $\Delta^{66}\text{Zn}$  (solide-solution) =  $0.35\pm 0.10$  ‰). Les fractionnements isotopiques mesurés peuvent être interprétés à partir de la connaissance de la structure et stabilité des complexes formés par le zinc à la surface des diatomées et dans leur cellule. Ce travail fournit les premières bases de l'utilisation des isotopes du zinc pour le traçage des processus biogéochimiques.

## V. INTERACTION BETWEEN ZINC AND FRESHWATER AND MARINE DIATOM SPECIES : SURFACE COMPLEXATION AND Zn ISOTOPE FRACTIONATION

**Interaction between zinc and freshwater and marine  
diatom species: Surface complexation and Zn isotope  
fractionation**

A. Gélabert<sup>1</sup>, O.S. Pokrovsky<sup>1\*</sup>, J. Viers<sup>1</sup>, J. Schott<sup>1</sup>, A. Boudou<sup>2</sup>, A. Feurtet-  
Mazel<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Laboratoire de Mécanismes et Transfert en Géologie (LMTG), UMR 5563, CNRS-OMP-  
Université Paul Sabatier, 14 Avenue Edouard Belin, 31400 Toulouse, France*

<sup>2</sup>*Laboratoire d'Ecotoxicologie et d'Ecophysiologie des Systèmes Aquatiques (LEESA), UMR  
CNRS 5805, Université de Bordeaux 1, Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France*

- Corresponding author's email : oleg@lmtg.obs-mip.fr

Submitted to *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 19 May 2005.

Keywords: diatom, adsorption, zinc, surface complexation, stable isotope fractionation.

**ABSTRACT**

This work is devoted to characterization of zinc interaction in aqueous solution with two marine planktonic (*Thalassiosira weissflogii* = TW, *Skeletonema costatum* = SC) and two freshwater periphytic species (*Achnanthes minutissimum* = AMIN, *Navicula minima* = NMIN) by combining adsorption and electrophoretic measurements with surface complexation modeling and by assessing Zn isotopes fractionation during both long term uptake and short term adsorption on diatom cells and their frustules. Reversible adsorption experiments were performed at 25 and 5°C as a function of exposure time (5 min to 140 hrs), pH (2 to 10), zinc concentration in solution (10 nM to 1 mM), ionic strength (I = 0.001 to 1.0 M) and the presence of light. While the shape of pH-dependent adsorption edge is similar (“unique”) among all four species, the constant-pH adsorption isotherm and maximal Zn binding capacities differ by an order of magnitude. The extent of adsorption increases with temperature from 5 to 25°C and does not depend on light intensity. Zinc adsorption decreases with increase of ionic strength suggesting competition with sodium for surface sites. Cell number-normalized concentrations of sorbed zinc on whole cells and their silica frustules demonstrated only weak contribution of the latter (10-20%) to overall zinc binding by diatom cell wall. Measurements of electrophoretic mobilities ( $\mu$ ) revealed negative diatoms surface potential in the full range of zinc concentrations investigated (0.01 to 50 mg/L), however, the absolute value of  $\mu$  decreases at  $[Zn] > 1$  mg/L suggesting a change in surface speciation. These observations allowed us to construct a surface complexation model for Zn binding by diatom surfaces that postulates the constant capacitance of the electric double layer and considers Zn complexation with mainly carboxylate and, partially, silanol groups. Thermodynamic and structural parameters of this model are based on previous acid-base titration and spectroscopic results and allow quantitative reproduction of all adsorption experiments. Although Zn adsorption constants on carboxylate groups are almost the same, Zn surface adsorption capacities are very different among diatom species which suggest that the “unique” observed adsorption edge cannot be a useful guide for quantitative modeling of Zn biogeochemical interactions.

Measurements of Zn isotopic composition ( $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ ) performed using a

multicollector ICP MS demonstrated that irreversible incorporation of Zn in cultured diatom cells produces enrichment in heavy isotope compared to growth media ( $\Delta^{66}\text{Zn}(\text{solid-solution}) = 0.27 \pm 0.05, 0.08 \pm 0.05, 0.21 \pm 0.05, \text{ and } 0.19 \pm 0.05 \text{ ‰}$  for TW, SC, NMIN and AMIN species, respectively). Accordingly, an enrichment of cells in heavy isotopes ( $\Delta^{66}\text{Zn}(\text{solid-solution}) = 0.43 \pm 0.1 \text{ and } 0.27 \pm 0.1 \text{ ‰}$  for NMIN and AMIN, respectively) is observed following short-term Zn sorption on freshwater cells in nutrient media at pH  $\sim 7.8$ . Finally, diatoms frustules are enriched in heavy isotope compared to solution during Zn adsorption on silica shells at pH  $\sim 5.5$  ( $\Delta^{66}\text{Zn}(\text{solid-solution}) = 0.35 \pm 0.10 \text{ ‰}$ ). Measured isotopes fractionation can be related to the structure and stability of Zn complexes formed and they provide a firm basis for using Zn isotopes for biogeochemical tracing.

## 1. Introduction

Diatoms, unicellular brown algae enclosed in an external siliceous skeleton (frustule), account for a quarter of all the photosynthesis on the planet. As their cell wall is known to display a high affinity for a wide range of aqueous metal cations, they are able to play a key role in metal speciation and distribution in many aquatic systems as well as in trophic transfer capacities to the benthic and pelagic foodwebs. As a result, diatoms are considered as bioindicators of water pollution in rivers (Dixit, 1992; Gold 2003a, b) or in sewage sludge (Pun, 1995) and are widely used as metal removal agent (Volesky and Holan, 1995; Csogor et al., 1999; Vrieling et al., 1999; Schmidt et al., 2001). Many studies have been devoted to metal uptake and adsorption by marine planktonic diatoms (Gonzalez-Davila, 1995; Gonzalez-Davila et al., 2000; Rijstenbil et al., 1994; Rijstenbil and Gerringa, 2002; Wang and Dei, 2001a, b), diatom response to metal stress (Sunda and Huntsman, 1998; Ahner et al., 1997; Fisher and Fabris, 1982) and their growth limitation by trace elements (Morel et al., 1991; Brand et al., 1986; Anderson et al., 1978; Ivorra et al., 2000). At the same time, freshwater diatoms received relatively little attention despite their importance in metals regulation in continental waters (Gold et al., 2002; Tien, 2004) owing to their accumulation

and transfer capacities along the foodwebs (Genter, 1996).

Among metals, zinc is of great interest because it is considered both as an essential micronutrient at low concentration (Morel et al., 1991, 1994) and as a toxic element at high concentration (50-200 mg/L) leading to depressed division rates or growth inhibition (Jensen et al., 1974, 1982; Fisher et al., 1981; Fisher, 1980). Inside the cell, zinc constitutes the major pool of metal ions and is usually associated with numerous proteins and enzymes (Vallee and Auld, 1990) but is also stored in carboxylate or polyphosphate complexes (Stauber and Florence, 1990; Kotrba, 1999; Cox, 2000; Frausta da Silva and Williams, 2001). Again, most of available information on zinc deals with marine diatom species due to their importance in Zn regulation in seawater (Sunda and Huntsman, 1992) and their potential use as proxies (Elwood and Hunter, 1999), and leave apart freshwater species. This study is aimed at filling this gap by providing of rigorous comparison of zinc binding to two marine planktonic and two freshwater periphytic species.

It has been widely argued that molecular mechanisms operating at solid/solution interface are likely to be responsible for isotopic fractionation of “heavy” elements (Johnson et al., 2004). For example, isotopic fractionation of Zn (Cacaly et al., 2004; Rousset et al., 2004; Pokrovsky et al., 2005b), Ge (Galy et al., 2002) and Mo (Barling and Anbar, 2004) has been reported during these elements adsorption on solid oxy(hydr)oxides. The role of biota in Zn isotopic fractionation in oceanic sediments (Pichat et al., 2003) as well as in its terrestrial cycle (Viers et al., 2004) has been largely evoked, however, to our knowledge, there is no experimental study of Zn isotopic fractionation during its uptake or adsorption by microorganisms.

Because the first step in metal uptake process by biota is aqueous ions or complexes adsorption on external cell layers (cell wall, plasmic membrane), studying this “primary” adsorption process is crucial for modeling the impact of aquatic organisms on metal transport in natural settings. The aim of this study, therefore, is to provide a rigorous thermodynamic

description of diatom cell-wall interactions with zinc by combining macroscopic adsorption and electrokinetic measurements with surface complexation modeling. Complementary to this,  $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$  isotopes fractionation during viable cells and frustules adsorption experiments as well as long term uptake were performed to assess the main factors controlling isotope fractionation and possibility to use this fractionation for tracing geochemical processes. In this work we retained four representative diatom species which are very abundant in temperate climate zone: two planktonic, *Skeletonema costatum* (marine) and *Thalassiosira weissflogii* (estuarine) and two freshwater periphytic, *Achnathidium minutissimum* and *Navicula minima*.

In the first part of this study it was demonstrated that the four diatom species have a similar cell wall structure which is mainly composed of polysaccharides and proteins coating the silica frustule (Gélabert et al., 2004). The main surface moieties of this complex 3D-cell wall structure are amino, carboxyl and silanol groups that control both surface charge, and, presumably, affinity to metal ions. Since diatoms site densities normalized to the area of siliceous shell are an order of magnitude higher than corresponding values for organic-free frustules, the metal affinity of diatom cultures is expected to be essentially controlled by the 3-D organic layer covering the silica frustule.

In the present study we are trying to address the following issues:

*i)* what are the main “external” (environmental) parameters controlling the interaction of zinc with diatom surfaces? *ii)* what are the differences in zinc binding properties between freshwater and marine species? *iii)* what are the main functional groups responsible for Zn sorption on diatom surfaces, and *iv)* is it possible to relate the isotopic fractionation produced by Zn interaction with diatom cultures to the structure and stability of metal complexes formed? We hope that answering these questions will provide a firm basis for quantitative biogeochemical modeling of zinc transport in natural environments controlled by aquatic biological communities.

## 2. Material and methods

### 2.1. Diatom cultures

Monospecific diatom cultures were developed from laboratory strains to separately produce biomass of four species: marine planktonic *Thalassiosira weissflogii* (abbreviated TW), *Skeletonema costatum* (SC), freshwater periphytic *Achnantheidium minutissimum* (AMIN) and *Navicula minima* (NMIN) as described previously (Gélabert et al., 2004). Diatoms were cultured to concentration of  $\sim 10^7$  cell/L at 20°C in a sterile Dauta (freshwater) or f/2 (seawater) medium (Gold, 2003a) at pH  $\sim 7.7$ -7.8 and  $[\text{Zn}]_{\text{tot}} \sim 0.2 \mu\text{M}$ . Continuous aeration of the culture was provided to prevent from pH increasing due to photosynthetic activity. Typical incubation time was 1 to 2 weeks. Diatoms were harvested from the late exponential - stationary growth phase and kept at 4°C until use.

The biomass of live diatom cells suspension was quantified by its humid (centrifuged 15 min at 2200 g) and dry (lyophilized) weight. Before the adsorption experiment, diatoms were rinsed three times in appropriate NaCl or NaNO<sub>3</sub> solution using centrifugation at 2200 g ( $\sim 400$  mL of solution for 1 g of wet biomass) to remove the adsorbed metals and cell exudates from the surface. Diatom frustules were extracted from cells suspension (20 g humid/L) by acid digestion (5% HNO<sub>3</sub>+5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) during 6 hrs at 105°C followed by thorough rinsing in sterile deionized water using centrifugation. FT-IR, XRD and SEM analysis of produced solid material revealed only amorphous silica (SiO<sub>2</sub>·nH<sub>2</sub>O) without detectable traces of organic constituents.

### 2.2. Zinc adsorption experiments

Zinc adsorption experiments were designed to provide a quantitative characterization of Zn binding by diatom surface via determining thermodynamic stability constant for adsorption reaction on different surface sites. For this, two types of experiments were

performed: *i*) adsorption at constant initial zinc concentration in solution as a function of pH (pH-dependent adsorption edge) and *ii*) adsorption at constant pH as a function of zinc concentration in solution (“Langmurian” isotherm). Furthermore, the influence of other environmental parameters such as ionic strength, biomass concentration, light intensity, temperature and time of exposure were also investigated. All experiments were performed in solutions undersaturated with respect to any solid metal oxide, hydroxide or carbonate phase as verified by calculation using MINTEQA2 computer code and corresponding database (Allison et al., 1992).

Adsorption experiments were conducted at  $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$  in continuously stirred diatom suspension of NaNO<sub>3</sub> or NaCl solution with ionic strength ranging from 0.001 to 1 M using 8 mL sterile polypropylene vials. Cell concentrations varied from 8 to 70 g humid/L ( $(2 - 4) \times 10^9$  cells/L) and zinc concentration in solution ( $[\text{Zn}]_{\text{aq}}$ ) spanned from 0.05 to 50 mg/L. pH was adjusted to the desired value using either NaOH or HNO<sub>3</sub> (HCl for NaCl electrolyte). HEPES buffer, which is known to do not complex divalent metals in aqueous solutions (Mirimanoff and Wilkinson, 2000), was added to a concentration of 0.003 M in order to keep pH constant during adsorption isotherm measurements. For all experiments, sterile de-ionized water (MilliQ, 18 mΩ) purged of CO<sub>2</sub> by N<sub>2</sub> bubbling was used. At the end of the experiment, the suspension was centrifuged and the resulting supernatant filtered through a 0.22 μm Nylon filter, acidified with ultrapure nitric acid and stored in the refrigerator until analysis. The concentration of metal adsorbed to diatom in each vessel were calculated by subtracting the concentration of metal in the supernatant from the original amount of zinc added in the suspension.

Exposure time varied from 15 minutes to 140 hrs but was typically fixed to 3 hrs. Measurements of zinc adsorption kinetics on diatom cells indicate that majority of zinc is sorbed within the first 10-100 minutes of exposure (Fig. 1), in agreement with previous works on metal adsorption onto bacteria (Fein et al., 1997; Ngwenya et al., 2003) and algae (Xue et al, 1998; Gonzalez-Davila et al., 1995, 2000).

The reversibility of Zn adsorption equilibria was first tested following the method developed by Fowle and Fein (2000). A homogeneous parent suspension solution of diatoms+Zn+electrolyte was adjusted to pH  $\sim 7$  at which 100% Zn was adsorbed onto diatoms. After 3 hrs of adsorption contact time, aliquots of this parent suspension solution were taken and adjusted to sequentially lower pH values (2 to 6.9). The reaction vessels equilibrated at new pH values for 3 hr were sampled for Zn (Fig. 2A). The concentration of “desorbed” zinc in the supernatant allowed calculation of the amount of irreversibly “incorporated” metal. This amount never exceeded 5-10% suggesting an equilibrium adsorption process with negligible amount of zinc penetrating inside the cell. The second method of reversibility test, developed in the present study, consists of preparing a series of reactors having the diatoms suspension with constant concentration of initially added zinc ( $[Zn]_o$ ) in a wide pH range, separating the cells and the supernatant by centrifugation and filtration and measuring dissolved ( $< 0.2\mu\text{m}$ ) zinc concentration in the first filtrate ( $[Zn]_1$ ). Afterwards, for each investigated pH, exact amount of new zinc-free electrolyte solution is added to wet centrifuged biomass in each reactor and “desorbed” aqueous zinc concentration in the second filtrate ( $[Zn]_{\text{desorb}}$ ) is monitored after 3 hrs of reaction. The proportion of irreversibly bound metal ( $[Zn]_{\text{incorp}}$ ) is calculated as

$$[Zn]_{\text{incorp}}(\%) = 100 \cdot \{ ([Zn]_o - [Zn]_1 - [Zn]_{\text{desorb}}) / [Zn]_o \} \quad (1)$$

This method was tested for zinc adsorption by *Skeletonema costatum* species for which very good recovery of all adsorbed zinc, meaning low amount of irreversibly bound zinc, was found (Fig. 2B).

Optical microscopic inspection of diatoms before and after adsorption experiments showed no visible change in the diatoms population. The cells and chloroplasts remained intact and non-deformed, and no cell fragments could be detected. Concentration of dissolved organic carbon in the course of adsorption experiment did not change for more than 30-50% as illustrated for two marine species in Figure 3. Only weak degradation of cell wall in usual

pH range of adsorption experiments ( $4 \leq \text{pH} \leq 8$ ) was observed. Low DOC concentration monitored during adsorption experiments (i.e., 2-4 mg/L, comparable with [DOC] in surface seawater) and relatively high Zn and cell biomass concentration (0.1-3 mg/L and 8-70 g/L, respectively) imply that diatom surface functional groups, and not organic exudates, are primary responsible for Zn binding in studied systems.

### *2.3. Electrophoretic measurements*

These experiments were designed to assess the cell surface potential or zeta-potential, and, by monitoring its dependence on Zn concentration in solution, to better constrain the surface complexation reactions (see section 3.3 below). This method allows very fast, *in-situ* estimation of the sign of electric surface potential and monitoring of its qualitative modification in the course of metal adsorption. Electrophoretic mobilities of live diatom cells *Achnanthis minutissimum* and *Thalassiosira weissflogii* were measured at 25°C using a microelectrophoremeter (“Zetaphoremeter IV” Z4000, CAD Instrumentation). Details are given in Gélabert et al. (2004). Three replicates were carried out and each replicate was performed by renewing the suspension in the microelectrophoresis cell. The uncertainty attached to electrophoretic mobilities were less than 5 %. Experiments were performed with viable cells (~1 g humid/L) under constant ionic strength (0.01 and 0.1 M) in solutions with zinc concentration ranging from 10 µg/L to 50 mg/L and pH around 7. All solutions were undersaturated with respect to solid oxides and hydroxides of zinc. The time of cells exposure to Zn-bearing solutions varied from 5-10 min to 3 hrs.

### *2.4. Analytical Methods.*

All filtered solutions were analyzed for Zn ( $[\text{Zn}]_{\text{aq}}$ ) using flame atomic absorption (Perkin Elmer 5100 PC spectrophotometer) with an uncertainty of  $\pm 1$  % and a detection limit of  $10^{-7}$  g/L. For Zn concentration lower than 100 µg/L, analyses were performed by ICP-MS

on Perkin Elmer SCIEX, Elan 6000 with a detection limit of 0.01 µg/L and a precision of ±5 %. Values of pH were measured using a Mettler Toledo® combined electrode, with an accuracy of ±0.002 units. Dissolved Organic Carbon (DOC) was analyzed using a Carbon Total Analyzer (Shimadzu TOC-5000) with an uncertainty of 3% and a detection limit of 0.1 ppm.

### *2.5. Zn Stable Isotope Measurements.*

Three types of experiments have been performed to study zinc stable isotope fractionation during its interaction with diatom cultures: (1) long-term Zn uptake (incorporation) in Dauta media in batch growing cultures (AMIN, NMIN, TW, SC) during 3-4 weeks with periodical renewing of nutrient solution to provide a semi-constant zinc concentration at  $0.30 \pm 0.05$  µM; (2) short-term interaction of Zn with viable diatom cultures AMIN and NMIN in nutrient media; and (3) reversible adsorption of Zn on NMIN frustules as a function of pH in 0.01 M NaNO<sub>3</sub>. For the uptake experiments (1), both the initial solution and growing biomass were analyzed while for the adsorption experiments (2) and (3), only filtered solution was processed.

Diatom cells harvested by centrifugation at 2500 g were dried at 80°C and grounded using agate mortar and pestle. Hundred milligrams of this powder was submitted to hydrogen peroxide digestion (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) followed by acid digestion (HNO<sub>3</sub> + HF) in a clean bench room. Blank tests were performed to estimate the level of Zn contamination induced by the digestion procedure and were found to be less than 0.2%. The international geostandard SRM 1515 (Apple Leaves, from NIST, USA) was used to check the validity and the reproducibility of both the acid digestion and ICP-MS analyses. The relative difference between our values and the certified data was close to 5%.

In isotopic fractionation experiments, a full recovery of filtered solution during

preparation procedure is crucial. Filtration of supernatant in (2) and (3) type experiments did not affect the fractionation coefficients because such a filtration of initial Zn stock solution did not change  $\delta^{66}\text{Zn}$  within the uncertainty ( $\pm 0.05\text{ ‰}$ ) as verified by *i*) ICP-MS-MC measurements on this filtered sample subjected to ion-column purification procedure, and *ii*) a  $100\pm 1\%$  recovery of  $[\text{Zn}]_{\text{aq}}$  in filtered standard solutions at pH = 6-7 as measured by AAS.

Zn isotopic composition has been measured at Lyon (Ecole Normale Supérieure) on the P54 MC-ICP-MS (VG Elemental) and at Toulouse (LMTG) on the Neptune MC-ICP-MS (ThermoFinnigan). Zn has five stable isotopes of mass 64, 66, 67, 68 and 70 whose average abundances are 48.63%, 27.90%, 4.10%, 18.75% and 0.62%, respectively. Zn was isolated from the bulk sample using the purification procedure of Maréchal et al. (1999) on the AGMP-1 anion exchange resin (Bio-Rad, USA). An aliquot containing about 300 ng of Zn was loaded on the column. Because isotopic fractionation may occur during the elemental separation on the ion-exchange resin (Maréchal and Albarède, 2002), we analyzed only the samples for which the separation procedure gave a yield of 100% taking into account the analytical uncertainties. The  $^{62}\text{Ni}$  signal was simultaneously measured to evaluate the isobaric interference of  $^{64}\text{Ni}$  on the  $^{64}\text{Zn}$  signal; no significant interference was found. Instrumental mass fractionation was corrected following the method described by Maréchal et al. (1999). A Cu standard (NIST 976) was added to the purified Zn fractions and a Cu (NIST 976) + Zn (JMC 3-0749L) standard mixture was run as a bracketing standard. The ratio of Cu and Zn fractionation factors (i.e.,  $f_{\text{Cu}}/f_{\text{Zn}}$ ) was found to be constant over a single analytical session (i.e., one day measurement) for both P54 and Neptune instruments. As already observed by Maréchal et al. (1999) and Pichat et al. (2003) this  $f_{\text{Cu}}/f_{\text{Zn}}$  ratio does not remain constant from one day to another. The slope of the fractionation line derived from the standard mixture raw data in a  $\ln(^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn})$  versus  $\ln(^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu})$  plot was used to correct the data on the Zn sample + Cu standard mixtures. The Zn isotopic results in this study are given in the recommended delta notation for the  $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$  ratio (Albarède et al., 2004):

$$\delta^{66}\text{Zn} = [((^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn})_s / (^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn})_{\text{JMC}}) - 1] * 1000 \text{ (in ‰)} \quad (2)$$

where *s* signifies sample and JMC the Zn isotopic standard solution. Note that this

JMC 3-0749L solution is not a referenced material but an elemental standard solution used by several laboratories. The  $\delta^{67}\text{Zn}$  and  $\delta^{68}\text{Zn}$  were also considered to check the validity of the measurements and to check that the different Zn isotopes fit on a theoretical mass-dependent fractionation line. The uncertainty given for the  $\delta^{66}\text{Zn}$  varies from 0.05 to 0.1‰.

For experiments (2) and (3) performed in a closed system, the isotopic signature of solid phase ( $\delta^{66}\text{Zn}_{\text{solid}}$ ) was calculated from the mass balance equation using the isotopic ratio in aqueous phase ( $\delta^{66}\text{Zn}_{\text{aq}}$ ), the amount of metal adsorbed (A, %), and the isotopic composition of initial solution ( $\delta^{66}\text{Zn}_{\text{initial}}$ ):

$$\delta^{66}\text{Zn}_{\text{solid}} = \{100 \cdot A - (100 - A) \cdot \delta^{66}\text{Zn}_{\text{aq}}\} / A \quad (3)$$

In this work, we define the isotopic offset between Zn in solution and Zn adsorbed or incorporated in diatoms cells and frustules as

$$\Delta^{66}\text{Zn}(\text{solid-solution}) = \delta^{66}\text{Zn}_{\text{solid}} - \delta^{66}\text{Zn}_{\text{aq}} \quad (4)$$

For experiments (1) on cultures growing under constant concentration of zinc, the isotopic offset is determined as the difference between  $\delta^{66}\text{Zn}$  in digested cells and that in the Zn salt used to prepare the growth media.

### 3. Experimental Results

#### 3.1. Adsorption.

Full compilation of adsorption experiments is given in the Electronic Appendix and summarized in Table 1. Altogether, ~50 experiments having 15-30 data points each have been performed for 4 species and their frustules. Results of zinc adsorption experiments on diatoms as a function of pH and zinc aqueous concentration are depicted in Figs. 4 to 9. For each species the general trend is a negligible adsorption of zinc at  $\text{pH} < 4-5$ , strong increase in adsorption at  $5 \leq \text{pH} \leq 7$  and complete removal of Zn at  $\text{pH} > 7-8$ . At a given pH, the proportion of adsorbed zinc increases with increase of biomass concentration or decrease of  $[\text{Zn}]_0$  in solution. Below, the effects of major, first-order external parameters which are likely to control metal-diatoms interactions such as exposure time, inorganic versus organic cell wall constituents, pH, ionic strength, temperature and light are described.

The pH-dependent adsorption edges were measured after 5 min, 3 hrs and 140 hrs on AMIN species at  $5^\circ\text{C}$  in the dark in order to prevent the cell growth and biological activity. Results are depicted in Figure 4. It can be seen that the proportion of adsorbed Zn does not change with time at  $\text{pH} < 6$ , but that the extent of adsorption significantly increases with reaction in weakly alkaline solutions. This is consistent with faster rates of adsorption at low pHs inferred from kinetic measurements (Fig. 1). Increase in the amount of adsorbed zinc with time in weakly alkaline solutions can be explained by 1) slow incorporation of zinc inside the cells thus renewing surface sites for adsorption and 2) modification of the diatom cell surface due to long term metal exposure that leads to the production of new surface complexants via detoxification mechanisms (i.e., Sunda and Huntsman, 1998; Ahner et al., 1997). Note, however, that these effects are minor compared to uncertainties attached both to surface groups concentration and surface adsorption constants (see section 3.3) and thus can be neglected for our first-order description of diatom surface complexation.

In order to quantify the organic layer contribution during zinc interaction with diatoms, adsorption experiments were conducted first on whole viable cells at a given

concentration ( $n \cdot 10^{10}$  cell/L) and then on the same number of frustules ( $n \cdot 10^{10}$  cell/L), which were obtained by quantitative acid digestion of the previous diatom pool. The difference between metal adsorption on the whole cells and corresponding amount of frustules, both for pH-dependent adsorption edge and for Langmurian adsorption isotherm (Fig. 5A-E) demonstrates relatively weak (i.e.,  $20 \pm 10\%$ ) contribution of silica skeleton to the overall adsorption of zinc by diatom cells. Note that this value represent the upper limit on frustule contribution to metal binding because organic protein and polysaccharidic layers envelopes the silica membrane from both sides thus decreasing the accessibility of silanol groups to zinc.

The effect of ionic strength on pH-dependent adsorption edge for four diatom species is presented in Fig. 6A-D. Overall, the percentage of adsorbed zinc decreases with increasing ionic strength suggesting a competition with sodium for the surface sites or electrostatic effects in the electric double layer. For planktonic species TW, the ionic strength effect is very weak, as the adsorption curves obtained at different electrolyte concentration are very similar. Note that the weak ionic strength dependence for TW is consistent with previous titration experiments (Gélabert et al., 2004) that demonstrated no effect of background electrolyte concentration on TW surface proton adsorption. Zn adsorption on AMIN and NMIN is much more affected by increasing ionic strength.

Compilation of constant pH, Langmurian adsorption isotherms for studied species is presented in Figures 7a-d. The order of zinc adsorption capacity among different species is  $SC > NMIN > AMIN > TW$ . This trend is in agreement with the weight-normalized concentration of surface carboxylate groups for each species: 117, 39, 26 and 24  $\mu\text{mol/g}$  wet weight for SC, NMIN, AMIN and TW, respectively as inferred both from proton adsorption and IR measurements (Gélabert et al., 2004). The effect of light exposure on zinc adsorption by viable diatoms is illustrated in Figure 8. A very slight increase of adsorption under continuous light exposure (6000-8000 lux) witnesses the processes of active uptake occurring in viable cells; however, within the experimental uncertainties, the effect of light can be considered as of second-order importance compared to other environmental parameters.

The effect of temperature on Zn adsorption on freshwater diatoms (AMIN) is illustrated in Fig. 9. The increase of adsorption with temperature observed in the present study is in agreement with available literature data on Cu (Gonzalez-Davila et al., 1995, 2000) and Pb (Santana-Casiano et al., 1995) adsorption on marine phytoplankton. This effect can be explained by *i*) positive enthalpy of adsorption reaction (i.e., the enthalpy of  $\text{ZnCH}_3\text{COO}^+(\text{aq})$  and  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2^0(\text{aq})$  formation reaction are equal to 8.5 kJ/mol and 22 kJ/mol, respectively, Martell et al., 1997), *ii*) specific active biological uptake mechanisms, or *iii*) organic surface layers conformation change at low temperatures. However, distinguishing between these mechanisms requires a detailed study of different adsorption-controlling factors at various temperatures.

### 3.2. Electrokinetic Measurements.

Electrophoretic mobilities of AMIN species submitted to an increasing concentration of zinc at  $\text{pH}=7.0\pm 0.1$  are depicted in Figure 10. The diatoms exhibit a constant negative mobility in the full range of investigated  $[\text{Zn}]_{\text{aq}}$  suggesting the dominance of negatively charged functional groups on the surface. Absolute values of electrophoretic mobilities decrease with  $[\text{Zn}]_{\text{aq}}$  at  $[\text{Zn}]_{\text{aq}} > 1\text{-}2$  mg/L, reflecting a decrease of the surface potential due to formation of neutral or positively charged Zn surface complexes (Fig. 10A). Extrapolating these dependencies to  $\mu = 0$  allows determination of diatoms isoelectric point in the presence of zinc:  $\text{pH} = 7$ ,  $[\text{Zn}]_{\text{aq}} = 110 \pm 20$  mg/L. The increase of ionic strength leads to a decrease of the absolute value of the electrophoretic mobilities in the full range of zinc concentration in solution because of the electric double layer compression (Fig. 10A).

No significant difference between the electrophoretic mobilities measured after short (5 min) and long (1-3 hrs) time exposure to zinc at  $\text{pH} = 7$  was detected (Fig. 10A). This suggests fast interaction between diatom surface and aqueous zinc ions, already evidenced from adsorption experiments (see sections 2.2 and 3.1), with no major change of diatom surface speciation occurring upon long-term metal exposure.

### 3.3. Surface Complexation Modeling

In the first part of this study (Gélabert et al., 2004), using a set of spectroscopic and macroscopic techniques, we identified the nature and determine the concentration of the major surface functional groups (carboxylate, amino, and silanol) that control the amphoteric acid-base properties of diatom surfaces. In the circumneutral pH range of adsorption experiments, carboxyl ( $pK_a \sim 4$ ) and silanol ( $pK_a \sim 7.5$ ) are negatively charged while the nitrogen lone pair from amino groups is already involved in proton binding under  $pH=8$ , resulting in a positive charge for amine sites. Thus, only carboxyl and silanol groups are likely to bind positively charged  $Zn^{2+}$  ions according to the reactions:



In this study, a 1:1 metal–ligand stoichiometry (mononuclear surface complexes) was postulated as follows from EXAFS results on zinc adsorption by diatom surfaces (Pokrovsky et al., 2005a) and in accordance with SCM approaches developed for metal adsorption on bacteria (Fein et al., 1997, 2001; Daughney et al, 1998, 2001).

Following the track developed for metal complexation with bacterial surfaces (Fein et al., 1997; Daughney and Fein, 1998; Fowle and Fein, 1999; Haas et al., 2001), full set of adsorption data was modeled within the framework of the constant capacitance model (CCM) using FITEQL computer code (Herbelin and Westall, 1996). This modeling included optimization of zinc complexation constant with carboxylate and silanol groups and the EDL capacitance value. Parameters related to “intrinsic” properties of diatom surfaces ( $pK_a$  of  $>R-COOH$ ,  $>R-NH_2$ ,  $>SiOH$  and their total concentrations) were allowed to vary only in the range of uncertainties defined in the first part of this study (Gélabert et al., 2004). Reactions (5) and (6) equilibrium constants,  $K_{>COO-Zn}$  and  $K_{>SiO-Zn}$ , were optimized at each ionic strength

since the surface potential is considered to be independent of electrolyte composition in the CCM (Sverjensky and Sahai, 1996; Lützenkirchen, 1999). However, as most investigated diatom species exhibit clear dependence of Zn adsorption on ionic strength (Fig. 6), significant improvement of fit was obtained by introducing zinc competition with sodium for surface carboxylate groups:



Therefore, the stability constant of reaction (7) was treated as additional adjustable parameters for both freshwater and marine species. Note that acid-base surface titrations performed in the first part of this study (Gélabert et al., 2004) did not allow quantification of reaction (7) due to insufficient amount of measurements at various ionic strengths.

Full set of SCM parameter values and average recommended values in this study for Zn-diatom surface interaction are listed in Tables 2 and 3, respectively. In agreement with previous studies of zinc complexation with bacteria (Fein et al., 2001), algae (Xue et al., 1988; Gonzalez- Davila, 1995), silica (Delolme et al., 2004) and sodium complexation with carboxylate groups of humic acids (Westall, 1995), the pK of intrinsic surface stability constants for reactions 5, 6 and 7 were initially fixed as 4.5, 3.0 and 1.5, respectively. Results of each adsorption experiment were fitted individually by varying surface reaction constants by not more than 0.5 log units from the initial values to provide simultaneously a best fit of the experimental pH-dependent adsorption edge and the “Langmurian” adsorption isotherm.

The goodness of model fit to a data set is represented by the overall variance (V(Y)) calculated by FITEQL. This variance is normalized with respect to the number of experimental data points, the number of chemical components for which the total concentration is known and the number of adjustable parameters. Generally, a value of V(Y) less than 20 corresponds to a good fit (Herbelin and Westall, 1996), although it has been

argued that graphical goodness of fit should be preferred over numerical goodness of fit parameters (Gunneriusson and Sjöberg, 1993). The overall variances calculated for each experiment are listed in Table 2; it can be seen that for most experiments,  $V(Y) \leq 20$  which indicates a good adherence to experimental data of predicted adsorbed concentration.

The EDL capacitance value,  $C$ , which could not be fitted by FITEQL, was initially fixed for each species according to previous work (Gélabert et al., 2004). However, it was revealed that optimization of  $C$  allows significant improvement of the fit. New optimized EDL capacitances listed in Table 2 are about four and ten times lower than those extracted from acid- base titrations for AMIN, NMIN, TW and SC, respectively. Although  $C$  value for porous multilayer diatom cell surface should be considered as a purely adjustable parameter without rigorous physical meaning, one can hypothesize that the decrease in EDL capacitance arises from weaker electrostatic effects associated with Zn sorption than with proton/hydroxyl penetration occurring during acid-base titrations of diatoms. This probably indicates that zinc penetration into surface layers is shallower than that of protons. In particular, it is unlikely that Zn interacts with protein template located beneath the silica membrane. Note that lower  $C$  values for Zn adsorption are also consistent with lower surface adsorption densities for Zn (0.4-4 mg/g humid or 6-50  $\mu\text{mol/g}$  humid, Fig. 7) compared to those for protons (20-120  $\mu\text{mol/g}$  humid, Gélabert et al., 2004). However, the slightly different models used for protons (pure CCM) and Zn adsorption (CCM with competition between Zn and Na for  $>R\text{-COO}^-$ ) might partly account for the different  $C$  values.

Results of Zn adsorption modeling are illustrated in Figures 5 – 8 where dashed or solid lines give predicted sorption of zinc as a function of pH or Zn aqueous concentration.

### *3.4. Stable Isotope Fractionation*

Results of stable isotope measurements are reported in Table 4. Analyses of digested

cells from two independent series of diatom culturing experiments in the presence of Zn agree within the uncertainty of analysis and demonstrate a clear enrichment of cells in heavy isotope. The isotopic offset  $\Delta^{66}\text{Zn}(\text{solid-solution})$  is equal to  $0.19\pm 0.05$ ,  $0.21\pm 0.05$ ,  $0.27\pm 0.05$ , and  $0.08\pm 0.05$  ‰ for AMIN, NMIN, TW and SC, respectively. For adsorption experiments on living cells at pH=7.6-8.1, systematic enrichment of cells in heavy isotope is observed which does not depend on exposition time (20 min to 42 hrs) and varies from  $\Delta^{66}\text{Zn}(\text{solid-solution}) = 0.27\pm 0.10$  to  $0.43\pm 0.10$  ‰ for AMIN and NMIN, respectively. Isotopic fractionation of zinc during its adsorption on frustules of *Navicula minima* at  $5.4 \leq \text{pH} \leq 5.6$  exhibits the enrichment of the surface in heavy isotope ( $\Delta^{66}\text{Zn}(\text{solid-solution}) = 0.35\pm 0.05$  ‰). Extent of this isotopic fractionation is comparable with that following Zn sorption on inorganic materials such as goethite, birnessite, pyrolusite, corundum, and  $\text{Al}(\text{OH})_3$  :  $\Delta^{66}\text{Zn}(\text{solid-solution}) = -0.20\pm 0.03$ ,  $-0.17\pm 0.06$ ,  $0.10\pm 0.03$ ,  $0.10\pm 0.09$ ,  $0.13\pm 0.12$  ‰, respectively (Pokrovsky et al., 2005b). Overall, zinc stable isotopic fractionation induced by adsorption on most mineral surfaces does not exceed 0.2 ‰. However, the isotopic shift induced by Zn sorption on ferrihydrite and hematite, can achieve +0.6 ‰ (Cacaly et al., 2004; Pokrovsky et al., 2005b).

#### 4. Discussion

For all studied species, a two sites (carboxyl and silanol) model that is based on previously measured site densities and protonation constants, provides a good description of the sorption data (i.e., see Figs 5-8). For *Skeletonema costatum*, very low contribution of silica to cell wall functional groups was demonstrated from metal-free system studies (Gélabert et al., 2004), and the adsorption data fitting did not require introducing reaction (6) in the model. For this species, the fitting of all adsorption data required amino groups concentration by an order of magnitude lower than that obtained from acid-base titration. This can be explained by the fact that the cell wall of SC has the highest thickness of porous organic layer (Gélabert et al., 2004). Because zinc adsorption onto SC is likely to occur on the most external polysaccharidic layers of the cell wall, a large amount of amino groups, located beneath the silica frustule (Hecky et al., 1973), do not contribute to surface charge and metal

sorption properties in the circumneutral pH range. In accordance with quantitative macroscopic measurements of the present study (Fig. 5), mainly carboxyl groups are involved in zinc binding on the cell surface while silanol sites contribution from the frustule are much less important.

The model elaborated in this study on the basis of surface adsorption data also allows adequate representation of surface electric potential as inferred from electrophoretic mobility measurements (Fig. 10). In the full range of investigated  $[Zn]_{aq}$  and at  $pH \sim 7$ , the cell outermost layers remain negatively charged due to the dominance of  $>COO^-$  groups. According to model prediction, at  $[Zn]_{aq} > 1-2$  mg/L,  $[>COOZn^+]$  species starts to contribute to the surface potential as their concentration mole fraction 10-20%, in agreement with measurements of electrophoretic mobilities (Fig. 11).

It has been argued that a number of microorganisms exhibit similar proton and metal binding constants leading to so-called “universal” adsorption edge. A unique pH-dependent Cd adsorption edge has been demonstrated in laboratory experiments using individual strains of bacteria (Yee and Fein, 2001) and natural bacteria consortia (Borrok et al., 2004). In this study, we tested this hypothesis for four diatom species by plotting *i*) the percentage of adsorbed zinc as a function of pH (Fig. 12A), and *ii*) the concentration of adsorbed zinc as a function of  $[Zn]_{aq}$  at constant pH (Fig. 12B). While semi-logarithmic pH-dependent adsorption edge (Fig. 12A) is, indeed, rather similar among all four species studied, a “Langmurian” adsorption isotherm plot (Fig. 12B) reveals major differences between species related to specific properties of metal binding reactions and weight-normalized site concentrations. Thus we conclude, in contrast to what was argued in previous studies, that presenting pH-dependent adsorption edge in semi- logarithmic scale as "unique" feature of metal adsorption may be somewhat misleading for quantitative biogeochemical modeling.

While the maximal Zn adsorption densities are different among all four species, the values of the main surface adsorption constant ( $K_{>COO-Zn}$ , reaction 5), are, in fact, of the same

order of magnitude: the average value for all experiments yields  $\log K_{>\text{COO-Zn}} = 4.8 \pm 0.3$ . Zinc-carboxylate group interaction with a similar value of reaction constant is widely used for modeling of metal binding by algae (Schiewer and Volesky, 1995; Kiefer et al., 1997) and bacteria surfaces (Fein et al., 2001; Ngwenya et al., 2003; Borrok et al., 2004). In some studies with bacteria, reported values for this stability constant are an order of magnitude lower (i.e., Plette et al., 1996; Fein et al., 2001; Ngwenya et al., 2003) than the value determined for diatoms in the present work. The reason for this is the different nature of surface groups involved in Zn and other metals binding by different microorganisms. Indeed, the set of SCM parameters used by the last authors for bacteria implies complexation with strongly-binding phosphate groups ( $\log K_{\text{Zn-PO}_4} \sim 5$ ) while the adsorption on carboxylate sites ( $\log K_{\text{Zn-COO}} \sim 3.5$ ) occurs mostly at high pHs. Spectroscopic observations also evidenced important role of phosphate moieties in Zn binding by bacterial cells (Webb et al., 2001; Boyanov et al., 2003). In bacterial cells, rigidity is brought by peptidoglycan of cell wall that contains secondary polymers (e.g., teichoic acid) having phosphoryl functions and exhibiting high affinity for metals (Beveridge, 1988; Beveridge et al., 1997). In diatoms, the role of peptidoglycan is partially played by silica frustule that also contributes to metal binding by the cell wall (reaction 6). Our spectroscopic and macroscopic measurements did not evidence the presence of phosphate groups in diatoms cell envelopes (i.e., their proportion is less than 1% of surface carboxylates, Gélabert et al., 2004). Moreover, the addition of these phosphate groups for Zn surface binding did not allow the fit to converge. Finally, our recent X-ray Absorption Spectroscopy (XAS) study of zinc adsorption on diatom surfaces did not evidenced the presence of phosphorus in the second neighbor environment and confirmed monodentate mononuclear or binuclear binding to carboxylate groups of the surface layer (Pokrovsky et al., 2005a).

The overall binding capacities of diatom surfaces to zinc measured in the present study (1-5 mg/g wet weight or 100-500  $\mu\text{mol/g}$  dry weight) are in good agreement with recent measurements of Klimmek et al. (2001) on 30 algae (100-400  $\mu\text{mol/g}$  dry weight) and diatoms (230  $\mu\text{mol/g}$  dry weight). The order of Zn binding capacity to diatoms cell wall (SC > NMIN > AMIN > TW) assessed in the present work is consistent with our previous Attenuated Total Reflection (FT-ATR) results of carboxylate group concentration in the surface layers (Gélabert et al., 2004).

The value of the constant for sodium – zinc exchange on diatoms surface ( $>\text{COO-Zn}^+ + \text{Na}^+ = >\text{COO-Na}^\circ + \text{Zn}^{2+}$ ) proposed in this study,  $\log K_{\text{exch}} = \log K_{>\text{COO-Na}} - \log K_{>\text{COO-Zn}}$ , varies between -2 and -3, in agreement with the value -2.1 found for other algae (*Vaucheria* s., Crist et al., 1981). Because Zn adsorption on freshwater species is much more affected by increasing Na concentration than that on marine species (section 3.1), the stability constant for sodium adsorption on carboxylate groups ( $\log K_{>\text{COO-Na}}$ ) is lower for SC and TW (~0.25) compared to AMIN and NMIN (~0.7). It follows both from spectroscopic observations and quantitative macroscopic measurements that marine planktonic diatoms contain much less amount of silica in their cell wall (Gélabert et al., 2004). It is known that for silica, the counter  $\text{Na}^+$  ions can closely approach the potential determining OH/O<sup>-</sup> groups (Iller, 1979). As a result, sodium can compete with Zn for surface sites (both silanol and carboxylate) of freshwater diatoms, but exhibit much less effect on marine species. The effect of NaCl on Zn adsorption on TW cells is the lowest among all studied species (Fig. 6D). *T. weissflogii* is the only estuarine species that lives under conditions of variable salinity. It is possible, that specific biochemical/organo-chemical characteristics such as protein and polysaccharides conformation on TW surface are responsible for the weak effect of salinity on Zn affinity to cell surface which is necessary for maintaining need for Zn homeostasis requirement under variable external media.

Measurements of zinc stable isotopes fractionation performed, for the first time, on diatoms and their silica frustules interacting with aqueous solutions, revealed systematic enrichment of cells in heavy isotope (Table 4). The  $^{66}\text{Zn}$  enrichment can be explained by the change of Zn coordination upon its reaction with diatoms: Zn is coordinated by six water molecules in aqueous solution but it reduces its coordination to four in the complexes it forms with carboxylate, amine or silanol groups inside or on the surface of the cells (Pokrovsky et al., 2005a). Enrichment of  $^{66}\text{Zn}$  in diatoms is consistent with results of quantum mechanical calculations which predict that the heavier isotope should concentrate in the species in which it is bounded most strongly (Criss, 1999), *i.e.*, tetrahedral Zn-carboxylate or silanol complexes with shorter Zn-O bonds. However, one cannot establish a simple correlation between the EXAFS- based shift in Zn first neighbor bond distances between diatoms, their frustules and aqueous solution (Pokrovsky et al., 2005a) and  $\Delta^{66}\text{Zn}(\text{solid-solution})$  measured in this study. As recently shown for B isotopes fractionation upon sorption on humic acid and metal oxides

(Lemarchand et al., 2005), results of surface complexation modeling may serve as a useful guide for assessing the degree of isotopic fractionation. Indeed, the difference in isotopic offset  $\Delta^{66}\text{Zn}(\text{solid- solution})$  between AMIN and NMIN species (0.27 and 0.43 ‰, respectively) exhibits the same trend as the difference in Zn surface adsorption constants on these diatoms ( $\log K_{>\text{COO-Zn}} = 4.25$  and  $5.0$ , respectively). The isotopic offset for NMIN frustules is lower than that for viable cells *Navicula minima*, and the surface adsorption constant is, accordingly, lower ( $\log K_{>\text{SiO-Zn}} < \log K_{>\text{COO-Zn}}$ , Table 2). Thus it can be advocated that, in the case of diatoms, for equivalent surface complexes, the higher the adsorption constant, the larger the isotopic fractionation if the metal is more strongly bonded in the surface species than in the aqueous species.

## 5. Conclusions

This study allows comprehensive and quantitative description of zinc adsorption on diatom surfaces. Various “external” parameters such as pH, zinc and biomass concentration in solution, ionic strength and temperature are likely to govern Zn binding by diatom cells. Like most processes of “passive” metal adsorption on organic and inorganic materials, zinc interaction with viable diatoms is very fast and largely reversible, thus it allows to use a thermodynamic approach for modeling zinc surface complexation reactions. Overall, the metal binding properties of diatom surfaces measured in the present study are comparable with those for bacteria, algae and other biological materials. The role of silica frustule, estimated from comparison of sorption experiments on whole cells and their silica exoskeletons, is relatively small and cannot exceed 30% of overall metal binding. As a result, the majority of diatom-trapped metals, located in the organic coating, are likely to be released in the environment during diagenesis of diatom cells.

Results of FITEQL thermodynamic modeling of adsorption data demonstrated that the major surface functional groups responsible for Zn binding by diatoms are carboxylate moieties located in the external polysaccharidic layers of cell wall. No complexation with

phosphoryl groups of surface layer was required to model Zn adsorption on diatoms, in agreement with previous XAS study. For freshwater species, competition between  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  for  $\text{>COO}^-$  sites leads to significant decrease of metal adsorption in solutions of high ionic strength. In agreement with previous results on bacteria, pH-dependent adsorption edge exhibits a “unique” shape for all four diatom species. The reaction constants for Zn adsorption on carboxylate sites are of the same order of magnitude (the average value for all experiments yields  $\log K_{>\text{COO-Zn}^{2+}} = 4.8 \pm 0.3$ ). However, Langmurian adsorption plots, and, accordingly, Zn surface adsorption capacities are very different among species. This strongly suggests that apparently “unique” shape of pH- adsorbed metal dependences claimed in earlier works could not be a useful guide for quantitative biogeochemical modeling.

The present study represents only a first-order macroscopic characterization of metal interactions with diatom surfaces. Nevertheless, together with previous studies of metal speciation on the surface and in solution (*e.g.*, Santana-Casiano et al., 1997; Gonzalez-Davila et al., 2000), and analysis of metal uptake and transport by marine diatoms (Phinney and Bruland, 1994; Sunda and Huntsman, 1998), it provides a basis for rigorous physico-chemical description of zinc interaction with planktonic and periphytic diatoms. More comprehensive analysis of active metal uptake processes and internalization fluxes via irreversible penetration inside the cells like that elaborated for green algae and bacteria (Mirimanoff and Wilkinson, 2000; Slaveykova and Wilkinson, 2002; Smiejan et al., 2003; Kola and Wilkinson, 2005) is not available for diatom species and will be a goal for further research.

The change of zinc isotopic composition during its incorporation and adsorption on viable diatoms and their frustules assessed, for the first time, in this work, provides important constraints on biological fractionation mechanisms in surficial aquatic environments. An isotopic offset of  $\Delta^{66}\text{Zn}(\text{solid-solution}) = 0.3 \pm 0.1 \text{ ‰}$  is expected when Zn is uptaken by diatoms from aqueous solution. New measurements of Zn isotopic composition in rivers, seawater, plankton and periphyton are necessary to compare these laboratory results with Zn geochemistry in natural settings and to test the tracks open in this study by Zn isotopes in the tracing of biogeochemical processes.

**Acknowledgements:**

This work was supported by the French National Programs for Basic Research ACI “Eau et Environnement” and ECODYN (Ecodynamique et Ecotoxicologie des Contaminants). We thank B. Etcheverria for invaluable help during diatom culture process. Participation of C. Gold at several stages of this work is equally acknowledged.

## REFERENCES

- Ahner B. A., Morel F. M. M., and Moffett J. W. (1997) Trace metal control of phytochelatin production in coastal waters. *Limnol. Oceanogr.* **42**, 601-608.
- Albarede F. (2004) The stable isotope geochemistry of copper and zinc. In: Geochemistry of non-traditional stable isotopes., Eds. Johnson, C.M., Beard, B.L., Albarede, F. Mineralogical society of America, Geochemical Society, Vol. 55.
- Allison J.D., Brown D.S., Novo-Gradac K.J., 1991. MINTEQA2/PRODEFA2, A geochemical assessment model for environmental systems: Version 3.0 user's manual. U.S. EPA, Athens, GA.
- Anderson M. A., Morel F. M. M., and Guillard R. R. L. (1978) Growth limitation of a coastal diatom by low zinc ion activity. *Nature* **276**, 70-71.
- Barling J. and Anbar A.D. (2004) Molybdenum isotope fractionation during adsorption by manganese oxides. *Earth Planet. Sci. Lett.* **217**, 315-329.
- Beveridge T.J. (1988) The bacterial surface: General consideration towards design and function. *Can. J. Microbiol.* **34**, 363-372.
- Beveridge T.J., Hughes M.N., Lee H., Leung K.T., Poole R.K., Savvaidis I., Silver S., and Trevors J.T. (1997) Metal-microbe interactions: contemporary approaches. *Adv. Microbiol. Physiol.* **38**, 177-243.
- Borrok D., Fein J.B., Kulpa Ch.F. (2004) Proton and Cd adsorption onto natural consortia: testing universal adsorption behavior. *Geochim. Cosmochim. Acta* **68**, 3231-3238.
- Boyanov M.I., Kelly S.D., Kemner K.M., Bunker B.A., Fein J.B., Fowle D.A. (2003) Adsorption of cadmium to *Bacillus subtilis* bacterial cell walls: A pH-dependent X-ray

- absorption fine structure spectroscopy study. *Geochim. Cosmochim. Acta* **67**, 3299-3311.
- Brand L. E., Sunda W. G., and Guillard R. R. L. (1986) Reduction of marine phytoplankton reproduction rates by copper and cadmium. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **96**, 225-250.
- Cacaly S., Marechal C., Juillot F., Guyot F., Benedetti M. (2004) Zn isotopes fractionation upon sorption and precipitation. Abstracts of the 13th annual V.M. Goldschmidt Conference. June 5-11, Copenhagen, Denmark. Supplement to *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2004, **68/11S**, p. A366.
- Cox E.H., McLendon G.L., Morel F.M.M., Lane, T.W., Prince, R.C., Pickering, I.J., George, G.N. (2000) The active site structure of *Thalassiosira weissflogii* carbonic anhydrase 1. *Biochemistry*, **39**, 12128-12130.
- Criss R.E. (1999) *Principles of Stable Isotope Distribution*. Oxford University Press, Oxford
- Crist R.H., Oberholser K., Shank N. and Nguyen M. (1981) Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls. *Environ. Sci. Technol.* **15**, 1212-1217.
- Csogor Z., Melgar D., Schmidt K., and Posten C. (1999) Production and particle characterization of the frustules of *Cyclotella cryptica* in comparison with siliceous earth. *J. Biotechnol.* **70**, 71-75.
- Daughney C. J. and Fein J. B. (1998) The effect of ionic strength on the adsorption of  $H^+$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ , and  $Cu^{2+}$  by *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*: A surface complexation model. *J. Coll. Interface Sci.* **198**, 53-77.
- Daughney C.J., Fein J.B., and Yee N. (1998) A comparison of the thermodynamics of metal adsorption onto two common bacteria. *Chem. Geol.* **144**, 161-176.
- Daughney C.J., Fowle D.A., and Fortin D.E. (2001) The effect of growth phase on proton and metal adsorption by *Bacillus subtilis*. *Geochim. Cosmochim. Acta* **65**, 1025-1035.
- Delolme C., Hébrad-Labit C., Spadini L., Gaudet J.-P. (2004) Experimental study and

- modeling of the transfer of zinc in a low reactive sand column in the presence of acetate. *J. Contam. Hydrol.* **70**, 205-224.
- Dixit S.S., Smol J.P., Kingston J.C., Charles D.F. (1992) Diatoms: powerful indicators of environmental change. *Environ. Sci. Technol.* **26**, 23-33.
- Elwood M.J. and Hunter K.A. (1999) Determination of the Zn/Si ratio in diatom opal: a method for the separation, cleaning and dissolution of diatoms. *Marine Chem.* **66**, 149-160.
- Fein J. B., Daughney C. J., Yee N., and Davis T. A. (1997) A chemical equilibrium model for metal adsorption onto bacterial surfaces. *Geochim. Cosmochim. Acta* **61**, 3319-3328.
- Fein J.B., Martin A.M., Wightman P.G. (2001) Metal adsorption onto bacterial surfaces: Development of a predictive approach. *Geochim. Cosmochim. Acta* **65**, 4267-4273.
- Fisher, N.S., Jones, G.L., Nelson D.M. (1981) Effects of copper and zinc on growth, morphology and metabolism of *Asterionella japonica* (Cleve). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **51**, 37-56.
- Fisher N. S. (1986) On the reactivity of metals for marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* **31**, 443-449.
- Fisher N.S. and Fabris J.G. (1982) Complexation of Cu, Zn, and Cd by metabolites excreted from marine diatoms. *Marine Chem.* **11**, 245-255.
- Frausto da Silva, J.J., Williams, R.J.P. *The Biological Chemistry of the Elements*. Oxford Univ. Press, **2001**, pp. 315-339.
- Fowle D.A. and Fein J.B. (1999) Competitive adsorption of metal cations onto two gram positive bacteria: Testing the chemical equilibrium model. *Geochim. Cosmochim. Acta* **63**, 3059- 3067.
- Fowle D.A. and Fein J.B. (2000) Experimental measurements of the reversibility of metal-

- bacteria adsorption reactions. *Chem. Geol.* **168**, 27-36.
- Galy A., Pokrovsky O.S., Schott J. (2002) Ge-isotopic fractionation during its sorption on goethite: an experimental study. Abstracts of the VM Goldschmidt Conference. August 18-23, Davos, Switzerland. Supplement to *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2002, **66**, p. A259.
- Gélabert A., Pokrovsky O.S., Schott J., Boudou A., Feurtet-Mazel A., Mielczarski J., Mielczarski E., Mesmer-Dudons N., Spalla O. (2004) Study of diatoms/aqueous solution interface. I. Acid-base equilibria, surface charge and spectroscopic observation of freshwater and marine species. *Geochim. Cosmochim. Acta* **68**, 4039-4058.
- Genter R.B. (1996) Ecotoxicology of inorganic chemical stress to algae. In *Algal ecology of freshwater benthic ecosystems*, Aquatic Ecology series, Stevenson R.J., Bothwell M.L., Lowe R.L. Eds., 1996, Academic Press, Boston, pp. 404-468.
- Gold C., Feurtet-Mazel A., Coste M., and Boudou A. (2002). Field transfer of periphytic diatom communities to assess short-term structural effects of metals (Cd, Zn) in rivers. *Water Res.* **36**, 3654-3664.
- Gold C., Feurtet-Mazel A., Coste M., and Boudou A. (2003a) Effect of cadmium stress on periphytic diatom communities in indoor artificial streams. *Freshwater Biol.* **48**, 316-328.
- Gold, C., Feurtet-Mazel, A., Coste, M., Boudou, A. (2003b) Impacts of metals (Cd, Zn) on the development of periphytic diatom communities within outdoor artificial streams along a pollution gradient. *Arch. Environ. Toxicol.* **44**, 189-197.
- Goncalves M. L. S., Sigg L., Reutlinger M., and Stumm W. (1987) Metal ion binding by biological surfaces: voltametric assessment in the presence of bacteria. *Sci. Total Environ.* **60**, 105-119.
- Gonzalez-Davila M. (1995) The role of phytoplankton cell on the control of heavy metal concentrations in seawater. *Marine Chem.* **48**, 215-236.

- Gonzales-Davila M., Santana-Casiano J. M., and Laglera L. M. (2000) Copper adsorption in diatom cultures. *Marine Chem.* **70**, 161-170.
- Gonzales-Davila M., Santana-Casiano J. M., Perez-Pena J., and Millero F. J. (1995) Binding of Cu(II) to the surface and exudates of the alga *Dunaliella tertiolecta* in seawater. *Environ. Sci. Technol.* **29**, 289-301.
- Gunneriusson L. and Sjöberg S. (1993) Surface complexation in the H<sup>+</sup>-goethite ( $\alpha$ -FeOOH)-Hg (II) - chloride system. *J. Colloid Interface Sci.* **156**, 121-128.
- Haas J.R., Dichristina T.J. and Wade R., Jr. (2001) Thermodynamics of U(VI) sorption onto *Shewanella putrefaciens*. *Chem. Geol.* **180**, 33-54.
- Hecky R.E., Mopper K., Kilham P., and Degens E.T. (1973) The amino acid and sugar composition of diatom cell-walls. *Marine Biol.* **19**, 323-331.
- Herbelin A.L. and Westall J.C. (1996) FITEQL version 3.2, a computer program for determination of chemical equilibrium constants from experimental data. Department of Chemistry, Oregon State University. Corvallis, Oregon 97331.
- Iller R.K. (1979) The Chemistry of Silica. Wiley, New York, p. 665.
- Ivorra N., Bremer S., Guasch H., Kraak M.H.S., Admiraal W. (2000) Differences in the sensitivity of benthic microalgae to Zn and Cd regarding biofilm development and exposure history. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**, 1332-1339.
- Jensen A., Rystad B., Melsom S. (1974) Heavy-metal tolerance of marine phytoplankton. 1. Tolerance of 3 algal species to zinc in coastal sea-water. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **15**, 145- 157.
- Jensen T.E., Baxter M., Rachlin, W., Jani, V. (1982) Uptake of heavy metals by *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae) into cellular components, especially polyphosphate bodies: an X-ray energy dispersive study. *Environ. Pollut. Ser. A*, **27**, 119-127.

- Johnson C.M., Beard B.L., Albarede F. (2004) *Geochemistry of Non-Traditional Stable Isotopes*, Min. Soc. Amer. Vol. 55.
- Kiefer E., Sigg L., and Schosseler P. (1997) Chemical and spectroscopic characterization of algae surfaces. *Environ. Sci. Technol.* **31**, 759-764.
- Klimmek S., Stan H.-J., Wilke A., Bunke G., Buchholz R. (2001) Comparative analysis of the biosorption of cadmium, lead, nickel, and zinc by algae. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 4283- 4288.
- Kola H. and Wilkinson K.J. (2005) Cadmium uptake by a green alga can be predicted by equilibrium modeling. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 3040-3047.
- Kotrba P., Macek T., Ruml T. (1999) Heavy metal-binding peptides and proteins in plants. A review. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **64**, 1057-1086.
- Lemarchand E., Schott J. and Gaillardet J. (2005) Boron isotopic fractionation related to boron sorption on humic acid and the structure of surface complexes formed. *Geochim. Cosmochim. Acta*, in press.
- Lützenkirchen J. (1999) The constant capacitance model and variable ionic strength: an evaluation of possible applications and applicability. *J. Coll. Interface Sci.* **217**, 8-18.
- Maréchal C.N., and Albarède F. (2002) Ion-exchange fractionation of copper and zinc isotopes. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **66**, 1499-1509.
- Maréchal C.N., Telouk P., Albarède F. (1999) Precise analysis of copper and zinc isotopic compositions by plasma-source mass spectrometry. *Chem. Geol.* **156**, 251-273.
- Martell A.E., Smith R.M., Motekaitis R.J. (1997) NIST Critically selected stability constants of metal complexes. Database software Version 3.0. Texas A & M University, College Station, TX .
- Mirimanoff N., Wilkinson K.J. (2000) Regulation of Zn accumulation by a freshwater gram-

- positive bacterium (*Rhodococcus opacus*). *Environ. Sci. Technol.* **34**, 616-622.
- Morel F. M. M., Hudson R. J. M., and Price N. M. (1991) Limitation of productivity by trace metals in the sea. *Limnol. Oceanogr.* **36**, 1742-1755.
- Morel F.M.M., Reinfelder J.R., Roberts S.B., Chamberlan C.P., Lee J.G., and Yee D. (1994) Zinc and carbon colimitation of marine phytoplankton. *Nature* **269**, 740- 742.
- Ngwenya B.T., Sutherland I.W. and Kennedy L. (2003) Comparison of the acid-base behaviour and metal adsorption characteristics of a gram-negative bacterium with other strains. *Appl. Geochem.* **18**, 527-538.
- Pichat S., Douchet C., Albarède F. (2003) Zinc isotope variations in deep-sea carbonates from the eastern equatorial Pacific over the last 175 ka. *Earth Planet. Sci. Lett.* **210**, 167-178.
- Plette A. C. C., Benedetti M. F., and van Riemsdijk W. H. (1996) Competitive binding of protons, calcium, cadmium, and zinc to isolated cell walls of a gram-positive soil bacterium. *Environ. Sci. Technol.* **30**, 1902-1910.
- Pokrovsky O.S., Pokrovski G.S., Gélabert A., Schott J., Boudou A. (2005a) Speciation of Zn associated with diatoms using X-ray Absorption Spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* in press.
- Pokrovsky O.S., Viers J., Freydisier R. (2005b) Zinc stable isotope fractionation during its adsorption on oxides and hydroxides. *J. Colloid Interface Sci.* in press.
- Pun K.C., Cheung R.Y.H. and Wong M.H. (1995) Characterization of sewage sludge and toxicity evaluation with microalgae. *Mar. Poll. Bull.* **31**, 394-401.
- Rijstenbil J.W. and Gerringa L.J.A. (2002) Interactions of algal ligands, metal complexation and availability, and cell responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a gradual increase in copper. *Aquatic Toxicol.* **56**, 115-131.
- Rijstenbil J.W., Sandee A., Van Drie J., and Wijnholds J.A. (1994) Interaction of toxic trace

- metals and mechanisms of detoxification in the planctonic diatoms *Ditylum brightwellii* and *Thalassiosira pseudonana*. *FEMS Microbiol. Rev.* **14**, 387-396.
- Rouseset D., Henderson G.M. and Shaw S. (2004) Cu and Zn isotope fractionation during sorption experiments. Abstracts of the 13th annual V.M. Goldschmidt Conference. June 5- 11, Copenhagen, Denmark. Supplement to *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2004, **68/11S**, p. A360.
- Santana-Casiano J.M., Gonzalez-Davila M., Perez-Pena J. and Millero F. (1995) Pb<sup>2+</sup> interactions with marine phytoplankton *Dunaliella tertiolecta*. *Marine Chem.* **48**, 115-129.
- Santana-Casiano J.M., Gonzalez-Davila M., Laglera L.M., Pérez-Pena J., Brand L., Millero F.J. (1997) The influence of zinc, aluminum and cadmium on the uptake kinetics of iron by algae. *Marine Chem.* **59**, 95-111.
- Schiewer S. and Volesky B. (1995) Modeling of the proton-metal ion exchange in biosorption. *Environ. Sci. Technol.* **29**, 3049-3058.
- Schmitt D., Muller A., Csogor Z., Frimmel F.H., and Posten C. (2001) The adsorption kinetics of metal ions onto different microalgae and siliceous earth. *Water Res.* **35**, 779-785.
- Slaveykova V.I., Wilkinson K.J. (2002) Physicochemical aspects of lead bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 969-975.
- Smiejan A., Wilkinson K.J., Rossier C. (2003) Cd bioaccumulation by a freshwater bacterium, *Rhodospirillum rubrum*. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 701-706.
- Stauber, J.L., Florence, T.M. (1990) Mechanism of toxicity of zinc to the marine diatom *Nitzschia closterium*. *Marine Biol.* **105**, 519-524.
- Sunda, W.G., Huntsman, S.A. (1992) Feedback interactions between zinc and phytoplankton in seawater. *Limnol. Oceanogr.* **37**, 25-40.

- Sunda W. G. and Huntsman S. A. (1998) Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: Phytoplankton as model systems. *Sci. Total Environ.* **219**, 165-181.
- Sverjensky D. and Sahai N. (1996) Theoretical prediction of single-site surface-protonation equilibrium constants for oxides and silicates in water. *Geochim. Cosmochim. Acta* **60**, 3773-3797.
- Tien C.-J. (2004) Some aspects of water quality in a polluted lowland river in relation to the intracellular chemical levels in planktonic and epilithic diatoms. *Water Res.* **38**, 1779-1790.
- Vallee B.L., Auld D.S. (1990) Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry*, **29**, 5647-5659.
- Viers J., Oliva P., Freydier R., and Dupre B. (2004) The use of Zn isotopes to constrain the biogeochemical cycling of metals in watersheds. *Geochim. Cosmochim. Acta Suppl.* **68**, N 11S, A413.
- Volesky B. and Holan Z.R. (1995) Biosorption of heavy metals. *Biotechnol. Prog.* **11**, 235-250.
- Vrieling E.G., Beelen T.P.M., van Santen R.A., and Gieskes W.W.C. (2000) Nanoscale uniformity of pore architecture in diatomaceous silica: a combined small and wide angle X-ray scattering study. *J. Phycol.* **36**, 146-159.
- Wang W.-X. and Dei R.C.H. (2001a) Effects of major nutrient additions on metal uptake in phytoplankton. *Environ. Pollution* **111**, 233-240. Wang W.-X. and Dei R.C.H. (2001b) Metal uptake in a coastal diatom influenced by major nutrients (N, P, and Si). *Water Res.* **35**, 315-321.
- Webb, S.M., Gaillard, J.-F., Jackson, B.E., Stahl, D.A. (2001) An EXAFS study of zinc coordination in microbial cells. *J. Synchrotron Rad.* **8**, 943-945.

Westall J.C., Jones J.D., Gary D. Turner G.D., John M. Zachara J.M. (1995) Models for association of metal ions with heterogeneous environmental sorbents. 1. Complexation of Co(II) by leonardite humic acid as a function of pH and NaClO<sub>4</sub> concentration. *Environ. Sci. Technol.* **29**, 951-959.

Xue H.-B., Stumm W. and Sigg L. (1988) The binding of heavy metals to algal surfaces. *Water Res.* **22**, 917-926.

Yee N. and Fein J. (2001) Cd adsorption onto bacterial surfaces: A universal adsorption edge? *Geochim. Cosmochim. Acta* **65**, 2037-2042.

**Table 1.** Summary of adsorption experiments. Cell concentration is in g humid/L unless indicated.

Exp. No	Species	Number of Data points	cell conc., g humid/L	[Zn] <sub>0</sub> , mg/L	pH	Electrolyte
Langmurian adsorption isotherm						
36	SC	14	8.5	0 - 4	7.50±0.02	0.1 M NaNO <sub>3</sub>
47	SC	20	8.5	0 - 12	7.15±0.02	0.1 M NaCl
103	SC	40	8.5	0 - 29	7.2±0.1	0.01 M NaCl
107	SC	27	36	0 - 48	7.3±0.1	0.1 M NaCl
70	TW	32	35	0 - 11	7.60±0.01	0.1 M NaCl
33	AMIN	10	8.6	0 - 2.7	9.2±0.6	0.1 M NaNO <sub>3</sub>
34	AMIN	11	8.3	0 - 8	7.50±0.02	0.1 M NaNO <sub>3</sub>
63	AMIN	20	8.4	0 - 37	7.49±0.02	0.1 M NaNO <sub>3</sub>
69	AMIN	26	8.5	0 - 3.7	7.50±0.02	0.1 M NaNO <sub>3</sub>
71	AMIN	19	25	0 - 23.5	6.16±0.02	0.1 M NaNO <sub>3</sub>
99a	AMIN	16	17	0 - 15	7.2±0.1	0.01 M NaNO <sub>3</sub>
99b	AMIN	16	17	0 - 15	7.2±0.1	0.01 M NaNO <sub>3</sub>
48	NMIN	19	8.5	0 - 20.4	7.05±0.02	0.1 M NaNO <sub>3</sub>
75	NMIN	32	8.5	0 - 32	6.20±0.02	0.1 M NaNO <sub>3</sub>
76	NMIN	31	8.5	0 - 13.5	8.15±0.10	0.1 M NaNO <sub>3</sub>
IS-19	NMIN	8	33	0 - 2.3	7.65±0.05	Danta Media
108	frust. SC	27	Equiv. 36 g/L	0 - 53	7.10±0.05	0.1 M NaCl
78	frust. TW	32	Equiv. 35 g/L	0 - 17	7.48±0.01	0.1 M NaCl
77	frust. AMIN	19	Equiv. 25 g/L	0 - 31	6.16±0.02	0.1 M NaNO <sub>3</sub>
40	SiO <sub>2</sub> am.	14	4 g dry/L	0 - 5	6.70±0.02	0.01 M NaCl
83	SiO <sub>2</sub> am.	30	4 g dry/L	0 - 27	6.6±0.1	0.01 M NaCl
pH –dependent adsorption edge						
35-46	SC	28	8.5	3.3	2.8 - 9.3	0.1 M NaNO <sub>3</sub>
59	SC	26	8.5	3.3	1.7 - 8.9	0.01 M NaNO <sub>3</sub>
72	SC	30	8.5	3.3	2.2 - 8.8	1 M NaNO <sub>3</sub>
81	SC	29	8.5	0.8	1.6 - 9.2	0.1 M NaCl
118b	SC	20	17	1	2.7 - 9.4	0.1 M NaCl
119b	SC	16	17	1	3.0 - 6.2	0.1 M NaCl
42-44	TW	29	8.5	3.3	3.4 - 10.5	0.1 M NaCl
51	TW	20	36	4	2.8 - 10.3	0.1 M NaCl
73	TW	25	70	0.6	3.4 - 11.3	0.1 M NaCl
79	TW	38	36	3.3	2.3 - 10.3	0.01 M NaCl
80	TW	26	36	3.3	3.9 - 8.6	1 M NaCl
30	AMIN	20	8.5	10	2.0 - 11.2	0.1 M NaCl
31	AMIN	20	35	10	2.3 - 11.3	0.1 M NaCl
32	AMIN	18	8.5	3.3	3.3 - 10.4	0.1 M NaNO <sub>3</sub>
64	AMIN	24	8.4	3.3	2.8 - 10.3	0.001 M NaNO <sub>3</sub>
65	AMIN	30	8.5	3.3	2.8 - 9.6	0.01 M NaNO <sub>3</sub>
66	AMIN	30	8.5	3.3	2.8 - 10.0	1 M NaNO <sub>3</sub>
67a	AMIN	18	8.5	3.3	3.2 - 10.5	0.1 M NaNO <sub>3</sub>
67b	AMIN	20	8.5	3.3	3.2 - 10.7	0.1 M NaNO <sub>3</sub>
67c	AMIN	18	8.5	3.3	3.1 - 9.7	0.1 M NaNO <sub>3</sub>
68	AMIN	22	8.5	0.7	2.7 - 10.1	0.01 M NaNO <sub>3</sub>
49	NMIN	20	8.5	3.3	4.0 - 10.1	0.001 M NaNO <sub>3</sub>
50	NMIN	30	8.5	3.3	3.9 - 9.7	0.1 M NaNO <sub>3</sub>
61	NMIN	26	8.5	3.3	2.6 - 10.1	0.01 M NaNO <sub>3</sub>
109a/b	NMIN	22	8.5	3.5	3.0 - 9.6	0.1 M NaCl
118	NMIN	20	8.5	3.3	3.1 - 8.8	1 M NaNO <sub>3</sub>
52	frust. TW	18	Equiv. 36 g/L	4	2.8 - 10.6	0.1 M NaCl
74	frust. TW	25	Equiv. 70 g/L	0.58	3.6 - 10.0	0.1 M NaCl
37	frust. AMIN	33	Equiv. 35 g/L	10	2.6 - 9.4	0.1 M NaCl
39	SiO <sub>2</sub> am.	10	4 g dry/L	4	3.0 - 8.7	0.01 M NaCl

Table 2. Summary of SCM parameters for Zn – diatom surface interaction. ND means non determined.

Exp. No.	Species	Electrolyte	>COOH pK <sub>a1</sub>	>NH <sub>2</sub> pK <sub>a3</sub>	>SiOH pK <sub>a2</sub>	log K <sub>COOZn</sub>	log K <sub>SiOZn</sub>	log K <sub>COONa</sub>	[>COOH] (mol/g <sub>humid</sub> )	[>NH <sub>3</sub> ] (mol/g <sub>humid</sub> )	[>SiOH] mol/g <sub>humid</sub>	C, F/g	V(Y)
36	SC	0.1 M NaNO <sub>3</sub>	-4.80	8.10	ND	5.15	ND	0.30	1.15E-04	1.96E-04	ND	25	32
47	SC	0.1 M NaCl	-4.80	8.20	ND	5.30	ND	0.20	1.13E-04	1.53E-04	ND	62	29
103	SC	0.01 M NaCl	-4.80	8.10	ND	5.54	ND	0.30	1.79E-04	1.96E-06	ND	75	89
107	SC	0.1 M NaCl	-4.80	8.20	ND	5.36	ND	0.30	7.58E-05	1.96E-04	ND	155	124
70	TW	0.1 M NaCl	-4.90	9.70	-7.00	4.61	2.80	0.41	2.40E-05	2.55E-05	1.94E-06	6	2.2
33	AMIN	0.1 M NaNO <sub>3</sub>	-4.80	9.70	-7.10	4.32	3.20	0.50	2.94E-05	2.40E-05	1.40E-05	37	80
34	AMIN	0.1 M NaNO <sub>3</sub>	-4.80	9.80	-7.10	4.23	3.20	0.32	2.95E-05	2.41E-05	7.47E-06	31	5.0
63	AMIN	0.1 M NaNO <sub>3</sub>	-4.80	9.8	-7.10	4.22	3.20	0.80	2.94E-05	2.40E-05	1.65E-05	38	21
69	AMIN	0.1 M NaNO <sub>3</sub>	-4.80	9.80	-7.10	4.24	3.20	0.56	2.82E-05	2.81E-05	1.03E-05	25	0.9
71	AMIN	0.1 M NaNO <sub>3</sub>	-4.80	9.80	-7.10	4.24	3.20	0.65	2.60E-05	2.81E-05	1.03E-05	25	70
99a	AMIN	0.01 M NaNO <sub>3</sub>	-4.80	10.20	-7.00	4.28	3.20	1.00	2.24E-05	2.41E-05	1.86E-05	35	3.4
99b	AMIN	0.01 M NaNO <sub>3</sub>	-4.80	10.20	-7.00	4.26	3.20	1.00	2.24E-05	2.41E-05	1.86E-05	35	3.4
48	NMIN	0.1 M NaNO <sub>3</sub>	-4.80	8.40	-6.60	5.04	3.00	0.32	4.11E-05	4.20E-05	1.60E-05	50	7.3
75	NMIN	0.1 M NaNO <sub>3</sub>	-4.80	8.40	-6.60	5.05	3.00	1.25	3.71E-05	4.40E-05	1.00E-05	12	1.0
76	NMIN	0.1 M NaNO <sub>3</sub>	-4.80	8.50	-6.60	5.00	3.00	1.25	4.11E-05	4.20E-05	1.60E-05	87	39
108	SC frustules	0.1 M NaCl	ND	ND	-7.00	ND	3.2	ND	ND	ND	1.06E-03	840	9.6
78	TW frustules	0.1 M NaCl	ND	ND	-7.00	ND	2.80	ND	ND	ND	1.33E-03	404	7.2
77	AMIN frustules	0.1 M NaNO <sub>3</sub>	ND	ND	-7.10	ND	3.2	ND	ND	ND	4.32E-04	70	2.5

Langmuir adsorption isotherm

Table 2, continued.

Exp. No.	Species	Electrolyte	>COOH $pK_{a1}$	>NH <sub>2</sub> $pK_{a3}$	>SiOH $pK_{a2}$	$\log K_{COOZn}$	$\log K_{SiOZn}$	$\log K_{COONa}$	[>COOH] (mol/g <sub>humid</sub> )	[>NH <sub>3</sub> ] (mol/g <sub>humid</sub> )	[>SiOH] (mol/g <sub>humid</sub> )	C, F/g	V(V)
pH-dependent adsorption edge													
35-46	SC	0.1 M NaNO <sub>3</sub>	-4.80	8.20	ND	5.32	ND	0.20	1.59E-04	1.96E-04	ND	47	1.7
59	SC	0.01 M NaNO <sub>3</sub>	-4.80	8.00	ND	5.20	ND	0.20	1.58E-04	1.96E-04	ND	50	1.5
72	SC	1 M NaNO <sub>3</sub>	-4.80	8.20	ND	5.33	ND	0.20	1.53E-04	1.96E-04	ND	37	1.1
81	SC	0.1 M NaCl	-4.80	8.20	ND	5.32	ND	0.20	1.35E-04	1.97E-04	ND	40	0.7
51	TW	0.1 M NaCl	-4.90	9.70	-7.00	4.78	2.80	0.20	2.32E-05	2.56E-05	1.28E-06	3	2.7
73	TW	0.1 M NaCl	-4.90	9.70	-7.00	4.60	2.80	0.41	2.40E-05	2.50E-05	4.06E-06	2	0.1
79	TW	0.01 M NaCl	-4.90	9.70	-7.40	4.77	2.80	0.21	2.40E-05	2.50E-05	4.06E-06	3	0.8
80	TW	1 M NaCl	-5.05	9.80	-7.20	4.72	2.80	< 0 (ND)	2.40E-05	2.50E-05	4.06E-06	12	5.0
30	AMIN	0.1 M NaCl	-4.80	9.70	-7.10	4.26	3.20	0.32	2.94E-05	3.21E-05	1.87E-05	25	2.0
31	AMIN	0.1 M NaCl	-4.80	9.70	-7.10	4.26	3.20	0.32	2.94E-05	3.09E-05	1.87E-05	18	1.5
32	AMIN	0.1 M NaNO <sub>3</sub>	-4.80	9.70	-7.10	4.24	3.20	0.32	2.94E-05	3.07E-05	1.87E-05	17	4.4
64	AMIN	0.001 M NaNO <sub>3</sub>	-4.80	9.80	-7.00	4.23	3.20	0.87	2.94E-05	2.42E-05	1.87E-05	25	0.8
65	AMIN	0.01 M NaNO <sub>3</sub>	-4.80	10.20	-7.00	4.26	3.20	1.00	2.95E-05	2.98E-05	1.87E-05	35	2.0
66	AMIN	1 M NaNO <sub>3</sub>	-4.80	8.30	-7.00	4.31	3.20	0.32	2.94E-05	2.40E-05	1.87E-05	5	1.8
68	AMIN	0.01 M NaNO <sub>3</sub>	-4.80	10.20	-7.00	4.29	3.20	1.00	2.74E-05	2.55E-05	1.87E-05	30	3.8
49	NMIN	0.001 M NaNO <sub>3</sub>	-4.80	8.70	-6.66	5.01	3.00	1.09	4.11E-05	4.20E-05	1.60E-05	17	8.1
50	NMIN	0.1 M NaNO <sub>3</sub>	-4.80	8.40	-6.60	5.07	3.00	0.32	4.11E-05	4.20E-05	1.60E-05	12	6.9
61	NMIN	0.01 M NaNO <sub>3</sub>	-4.80	10.00	-6.90	5.00	3.00	0.37	3.87E-05	4.20E-05	1.60E-05	10	3.3
109a/b	NMIN	0.1 M NaCl	-4.80	8.40	-6.60	5.00	3.00	0.94	3.71E-05	4.40E-05	1.00E-05	12	1.8
118	NMIN	1 M NaNO <sub>3</sub>	-4.80	8.40	-6.60	5.07	3.00	0.32	3.71E-05	4.36E-05	1.00E-05	7	4.8
74	TW frustules	0.1 M NaCl	ND	ND	-7	ND	2.79	ND	ND	ND	ND	404	0.2
37	AMIN frustules	0.1 M NaCl	ND	ND	-7.1	ND	3.21	ND	ND	ND	4.32E-04	70	5.2

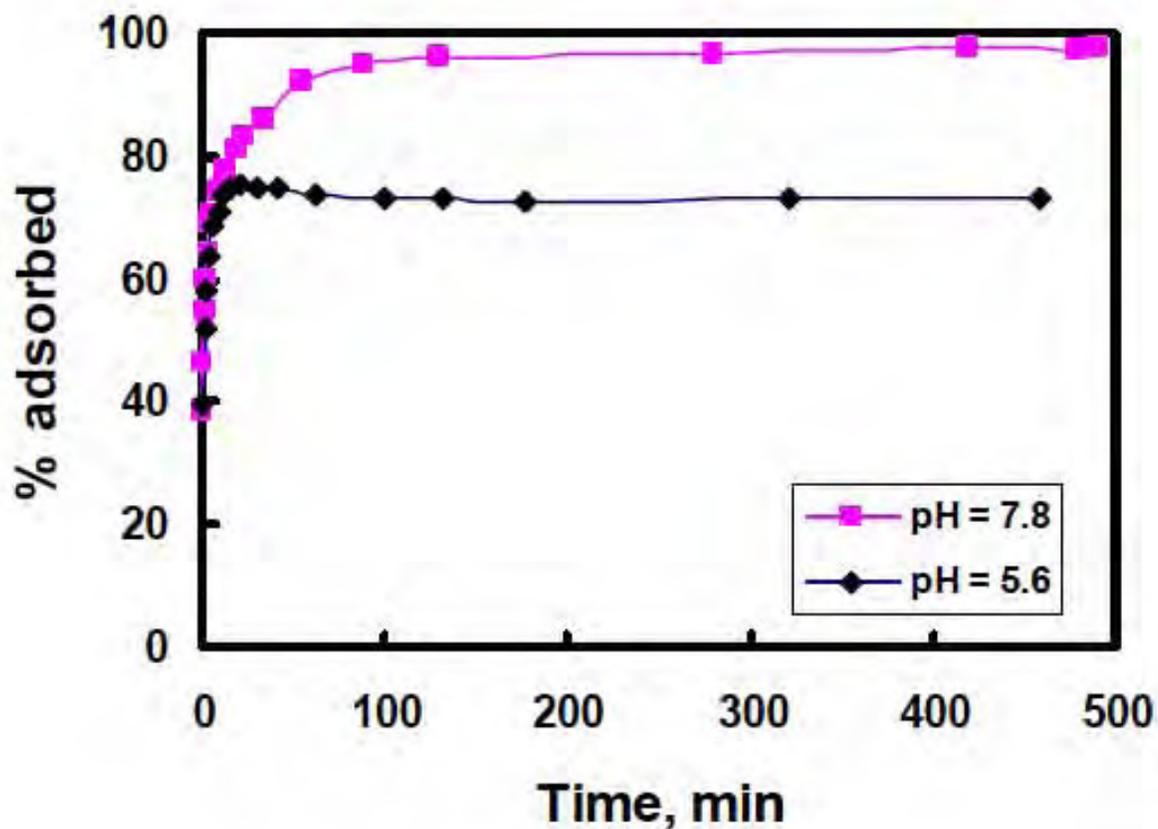
**Table 3.** Average recommended parameters of constant capacitance, surface complexation model used to describe Zn-diatoms interactions in aqueous solutions at 25°C.

Species	$\log K_5$ (>R-COOZn <sup>+</sup> )	$\log K_6$ (>SiO-Zn <sup>+</sup> )	$\log K_7$ (>R-COONa <sup>0</sup> )	[>COOH] ( $\mu\text{mol/g humid}$ )	EDL capacitance, F/g
<i>Skeletonema c.</i> (SC)	5.32 ± 0.12	N.D.	0.24 ± 0.05	136 ± 34	61 ± 41
<i>Thalassiosira w.</i> (TW)	4.70 ± 0.09	2.8 ± 0.1	0.25 ± 0.15	24 ± 0.4	5.0 ± 4.1
<i>Achnanthisdium m.</i> (AMIN)	4.26 ± 0.03	3.2 ± 0.1	0.6 ± 0.3	28 ± 3	27 ± 9
<i>Navicula m.</i> (NMIN)	5.03 ± 0.03	3.0 ± 0.1	0.8 ± 0.4	39 ± 2	26 ± 28

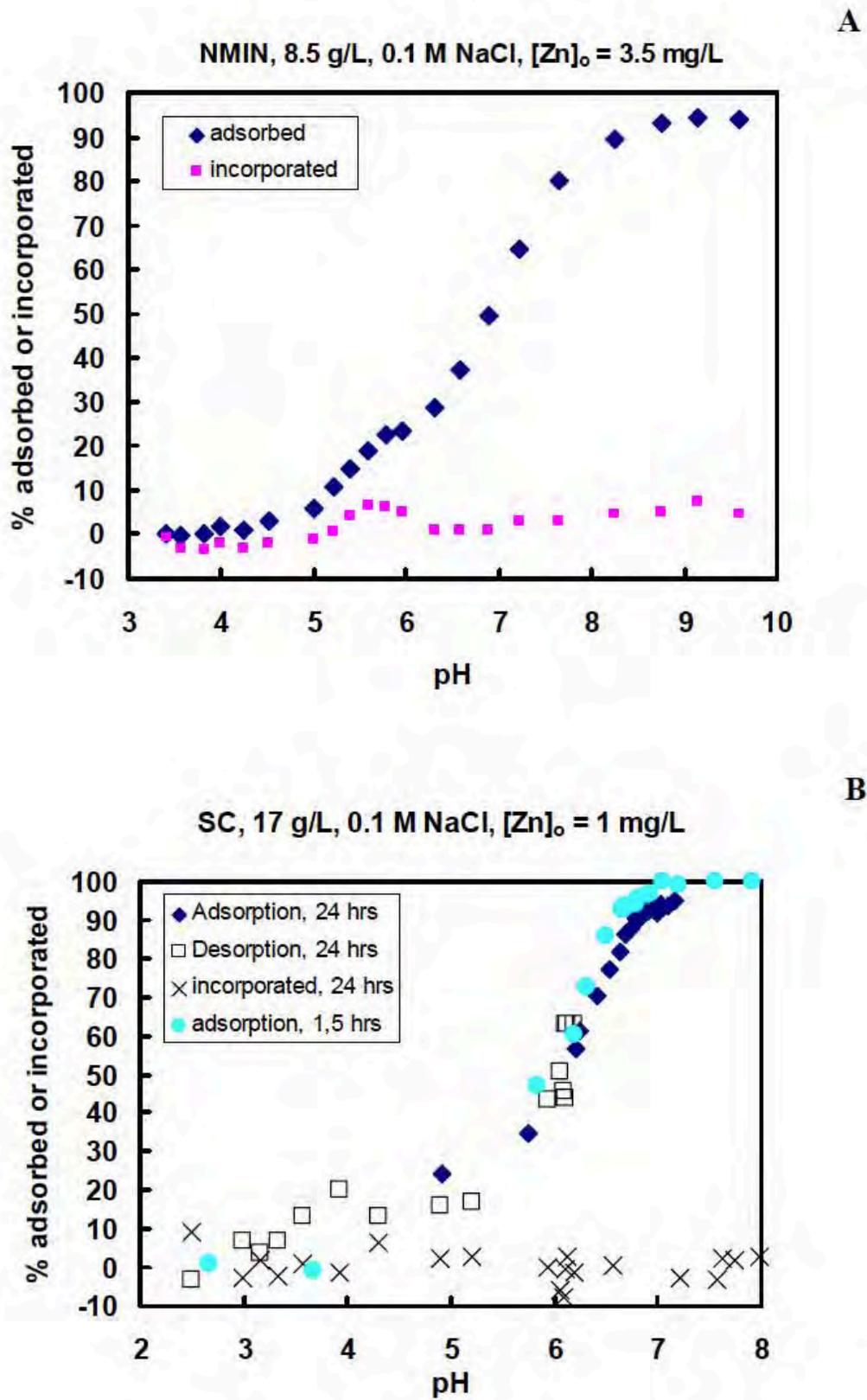
**Table 4.** Results of stable isotopic fractionation. In the initial Zn salt  $\delta^{66}\text{Zn}_{\text{initial}} = 0.12 \pm 0.05\%$ . Uncertainty on  $\delta^{66}\text{Zn}$  is 0.05‰ unless indicated.

Sample description	Duration of exposure	pH	[Zn] <sub>aq</sub> mg/L	[DOC] mg/L	% Zn adsorbed	$\delta^{66}\text{Zn}_{\text{aq}}$ ‰	$\delta^{66}\text{Zn}_{\text{solid}}$ ‰	$\Delta^{66/64}\text{Zn}_{\text{solid/solution}}$ ‰
<b>(1) Long-term uptake in growing cells (20°C, under light)</b>								
AMIN	3 weeks	7.75±0.25	0.02±0.003	8.0	N.D.	0.12	0.31	0.19
NMIN	3 weeks	7.75±0.25	0.02±0.003	8.0	N.D.	0.12	0.33	0.21
TW	3 weeks	7.75±0.25	0.02±0.003	10.0	N.D.	0.12	0.39	0.27
SC	4 weeks	7.95±0.25	0.02±0.003	15.0	N.D.	0.12	0.20	0.08
<b>(2) Short-term adsorption on growing cells from culture media (20°C, under light)</b>								
NMIN N 7	3.5 hrs	8.14	0.165	3.9	67	-0.19±0.1	0.27	0.47
NMIN N 5	16 hrs	8.03	0.304	2.9	74	-0.10±0.1	0.23	0.33
NMIN N 6	42 hrs	7.64	0.395	3.1	67	-0.25±0.1	0.25	0.50
AMIN N 3	20 min	7.85	0.09	3.5	70	-0.08±0.1	0.21	0.29
AMIN N 2	19 hrs	7.80	0.325	3.1	73	-0.06±0.1	0.19	0.24
<b>(3) Reversible adsorption on frustules (SiO<sub>2</sub>·nH<sub>2</sub>O) of NMIN in 0.01 M NaNO<sub>3</sub> (25°C, in the dark)</b>								
NF - 18	20 hrs	5.37	1.28	<0.2	15	0.084	0.33	0.25
NF - 19	20 hrs	5.43	1.11	<0.2	26	0.052	0.31	0.26
NF - 20	20 hrs	5.57	0.91	<0.2	39	-0.038	0.36	0.40
NF - 9	20 hrs	5.62	0.35	<0.2	73	-0.206	0.24	0.48

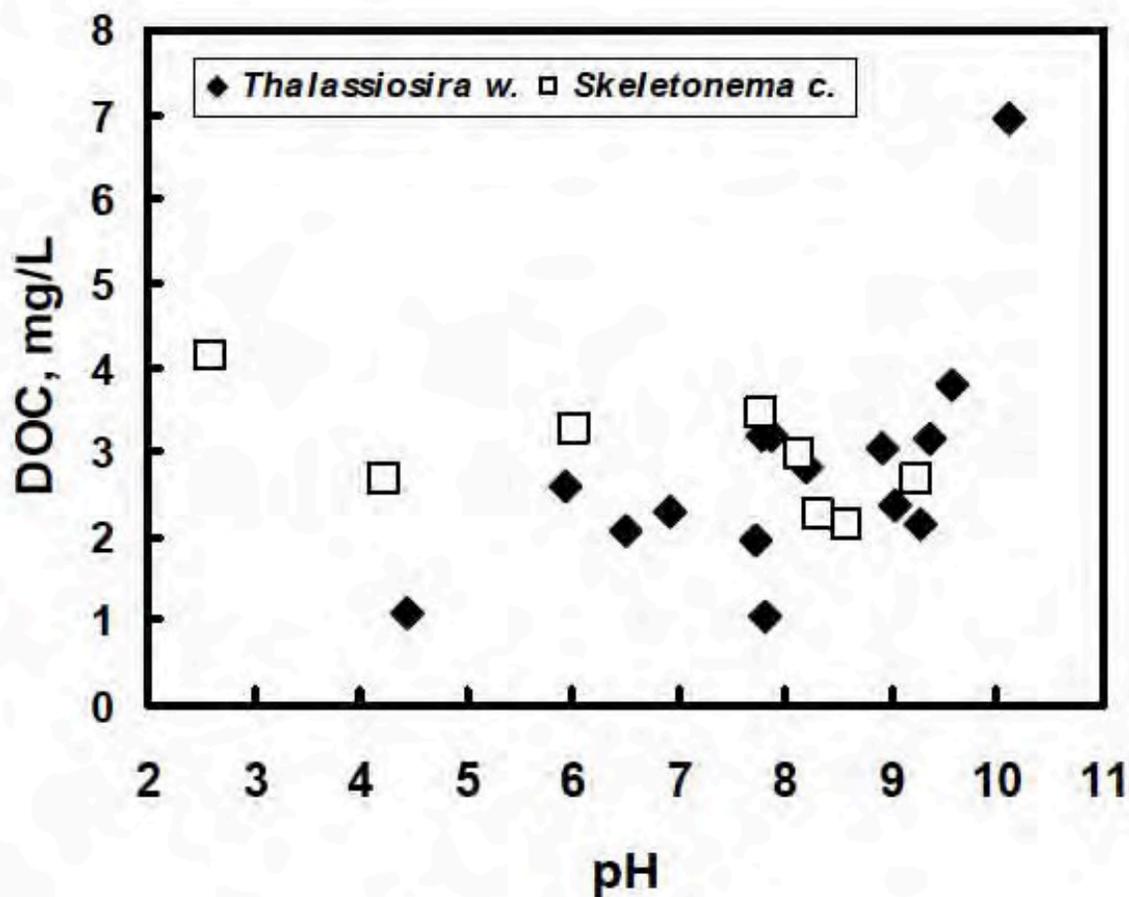
## FIGURES



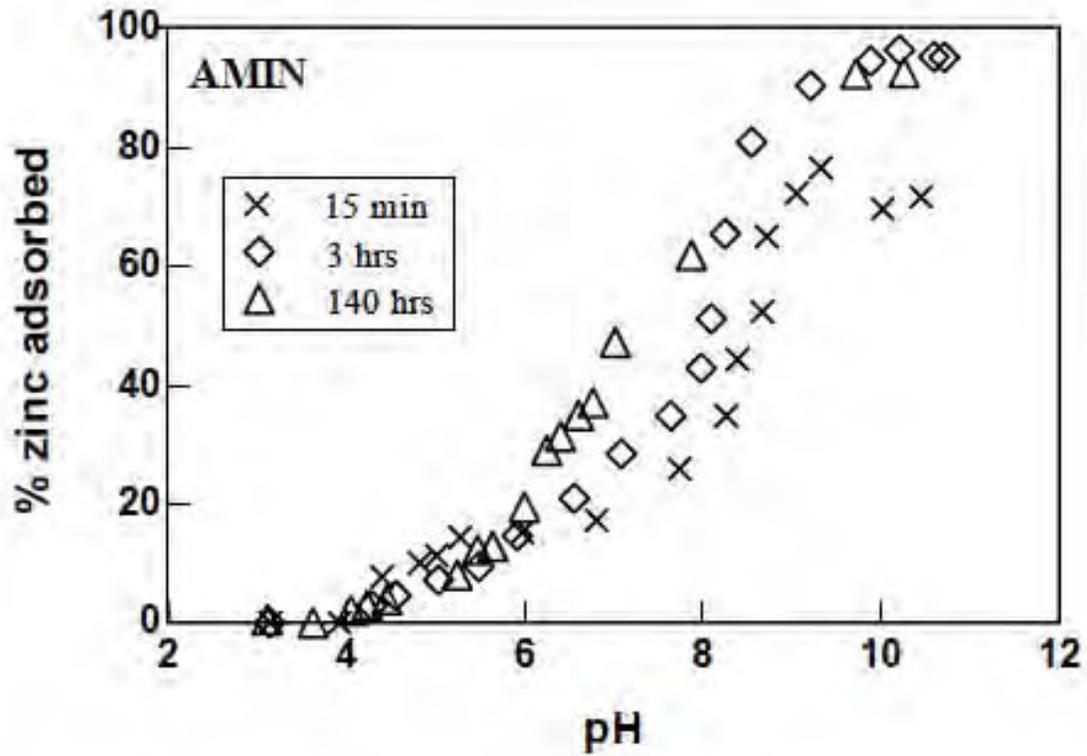
**Figure 1.** Kinetics of zinc adsorption on *Navicula minima* species. Experimental conditions: 0.001 M NaNO<sub>3</sub>; biomass concentration equals 8.5 g humid/L; [Zn]<sub>0</sub> = 4 mg/L; continuous shaking at 25°C in the dark.



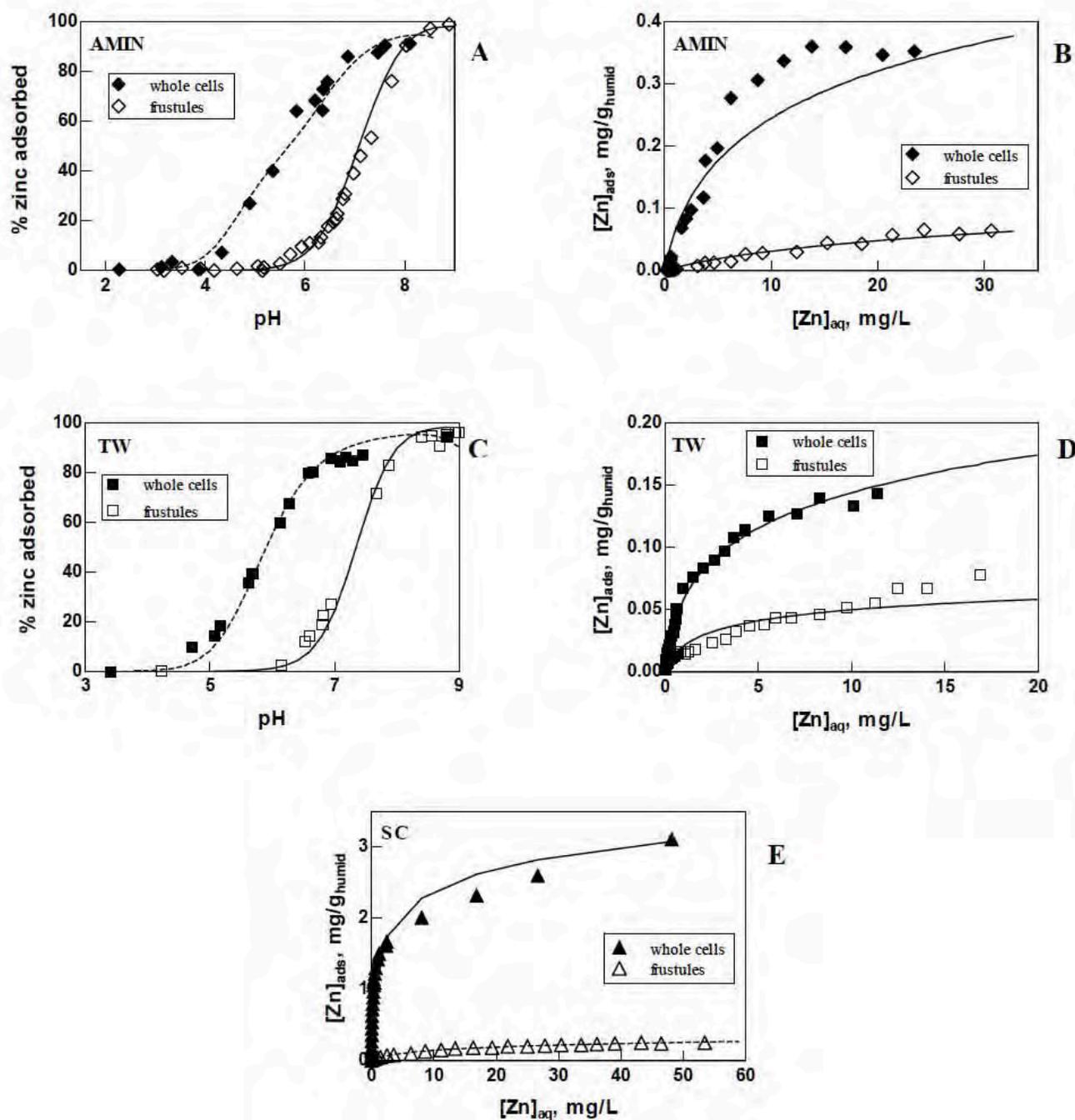
**Figure 2.** Reversibility of adsorption equilibria: percentage of adsorbed or incorporated zinc as a function of pH for *Navicula minima* (A) and *Skeletonema costatum* (B).



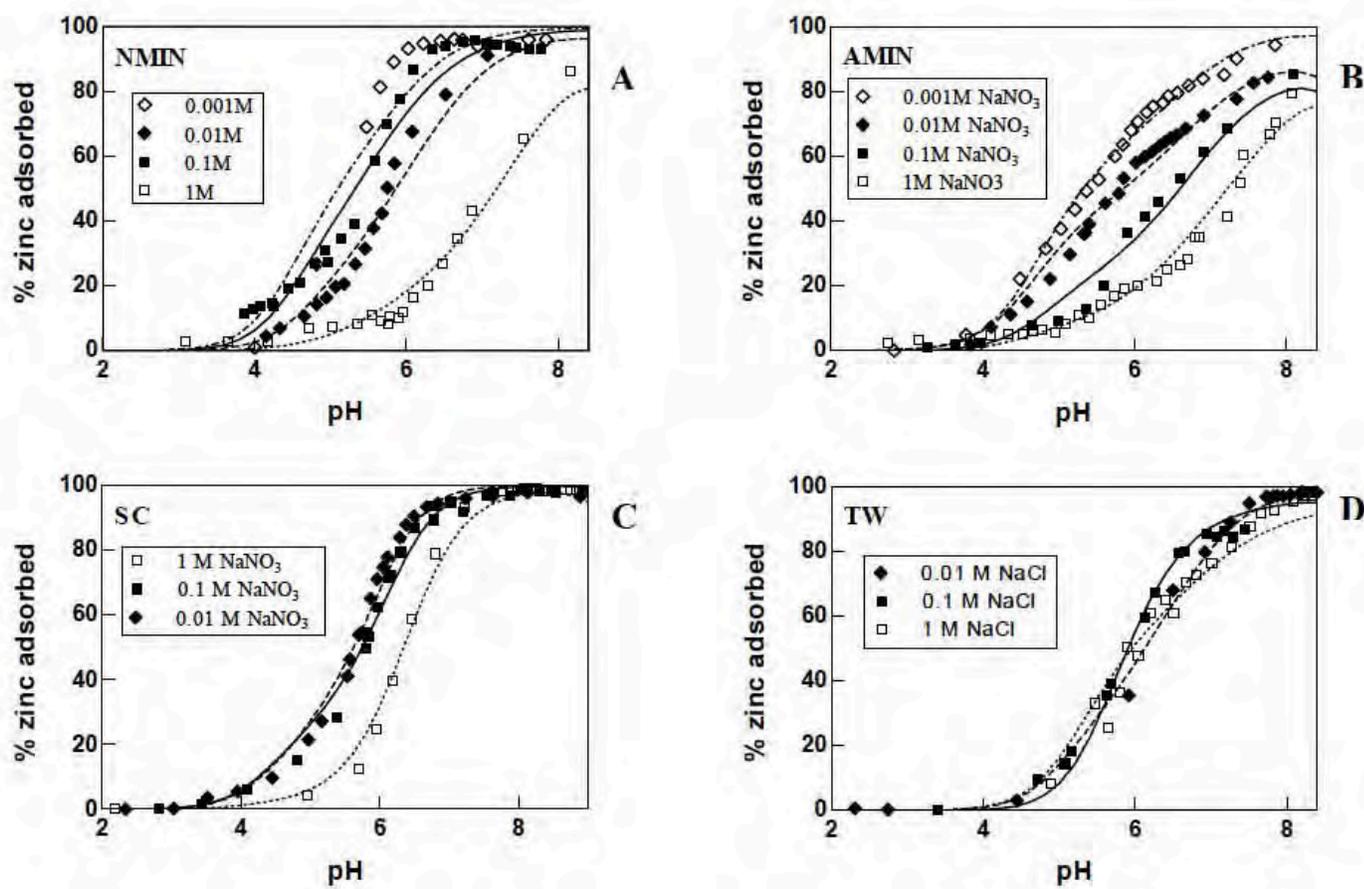
**Figure 3.** Dissolved Organic Carbon (DOC) concentration as a function of pH during Zn adsorption experiments. Experimental conditions: biomass concentration equals 36 g/L (TW) and 8.5 g/L (SC); 0.1 M NaCl;  $[Zn]_0 = 3.3$  mg/L. Exposure time equals 3 hr in the dark.



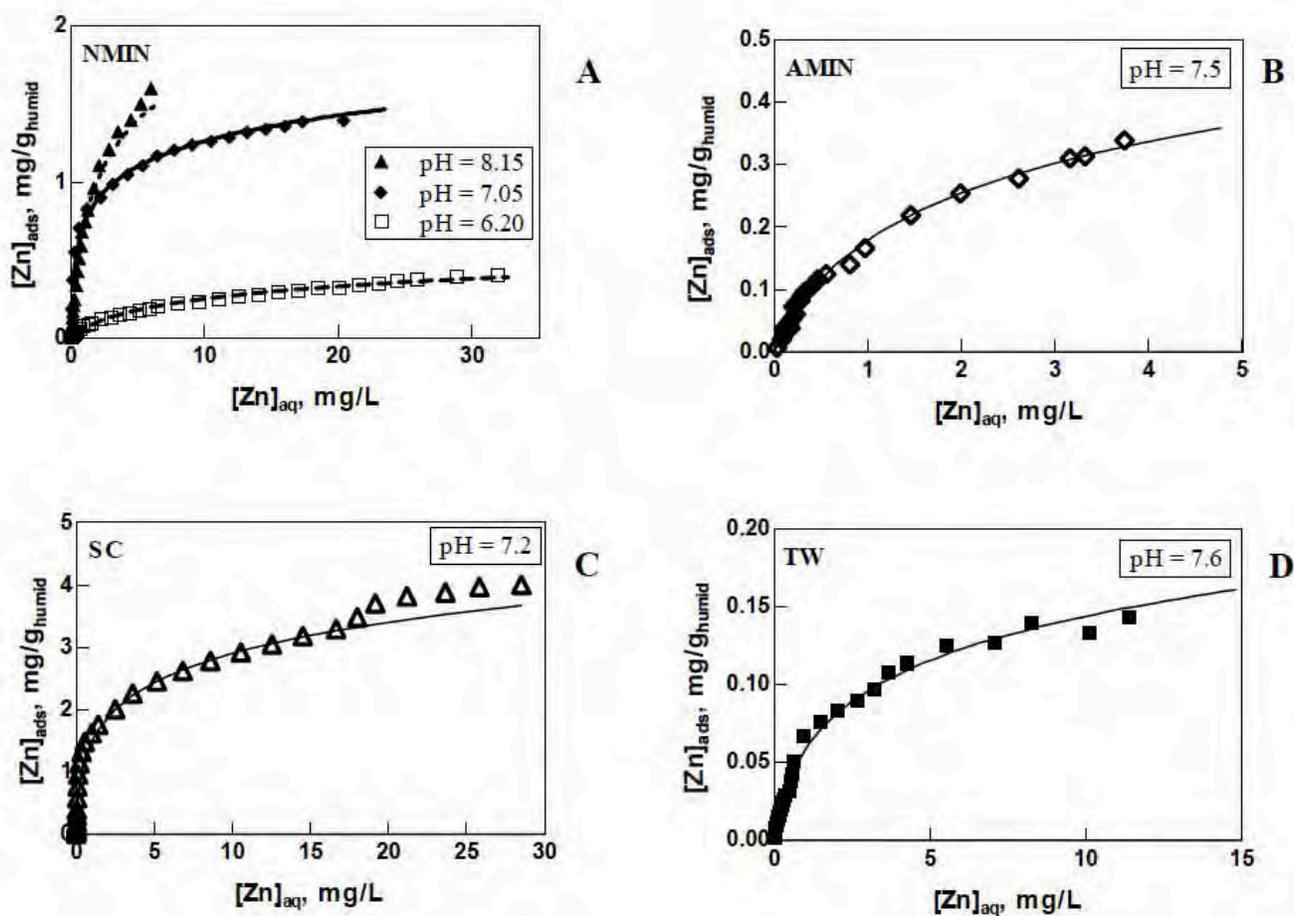
**Fig. 4.** Effect of exposure time on zinc adsorption on diatoms at 5°C in the dark. Experimental conditions: biomass equals 8.5 g/L, 0.1 M NaNO<sub>3</sub>. Cells were exposed during 15 min, 3hrs and 140 hrs to solution with [Zn]<sub>0</sub> = 3.3 mg/L (Exp Nos AMIN67a, AMIN67b and AMIN67c, respectively).



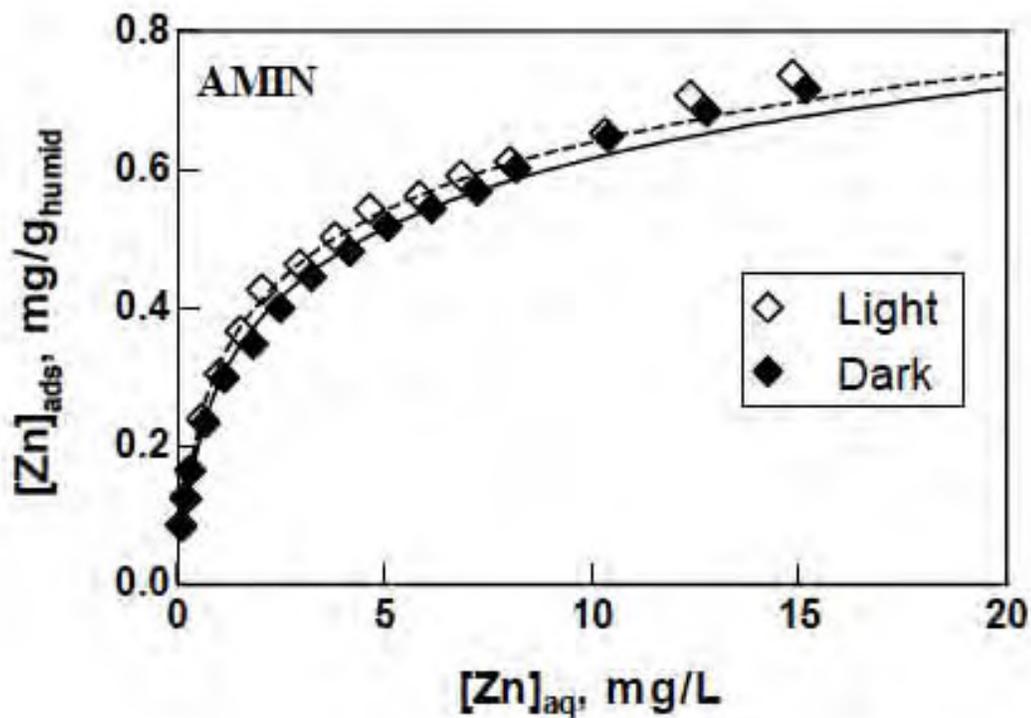
**Fig. 5.** Adsorption of zinc on whole cells and their frustules as a function of pH and concentration in solution. The frustules were obtained by quantitative digestion of whole cells. Experimental conditions: A: AMIN, experiments No 31 and 37, 0.1 M NaCl,  $[Zn]_o = 10$  mg/L, 35 g/L ( $9.5 \cdot 10^9$  cell/L) B: AMIN, experiments No 71 and 77, 0.1 M NaNO<sub>3</sub>, pH =  $6.16 \pm 0.02$ , 25 g/L ( $6.8 \cdot 10^9$  cell/L) C: TW, experiments No 73 and 74, 0.1 M NaCl,  $[Zn]_o = 0.6$  mg/L; 70 g/L ( $3.9 \cdot 10^9$  cell/L) D: TW, experiments No 70 and 78, 0.1 M NaCl, pH =  $7.54 \pm 0.06$ , 35 g/L ( $1.9 \cdot 10^9$  cell/L) E: SC, experiments No 107 and 108, 0.1 M NaCl, pH =  $7.2 \pm 0.1$ , 36 g/L ( $1.6 \cdot 10^{10}$  cell/L) The symbols represent results of adsorption experiments, but the curves were generated from the surface complexation model (SCM) proposed in this study using thermodynamic parameters listed in Table 2.



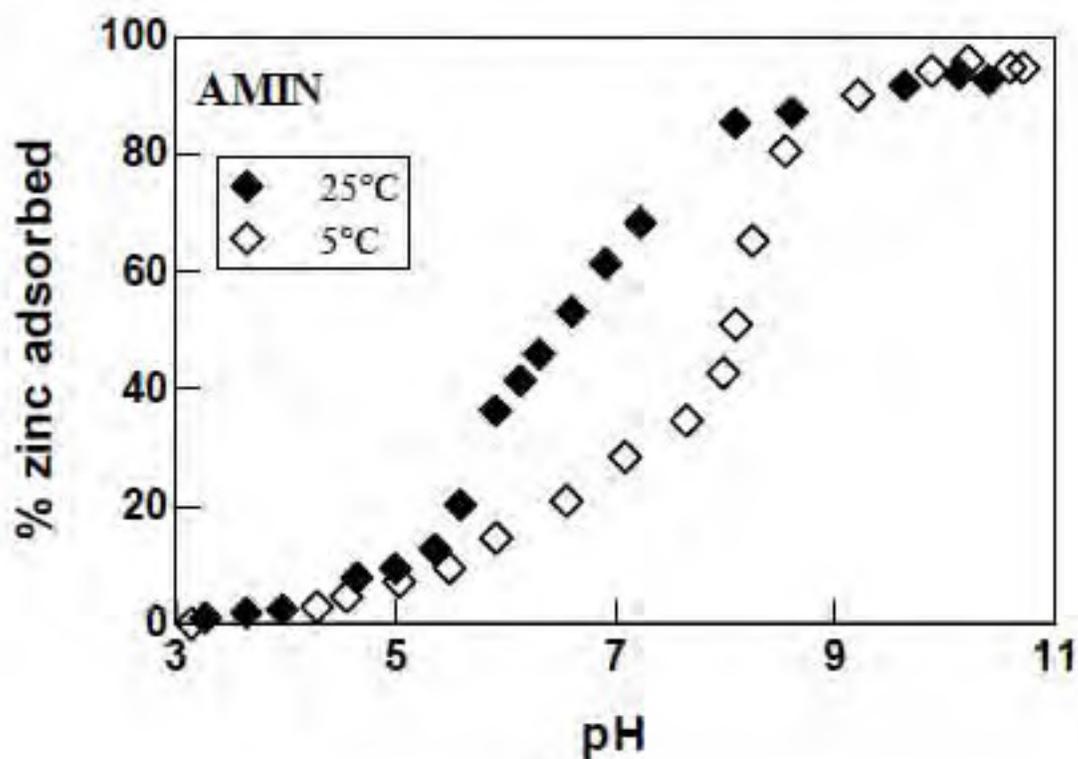
**Fig. 6.** Percentage of adsorbed Zn Experimental conditions: A: NMIN, experiments No 49, 50, B: AMIN, experiments No 32, 64, C: SC, experiments No 35, 59 and D: TW, experiments No 73, 79 and 80,  $[Zn]_0 = 0.6-3.3$  mg/L, 36 g cells/L;; The symbols represent results of adsorption experiments, but the curves were generated from the surface complexation model (SCM) proposed in this study using thermodynamic parameters listed in Table 2.



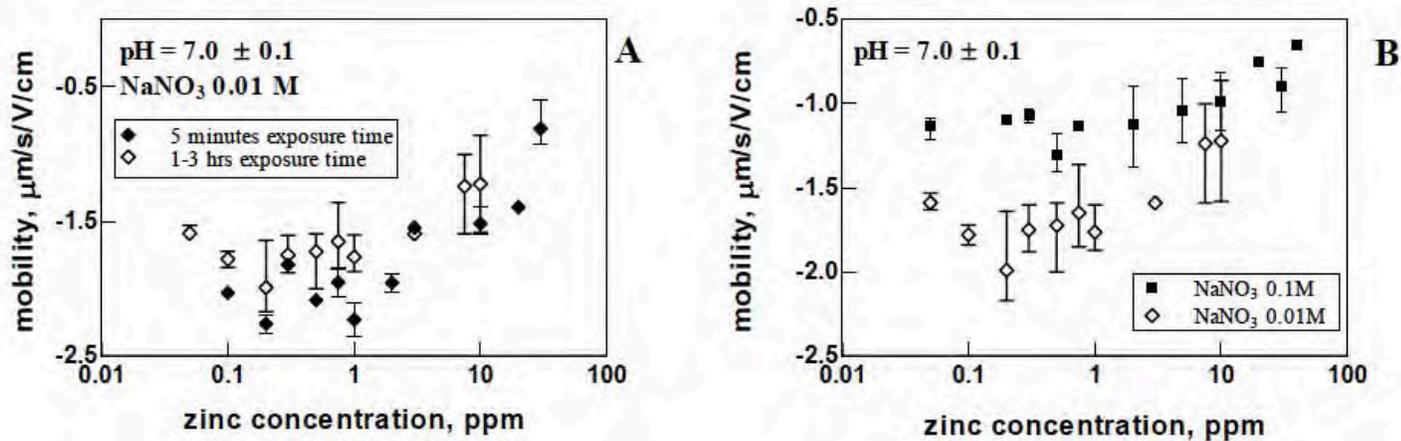
**Fig. 7.** Concentration of adsorbed zinc as a function of equilibrium zinc concentration in solution (Langmuirian adsorption isotherms). Experimental conditions: A: NMIN, experiments No 48, 75 and 76, pH = 6.20, 7.05 and 8.15; 0.1 M NaNO<sub>3</sub>, 8.5 g cells/L; B: AMIN, experiments No 69, pH = 7.50; 0.1 M NaNO<sub>3</sub>, 8.5 g cells/L; C: SC, experiments No 103, pH = 7.20; 0.01 M NaCl, 8.5 g cells/L; D: TW, experiments No 70, pH = 7.60; 0.1 M NaCl, 36 g cells/L. The symbols represent results of adsorption experiments, but the curves were generated from the surface complexation model (SCM) proposed in this study using thermodynamic parameters listed in Table 2.



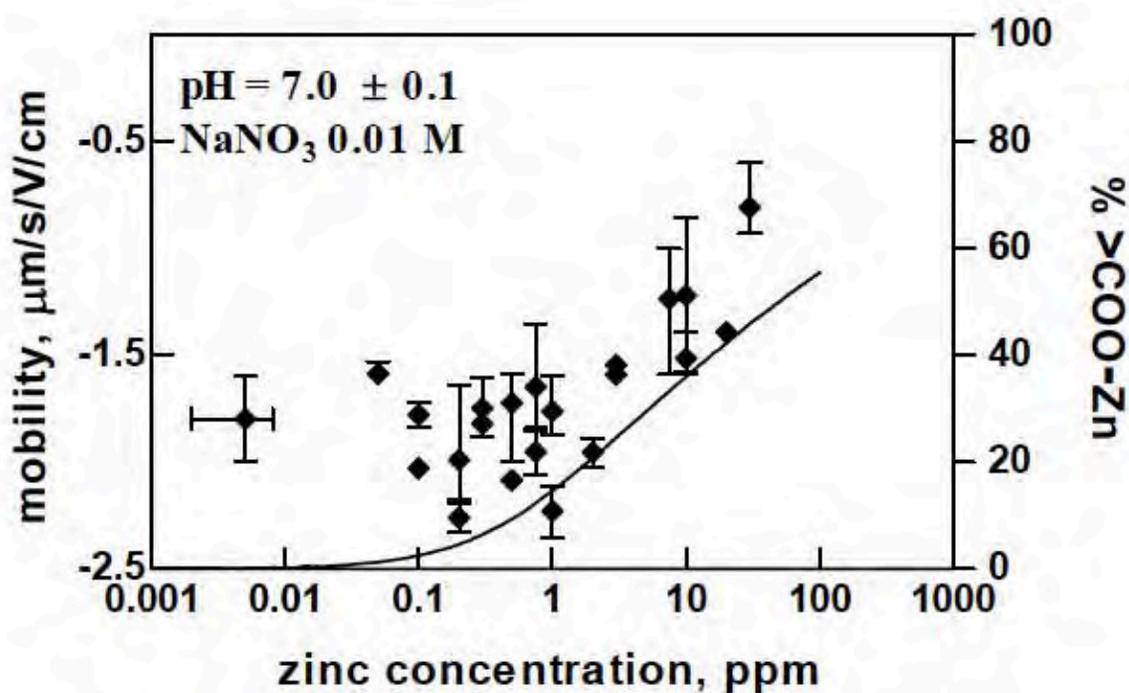
**Fig. 8.** Langmuirian adsorption isotherms of zinc on AMIN cells under light (open diamonds, Exp No AMIN99a) and in the darkness (solid diamonds, Exp No AMIN 99b). Experimental conditions: 17 g cells/L, 0.01 M NaNO<sub>3</sub>, pH = 7.2±0.1, exposure time equals 3.5 hrs.



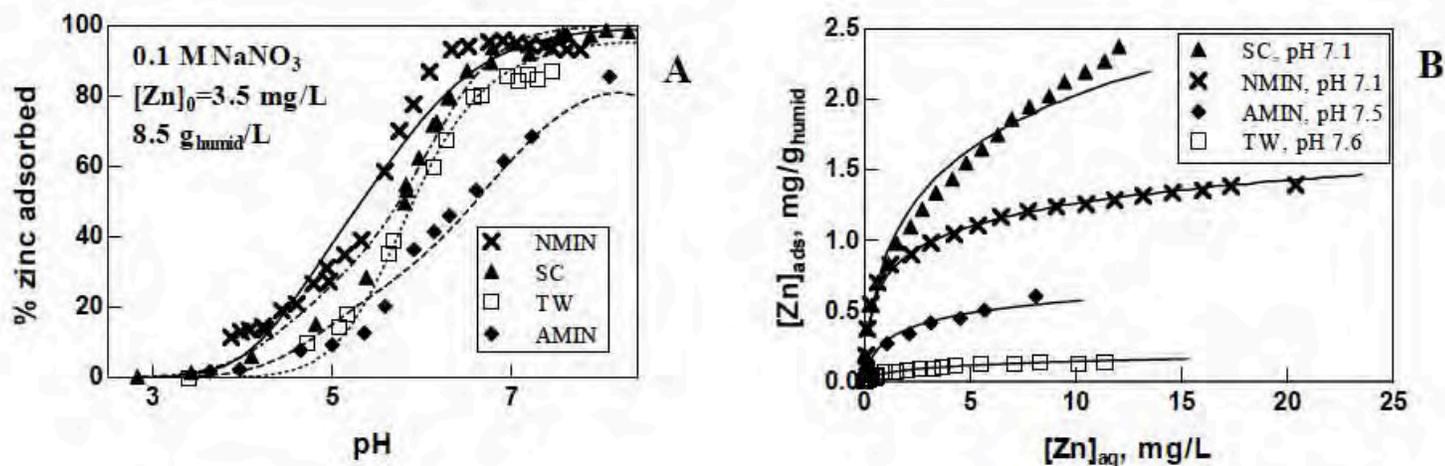
**Fig. 9.** Zinc adsorption on AMIN cells as a function of pH at 5°C (open diamonds, experiment No 32) and 25°C (solid diamonds, experiment No 67b) in 0.1 M NaNO<sub>3</sub>. Cell concentration = 8.5 g humid/L, [Zn]<sub>0</sub> = 3.3 mg/L, exposure time = 3 hrs in the dark.



**Fig. 10.** Electrophoretic mobility of AMIN cells at pH = 7.0 as a function of zinc concentration in solution for different exposure time in 0.01 M NaNO<sub>3</sub> (A) and different ionic strengths after 3 hrs exposure (B).



**Fig. 11.** Electrophoretic mobilities of AMIN species as a function of zinc concentration in solution measured in 0.01 M  $\text{NaNO}_3$  at  $\text{pH} = 7.0$  (symbols) and SCM prediction of the molar percentage of  $>\text{R-COOZn}^+$  species on the outermost surface layer (solid line).



**Fig. 12.** Comparison of zinc adsorption among the four diatom species:

(A) pH-dependent adsorption edge (experiments No 32 (AMIN), 50 (NMIN), 73 (TW) and 35 (SC)) at  $[\text{Zn}]_0 = 3.5 \text{ mg/L}$ ,  $I = 0.1 \text{ M}$  and cell concentration equals  $8.5 \text{ g/L}$ ;

(B) "Langmuirian" adsorption isotherm (experiments No 34 (AMIN), 48 (NMIN), 70 (TW) and 47 (SC)) at  $I = 0.1 \text{ M}$  and  $\text{pH} = 7.3 \pm 0.2$ .

▪

CHAPITRE 6

INTERACTIONS DES DIATOMÉES  
AVEC LE PLOMB ET LE CADMIUM

## I. INTRODUCTION

Les parois des diatomées jouent un rôle important dans les processus d'adsorption et d'incorporation du zinc grâce aux sites surfaciques qu'elles contiennent. Si la charge totale surfacique est déterminée par l'ensemble des groupes carboxyliques, silanols et aminés présents au niveau de la paroi cellulaire, l'adsorption de cations métalliques comme le zinc semble être contrôlée par les sites carboxyliques présents au niveau des polysaccharides de la surface. Le cadmium est un métal très proche du zinc du point de vue des propriétés chimiques. Il peut être ainsi impliqué dans des processus biologiques à la place de Zn quand ce dernier est présent en trop faible concentration. En revanche, pour les mêmes raisons, il peut être toxique pour les organismes vivants, en occupant les sites moléculaires spécifiques au zinc ou au magnésium. Le plomb, à l'inverse du cadmium, n'a aucune activité métabolique dans la cellule. Son interaction avec les ligands et les surfaces organiques est plus forte que celle des deux autres métaux.

Le travail présenté ici vise à caractériser les interactions entre le cadmium et le plomb et les groupes surfaciques de plusieurs espèces de diatomées, en mettant en évidence les principaux paramètres qui contrôlent ces interactions et, notamment, en identifiant les groupes surfaciques responsables de l'adsorption.

## II. VERSION ABREGEE EN FRANCAIS DE "A SURFACE COMPLEXATION MODEL FOR CADMIUM AND LEAD ADSORPTION ONTO DIATOM SURFACE"

Ce travail a pour but principal de fournir une description des interactions en solution aqueuse entre le cadmium et le plomb et quatre espèces de diatomées (deux marines planctoniques, *Thalassiosira weissflogii* = TW et *Skeletonema costatum* = SC, et deux fluviatiles péryphytiques, *Achnanthydium minutissimum* = AMIN et *Navicula minima* = NMIN). Il a consisté à réaliser des mesures électrophoriques et des essais d'adsorption de ces métaux en fonction du pH et de leur concentration en solution. L'influence de divers paramètres, susceptibles de contrôler la sorption de ces métaux sur les surfaces des diatomées comme la durée d'exposition, l'intensité lumineuse et la force ionique a été aussi étudiée. Le

modèle que nous avons élaboré pour décrire l'adsorption du zinc à la surface des diatomées a été appliqué pour décrire celles de Cd et Pb.

Les expériences d'adsorption ont été effectuées à 25°C avec un temps d'exposition de 3 heures à des solutions de différentes forces ioniques ( $I = 0.001$  à  $1.0$  M De  $\text{NaNO}_3$  et  $\text{NaCl}$ ). Pour les quatre espèces étudiées, l'adsorption du cadmium est négligeable avant  $\text{pH} = 3-4$ , le seuil d'adsorption se produit pour  $4 \leq \text{pH} \leq 6$  et, au-delà de  $\text{pH} = 6$ , la totalité du cadmium est adsorbée. Le plomb présente le même comportement avec une adsorption négligeable avant  $\text{pH}=2-3$ , un seuil d'adsorption qui se situe à  $3 \leq \text{pH} \leq 5$  et une adsorption maximale au-delà de  $\text{pH}=5$  (figure 33). En accord avec le modèle de complexation surfacique, les sites carboxyliques et silanols sont responsables de l'adsorption de ces deux métaux à la surface des cellules, suivant une stoechiométrie 1 :1. Cependant, dans la zone de  $\text{pH}$  considérée les groupes silanols ne sont pas déprotonés et la contribution du test siliceux à l'adsorption de Pb et Cd est très faible.

La différence d'adsorption de Cd sur les diatomées mises en suspension dans des solutions de  $\text{NaNO}_3$  et de  $\text{NaCl}$  indique que l'adsorption des complexes chlorés ( $\text{CdCl}^+$  et  $\text{CdCl}_2$ ) à la surface des diatomées est négligeable (figure 34). Les essais d'adsorption réalisés à différentes forces ioniques montrent, en outre, une compétition importante entre le sodium et les métaux. Les capacités d'adsorption de Cd et Pb par les différentes espèces suit l'ordre  $\text{SC} > \text{NMIN} > \text{AMIN} > \text{TW}$ , ceci est conforme au classement des concentrations des groupes carboxyliques à la surface de ces espèces déterminées par titrage acido-basique (117, 39, 26 et 24  $\mu\text{mol/g}$  humide pour SC, NMIN, AMIN et TW, respectivement) ou par spectroscopie infrarouge ATR (Gélabert et al., 2004).

Les valeurs des constantes de stabilité obtenues dans cette étude pour les complexes formés entre le plomb et les sites carboxyliques des diatomées ( $\log K_{>\text{COO-Pb}} \sim 6.3$ ) sont comparables à celles obtenues pour les surfaces de bactéries (Fowle et Fein, 1999). En revanche, les valeurs des constantes de stabilité des complexes formés entre le cadmium et les sites carboxyliques ( $\log K_{>\text{COO-Cd}} \sim 4.7-6.1$ ) sont d'un ordre de grandeur plus élevé que celles rapportées pour d'autres surfaces biologiques. Cette différence peut être expliquée par le fait que les autres études considèrent une réaction d'adsorption supplémentaire sur les sites phosphatés ( $\log K_{>\text{PO}_4\text{-Cd}} = 4.4 \pm 0.7$ ). Les valeurs des paramètres décrivant l'adsorption de Cd et Pb sur les quatre familles de diatomées sont listées dans les tableaux 8 et 9.

Bien que plusieurs travaux antérieurs aient rapportés la présence, à la surface d'algues, de ligands peu abondants mais à forte affinité pour le Cd et le Pb (Gonzalez-Davila et al., 2000), ceux-ci n'ont pu être mis en évidence dans cette étude. L'ajout de ce type de site dans le modèle de complexation surfacique n'améliore pas significativement les résultats obtenus. De plus, la modélisation d'isothermes d'adsorption, conduite à très basses concentrations de Cd sur les diatomées géantes *Odontella* et *NVRO*, en considérant que l'adsorption s'effectuait seulement sur les sites carboxyliques et silanols conduit à un bon accord avec les données expérimentales et constitue ainsi la validité de ce modèle (figure 35). L'existence d'un seuil d'adsorption unique décrite pour plusieurs microorganismes (Borrok et al., 2004) a été testée pour les espèces de diatomées investiguées dans ce travail. Celles-ci présentent le même seuil d'adsorption en fonction du pH, par contre leurs capacités d'adsorption sont très différentes d'une espèce à l'autre. Ce résultat montre que les seules mesures d'adsorption en fonction du pH ne suffisent pas à décrire rigoureusement les propriétés d'adsorption des métaux à la surface des diatomées.

En conclusion, les résultats de cette étude démontrent que les interactions entre le cadmium et le plomb et la surface des diatomées peuvent être décrites, comme dans le cas du zinc, dans le cadre de la formation de complexes surfaciques sur les sites carboxyliques des parois cellulaires.

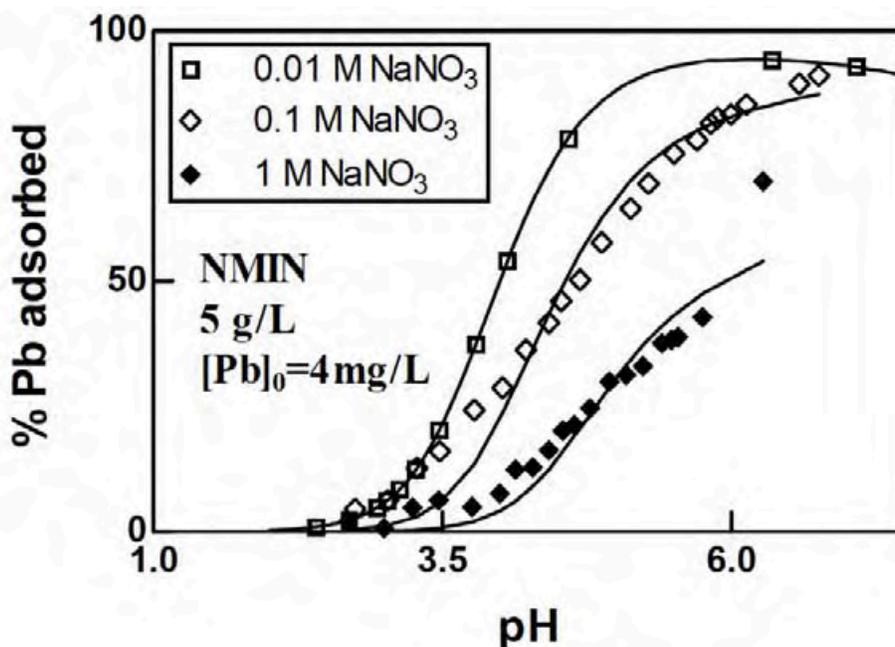


Figure 33: adsorption de Pb sur NMIN en fonction du pH

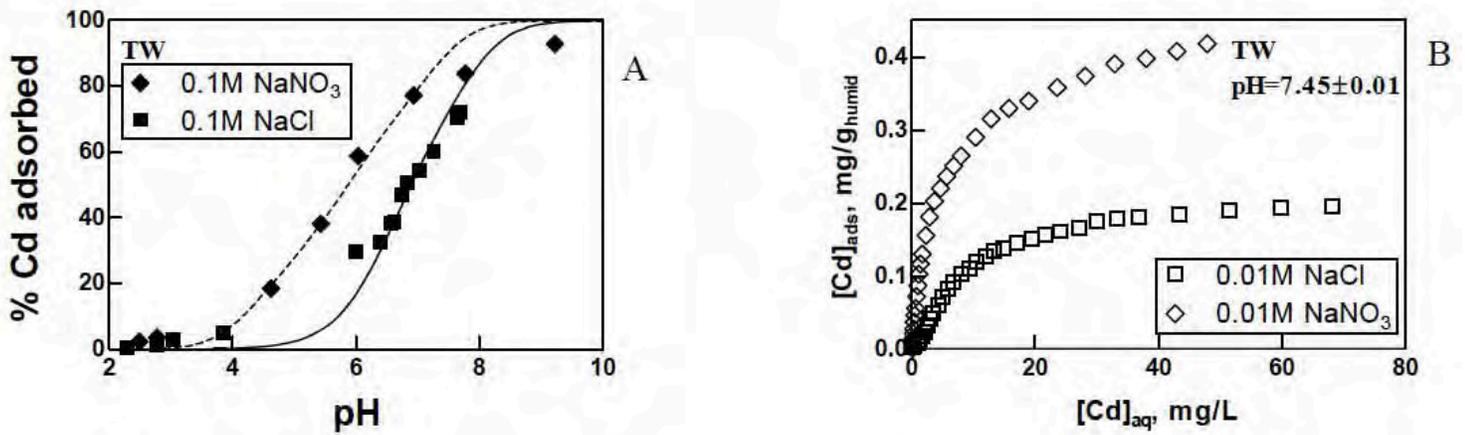


Figure 34 : Adsorption du cadmium : (A) sur des cellules de TW (35 g<sub>humid</sub>/L) en fonction du pH en solution et (B) sur des cellules de TW cells (49 g<sub>humid</sub>/L) en fonction de la concentration de métal en solution.

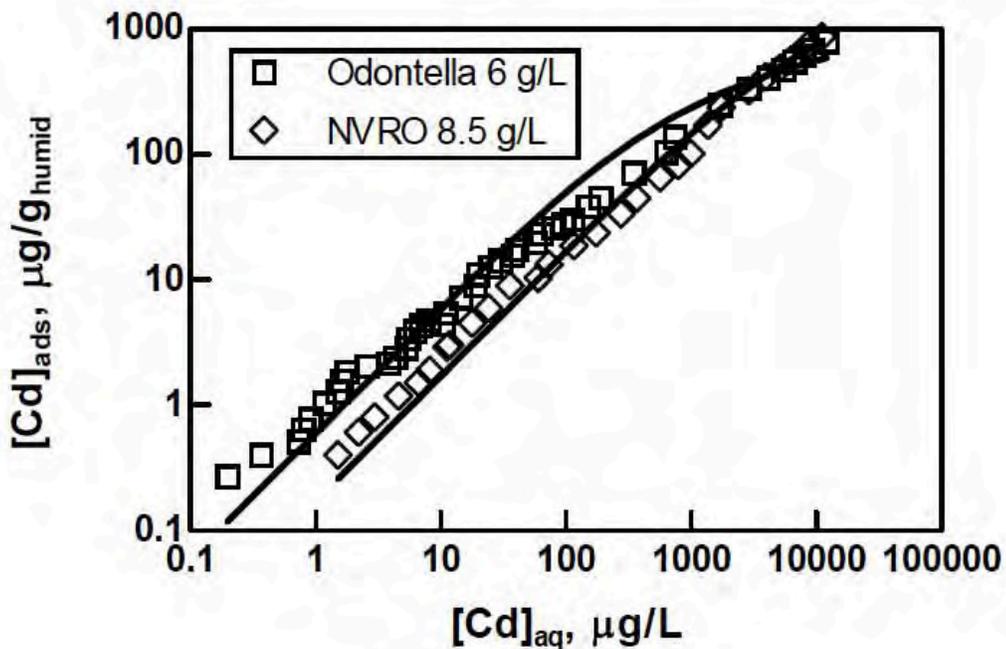


Figure 35 : Adsorption du cadmium sur Odontella et NVRO en fonction de la concentration en métal dans une solution de NaNO<sub>3</sub> 0.1 M (sous faibles concentrations en métal) pH = 6.75 ± 0.05

Espèces	$\log K_1$ (>R-COOCd <sup>+</sup> )	$\log K_2$ (>SiO-Cd <sup>+</sup> )	$\log K_3$ (>R-COONa <sup>o</sup> )	[>COOH] ( $\mu\text{mol/g humid}$ )	capacitance, F/g
<i>Skeletonema c.</i> (SC)	6.12 ± 0.15	N.D.	1.77 ± 0.85	102 ± 50	49 ± 41
<i>Thalassiosira w.</i> (TW)	5.24 ± 0.18	3.3 ± 0.1	0.39 ± 0.03	23.6 ± 0.4	5.0 ± 3
<i>Achnanthisdium m.</i> (AMIN)	4.73 ± 0.10	3.7 ± 0.1	0.72 ± 0.20	23.7 ± 2.8	34 ± 9
<i>Navicula m.</i> (NMIN)	5.2 ± 0.02	3.5 ± 0.1	1.40 ± 0.24	37.1 ± 0.1	23±3

**Tableau 8. Paramètres moyens du modèle de complexation surfacique pour décrire les interactions diatomées-Cd. ND signifie non-déterminé.**

Species	$\log K_1$ (>R-COOPb <sup>+</sup> )	$\log K_2$ (>SiO-Pb <sup>+</sup> )	$\log K_3$ (>R-COONa <sup>o</sup> )	[>COOH] ( $\mu\text{mol/g humid}$ )	EDL capacitance, F/g
<i>Skeletonema c.</i> (SC)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Thalassiosira w.</i> (TW)	6.67±0.1	3.8 ± 0.1	0.4±0.1	24.0 ± 0.2	3 ± 1
<i>Achnanthisdium m.</i> (AMIN)	6.16 ± 0.04	4.2 ± 0.1	0.87 ± 0.05	22.50 ± 0.03	33 ± 3
<i>Navicula m.</i> (NMIN)	6.12 ± 0.27	4.0 ± 0.1	0.95 ± 0.17	39.4 ± 2.2	31 ± 26

**Tableau 9. Paramètres moyens du modèle de complexation surfacique pour décrire les interactions diatomées-Pb. ND signifie non-déterminé.**

### III. A SURFACE COMPLEXATION MODEL FOR CADMIUM AND LEAD ADSORPTION ONTO DIATOM SURFACE

**A surface complexation model for cadmium and lead  
adsorption onto diatom surface**

A. Gélabert<sup>1</sup>, O.S. Pokrovsky<sup>1</sup>, C. Reguant<sup>1</sup>, J. Schott<sup>1</sup>, A. Boudou<sup>2</sup>

*<sup>1</sup>Laboratoire de Mécanismes et Transfert en Géologie (LMTG), UMR 5563, CNRS-OMP-  
Université Paul Sabatier, 14 Avenue Edouard Belin, 31400 Toulouse, France*

*<sup>2</sup>Laboratoire d'Ecotoxicologie et d'Ecophysiologie des Systèmes Aquatiques (LEESA), UMR  
CNRS 5805, Université de Bordeaux 1, Place du Dr Peyneau, 33120 Arcachon, France*

*E-mail address: [gelabert@lmtg.obs-mip.fr](mailto:gelabert@lmtg.obs-mip.fr)*

Keywords : diatom, lead, cadmium, adsorption, surface complexation

## ABSTRACT

This work is devoted to the physico-chemical study of cadmium and lead interaction with diatom-water interfaces for two marine planktonic (*Thalassiosira weissflogii* = TW, *Skeletonema costatum* = SC) and two freshwater periphytic species (*Achnanthydium minutissimum* = AMIN, *Navicula minima* = NMIN) by combining adsorption measurements with surface complexation modeling. Reversible adsorption experiments were performed at 20°C after 3 hrs of exposure as a function of pH, metal concentration in solution, and ionic strength. While the shape of pH-dependent adsorption edge is similar among all four diatom species, the constant-pH adsorption isotherm and maximal binding capacities differ. These observations allowed us to construct a surface complexation model for cadmium and lead binding by diatom surfaces that postulates the constant capacitance of the electric double layer and considers Cd and Pb complexation with mainly carboxylic and, partially, silanol groups. Parameters of this model are in agreement with previous acid-base titration results and allow quantitative reproduction of all adsorption experiments.

## 1. INTRODUCTION

Adsorption onto the cell wall constitutes the first step in metal uptake by biota and thus its accurate quantification is crucial for modeling the impact of aquatic organisms on metal transport in natural settings. The aim of this study is to provide a quantitative description of lead and cadmium interactions with the diatom cell-wall, by combining adsorption experiments and electrokinetic measurements with surface complexation modeling. For this study, we retained several representative diatom species typical of temperate climate zones: two planktonic, *Skeletonema costatum* (marine) and *Thalassiosira weissflogii* (estuarine) and two freshwater periphytic, *Achnanthydium minutissimum* and *Navicula minima*. The cadmium adsorption characteristic under low metal concentration has been investigated for two other species, *Odontella* (marine) and *NVRO* (freshwater). Acid-base titrations and spectroscopic observations of the diatom surfaces revealed their similar cell wall structure which is mainly composed of polysaccharides and proteins coating a silica frustule (Gélabert et al., 2004). The surface charge and, presumably, metal-ion affinity are controlled by amino, carboxyl and silanol groups present in this three-dimensional surface envelope. Tested for diatom complexation with zinc, the thermodynamic model indicates that zinc adsorption onto diatom surfaces is mainly controlled by carboxylic groups located in

the external polysaccharidic layers of the cell wall. Furthermore pH, zinc and biomass concentration in solution, ionic strength and temperature were evidenced to be the main external parameters that govern zinc binding. Cadmium is often considered as analogue of Zn in terms of biological availability due to its important role for metabolic activity of planctonic cells (LANE and MOREL, 2000). While this metal is toxic at high concentration, at the conditions of Zn deficit it becomes essential nutrient replacing Zn in certain enzymes. In contrast, lead does not demonstrate any metabolic requirements by cells while its interaction with ligands and solid surfaces is much stronger than that of two other metals. In this regard, comparative and consistent study of Zn, Cd and Pb adsorption on diatoms cells as a first step in metal uptake by the microorganisms is very timing.

The present study aims at identifying *i*) the main environmental parameters controlling the interaction of cadmium and lead with diatom surfaces *ii*) the differences in metal binding properties between freshwater and marine species and between cadmium and lead, and *iii*) the main functional groups involved in cadmium and lead sorption on diatom surfaces. It is anticipated that these results should provide a basis for quantitative biogeochemical modeling of cadmium and lead transport in natural environments controlled by aquatic biological communities.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Diatom cultures**

Monospecific diatom cultures were developed from laboratory strains to produce biomass of four species: marine planctonic *Thalassiosira weissflogii* (abbreviated TW), *Skeletonema costatum* (SC), freshwater periphytic *Achnantheidium minutissimum* (AMIN) and *Navicula minima* (NMIN) as described previously (Gélabert et al., 2004). Diatoms were cultured to a concentration of  $\sim 10^7$  cell/L at 20°C in a sterile Dauta (freshwater) or f/2 (seawater) medium (Gold, 2003) at pH  $\sim 7.7-7.8$ . Before the adsorption experiments, diatoms were rinsed three times in a NaCl or NaNO<sub>3</sub> electrolyte solution using centrifugation at 2200 g ( $\sim 400$  mL of solution for 1 g of wet biomass). Their specific surface area is 7.7 m<sup>2</sup>/g, 12.8 m<sup>2</sup>/g, 74.3 m<sup>2</sup>/g and 156 m<sup>2</sup>/g and the average size of cells is 7, 12, 10, 10  $\mu\text{m}$  for NMIN, AMIN, TW and SC respectively. Two “giant” diatom species, marine *Odontella* s. (diameter 200-300  $\mu\text{m}$ ) and freshwater NVRO (diameter 50-100  $\mu\text{m}$ ) were also used in several

experiments.

## 2.2. Metal adsorption

In order to provide a quantitative description of cadmium and lead binding onto diatom surfaces, two types of adsorption experiments were conducted: *i)* adsorption at constant initial metal concentration as a function of pH (pH-dependent adsorption edge) and *ii)* adsorption at constant pH isotherm as a function of metal concentration in solution. In order to assess the environmental parameters controlling the interaction of cadmium and lead with diatom surfaces, ionic strength, biomass concentration and light exposure were also investigated. All experiments were performed in solutions undersaturated with respect to any solid metal oxide, hydroxide or carbonate phase as verified by calculation using MINTEQA2 computer code and corresponding database (Allison et al., 1991).

Adsorption experiments were conducted at  $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$  in a continuously agitated diatom suspension of  $\text{NaNO}_3$  or  $\text{NaCl}$  solution with an ionic strength ranging from 0.001 M to 1 M. The pH-dependent adsorption edges were measured after 3 hrs of exposure in the dark in order to prevent cell growth and metabolic activity. pH was adjusted using either  $\text{NaOH}$  or  $\text{HNO}_3$  ( $\text{HCl}$  for  $\text{NaCl}$  electrolyte). HEPES, a non metal-complexing buffer in aqueous solutions (Miramanoff and Wilkinson, 2000), was added to a concentration of 0.003 M in order to keep pH constant during adsorption isotherm measurements. For all experiments sterile de-ionized water (MilliQ, 18 m $\Omega$ ) purged of  $\text{CO}_2$  by  $\text{N}_2$  bubbling was used. At the end of the experiment, the suspension was centrifuged and the resulting supernatant filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  Nylon filter, acidified with ultrapure nitric acid and stored in the refrigerator before the analysis. The concentration of metal adsorbed on diatoms was calculated by subtracting the concentration of metal in the supernatant from the original amount of metal added in the solution.

Exposure time was fixed to 3 hrs. Measurements of lead and cadmium adsorption kinetics on diatom cells indicate that the majority of metal is sorbed within the first 10-100 minutes of exposure. The reversibility of adsorption equilibria was tested by adding different amounts of acid to a suspension of diatoms with 100% adsorbed metal (Cd or Pb). The proportion of irreversibly bound metal ( $[\text{Me}]_{\text{incorp}}$ ) is calculated following:

$$[\text{Me}]_{\text{incorp}}(\%) = 100 \cdot \{([\text{Me}]_o - [\text{Me}]_1 - [\text{Me}]_{\text{desorb}})/[\text{Me}]_o\} \quad (1)$$

In these experiments, full desorption was observed in less than 1 hour of exposure time and it was found that, at pH from 3 to 9, the amount of irreversibly adsorbed metal did not exceed 5% suggesting an equilibrium adsorption process.

Concentration of dissolved organic carbon (DOC) in the course of adsorption experiment did not change by more than 30-50%. Only a weak degradation of the cell wall in the usual pH range of adsorption experiments ( $4 \leq \text{pH} \leq 8$ ) was observed. Low DOC concentration monitored during adsorption experiments (i.e., 2-4 mg/L, comparable with [DOC] in surface seawater) and relatively high metal and cell biomass concentrations (0.5-3 mg/L and 8-70 g/L, respectively) allow us to suggest that diatom surface functional groups, and not organic exudates, are primarily responsible for Cd and Pb binding in studied systems. This was also confirmed by potentiometric measurements using  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  - selective electrodes; no complexation with diatom exudates was revealed in the pH range of adsorption reactions (4 to 8 for Cd and 3 to 7 for Pb).

### **2.3. Electrophoretic measurements**

In order to investigate the effect of metal load on zeta potential of the cells, electrophoretic measurements were performed on *Achnanthisdium minutissimum* with adsorbed lead. This method provides a good estimation of the overall surface charge and its evolution with increasing metal load. The electrophoretic mobilities of live diatom cells were measured at 25°C using a microelectrophoremeter (“Zetaphoremeter IV” Z4000, CAD Instrumentation) with a time of cells exposure to Pb-bearing solutions of 5-10 min. Details are given in Gélabert et al. (2004). Three replicates were carried out and each replicate were performed by renewing the suspension in the microelectrophoresis cell. The uncertainty attached to electrophoretic mobilities were less than 5 %. Experiments were performed with viable cells (1 g humid/L) under constant ionic strength (0.01 M) in solutions with lead concentration ranging from 10 µg/L to 130 mg/L and pH around 5. All solutions were undersaturated with respect to solid oxides and hydroxides of lead.

### **2.4. Analytical Methods**

All filtered solutions were analyzed for aqueous Cd and Pb concentration using flame atomic absorption (Perkin Elmer 5100 PC spectrophotometer) with an uncertainty of  $\pm 1$  %. For lower metal concentration, analyses were performed by ICP-MS on Perkin Elmer SCIEX,

Elan 6000 with a detection limit of 0.01 µg/L and a precision of ±5 %. Values of pH were measured using a Mettler Toledo® combined electrode, with an accuracy of ±0.002 units. Dissolved Organic Carbon (DOC) was analyzed using a Carbon Total Analyzer (Shimadzu TOC-5000) with an uncertainty of 3% and a detection limit of 0.1 ppm.

## **2.5. Potentiometry with ion-selective electrodes.**

In-situ, high-resolution potentiometry was used to monitor activity and free concentration of Cd<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> in cell suspension. Solid-contact Cd and Pb sulfide electrodes (NIKO Analit, Russia) coupled with Ag/AgCl reference electrode in 3.5 M KCl connected with solution via 1 M NaNO<sub>3</sub> salt bridge were calibrated in standard Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> and Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> solutions of constant ionic strength 0.01 or 0.1 M maintained by addition of NaNO<sub>3</sub>. Potentiometric measurements were performed in working concentration range of 10<sup>-6</sup> to 10<sup>-2</sup> M with a detection limit of 10<sup>-7</sup> M, and the uncertainty of 5%. At 25°C, the calibration curve was linear with a slope within ±10% of that of Nernstian value.

## **RESULTS**

### **2.4. Metal adsorption**

Results of metal adsorption experiments on diatoms as a function of pH and metal aqueous concentration are depicted in Figs. 1 to 6. The effects of some first-order external parameters which are likely to control metal-diatoms interactions such as exposure time, pH, ionic strength and light are described.

For each species, a negligible adsorption of cadmium is observed at pH < 3-4, a strong increase in adsorption occurs at 4 ≤ pH ≤ 6 and 100% adsorption on the surface happens at pH > 6. For lead, the same trend is evidenced with a negligible adsorption at pH < 2-3, a strong increase in adsorption at 3 ≤ pH ≤ 5, and the maximal adsorption occurring at pH > 5 (Figures 1 and 3). The proportion of adsorbed metal increases with the increase of biomass concentration or decrease of initial metal concentration.

The effect of exposure time and the adsorption kinetics have been investigated at two

different pHs for Cd adsorption onto freshwater species NMIN (fig. 7 and 10). While stable Cd concentration is observed after 10 minutes of reaction at pH= 6.17, almost 100 minutes are necessary to complete the adsorption in more alkaline conditions (Fig. 7). This is consistent with previous result of zinc adsorption on diatoms, when the adsorption occurred much faster at low pHs. Under weakly alkaline conditions, the retard of adsorption process might be due to: 1) slow incorporation of metal inside the cell thus liberating new available sites; 2) modification of the cell surface due to hydrolysis reactions, and 3) extracellular secreting of new complexants due to detoxification mechanisms (Sunda and Huntsman, 1998; Ahner et al., 1997, Gélabert et al., 2004). In all our experiments, 3 hrs or more of exposure time was largely enough to provide stable (equilibrium) distribution of metal between the cell surface and solution. Long-term slow incorporation process with an adsorption kinetics following the square root of time (Gonzalez-Davila et al., 2000) has not been evidenced in our experiments.

The effect of light on cadmium adsorption by viable diatoms is illustrated in Figure 9. A slight increase of adsorption under continuous light exposure (6000-8000 lux) reflects some active uptake processes occurring in viable cells. Similar difference between light and dark adsorption of copper was reported for the diatom *Ditylum brightwellii* (Rijstenbil and Gerringa, 2002).

Comparison of lead and cadmium adsorption under similar external media demonstrates much stronger affinity of diatom surfaces for lead with a maximum adsorption capacities significantly higher for lead compared to Cd (Fig 11).

The effect of ionic strength on pH-dependent adsorption edge for SC is presented in Fig. 1-3. The proportion of adsorbed cadmium and lead decreases with increasing ionic strength. This suggests a competition between sodium ions and metal during adsorption processes on surface sites or the electrostatics effects in the electric double layer.

Cadmium adsorption in two different electrolytes (NaNO<sub>3</sub> and NaCl) and chloride complexation effect on adsorption have been tested for *Thalassiosira w.* (Fig. 1 and 2): the adsorption is much weaker in NaCl compared to NaNO<sub>3</sub> suggesting that the adsorption of Cd chloride aqueous complexes (of CdCl<sup>+</sup> and CdCl<sub>2</sub>) is negligible.

Examples of constant pH, adsorption isotherms for studied species are presented in Figures 2-4. The order of cadmium and lead adsorption capacity among different species is

SC > NMIN > AMIN > TW which is consistent with the relative number of weight-normalized surface carboxylic groups for each species: 117, 39, 26 and 24  $\mu\text{mol/g}$  humid for SC, NMIN, AMIN and TW, respectively (Gélabert et al., 2004).

## 2.5. Electrophoretic measurements

Electrophoretic mobilities of AMIN exposed to an increasing concentration of lead at  $\text{pH}=5.0\pm 0.1$  are depicted in Figure 8. At  $[\text{Pb}]_{\text{aq}} \leq 100 \text{ mg/L}$ , a constant and negative mobility of the cells is observed, suggesting the dominance of negatively charged functional groups on the surface. Like it is the case for zinc exposure (Gélabert et al., 2005), the absolute value of negative electrophoretic mobilities decreases significantly at  $[\text{Pb}]_{\text{aq}} > 1 \text{ mg/L}$ . The isoelectric point in the presence of lead at  $\text{pH} = 5$  is reached at  $[\text{Pb}]_{\text{aq}} = 100 \pm 20 \text{ mg/L}$ .

## 2.6. Surface complexation modeling

Recently, using a set of spectroscopic and macroscopic techniques, we identified the nature and determined the concentration of the major surface functional groups (carboxyl, amino, and silanol) that control the amphoteric acid-base properties of diatom surfaces (Gélabert et al., 2004). Total Cd adsorption occurs below  $\text{pH}=6$  and total Pb adsorption below  $\text{pH}=5$ . In the  $\text{pH}$  range related to Cd and Pb adsorption, only carboxyl and silanol sites are negatively charged while amino groups of proteins remain positively charged until weakly alkaline conditions.

Thus, carboxyl and silanol groups are most likely to bind positively charged  $\text{Me}^{2+}$  ions according to the reactions:



In this study, a 1:1 metal–ligand stoichiometry (mononuclear surface complexes) was postulated in accord with the SCM approach developed for zinc adsorption on the same diatom species. This stoichiometry is consistent with previous studies dealing with zinc adsorption (Gélabert et al., 2005), of Cd onto bacteria (Yee N. and Fein J. (2001)) and copper onto diatoms (Gonzalez-Davila et al., 2000). It is known that thermodynamic parameters of the constant capacitance model (CCM) are only valid for a single ionic strength and medium

composition (Sverjensky and Sahai, 1996; Lützenkirchen, 1999) since the surface potential is considered to be independent on electrolyte composition. Thus, different set of surface protonation and metal-binding constant for each ionic strength and electrolyte type investigated are required. Following the same approach than zinc complexation with diatom surfaces, and because it appears that ionic strength influences Cd and Pb adsorption for all four species, we introduced metal competition with sodium for carboxylic groups following the reaction:



Thus the stability constant of reaction (3) was treated as additional adjustable parameters.

Sodium complexation with silanol groups located in the deep surface layers of the cells is considered to be negligible compared to carboxylate groups interaction.

A full set of adsorption data was modeled using FITEQL computer codes (Herbelin and Westall, 1996). This modeling included optimization of cadmium and lead complexation constants with carboxylic and silanol groups and the EDL capacitance value. Parameters related to “intrinsic” properties of diatom surfaces ( $\text{pK}_a$  of  $>\text{COOH}$ ,  $>\text{NH}_2$ ,  $>\text{SiOH}$  and their total concentrations) were fixed within the range of accepted uncertainties as used in previous diatom surface complexation model (Gélabert et al., 2004). Therefore, two adjustable parameters,  $K_{>\text{COO-Me}}$  and  $K_{>\text{SiO-Me}}$  for reactions (1) and (2) were used to describe the adsorption experiments. A constant capacitance of the electric double layer was assumed in our surface complexation model following the track developed for metal complexation with bacterial surfaces.

Typical shift from zinc to cadmium and lead stability constant for bacteria was 0.5 log unit and 1 log unit respectively (Fein et al., 2001). This difference in stability constants between two metals has been applied for silanol group interaction (Eqn. 2). Because the contribution of silanol groups to overall metal binding to the cell wall is much weaker than that of carboxylic groups (< 10% and > 90%, respectively), quantitative evaluation of  $\log K_2$  using surface complexation modeling was very difficult.

The goodness of model fit to a data set is represented by the overall variance ( $V(Y)$ ) calculated by FITEQL. This variance is normalized with respect to the number of

experimental data points, the number of chemical components for which the total concentration is known and the number of adjustable parameters. Generally, a value of  $V(Y)$  less than 20 corresponds to a good fit (Herbelin and Westall, 1996), although it has been argued that graphical goodness of fit should be preferred over numerical goodness of fit parameters (Gunneriusson and Sjoberg, 1993). It is seen that for most experiments,  $V(Y) \leq 20$  which indicates a good adherence to experimental data of predicted adsorbed concentration.

The EDL capacitance value,  $C$ , which could not be fitted by FITEQL, was initially fixed for each species according to previous work on zinc adsorption onto diatom surfaces. Then,  $C$  were allowed to some variations in order to better optimize the fit. In this regard,  $C$  can be considered only as purely adjustable parameter

Results of metal adsorption modeling are presented in Figures 1 to 6 as solid lines. Results of each adsorption experiment were fitted individually to provide simultaneously best fits of the experimental pH-dependent adsorption edge and the adsorption isotherm

For the large dataset treated in the present study, simultaneous fitting of several isotherms with initially fixed parameters was not possible. For each experiment, slight adjustment of several variables ( $C$ ,  $\log K$  and surface site concentrations) was necessary to achieve the mathematiccaly “best” fit. The variation of parameters was allowed only within the uncertainties contrained by actual experimental reproducibility.

### **3. DISCUSSION**

For all six species investigated, a two sites (carboxyl and silanol) model was found to satisfactory reproduce the experimental data. Compared to Zn, the silanol contribution to metal adsorption is weaker because lead and cadmium adsorption occurs at lower pH, where the silanol groups are not deprotonated. For *Skeletonema costatum*, the frustule contribution can be neglected like it is the case of proton and zinc adsorption (Gélabert et al., 2004 and 2005, respectively). Furthermore, fitting of metal adsorption on SC requires an amino groups concentration one order of magnitude lower than that obtained from acid-base titration. This phenomenon, already evidenced for zinc adsorption, might be due to the high thickness of its porous organic layer: metal ions are adsorbed onto the most external polysaccharidic layers and do not “see” a large proportion of amino groups, located at the basis of the cell wall organic matrix .

Electrokinetics measurements indicate that surface charge behaviour of diatoms exposed to lead is similar to that of zinc adsorption onto diatoms. The increase of the curve from  $[Pb] \sim 1$  g/L suggests that significant amount of  $Pb^{2+}$  is complexed to carboxylic groups of the cell wall thus giving a positive charge to the surface, in agreement with reaction 1. In this regard, the exchange of  $Pb^{2+}$  for two  $H^+$  on the surface like it was evocated for other metals by Christ et al. (1981, 1990) is not plausible. The electrophoretic mobility becomes positive around  $[Pb] \sim 100$  g/L suggesting the dominance of positively charged  $>COO-Pb^+$  groups on the surface. Parameters of isoelectric point measured in the present study for Pb adsorption on diatom surface ( $pH = 5$ ,  $[Pb]_{aq} = 100 \pm 20$  mg/L) could not be reproduced by surface complexation calculation: the model predicts equal concentrations of  $>R-COO^-$  and  $>R-COOPb^+$  at the surface around 1 g/L. This can be explained by very shallow depth of surface layer responsible for zeta potential formation at the shear plane: only 10 percent of lead is located at the most external layer, the rest of metal is reversibly adsorbed over the full depth of polysaccharidic envelope. The stability constant for sodium adsorption on carboxylate groups ( $\log K_{>COO-Na}$ ) is lower for TW ( $\sim 0.4$ ) compared to AMIN and NMIN ( $\sim 0.7-1.4$ ) and surprisingly SC ( $\sim 1.8$ ). These stability constants are different from previous values corresponding to zinc adsorption (Gélabert et al., 2005). This may be explained by a weak sensitivity of the model to  $\log K_{>COO-Na}$ . More, Cd and Pb constitute octahedric complexes at the surface whereas Zn constitutes tetrahedric complexes. Thus, when Cd or Pb are adsorbed, more  $H_2O$  molecules are present on the surface, this may influence the  $\log K_{>COO-Na}$  value.

The surface stability constants obtained in the present study for lead complexation with diatom carboxylate sites ( $\log K_{>COO-Pb} \sim 6.3$ ) is close to those for lead complexation with bacterial surfaces (Fowle and Fein, 1999). At the same time, reaction constants for cadmium complexation with diatom carboxylate sites ( $\log K_{>COO-Cd} \sim 4.7-6.1$ ) are an order of magnitude higher than those reported for other biological materials such as bacteria (Daughney et al, 1998). Similar difference has been reported for Zn complexation with diatom and bacterial surfaces, respectively (Gélabert et al., 2005). Note however, that the set of parameters used by last authors for bacteria includes reaction with phosphate surface groups ( $\log K_{>PO_4-Cd} = 4.4 \pm 0.7$ ) while adsorption on carboxylate sites for bacteria is weaker than that for diatoms. Previous characterization of diatom surface by spectroscopic and macroscopic techniques did not evidenced measurable amount of phosphate groups (Gélabert

et al., 2004). In accord with that, our XAFS study on zinc complexation did not evidenced phosphate-zinc complexes on diatom surface (Pokrovsky et al., 2005). Therefore, carboxylate surface groups complexation is the primary process responsible for metal fixation on diatom cell walls. Other studies also argued for predominantly carboxylate binding of divalent metals ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{UO}_2^{2+}$ ) to bacteria surfaces at pH above 4 (Boyanov et al., 2003; Kelly et al., 2002) and the carboxylate group interaction is widely used for modeling of metal binding algae (Schiewer and Volesky, 1995) and bacteria surfaces (Ngwenya et al., 2003).

Many studies report the presence of lower-abundant sites which have an affinity for Cd and Pb higher than carboxylic groups and which are likely to control the metal adsorption at low metal/solid ratio (Gonzalez-Davila et al., 2000). Plotting our experimental data in a linear Scatchard plot ( $1/X$  versus  $1/Y$ , see Gonzalez-Davila et al., (2000) for details) did not allow detection of any surface heterogeneity due to the presence of small amount of strong sites. Furthermore, modeling of adsorption isotherm on a log scale for Cd over three to four orders of magnitude on  $[\text{Cd}]_{\text{aq}}$  onto *Odontella s.* and *NVRO* surfaces, a straight dependence with a slope close to 1 is observed down to very low metal concentrations thus indicating the presence of one single site for metal complexation under low metal load. The curves presented in Figures 5, 6 were modelled using only reactions 1 and 2 corresponding to carboxylate and silanol complexation. Addition of new surface sites of low abundance but high affinity to metal did not significantly improve the quality of experimental data description and, in many cases, the convergence of the fit was not achieved. The binding capacities of diatom surfaces with cadmium and lead (100-500  $\mu\text{mol/g}$  dry weight) are in good agreement with recent measurements of Klimmek et al. (2001) on 30 algae (50-340  $\mu\text{mol Cd/g}$  dry weight and 20-850  $\mu\text{mol Pb/g}$  dry weight) and diatom (230  $\mu\text{mol Cd/g}$  dry weight and 360  $\mu\text{mol Pb/g}$  dry weight). The order of Cd and Pb binding affinity to diatoms cell wall ( $\text{SC} > \text{NMIN} > \text{AMIN} > \text{TW}$ ) follows the same trend as for Zn (Gélabert et al., 2005), in agreement with carboxylate group concentration in the surface layers as measured by Attenuated Total Reflection (FT-ATR) technique (Gélabert et al., 2004). A “universal” adsorption edge has been described for a number of microorganisms. According to this approach, similar surface binding constants and sites concentrations are necessary to model Cd adsorption by different bacteria species (Yee and Fein, 2001) as well as natural bacteria consortia (Borrok et al., 2004). This hypothesis was tested for four diatom species in this study: all four species exhibit similar pH-dependent adsorption edge (Fig.12). At the same

time, “Langmuirian” adsorption isotherms plotted in non-logarithmic scale reveals some differences between species (Fig. 12). The latter allows better seeing the effect of specific metal binding constants and to define the order of weight-normalized site density among the species. Therefore, focusing solely on pH-dependent adsorption edge plotted in semi-logarithmic scale might be not sufficient for adequate description of metal binding to organic surfaces. Unfortunately, because rigorous Langmuir adsorption isotherm data for bacteria are currently lacking, this conclusion can not be extended to other microorganisms.

#### **4. CONCLUSION**

This study provides a firm ground for modeling the biogeochemical fluxes of lead and cadmium controlled by marine and freshwater algae. Results of FITEQL thermodynamic modeling of adsorption data demonstrated that carboxylate moieties located in the external polysaccharidic layers of cell wall are the major surface functional groups responsible for metal binding to diatom surfaces. The role of the silica frustule is weak for cadmium and lead adsorption. No complexation with strong sites was required to model metal adsorption at low metal/surface ratios and low, naturally-relevant metal concentrations in solution. Although pH-dependent adsorption edge exhibits a similar behaviour for all four diatom species, metal surface adsorption capacities and reaction constant are distinctly different among species. The surface adsorption constants and their dependences on various environmental factors (pH, ionic strength, metal speciation in solution and the biomass concentration, light) are the key parameters affecting the toxic effects, biological storage, and, consequently, biogeochemical migration of heavy metals.

#### **REFERENCES**

- Ahner B. A., Morel F. M. M., and Moffet J. W. (1997) Trace metal control of phytochelatin production in coastal waters. *Limnology and oceanography* **42(3)**, 601-608.
- Allison, J.D., Brown D.S., Novo-Gradac, K.J., 1991. MINTEQA2/PRODEFA2, A geochemical assessment model for environmental systems: Version 3.0 user’s manual. U.S. EPA, Athens, GA.
- Boyanov M.I., Kelly S.D., Kemner K.M., Bunker B.A., Fein J.B., Fowle D.A. (2003) Adsorption of cadmium to *Bacillus subtilis* bacterial cell walls: A pH-dependent X-ray absorption fine structure spectroscopy study. *Geochim. Cosmochim. Acta* **67**, 3299-3311.
- Crist R. H., Oberholser K., Shank N., and Nguyen M. (1981) Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls. *Environmental Science and Technology* **15(10)**, 1212-

1217.

- Crist R. H., Martin J. R., Guptill P. W., and Eslinger J. M. (1990) Interaction of metals and protons with algae. 2. Ion exchange in adsorption and metal displacement by protons. *Environmental Science and Technology* **24**(3), 337-342.
- Daughney C.J., Fein J.B., and Yee N. (1998) A comparison of the thermodynamics of metal adsorption onto two common bacteria. *Chem. Geol.* **144**, 161-176.
- Fein J.B., Martin A.M., Wightman P.G. (2001) Metal adsorption onto bacterial surfaces: Development of a predictive approach. *Geochim. Cosmochim. Acta* **65**, 4267-4273.
- Fowle D.A. and Fein J.B. (1999) Competitive adsorption of metal cations onto two gram positive bacteria: Testing the chemical equilibrium model. *Geochim. Cosmochim. Acta* **63**, 3059-3067.
- Gélabert, A., Pokrovsky, O.S., Schott, J., Boudou, A., Feurtet-Mazel, A., Mielczarski, J., Mielczarski, E., Mesmer-Dudons, N., Spalla, O. (2004) Study of diatoms/aqueous solution interface. I. Acid-base equilibria, surface charge and spectroscopic observation of two freshwater peryphytic and two marine planktonic diatoms. *Geochim. Cosmochim. Acta* **68**, 4039-4058.
- Gold C., Feurtet-Mazel A., Coste M., and Boudou A. (2003) Effect of cadmium stress on peryphytic diatom communities in indoor artificial streams. *Freshwater Biol.* **48**, 316-328.
- Gonzalez-Davila M., Santana-Casiano J. M., and Laglera L. M. (2000) Copper adsorption in diatom cultures. *Marine Chemistry* **70**, 161-170.
- Gunneriusson L. and Sjöberg S. (1993) Surface complexation in the H<sup>+</sup>-goethite ( $\alpha$ -FeOOH)-Hg (II) - chloride system. *J. Colloid Interface Sci.* **156**, 121-128.
- Herbelin A.L. and Westall J.C. (1996) FITEQL version 3.2, a computer program for determination of chemical equilibrium constants from experimental data. Department of Chemistry, Oregon State University. Corvallis, Oregon 97331.
- Kelly S.D., Kemner K.M., Fein J.B., Fowle D.A., Boyanov M.I., Bunker B.A., Yee N. (2002) X-ray absorption fine structure determination of pH-dependent U-bacterial cell wall interactions. *Geochim. Cosmochim. Acta* **66**, 3855-3871.
- Kiefer E., Sigg L., and Schosseler P. (1997) Chemical and spectroscopic characterization of algae surfaces. *Environ. Sci. Technol.* **31**, 759-764.
- Lane T. W. and Morel F. M. M. (2000) A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(9), 4627-4631.
- Mirimanoff N. and Wilkinson K. J. (2000) Regulation of Zn Accumulation by a Freshwater Gram-Positive Bacterium (*Rhodococcus opacus*). *Environmental Science and Technology* **34**(4), 616-622.
- Lützenkirchen J. (1999) The constant capacitance model and variable ionic strength: an evaluation of possible applications and applicability. *J. Coll. Interface Sci.* **217**, 8-18.
- Ngwenya B.T., Sutherland I.W. and Kennedy L. (2003) Comparison of the acid-base behaviour and metal adsorption characteristics of a gram-negative bacterium with other strains. *Appl. Geochem.* **18**, 527-538.

- Pokrovsky O.S., Pokrovski G.S., Gélabert A., Schott J., Boudou A. (2005) Speciation of Zn associated with diatoms using X-ray Absorption Spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 4490-4498.
- Rijstenbil J.W. and Gerringa L.J.A. (2002) Interactions of algal ligands, metal complexation and availability, and cell responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a gradual increase in copper. *Aquatic Toxicol.* **56**, 115-131.
- Schiewer S. and Volesky B. (1995) Modeling of the proton-metal ion exchange in biosorption. *Environ. Sci. Technol.* **29**, 3049-3058.
- Slaveykova V.I., Wilkinson K.J. (2002) Physicochemical aspects of lead bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 969-975.
- Slaveykova V.I. and Wilkinson K.J. (2005) Predicting the bioavailability of metals and metal complexes: Critical review of the Biotic Ligand Model. *Environ. Chem.* **2**, 9-24.
- Sunda W. G. and Huntsman S. A. (1998) Control of Cd Concentrations in a Coastal Diatom by Interactions among Free Ionic Cd, Zn, and Mn in Seawater. *Environmental Science and Technology* **32(19)**, 2961-2968.
- Sverjensky D. and Sahai N. (1996) Theoretical prediction of single-site surface-protonation equilibrium constants for oxides and silicates in water. *Geochim. Cosmochim. Acta* **60**, 3773-3797.
- Yee N. and Fein J. (2001) Cd adsorption onto bacterial surfaces: A universal adsorption edge? *Geochimica et Cosmochimica Acta* **65(13)**, 2037-2042.

Table 1. Summary of SCM parameters for Cd – diatom surface interaction. ND means non determined.

Exp. No.	Species	Electrolyte	>COOH	>NH <sub>2</sub>	>SiOH	log K <sub>COOCd</sub>	log K <sub>SiOCd</sub>	log K <sub>COONa</sub>	>COOH	>NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	>SiOH	C, F/g	V(V)
Langmuirian adsorption isotherm													
pH – dependent adsorption edge													
IS-13	SC	0,7 NaCl	-4,80	8,20	ND	6,05	ND	2,30 ?	5,52E-05	1,41E-04	ND	8	6
146	SC	0,1 NaNO <sub>3</sub>	-4,80	8,10	ND	6,02	ND	1,25 ?	1,15E-04	1,96E-04	ND	25	0,7
IS-5	SC	1 NaNO <sub>3</sub>	-4,80	8,10	ND	6,02	ND	2,30 ?	6,91E-05	1,71E-04	ND	65	26
58	TW	0,1 NaNO <sub>3</sub>	-4,90	9,70	-7,00	5,12	3,30	0,50	2,32E-05	2,55E-05	1,28E-06	1	0,6
137	TW	0,1 NaNO <sub>3</sub>	-4,80	9,70	-7,00	4,95	3,30	0,40	2,40E-05	2,50E-05	1,32E-06	10	5
57	AMIN	0,1 NaNO <sub>3</sub>	-4,80	9,70	-7,10	4,73	3,70	0,50	2,25E-05	3,21E-05	1,00E-05	32	2,3
56	AMIN	0,001 NaNO <sub>3</sub>	-4,80	9,80	-7,00	4,73	3,70	0,87	2,88E-05	2,40E-05	2,20E-06	50	13
100D	AMIN	0,01M NaNO <sub>3</sub>	-4,80	10,20	-7,00	4,73	3,70	0,87	2,25E-05	3,21E-05	1,60E-05	30	1,8
94a	NMIN	0,1 NaNO <sub>3</sub>	-4,80	8,40	-6,60	5,25	3,50	1,59	3,71E-05	4,40E-05	1,00E-05	22	1,2
94b	NMIN	0,1 NaNO <sub>3</sub>	-4,80	8,60	-6,60	5,30	3,50	1,38	3,71E-05	4,40E-05	1,00E-05	25	0,2
94c	NMIN	0,1 NaNO <sub>3</sub>	-4,80	8,60	-6,60	5,30	3,50	1,56	3,71E-05	4,40E-05	1,00E-05	27	0,5
N133	NMIN	0,1 NaNO <sub>3</sub>	-4,80	8,70	-6,80	5,25	3,50	1,38	3,71E-05	4,40E-05	1,00E-05	22	-
N132	NMIN	0,1 NaNO <sub>3</sub>	-4,80	8,70	-6,80	5,30	3,50	1,06	3,71E-05	4,40E-05	1,00E-05	20	-
N131	NMIN	0,1 NaNO <sub>3</sub>	-4,80	8,70	-6,80	5,30	3,50	1,11	3,71E-05	4,40E-05	1,00E-05	25	-
141	SC	0,01 NaNO <sub>3</sub>	-4,80	8,10	ND	6,30	ND	2,20	5,65E-05	1,38E-04	ND	127	0,2
142	SC	0,1 NaNO <sub>3</sub>	-4,80	8,10	ND	6,05	ND	2,30	1,79E-04	1,57E-04	ND	57	0,2
143	SC	1 NaNO <sub>3</sub>	-4,80	8,20	ND	6,05	ND	1,73	1,59E-04	1,41E-04	ND	48	0,6
IS-4	SC	0,1 NaNO <sub>3</sub>	-4,80	8,10	ND	6,38	ND	0,30	8,12E-05	1,01E-04	ND	13	4
93	TW	0,1 NaNO <sub>3</sub>	-4,90	9,70	-7,00	5,27	3,30	0,41	2,32E-05	2,56E-05	1,28E-06	5	0,6
86	TW	0,1 NaCl	-4,90	9,70	-7,00	5,27	3,30	0,34	2,40E-05	2,55E-05	4,06E-06	3	0,4
IS-9	TW	0,01 NaNO <sub>3</sub>	-4,90	9,70	-7,40	5,44	3,30	0,41	2,32E-05	2,56E-05	1,28E-06	6	0,1
IS-10	TW	0,01 NaCl	-4,90	9,70	-7,40	5,41	3,30	0,41	2,38E-05	2,56E-05	1,28E-06	8	0,5
38	AMIN	0,1 NaNO <sub>3</sub>	-4,80	9,70	-7,10	4,73	3,70	0,50	2,25E-05	3,21E-05	1,34E-05	27	0,7
IS-6-2	AMIN	0,1 NaNO <sub>3</sub>	-4,80	9,70	-7,10	4,73	3,70	0,5	2,37E-05	2,68E-05	1,87E-05	18	1,2
62	NMIN	0,1 NaNO <sub>3</sub>	-4,80	10,00	-6,90	5,30	3,50	1,70	3,71E-05	4,40E-05	1,00E-05	17	6

**Table 2.** Average recommended parameters of constant capacitance, surface complexation model used to describe Cd-diatoms interactions in aqueous solutions at 25°C.

Species	$\log K_1$ (>R-COOCd <sup>+</sup> )	$\log K_2$ (>SiO-Cd <sup>+</sup> )	$\log K_3$ (>R-COONa <sup>0</sup> )	[>COOH] ( $\mu\text{mol/g humid}$ )	EDL capacitance, F/g
<i>Skeletonema c.</i> (SC)	6.12 ± 0.15	N.D.	1.77 ± 0.85	102 ± 50	49 ± 41
<i>Thalassiosira w.</i> (TW)	5.24 ± 0.18	3.3 ± 0.1	0.39 ± 0.03	23.6 ± 0.4	5.0 ± 3
<i>Achnanthes m.</i> (AMIN)	4.73 ± 0.10	3.7 ± 0.1	0.72 ± 0.20	23.7 ± 2.8	34 ± 9
<i>Navicula m.</i> (NMIN)	5.2 ± 0.02	3.5 ± 0.1	1.40 ± 0.24	37.1 ± 0.1	23 ± 3

**Table 3.** Summary of SCM parameters for Pb – diatom surface interaction. ND means non determined.

Exp. No.	Species	Electrolyte	>COOH $pK_{a1}$	>NH <sub>2</sub> $pK_{a3}$	>SiOH $pK_{a2}$	$\log K_{COOH}$	$\log K_{SiOH}$	C, F/g	V(Y)															
Cl-9	AMIN	0.01 NaNO <sub>3</sub>	-4.80	10.20	-6.60	6.19	4.20	0.87	4.20	0.87	4.20	0.87	4.20	0.87	4.20	0.87	4.20	0.87	4.20	0.87	4.20	0.87	9	36
102	NMIN	0.01 NaNO <sub>3</sub>	-4.80	9.90	-7.10	5.71	4	1.25	4	1.25	4	1.25	4	1.25	4	1.25	4	1.25	4	1.25	4	1.25	36	75
Cl-2	AMIN	0.01 NaNO <sub>3</sub>	-4.80	10.20	-6.60	6.16	4.20	0.87	4.20	0.87	4.20	0.87	4.20	0.87	4.20	0.87	4.20	0.87	4.20	0.87	4.20	0.87	32	1.5
Cl-4	AMIN	0.01 NaCl	-4.80	10.20	-6.60	6.12	4.20	0.87	4.20	0.87	4.20	0.87	4.20	0.87	4.20	0.87	4.20	0.87	4.20	0.87	4.20	0.87	30	2.9
149	NMIN	0.01 NaNO <sub>3</sub>	-4.80	9.90	-7.10	6.11	4.00	0.87	4.00	0.87	4.00	0.87	4.00	0.87	4.00	0.87	4.00	0.87	4.00	0.87	4.00	0.87	25	0.1
150	NMIN	0.1 NaNO <sub>3</sub>	-4.80	9.90	-7.10	6.06	4.00	0.87	4.00	0.87	4.00	0.87	4.00	0.87	4.00	0.87	4.00	0.87	4.00	0.87	4.00	0.87	30	0.3
151	NMIN	1 NaNO <sub>3</sub>	-4.80	8.70	-6.80	6.42	4.00	0.87	4.00	0.87	4.00	0.87	4.00	0.87	4.00	0.87	4.00	0.87	4.00	0.87	4.00	0.87	13	0.9
92	TW	0.1 NaNO <sub>3</sub>	-4.90	9.70	-7.00	6.68	3.80	0.40	3.80	0.40	3.80	0.40	3.80	0.40	3.80	0.40	3.80	0.40	3.80	0.40	3.80	0.40	3	1.6

Langmuirian adsorption isotherm

pH-dependent adsorption edge

**Table 4.** Average recommended parameters of constant capacitance, surface complexation model used to describe Pb-diatoms interactions in aqueous solutions at 25°C.

N.D. stands for Non-determined because of lack of experimental data to probe one or several modeling parameters.

Species	$\log K_1$ (>R-COOPb <sup>+</sup> )	$\log K_2$ (>SiO-Pb <sup>+</sup> )	$\log K_3$ (>R-COONa <sup>0</sup> )	[>COOH] ( $\mu\text{mol/g humid}$ )	EDL capacitance, F/g
<i>Sketonema c.</i> (SC)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Thalassiosira w.</i> (TW)	6.67±0.1	3.8 ± 0.1	0.4±0.1	24.0 ± 0.2	3 ± 1
<i>Achnanthisdium m.</i> (AMIN)	6.16 ± 0.04	4.2 ± 0.1	0.87 ± 0.05	22.50 ± 0.03	33 ± 3
<i>Navicula m.</i> (NMIN)	6.12 ± 0.27	4.0 ± 0.1	0.95 ± 0.17	39.4 ± 2.2	31 ± 26

FIGURES:

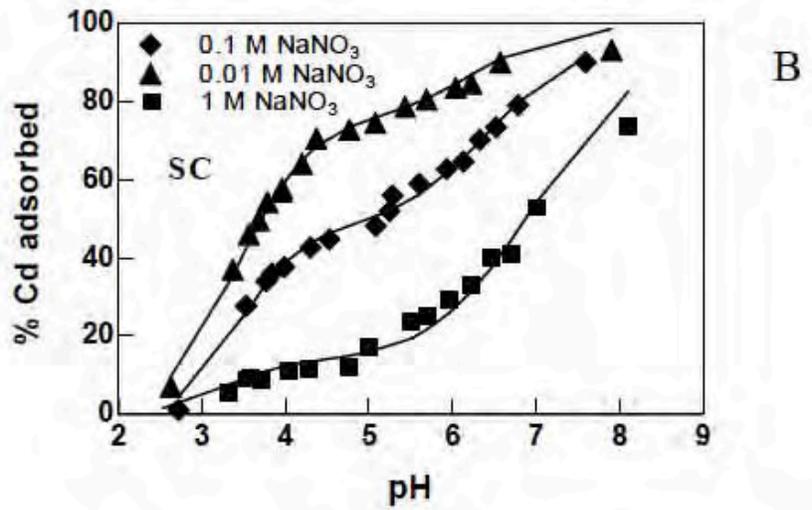
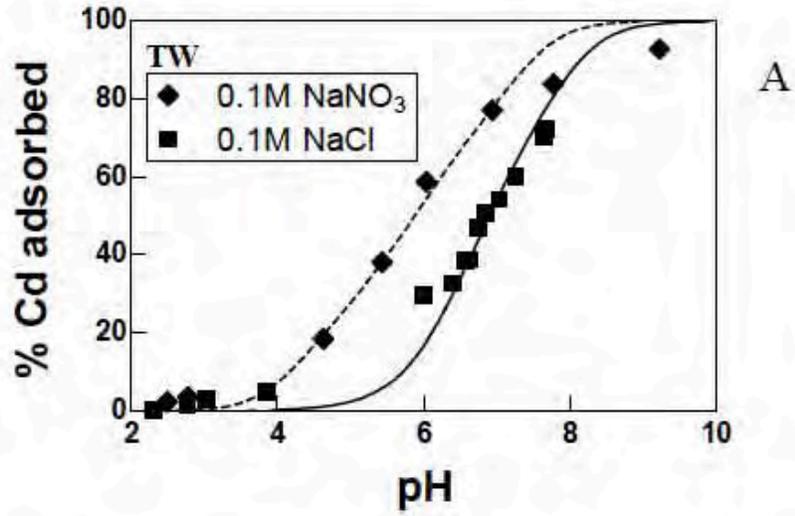
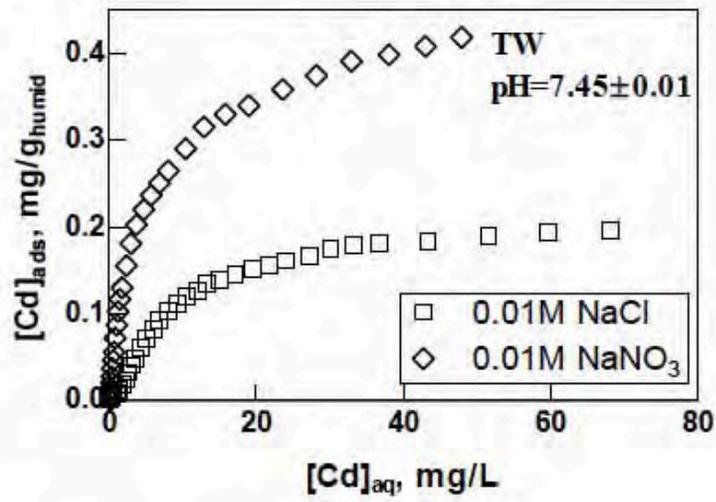
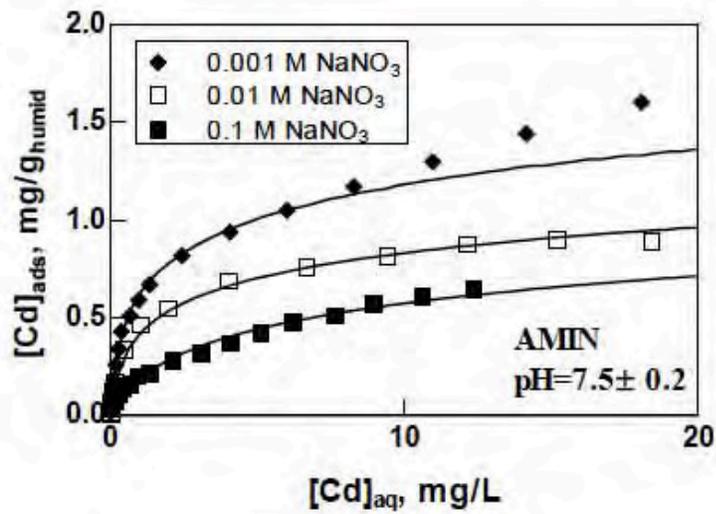


Figure 1



A



B

Figure 2

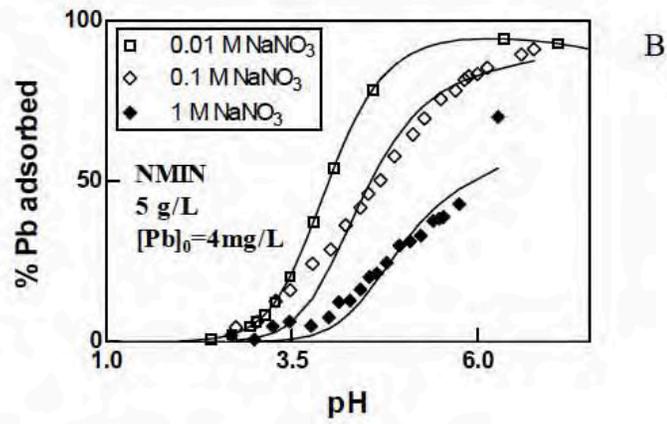
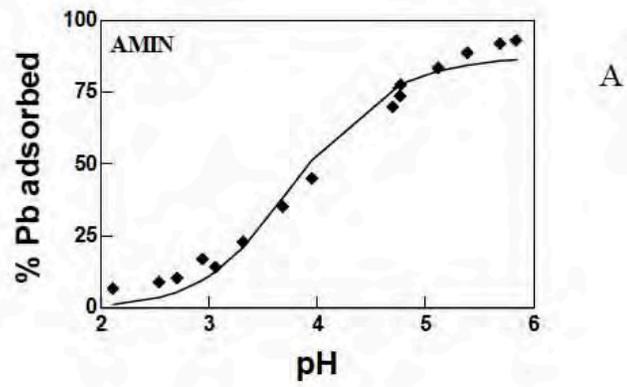


Figure 3

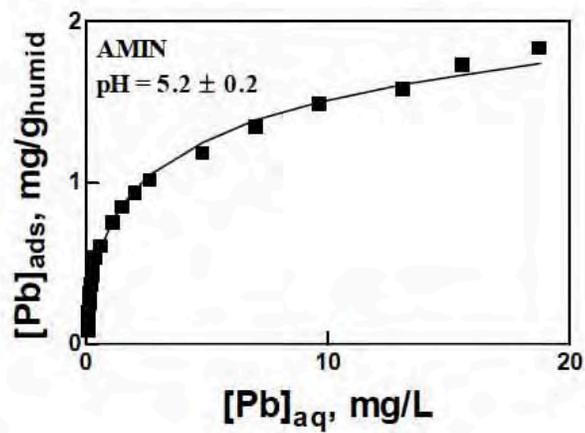


Figure 4

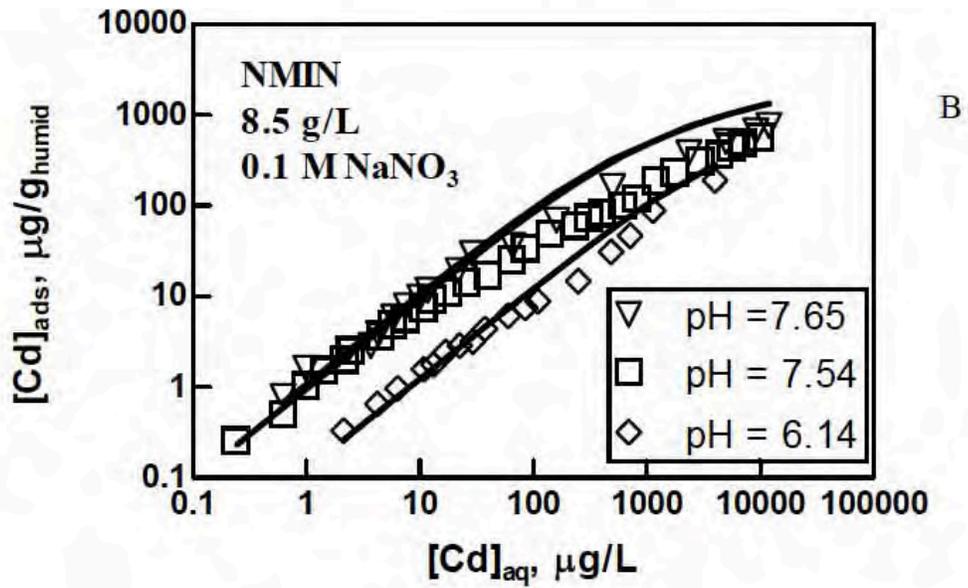
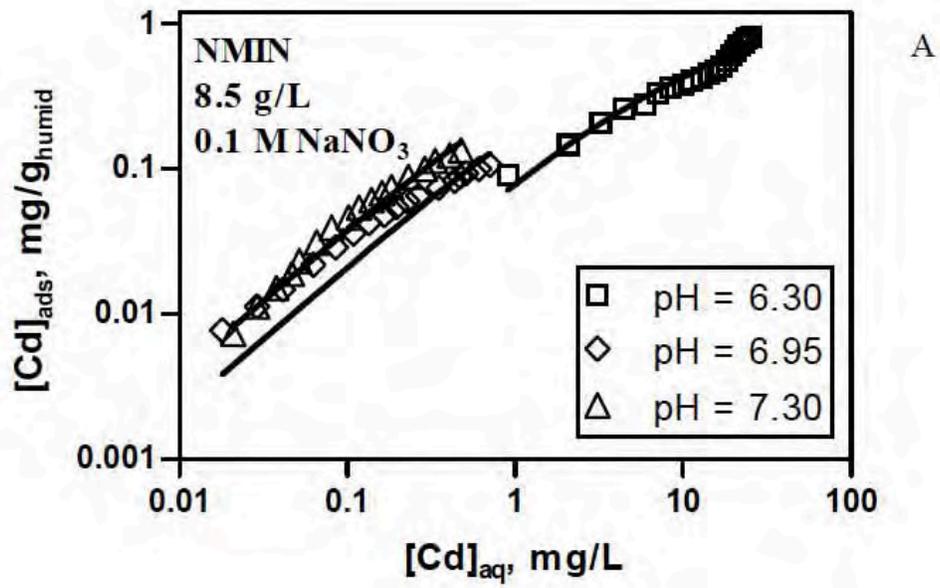


Figure5

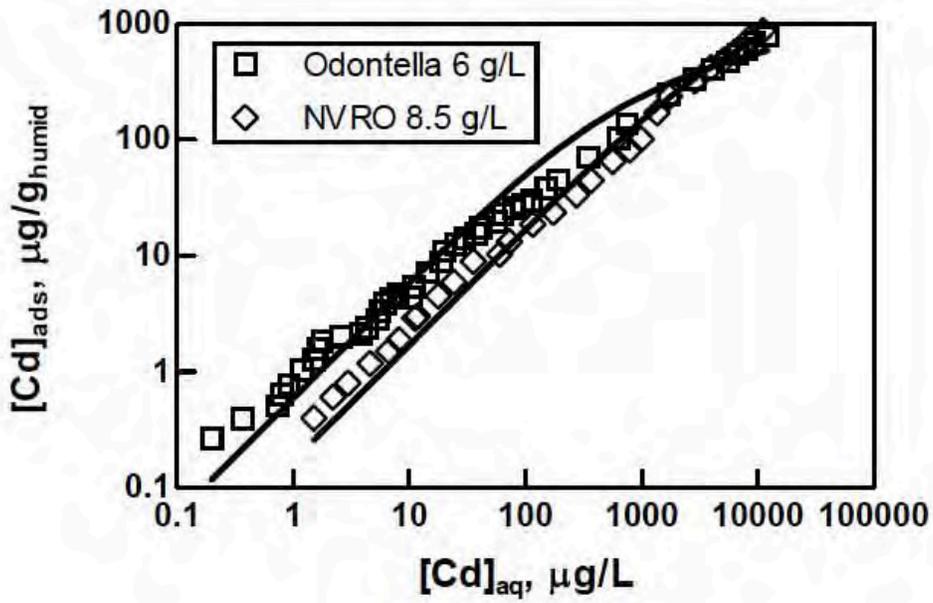


Figure6

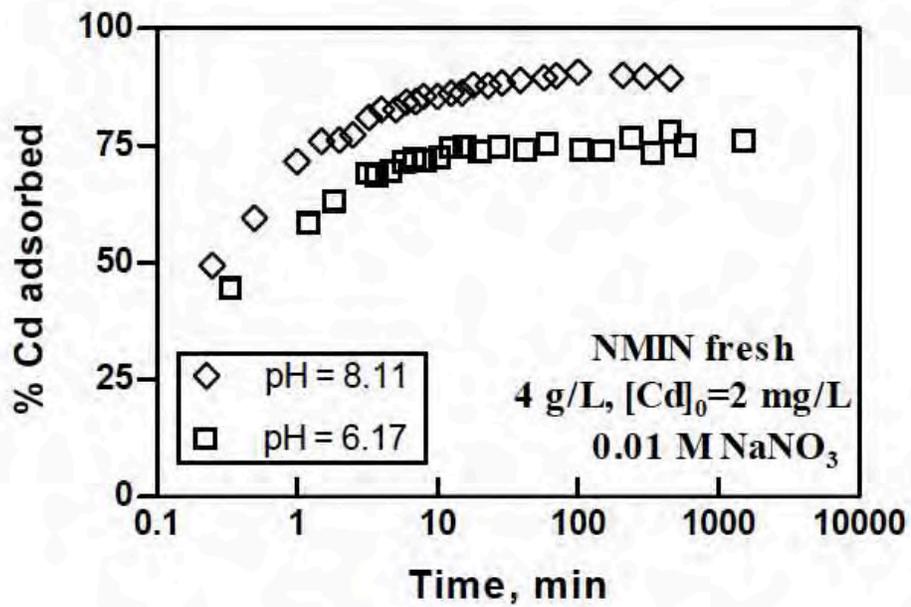


Figure7

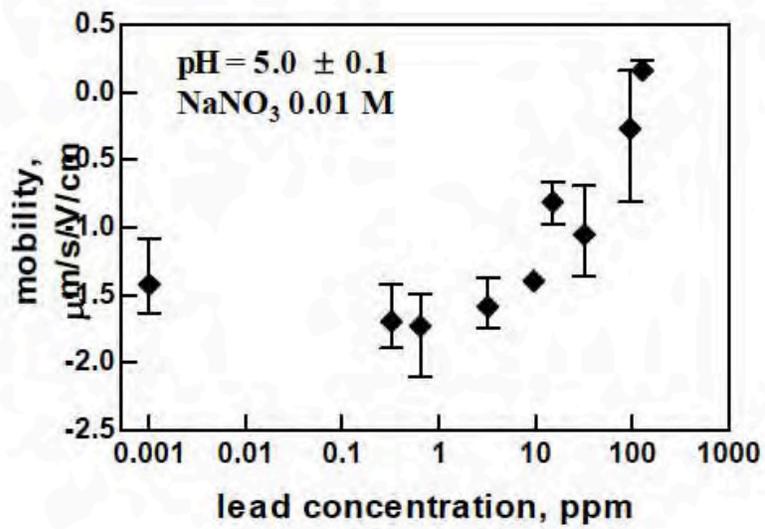


Figure 8

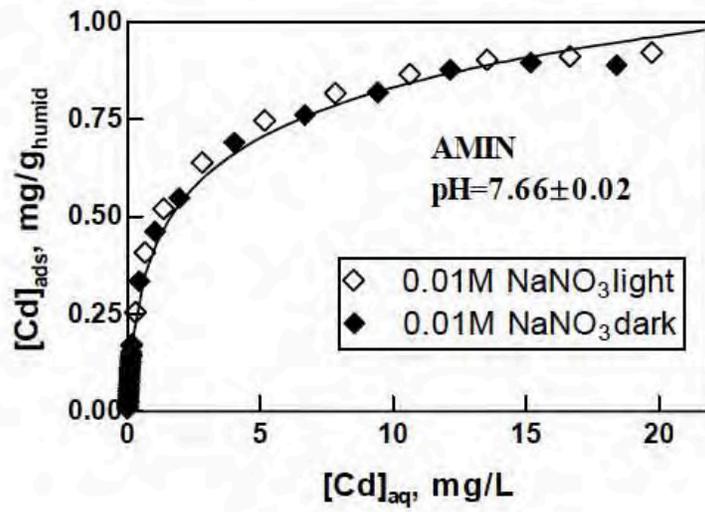


Figure 9

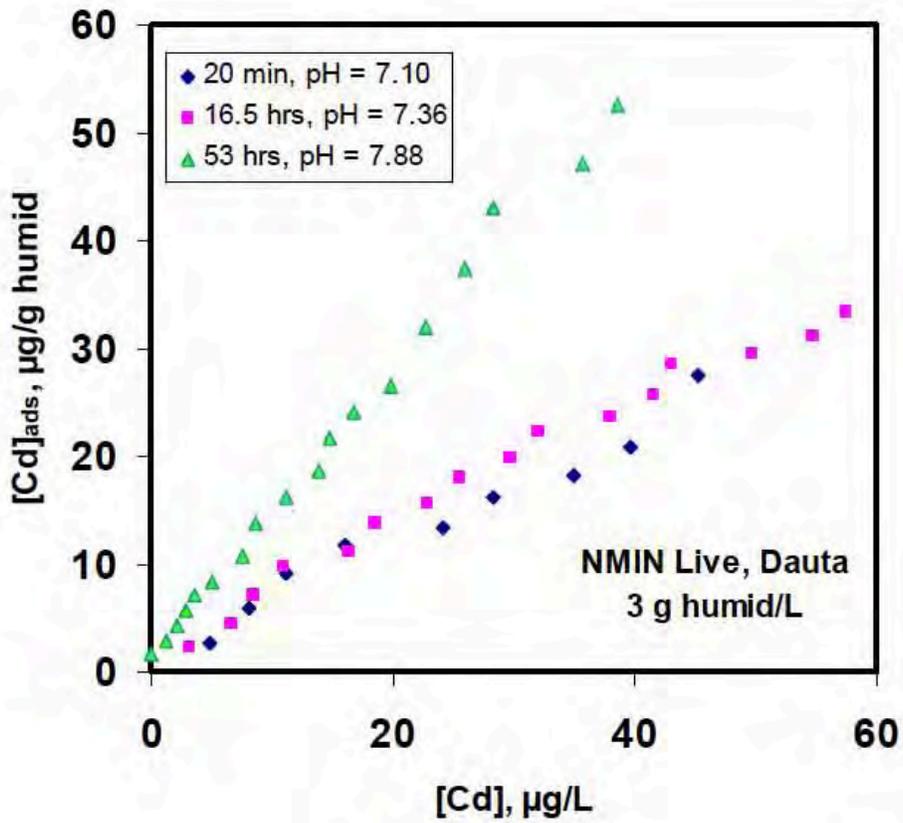


Figure 10

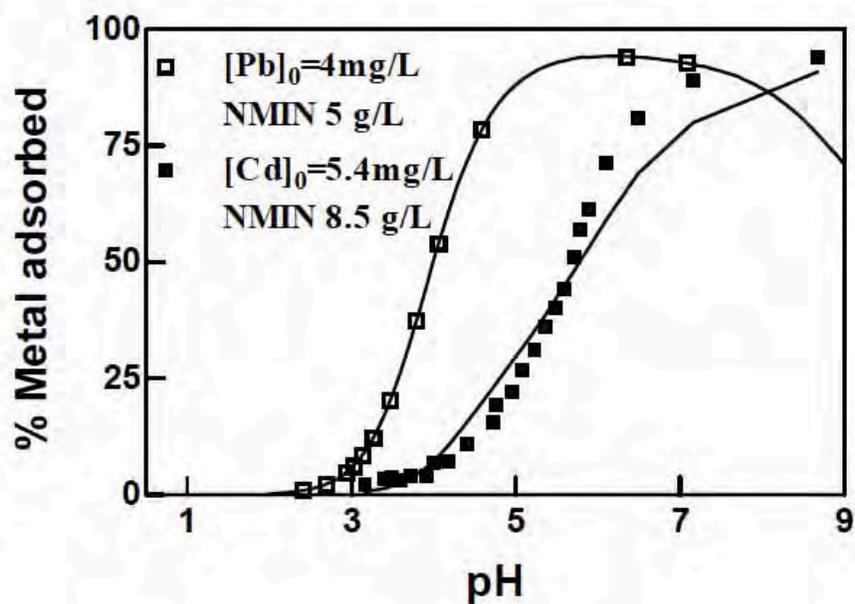


Figure 11

A

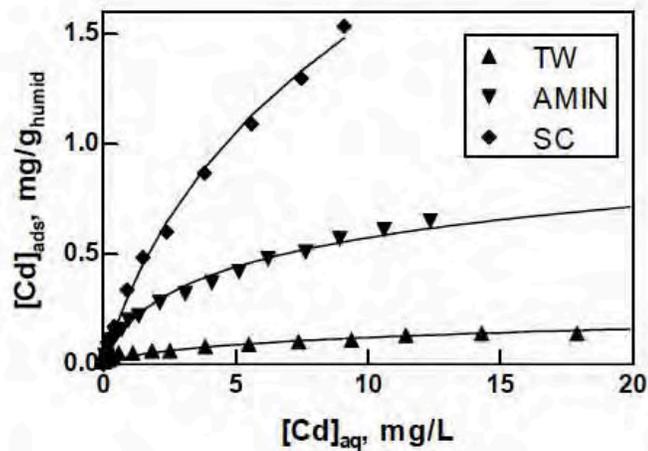
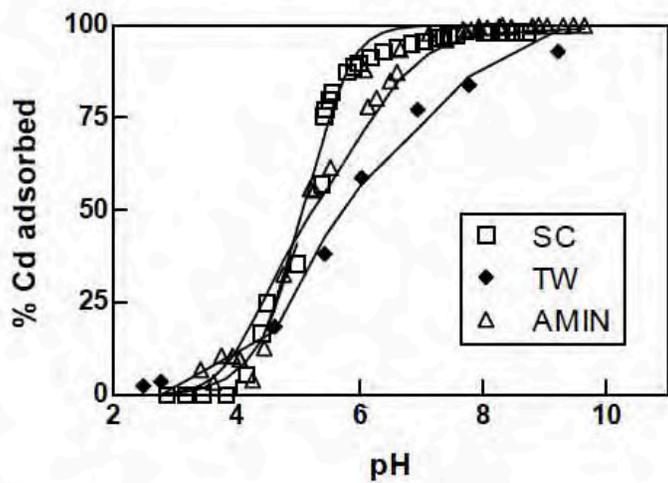


Figure 12

## **FIGURE CAPTIONS**

Fig. 1.: Adsorption of cadmium on diatom cells as a function of pH in solution. A: Adsorption of cadmium on TW cells, 35 ghumid/L, 0.1 M NaCl and 0.1 M NaNO<sub>3</sub>, [Cd]<sub>o</sub> = 2.5 mg/L; B: Adsorption of cadmium on SC cells, 7.5 ghumid/L, [Cd]<sub>o</sub> = 3 mg/L

Fig. 2.: Adsorption of cadmium as a function of metal concentration in solution for A: TW cells (49 ghumid/L) and B: AMIN cells (8.5 ghumid/L)

Fig. 3.: Adsorption of lead on diatom cells as a function of pH in solution. A: Adsorption of cadmium on AMIN cells 8.5 ghumid/L, [Cd]<sub>o</sub> = 6 mg/L, 0.01 M NaNO<sub>3</sub> B: Adsorption of cadmium on NMIN cells 5 ghumid/L, [Cd]<sub>o</sub> = 4 mg/L

Fig.4.: Adsorption of lead on AMIN cells (17 ghumid/L) as a function of metal concentration in solution

Fig. 5: Adsorption of cadmium on NMIN cells as a function of metal concentration in solution (Log plot). A: High metal concentration. B: Low metal concentration.

Fig. 6: Adsorption of cadmium on Odontella and NVRO cells as a function of metal concentration in solution 0.1 M NaNO<sub>3</sub> (Log plot) under low metal concentration. pH = 6.75± 0.05

Fig. 7: Kinetics of cadmium adsorption on viable AMIN species. Experimental conditions: at two different pH (6.17 and 8.11).

Fig. 8: Electrophoretic mobility of AMIN cells (1 g/L) exposed to lead at pH = 5.

Fig. 9: Adsorption of cadmium on AMIN cells (8.5 g/L) as a function of metal concentration in solution under dark and light.

Fig. 10: Adsorption of cadmium on live NMIN cells as a function of metal concentration in solution at three different exposure times.

Fig. 11: Difference between lead and cadmium adsorption onto NMIN in 0.01 M NaNO<sub>3</sub>

Fig. 12: Adsorption of Cd in 0.1 M NaNO<sub>3</sub> for different species (A) as a function of pH, SC at 20g/L and [Cd]<sub>0</sub>=7.8 mg/L, TW at 35g/L and [Cd]<sub>0</sub>=2.5 mg/L, AMIN at 25g/L and [Cd]<sub>0</sub>=9 mg/L and (B) as a function of metal concentration with a diatom concentration of 8.5g/L and pH = 7.3, 7.7 and 6.7 for AMIN, TW and SC respectively.

▪

---

CHAPITRE 7

INTERACTIONS AVEC CERTAINS  
ANIONS ET CATIONS  
TRIVALENTS

---

## I. INTRODUCTION

Le modèle de complexation surfacique élaboré dans ce travail a permis de caractériser les interactions entre les surfaces des diatomées et trois métaux divalents,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  et  $Pb^{2+}$ . Il est apparu intéressant pour compléter notre étude, de tester les capacités de prévision du modèle d'adsorption de métaux qui ne sont pas divalents et forment en solution des espèces hydrolysées cationiques et anioniques. Dans ce but, nous avons investigué l'adsorption en fonction du pH d'un métal trivalent, Ga(III), et de trois métaux hexavalents, W(VI), Mo(VI) et Cr (VI), sur les espèces AMIN et TW. Nous avons ensuite modélisé les données d'adsorption à l'aide de notre modèle de complexation surfacique, en effectuant seulement un ajustement minimum de ses paramètres.

## II. METHODE

### A. Adsorption des éléments

Les diatomées utilisées lors de cette étude sont l'espèce marine planctonique *Thalassiosira weissflogii* (TW) et l'espèce fluviatile périphtyque *Navicula minima* (NMIN). Des essais d'adsorption à concentration initiale constante en métal ont été effectués en fonction du pH, suivant le même protocole que lors de l'adsorption de Zn, Cd et Pb.

Les expériences ont été conduites à  $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$  dans des piluliers de 8 mL en polypropylène contenant une solution de  $\text{NaNO}_3$  0,01 M soumise à une agitation permanente. La concentration en cellule a été fixée à 8,5  $\text{g}_{\text{humide}}/\text{L}$  pour NMIN et a varié de 18,9 à 36  $\text{g}_{\text{humide}}/\text{L}$  selon les expériences pour TW. Le temps d'exposition des métaux aux cellules a été de trois heures. Le pH a été ajusté à la valeur désirée à l'aide de solutions de NaOH et  $\text{HNO}_3$  et de l'eau stérile déionisée (MilliQ, 18  $\text{m}\Omega$ ) purgée du  $\text{CO}_2$  sous bullage d'azote.

A la fin des expériences, la suspension a été centrifugée et le surnageant a été filtré à l'aide de filtres en nylons de 0,22  $\mu\text{m}$ . Le filtrat a été acidifié avec de l'acide nitrique bi-distillé et stocké au réfrigérateur jusqu'à analyse. La concentration de métal adsorbé dans chaque pilulier a été calculée en soustrayant la quantité de métal présent dans le surnageant de la quantité totale introduite en début d'expérience.

## B. Analyses par ICP-MS

Les concentrations en solution des métaux étudiés (W, Cr, Mo, Ga) ont été déterminées par mesures ICP-MS (Elan 6000, Perkin Elmer). L'Indium a été utilisé comme standard externe et les interférences dues à la formation d'oxydes et hydroxydes métalliques ont été corrigées suivant la méthode de Aries et al. (2000). Le géostandard international SLRS-4 (Riverine Water Reference Material for Trace Metals certifié par le National Research Council of Canada) a été utilisé pour contrôler la validité et la reproductibilité des analyses. Une bonne correspondance entre nos différentes mesures de SLRS-4 et les valeurs certifiées a été obtenue (différence relative inférieure à 10%).

## III. RESULTATS D'ADSORPTION

### A. ADSORPTION DES METAUX HEXAVALENTS

L'adsorption de W et Mo est maximale en milieu acide puis décroît. Dans le cas du tungstène, cette décroissance s'amorce dès pH= 4 (pour TW) et 5 (pour NMIN) ; et dans le cas du molybdène, elle commence à pH = 6 (NMIN).

Le comportement du chrome est différent puisque sa désorption en fonction du pH se produit en deux étapes : une première décroissance autour de pH = 3,5, est suivie d'un palier puis d'une seconde décroissance à pH~6,5 pour aboutir à un second palier (avec une adsorption autour de 25%).

### B. ADSORPTION DU GALLIUM

Les caractéristiques d'adsorption du gallium, proches de celles de W et Mo, sont nettement différentes de celles des métaux divalents puisque l'adsorption de ce métal commence dès pH=1,5 et que sa désorption se produit à partir de pH=6 (NMIN) ou pH=8 (TW).

## IV. MODELISATION ET DISCUSSION

L'examen de la spéciation aqueuse des métaux étudiés permet de comprendre leur comportement lors de l'adsorption. Les trois métaux hexavalents investigués sont présents sous la forme de leur acide non dissocié H<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> et H<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> en milieu acide (pH<3,5 pour W et Mo, et pH<0 pour Cr), et sous forme d'oxyanions WO<sub>4</sub><sup>2-</sup> et MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> aux pH≥3,5 et, pour Cr, sous forme de HCrO<sub>4</sub><sup>-</sup> jusqu'à pH ~ 6 et CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup> au-delà.

La modélisation de l'adsorption de ces trois métaux a pu être décrite par la formation d'un complexe chargé négativement sur les groupements aminés suivant la réaction :



où A<sup>2-</sup> représente WO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ou CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Dans le cas du chrome, afin de rendre compte du palier d'adsorption à pH≥5, nous avons considéré une réaction supplémentaire qui conduit à la formation d'un complexe aminé neutre.



L'hydrolyse rapide du gallium en solution (dès pH=2) conduit à la formation successive de GaOH<sup>2+</sup>, Ga(OH)<sub>2</sub><sup>+</sup>, Ga(OH)<sub>3</sub> et Ga(OH)<sub>4</sub><sup>-</sup> qui est l'espèce aqueuse dominante du gallium à pH>4,5. Dans ce cadre, nous avons décrit l'adsorption du gallium à partir de trois réactions d'adsorption du gallium respectivement sur les sites carboxyliques et aminés de la paroi organique et les sites silanols du frustule :



Les constantes de formation des différents complexes surfaciques formés ont été déterminés à l'aide du logiciel FITEQL3.2 dans le cadre d'un modèle de capacitance constante de la double couche. Les constantes d'hydrolyse des métaux en solution ont été tirées de la base de données CRITICAL (W, Mo, Cr) et de BENEZETH et al., 1997 (Ga) mais les paramètres du modèle de spéciation surfacique des diatomées (densité et pKa et

capacitance des sites) ont été ceux utilisés pour les modélisations avec les métaux divalents. Le logiciel FITEQL3.2 a permis de déterminer les valeurs des constantes de stabilité des différents complexes surfaciques envisagés. Il est important de signaler que ces valeurs doivent être seulement considérées comme des paramètres ajustables et qu'aucunes contraintes ne leur ont été imposées. Les valeurs des paramètres utilisés lors de cette modélisation sont regroupées dans le tableau 10.

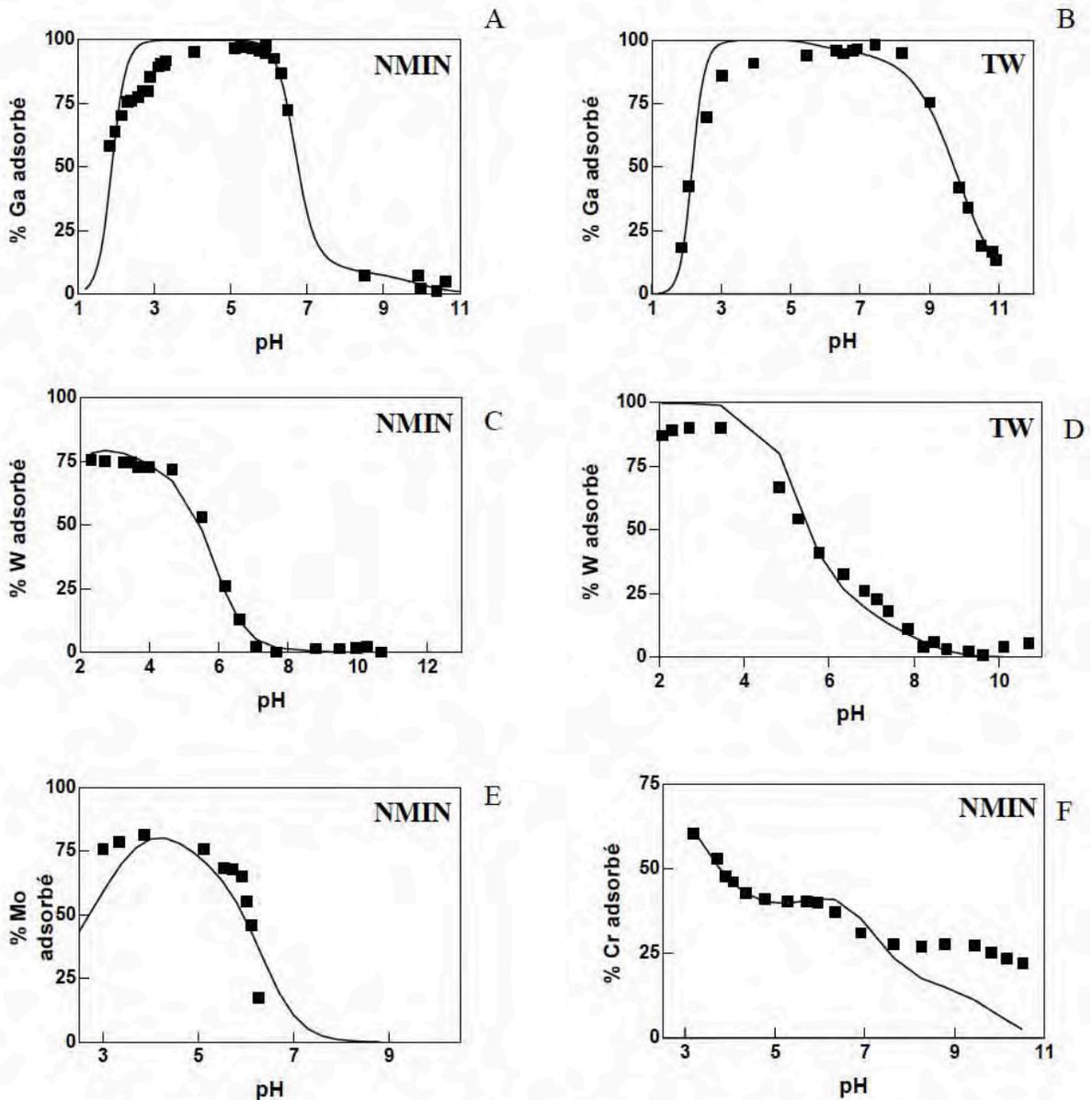


Figure 36 : Adsorption en fonction du pH A) de Ga(III) ( $0,7 \cdot 10^{-6}$  M) sur NMIN (8,5 g/L); B) de Ga(III) ( $7,5 \cdot 10^{-8}$  M) sur TW (26,5 g/L); C) de W ( $0,63 \cdot 10^{-6}$  M) sur NMIN (8,5 g/L); D) de W ( $0,63 \cdot 10^{-6}$  M) sur TW (36 g/L); E) de Mo ( $1,25 \cdot 10^{-6}$  M) sur NMIN (8,5 g/L) et F) de Cr(VI) ( $9,6 \cdot 10^{-6}$  M) sur NMIN (8,5 g/L).

Espèce	élément	nCOOH, mol/g	nNH3, mol/g	nSiOH, mol/g	Log K <sub>COO-</sub>	Log K <sub>NH3+</sub>	Log K <sub>SiO-</sub>	Log K <sub>COONa</sub>	C, F/g	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>	K <sub>4</sub>	K <sub>5</sub>
NMIN	Ga(III)	3,81E-05	4,40E-05	1,60E-05	-4,80	10,00	-6,90	-4,00	20	-	-	2,45	1,87	-2,86
TW	Ga(III)	2,32E-05	2,55E-05	1,28E-06	-4,90	9,70	-7,40	-4,50	5	-	-	2,59	1,37	-2,08
TW	W	2,32E-05	2,56E-05	1,28E-06	-5,00	9,80	-7,50	-	9	11,5	-	-	-	-
NMIN	W	3,71E-05	4,40E-05	1,00E-05	-3,40	10,00	-6,90	-	12,5	12,0	-	-	-	-
NMIN	Mo	4,11E-05	4,20E-05	1,60E-05	-3,40	10,00	-6,90	-	10	13,6	-	-	-	-
NMIN	Cr(VI)	4,11E-05	4,40E-05	1,60E-05	-3,40	10,20	-6,90	-	54	13,7	19,9	-	-	-

**Tableau 10 : Paramètres de modélisation utilisés pour décrire l'adsorption de Ga(III), W(VI), Mo(VI) et Cr(VI) à la surface de deux espèces de diatomées.**

Les courbes de modélisation obtenues (trait plein sur la figure) donnent une représentation qualitative correcte des points expérimentaux. En particulier, le comportement de Ga, Mo et de W lors de leur adsorption à la surface des deux espèces de diatomées est bien décrit par le modèle. L'adsorption de Cr(VI) n'est décrite de manière satisfaisante qu'aux pH<8, avec une valeur élevée de la capacitance (il s'agit de la valeur maximum de capacitance acceptable pour les surfaces de NMIN).

On peut conclure de cette étude que le modèle que nous avons élaboré dans le cadre de cette thèse qui décrit avec précision l'adsorption des métaux divalents Pb<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> et Cd<sup>2+</sup>, est directement applicable, sans modifications importantes, à la caractérisation de l'adsorption de W, Mo, Cr et Ga bien que ces métaux aient des degrés d'oxydation très différents et qu'ils sont généralement présents en solution sous forme d'oxyanions. Ces essais illustrent ainsi la robustesse du modèle développé dans ce travail pour décrire les interactions métaux-diatomées.

---

# CONCLUSION

---

Le but de ce travail était d'effectuer une caractérisation physico-chimique des interactions métaux-diatomées. Les résultats obtenus au cours de cette étude et leur application concernant les sciences de l'environnement sont résumés dans les pages suivantes.

## I. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES INTERACTIONS METAUX-DIATOMEES

Nos travaux ont permis de développer un modèle de complexation surfacique qui décrit les propriétés physico-chimiques d'adsorption des métaux (principalement Zn, Pb, Cd mais aussi Ga, W, Mo et Cr) sur les surfaces des diatomées. Des mesures par spectroscopie d'absorption des RX (XAFS) ont permis de caractériser à l'échelle atomique la nature des complexes formés par le zinc à la surface des diatomées et à l'intérieur des cellules. En association avec la détermination des fractionnements isotopiques du Zn induits par les processus d'adsorption et d'incorporation, cette étude est à même de fournir une base solide pour quantifier les interactions entre les diatomées et les métaux et leurs isotopes et analyser l'impact des diatomées sur le transport des métaux dans les processus géochimiques et environnementaux.

### A. Structure chimiques des parois de diatomées

Différentes techniques complémentaires ont été utilisées afin de déterminer la structure et les propriétés physiques des parois cellulaires des diatomées, pour lesquelles très peu de descriptions étaient disponibles jusqu'à présent.

Les principaux constituants de la surface des diatomées sont : les protéines qui représentent entre 10 et 30 % de la partie organique de la paroi cellulaire, les polysaccharides, entre 30 et 40 %, et les groupes aliphatiques (30 à 60%). Ces molécules comportent des sites fonctionnels impliqués dans les processus d'adsorption des protons, hydroxyles et des métaux à la surface des diatomées, principalement les sites carboxyliques et aminés à la surface de la paroi cellulaire et les groupes silanols à la surface du frustule siliceux.

Ces molécules sont disposées en couches successives ce qui explique les différences entre le pH du point isoélectrique (1-2) et le pH du point de charge nulle (6-9) observées pour les quatre espèces. Les groupes carboxyliques sont majoritaires au niveau des couches les plus externes de la paroi cellulaire (polysaccharides) alors que les groupes aminés se localisent principalement au niveau des couches les plus profondes. Cette conformation tridimensionnelle de la paroi cellulaire des diatomées est confirmée par une densité de sites dans la paroi organique qui est un ordre de grandeur supérieure à celle à la surface du frustule. Le revêtement organique joue ainsi un rôle déterminant dans le contrôle de la charge surfacique et l'adsorption des métaux.

Des différences importantes de structure de la paroi cellulaire et de répartition de la charge surfacique ont été mises en évidence entre les espèces marines et estuariennes : les espèces planctoniques marines ont une proportion de silice moins importante et un revêtement organique plus épais que les espèces fluviatiles périphytiques.

## B. Modélisation des titrages acido-basiques

L'approche thermodynamique utilisée dans cette étude a permis de caractériser les réactions chimiques, ainsi que leurs constantes d'équilibre, qui se produisent aux interfaces solution/diatomée. Cette modélisation a été faite dans le cadre d'un modèle de double couche à capacitance constante, à l'aide du logiciel FITEQL 3.2.

Les concentrations relatives des différents groupes surfaciques varient d'une espèce à l'autre. Nous avons trouvé les valeurs suivantes pour les rapports  $\{>\text{COOH}\} : \{>\text{NH}_3\} : \{>\text{SiOH}\} : 1:1:0.1, 1:10:0, 1:1:0.4$  et  $1:1:0.3$  pour TW, SC, AMIN et NMIN, respectivement. De même, les densités de sites sont égales à 0.35, 0.94, 0.19, 0.28 mmol/m<sup>2</sup> respectivement pour TW, SC, AMIN et NMIN.

## C. Adsorption des métaux (Zn, Pb, Cd)

Différents paramètres externes comme le pH, la concentration en biomasse ou en métaux, la force ionique de la solution et la température sont à même de contrôler la

complexation de Zn, Cd et Pb à la surface des diatomées.

Un modèle de complexation surfacique, utilisant les densités de sites et leurs constantes de protonation intrinsèques déterminées à partir des titrages acido-basiques, a été élaboré pour décrire l'adsorption des métaux à la surface des diatomées. Les principaux sites responsables de l'adsorption des métaux à la surface des diatomées sont les sites carboxyliques situés au niveau des polysaccharides et les sites aminés pour les complexes anioniques des métaux. Les sites silanols n'y sont que faiblement impliqués (généralement moins de 10 % et toujours moins de 30 %). De plus, le fait que la majorité des métaux adsorbés à la surface soient associés avec le revêtement organique et non avec le frustule implique, qu'à la mort des diatomées, la majeure partie des métaux qu'elles ont piégés sera relarguée dans le milieu extérieur au moment de la dégradation de la cellule par les microorganismes.

Les constantes de stabilité pour chaque métal étudié sont du même ordre de grandeur pour les quatre espèces de diatomées. Toutefois des différences dans les capacités d'adsorption existent d'une espèce à l'autre. Les capacités d'adsorption des surfaces de diatomées pour les métaux se classent suivant l'ordre : SC > NMIN > AMIN > TW. Ce classement suit la densité de sites carboxyliques à la surface des parois cellulaires :  $1.17 \cdot 10^{-4}$ ,  $3.90 \cdot 10^{-5}$ ,  $2.59 \cdot 10^{-5}$ ,  $2.37 \cdot 10^{-5}$  mol.g<sup>-1</sup> pour SC, NMIN, AMIN et TW, respectivement. L'affinité des métaux pour les surfaces suit l'ordre : Pb > Cd > Zn qui est le même que celui observé lors de l'adsorption de Zn sur de nombreux matériaux inorganiques.

Quelques essais supplémentaires d'adsorption effectués avec W, Mo, Cr et Ga, ont pu être ainsi décrits en utilisant les mêmes valeurs des paramètres du modèle de complexation surfacique développé dans ce travail, bien que ces métaux aient des degrés d'oxydation différents et se présentent généralement sous forme anionique en solution. Ces essais valident la robustesse du modèle développé dans ce travail.

Les données isotopiques du zinc ont montré un enrichissement des cellules et des frustules en isotope lourd lors de son adsorption ou de son incorporation, avec un fractionnement  $\Delta^{66}\text{Zn}(\text{solide-solution}) = 0.3 \pm 0.1$  ‰. L'enrichissement des diatomées en isotope lourd est lié à la formation de complexes tétracoordinés du Zn dans lesquels <sup>66</sup>Zn est plus fortement attaché que les aqua ions du zinc en coordinence 6. Ce travail permet ainsi d'établir les bases d'utilisation des isotopes du Zn comme traceurs de processus

biogéochimiques.

La caractérisation par EXAFS des complexes formés entre le zinc et les diatomées montre que durant l'incorporation et l'adsorption, le zinc réduit sa coordinance de 6 ( $Zn^{2+}$  coordonné à 6 molécules d'eau) à 4 (complexes tétracoordonnés, généralement avec les atomes d'oxygène des groupes fonctionnels de la cellule).

A la surface des cellules de toutes les diatomées, le zinc forme des complexes monodentates reliés à un ou deux groupes carboxyliques, en accord avec le modèle de spéciation surfacique déduit de nos expériences de titrage et d'adsorption du zinc. L'environnement du zinc incorporé dans les cellules, au terme de la croissance des diatomées dans les solutions de nutriment, est significativement différent de celui du zinc adsorbé. Il est dominé par O (ou N) dans sa première sphère de coordination avec la présence dans la deuxième sphère d'un atome de phosphore et de deux atomes de carbone excepté dans SC pour laquelle Zn est coordonné à deux atomes de O / N et deux atomes de soufre. Cette étude montre que le zinc incorporé dans les cellules peut être associé à des groupements phosphoryles et carboxyles des peptidoglycanes, à des groupes fonctionnels de chaînes latérales d'acides aminés comme la fonction carboxylique de l'acide glutamique, des enzymes comportant de l'histidine, des polyphosphates, ou encore des acides carboxyliques simples responsables du stockage du zinc dans la cellule.

## II. APPORTS DE NOTRE ETUDE

Cette étude a permis de fournir une description détaillée de la surface des diatomées et une caractérisation des processus d'adsorption des métaux avec, en particulier, l'élaboration d'un modèle de complexation surfacique. Jusqu'à présent cette démarche n'avait été appliquée qu'aux bactéries. Elle permet de mettre en évidence des différences importantes dans les propriétés surfaciques de ces deux types d'organismes. Ainsi, si l'adsorption des métaux sur les surfaces biologiques implique souvent les mêmes groupes fonctionnels, en particulier les fonctions carboxyliques, les propriétés d'adsorption et donc l'impact des microorganismes sur leur environnement sont très différents y compris au sein d'une même espèce comme cela a été montré pour les diatomées SC et TW. Enfin, et surtout, elle fournit un modèle pour étudier quantitativement l'impact géochimique et environnemental des diatomées dans les milieux aquatiques.

### III. APPLICATIONS AUX THEMATIQUES ENVIRONNEMENTALES

La caractérisation physico-chimique des interactions métaux – diatomées effectuée dans ce travail permet d’utiles applications à des thématiques environnementales. C’est ce qui est montré dans cette partie avec deux exemples traitant respectivement de biorémediation et de systèmes aquatiques naturels.

#### A. Outil de biorémediation

Les propriétés de complexation des métaux par les diatomées déterminées au cours de ce travail sont comparables avec celles d’autres matériels biologiques comme les bactéries ou les algues. A titre comparatif, le tableau 11 présente les capacités d’adsorption de plusieurs algues (d’après Klimmek et al. (2001)) et microorganismes (d’après Ledin (2000)) utilisés comme agents de biorémediation ainsi que celles des diatomées que nous avons étudiées (listée au bas du tableau).

Les espèces de diatomées examinées apparaissent comme de bons agents potentiels de biorémediation pour le zinc et le cadmium puisqu’elles se trouvent dans la gamme des capacités d’adsorption des autres microorganismes; c’est en particulier le cas de SC qui se situe parmi les espèces ayant la plus grande capacité d’adsorption. En revanche TW a des capacités d’adsorption plus faibles. Toutefois, des études complémentaires plus précises seraient nécessaires pour évaluer plus rigoureusement les capacités de complexation des diatomées dans une optique d’utilisation en biorémediation.

Espèce	Pb (mmol/g)	Cd (mmol/g)	Zn (mmol/g)	Références
<i>S. hofmani</i>	0.85	0.33	0.37	Klimmek et al., 2001
<i>L. taylorii</i>	0.84	0.32	0.37	Klimmek et al., 2001
<i>A. densus</i>	0.80	0.24	0.23	Klimmek et al., 2001
<i>K. spiculiformis</i>	0.71	0.34	0.42	Klimmek et al., 2001
<i>V. dichotoma</i>	0.70	0.28	0.42	Klimmek et al., 2001
<i>C. kessleri</i>	0.55	0.24	0.14	Klimmek et al., 2001
<i>M. species</i>	0.54	0.25	0.24	Klimmek et al., 2001
<i>N. parmeloïdes</i>	0.50	0.23	0.23	Klimmek et al., 2001
<i>S. maxima</i>	0.49	0.27	0.18	Klimmek et al., 2001
<i>C. vulgaris</i>	0.46	0.29	0.28	Klimmek et al., 2001
<i>G. longicauda</i>	0.44	0.27	0.25	Klimmek et al., 2001
<i>R. spiculiforme</i>	0.40	0.25	0.11	Klimmek et al., 2001
<i>A. hantzschii</i>	0.39	0.27	0.27	Klimmek et al., 2001
<i>S. platensis</i>	0.38	0.29	0.37	Klimmek et al., 2001
<i>P. tricornutum</i>	0.36	0.23	0.23	Klimmek et al., 2001
<i>M. aeruginosa</i>	0.35	0.23	0.25	Klimmek et al., 2001
<i>P. purpureum</i>	0.33	0.18	0.19	Klimmek et al., 2001
<i>T. species</i>	0.30	0.13	0.24	Klimmek et al., 2001
<i>G. verrucosa</i>	0.24	0.15	0.16	Klimmek et al., 2001
<i>C. species</i>	0.23	0.20	0.10	Klimmek et al., 2001
<i>A. cylindrica</i>	0.22	0.14	0.11	Klimmek et al., 2001
<i>S. laxissima</i>	0.22	0.22	0.18	Klimmek et al., 2001
<i>G. planctonica</i>	0.21	0.06	0.07	Klimmek et al., 2001
<i>S. species</i>	0.19	0.24	0.36	Klimmek et al., 2001
<i>P. species</i>	0.19	0.17	0.11	Klimmek et al., 2001
<i>A. africanum</i>	0.18	0.17	0.17	Klimmek et al., 2001
<i>E. magnus</i>	0.16	0.09	0.06	Klimmek et al., 2001
<i>D. salina</i>	0.10	0.07	0.06	Klimmek et al., 2001
<i>A. inaequalis</i>	0.10	0.08	0.10	Klimmek et al., 2001
<i>D. bioculata</i>	0.02	0.05	0.04	Klimmek et al., 2001
<i>Pseudomonas cepacia</i>		0,05		Savvaïdis et al., 1992
<i>Escherichia coli</i>	0.65			Premuzic et al., 1991
<i>Bacillus simplex</i>		0,011		Valentine et al., 1996
<i>Bacillus subtilis</i>		0,007		Valentine et al., 1997
<i>Bacillus subtilis</i>		1	1,1	Cotoras et al., 1992
<i>Streptomyces griseus</i>		0,25		Matis and Zouboulis, 1994
<i>Rhodococcus</i>		0,0015	0,0015	Plette et al., 1996c
<i>Aspergillus niger</i>		0,04		Mullen et al., 1992
<i>Rhizopus arrhizus</i>	0,9	0,4	0,55	Fourest et al., 1994
<i>Rhizopus arrhizus</i>		0,049	0,034	Morley and Gadd, 1995
<i>Trichoderma firiide</i>		0,078	0,047	Morley and Gadd, 1995
AMIN	0,17	0,3	0,17	cette étude
SC		0,4	0,5	cette étude
NMIN	0,15	0,14	0,3	cette étude
TW		0,05	0,04	cette étude

Tableau 11 : comparaison des capacités de complexation de divers microorganismes

## B. Contrôle des systèmes naturels

Du fait de leur concentration élevée dans un très grand nombre de systèmes aquatiques, les diatomées sont à même de contrôler la spéciation des métaux présents dans ces milieux.

Afin d'illustrer ces capacités, nous avons utilisé le modèle élaboré dans ce travail afin de prédire la spéciation du cadmium et du zinc dans des conditions représentatives des milieux aquatiques naturels contenant :

1) des diatomées NMIN à des concentrations de  $0.2 \text{ g}_{\text{humide}}/\text{L}$  (soit  $2 \cdot 10^7$  cellules par litre, ce qui est la concentration maximum dans les eaux naturelles) et  $0.01 \text{ g}_{\text{humide}}/\text{L}$  ( $10^6$  cellules par litre, concentration typique) ;

2) une argile (Na-montmorillonite), qui représente la matière inorganique en suspension, à la concentration  $1 \text{ g/L}$  et  $0.1 \text{ g/L}$  ;

3) du zinc et du cadmium à des teneurs respectives de 60 et 0.25 ppb, correspondant à des concentrations de rivières française (Loubet et al., 2003)

Les calculs de spéciation ont été faits à l'aide du logiciel FITEQL 3.2. Les paramètres du modèle de complexation surfacique des diatomées déterminés dans ce travail ont été utilisés pour décrire l'adsorption des métaux sur NMIN. L'adsorption sur la montmorillonite a été introduite dans le logiciel comme si la montmorillonite était un ligand en solution d'un ligand en solution dans le cas de l'adsorption de Cd, et comme deux ligands en solution (un ligand fortement complexant et un ligand faiblement complexant), dans le cas de l'adsorption de Zn. Les paramètres de modélisation de la montmorillonite sont donnés dans le tableau 12 (Bradbury and Baeyens, 2005).

Les résultats des modélisations sont représentés sur la figure 37. Dans tous les cas le piégeage des métaux par les diatomées est significatif par rapport à celui par l'argile. Quand la concentration en diatomée est importante ( $0.2 \text{ g/L}$ ) et celle de l'argile est faible ( $0.1 \text{ g/L}$ ), les diatomées contrôlent plus de 50 % du zinc à pH neutre. Dans les autres cas, aux pH des eaux naturelles (6.5 – 7), le contrôle exercé par les surfaces biologiques et inorganiques est équivalent.

Site	Densité (mol/kg)	Constantes de protonation et de complexation	Références
$>S^sOH$	$2.10^{-3}$	$>S^sOH + H^+ = >S^sOH_2^+ \quad \log K = 4.5$	Bradbury and Baeyens, 2005
		$>S^sOH = >S^sO^- + H^+ \quad \log K = -7.9$	
$>S^sOH$	$2.10^{-3}$	$>S^sOH + Cd^{2+} = >S^sOCd^+ + H^+ \quad \log K = -1.0$	Zachara et al., 1993
		$>S^sOH + Zn^{2+} = >S^sOZn^+ + H^+ \quad \log K = 1.6$	Baeyens and Bradbury, 1997
$>S^wOH$	$4.10^{-2}$	$>S^wOH + H^+ = >S^wOH_2^+ \quad \log K = 4.5$	Bradbury and Baeyens, 2005
		$>S^wOH = >S^wO^- + H^+ \quad \log K = -7.9$	
$>S^wOH$	$4.10^{-2}$	$>S^wOH + Cd^{2+} = >S^wOCd^+ + H^+ \quad \log K = ND$	Baeyens and Bradbury, 1997
		$>S^wOH + Zn^{2+} = >S^wOZn^+ + H^+ \quad \log K = -2.7$	

Tableau 12: Paramètres de modélisation de l'adsorption de Cd et Zn sur une montmorillonite sodique.  $>S^sOH$  et  $S^wOH$  représentent respectivement des sites surfaciques de fort et faible affinité pour les métaux.

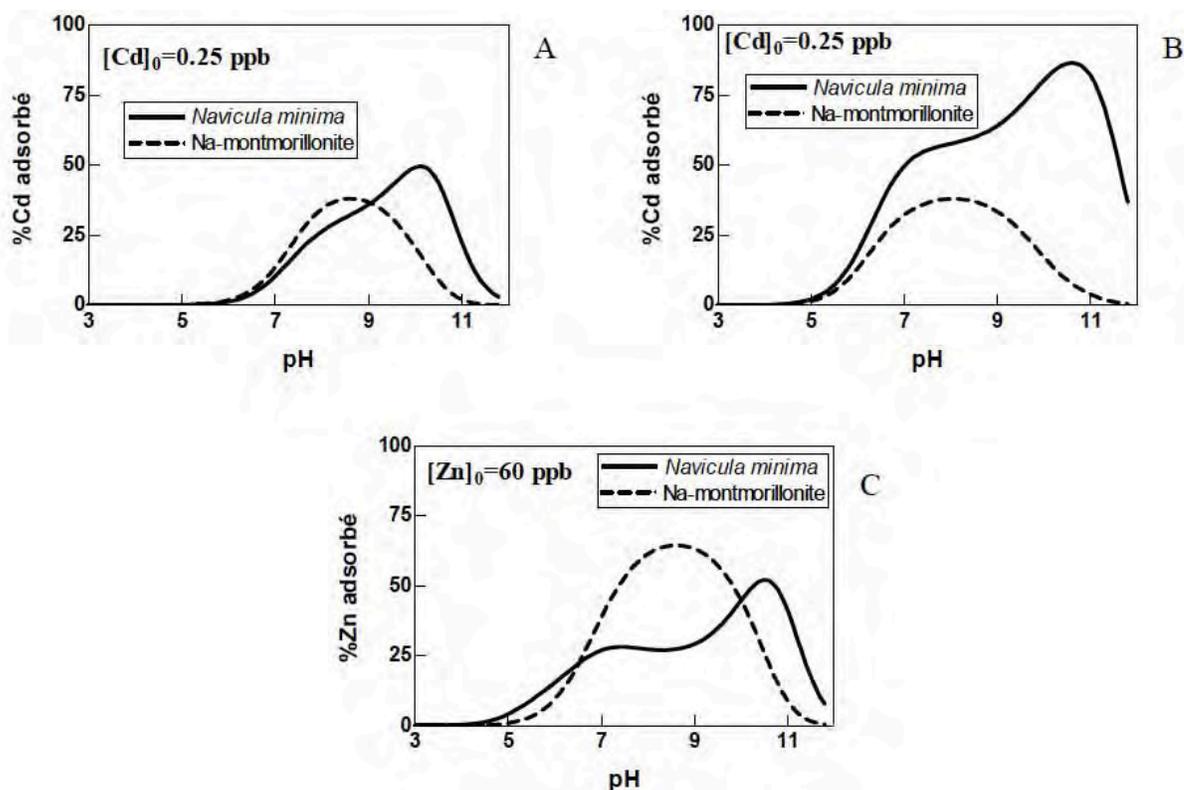


Figure 37 : Spéciation du cadmium et du zinc dans un système métal-argile-diatomée : A)  $[Cd]_0 = 0.25$  ppb,  $0.01 \text{ g}_{\text{humide}}/\text{L}$  de AMIN,  $0.1 \text{ g/L}$  d'argile ; B)  $[Cd]_0 = 0.25$  ppb,  $0.2 \text{ g}_{\text{humide}}/\text{L}$  de AMIN,  $1 \text{ g/L}$  d'argile ; C)  $[Zn]_0 = 60$  ppb,  $0.2 \text{ g}_{\text{humide}}/\text{L}$  de AMIN,  $1 \text{ g/L}$  d'argile.

Ces calculs montrent que les diatomées peuvent exercer un contrôle important sur la spéciation des métaux dans un système naturel contenant à la fois des sites d'adsorption inorganiques et biologiques. Ils illustrent, en outre, l'utilisation du modèle de complexation surfacique établi dans ce travail pour quantifier la distribution des métaux dans les environnements aquatiques naturels.

## IV . PERSPECTIVES

Au cours de ce travail, plusieurs problèmes ont été soulevés auxquels il conviendrait d'essayer d'apporter des réponses.

### A. Caractérisation structurale

Au cours de cette étude, il a été montré que les méthodes d'analyses comme la spectroscopie XAFS fournissaient de précieuses informations sur la nature et la structure des complexes métalliques formés à la surface des diatomées. Utiliser la même technique pour caractériser les complexes formés par Cd ou Pb nous permettrait de mieux contraindre les mécanismes d'adsorption de ces métaux.

### B. Résistance liée aux capacités d'adsorption

Il est généralement admis qu'il existe une relation entre les capacités de résistances des microorganismes et leur capacité de complexation des métaux : les microorganismes qui possèdent la plus grande capacité d'adsorption semblent être aussi les plus résistants. D'autre part, plusieurs travaux considèrent qu'il existe une relation directe entre la résistance du microorganisme et sa capacité de production de ligands complexants (comme les phytochélatines, par exemple).

Les capacités de complexation des métaux ont été déterminées pour les quatre espèces de diatomées examinées dans cette étude. Il serait intéressant de les comparer avec précision à leur capacité de résistance à un « stress métallique », ceci afin de mieux comprendre les mécanismes qui contrôlent leur utilisation comme indicateurs de qualité des eaux.

### C. Incorporation à l'intérieur de la cellule

Dans les thématiques environnementales, la bioaccumulation des métaux toxiques le long des chaînes trophiques est un processus important sur lequel les diatomées exercent un contrôle. Cependant, les mécanismes d'internalisation par pénétration irréversible à l'intérieur des cellules, si ils ont été étudiés pour les algues vertes et les bactéries (Mirimanoff and Wilkinson, 2000; Slaveykova and Wilkinson, 2002; Smiejan et al., 2003; Kola and Wilkinson, 2005), sont encore assez mal connus pour les diatomées. L'étude de ces mécanismes au niveau des diatomées, permettrait de mieux contraindre les processus de bioaccumulation des éléments toxiques. En complément de cette étude, l'analyse de la migration latérale des métaux à la surface des cellules, c'est-à-dire leur déplacement entre sites « passifs » dominants et sites « actifs » responsables du transport, pourrait fournir des informations précieuses pour la compréhension des processus d'incorporation.

### D. Adsorption des ions de l'électrolyte

Quantifier l'adsorption des ions présents dans les électrolytes (comme Na, Ca ou Mg) à la surface des diatomées permettrait de mieux prendre en compte les processus de compétition qui se produisent lors de l'adsorption des métaux comme Zn, Cd ou Pb.

### E. Faibles concentrations en métaux

L'étude que nous avons effectuée a considéré l'interaction entre les diatomées et les métaux à des concentrations relativement élevées (~ 0.1-10 mg/L). Des expériences menées à de faibles concentrations en métaux pourraient mettre en évidence, s'ils existent, les sites fortement complexants mais peu nombreux à la surface des diatomées.

### F. Caractérisation des exudats

Les exudats produits par les diatomées d'eau douce sont très mal connus actuellement.

L'étude de la structure de ces exudats et de leur complexation avec les métaux, au moyen de la polarographie, permettrait d'évaluer le rôle qu'ils jouent dans la spéciation des métaux dans les milieux naturels.

### G. Complexité des milieux naturels : métaux et ligands organiques

Nous avons vu dans cette étude que les paramètres du modèle de complexation surfacique peuvent être appliqués à la description des milieux aquatiques naturels comportant plusieurs types de surfaces complexantes. Cependant, les systèmes naturels contiennent aussi de nombreux éléments en solution susceptibles d'entrer en concurrence pour occuper ces sites surfaciques qui, pour la plupart, ne sont pas spécifiques. Certains travaux sur les bactéries suggèrent, toutefois, que les constantes déterminées dans les systèmes mono-élément sont directement applicables aux systèmes multi-élément (FOWLE and FEIN, 1999). L'étude de l'adsorption de solutions multi-élémentaires permettrait de vérifier si les paramètres déterminés avec des solutions contenant un seul métal sont directement applicables aux systèmes naturels.

Pendant longtemps, les études expérimentales de l'adsorption n'ont été conduites qu'avec les formes libres des métaux. Dans les milieux aquatiques naturels la situation est totalement différente puisque plus de 80% des éléments sont complexés avec des ligands (acides fulviques ou humiques et exudats de microorganismes) en solution. Ceux-ci peuvent favoriser, limiter ou ne pas influencer (complexe très labile) l'adsorption du métal sur la cellule. Certains travaux ont tenté d'établir de nouveaux modèles d'adsorption en considérant la complexation avec des ligands en solution (MIRIMANOFF and WILKINSON, 2000). Des données expérimentales sont nécessaires pour pouvoir valider ces modèles et les appliquer.

### H. Rapport entre structure du biofilm et morphologie du frustule

Il serait intéressant d'essayer d'établir, à partir de l'étude de plusieurs espèces de diatomées, les relations qui existent entre, d'une part la composition et structure du biofilm et, d'autre part, la bioformation et la morphologie du frustule siliceux. A cet égard, des

informations nouvelles pourraient être apportées par l'étude des mécanismes de fractionnement isotopique du silicium entre solution biofilm et frustule, et l'analyse structurale de la silice dans les mêmes compartiments par RMN de  $^{29}\text{Si}$ .

### I. Caractérisation isotopique

Les fractionnements isotopiques du zinc déterminés dans ce travail sont d'ampleur modeste et font douter, s'ils sont confirmés, que les isotopes de Zn puissent servir de marqueurs de processus biogéochimiques. Il conviendrait cependant de poursuivre cette démarche avec d'autres éléments (comme Fe, Cu, Mo, Ge ou Si) afin de détecter des fractionnements induits par les processus d'adsorption à la surface et de piégeage à l'intérieur des cellules de diatomées.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahner B. A., Kong S., and Morel F. M. M. (1995) Phytochelatin production in marine algae. 1. An interspecies comparison. *Limnology and oceanography* **40(4)**, 649-657.
- Ahner B. A., Lee J. G., Price N. M., and Morel F. M. M. (1998) Phytochelatin concentrations in the equatorial Pacific. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **45(11)**, 1779-1796.
- Ahner B. A., Morel F. M. M., and Moffet J. W. (1997) Trace metal control of phytochelatin production in coastal waters. *Limnology and oceanography* **42(3)**, 601-608.
- Allison J. D., Brown D. S., and Novo-Gradac K. J. (1991) *MINTEQA2/PRODEFA2, A geochemical assessment model for environmental systems. Version 3.0 user's manual.*
- Armbrust E. V., Berges J. A., Bowler C., Green B. R., Martinez D., Putnam N. H., Zhou S., Allen A. E., Apt K. E., Bechner M., Brzezinski M. A., Chaal B. K., Chiovitti A., Davis A. K., Demarest M. S., Detter J. C., Glavina T., Goodstein D., Hadi M. Z., Hellsten U., Hildebrand M., Jenkins B. D., Jurka J., Kapitonov V. V., Kroger N., Lau W. W. Y., Lane T. W., Larimer F. W., Lippmeier J. C., Lucas S., Medina M., Montsant A., Obornik M., Parker M. S., Palenik B., Pazour G. J., Richardson P. M., Rynearson T. A., Saito M. A., Schwartz D. C., Thamatrakoln K., Valentin K., Vardi A., Wilkerson F. P., and S. R. D. (2004) The Genome of the Diatom *Thalassiosira Pseudonana*: Ecology, Evolution, and Metabolism. *Science* **306**, 79-86.
- Baudrimont M., Schafer J., Marie V., Maury-Brachet R., Bossy C., Boudou A., and Blanc G. (2005) Geochemical survey and metal bioaccumulation of three bivalve species (*Crassostrea gigas*, *Cerastoderma edule* and *Ruditapes philippinarum*) in the Nord Medoc salt marshes (Gironde estuary, France). *Science of The Total Environment* **337(1-3)**, 265-280.
- Beveridge T. J. and Ferris F. G. (1985) Functions of Bacterial Cell Surface Structures. *BioScience* **35(3)**, 172-177.
- Beveridge T. J., Hughes M. N., Lee H., Leung K. T., Poole R. K., Savvaidis I., Silver S., and Trevors J. T. (1997a) Metal-microbe interactions: Contemporary approaches. *Advances in Microbial Physiology* **38**, 177-243.
- Beveridge T. J., Makin S. A., Kadurugamuwa J. L., and Li Z. (1997b) Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiology Reviews* **20(3-4)**, 291-303.
- Beveridge T. J. and Murray R. G. E. (1980) Sites of Metal Deposition in the Cell Wall of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **141(2)**, 876-887.
- Borrok D. and Fein J. B. (2004) Distribution of protons and Cd between bacterial surfaces and dissolved humic substances determined through chemical equilibrium modeling. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **68(14)**, 3043-3052.

- Borrok D., Fein J. B., and Kulpa C. F. (2004a) Proton and Cd adsorption onto natural bacterial consortia: Testing universal adsorption behavior. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **68(15)**, 3231-3238.
- Borrok D., Fein J. B., Tishler M., O'Loughlin E., Meyer H., Liss M., and Kemmer K. M. (2004b) The effect of acidic solutions and growth conditions on the adsorptive properties of bacterial surfaces. *Chemical Geology* **209**, 107-119.
- Borrok D. M., Fein J. B., and Kulpa C. F. (2004c) Cd and Proton Adsorption onto Bacterial Consortia Grown from Industrial Wastes and Contaminated Geologic Settings. *Environmental Science and Technology* **38(21)**, 5656-5664.
- Boyantov M. I., Kelly S. D., Kemner K. M., Bunker B. A., Fein J. B., and Fowle D. A. (2003) Adsorption of cadmium to *Bacillus subtilis* bacterial cell walls: a pH-dependent X-ray absorption fine structure spectroscopy study. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **67(18)**, 3299-3311.
- Brassard P., Kramer J. R., and Collins P. V. (1990) Binding site analysis using linear programming. *Environmental Science and Technology* **24**, 195-201.
- Braun V. and Braun M. (2002) Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **529(1)**, 78-85.
- Burckle L. H. (1998) Marine diatoms. In *Introduction to marine micropaleontology* (ed. B. U. Haq and A. Boersma). Elsevier.
- Carrilho E. N. V. M., Ferreira A. G., and Gilbert T. R. (2002) Characterization of Sorption Sites on *Pilayella littoralis* and Metal Binding Assessment Using <sup>113</sup>Cd and <sup>27</sup>Al Nuclear Magnetic Resonance. *Environmental Science and Technology* **36(9)**, 2003-2007.
- Cetinkaya Donmez G., Aksu Z., Ozturk A., and Kutsal T. (1999) A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae. *Process Biochemistry* **34(9)**, 885-892.
- Chen M., Dei R. C. H., Wang W.-X., and Guo L. (2003) Marine diatom uptake of iron bound with natural colloids of different origins. *Marine Chemistry* **81(3-4)**, 177-189.
- Clemens S. (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *planta* **212**, 475-486.
- Cobbet C. S. (2000) Phytochelatins and Their Roles in Heavy Metal Detoxification. *Plant Physiology* **123**, 825-835.
- Collins Y. and Stotzky G. (1992) Heavy metals alter the electrokinetic properties of bacteria, yeasts, and clay minerals. *Applied and Environmental Microbiology* **58(5)**, 1592-1600.
- Conley D. J. and Kilham S. S. (1989) Differences in silica content between marine and freshwater diatoms. *Limnology and oceanography* **34(1)**, 205-213.

- Cosden J. M., Schijf J., and Byrne R. H. (2003) Fractionation of Platinum Group Elements in Aqueous Systems: Comparative Kinetics of Palladium and Platinum Removal from Seawater by *Ulva lactuca* L. *Environmental Science and Technology* **37(3)**, 555-560.
- Cox J. S., Smith D. S., Warren L. A., and Ferris F. G. (1999) Characterizing Heterogeneous Bacterial Surface Functional Groups Using Discrete Affinity Spectra for Proton Binding. *Environmental Science and Technology* **33(24)**, 4514-4521.
- Crist R. H., Martin J. R., Carr D., Watson J. R., Clarke H. J., and Crist D. R. (1994) Interaction of Metals and Protons with Algae. 4. Ion Exchange vs Adsorption Models and a Reassessment of Scatchard Plots; Ion-Exchange Rates and Equilibria Compared with Calcium Alginate. *Environmental Science and Technology* **28(11)**, 1859-1866.
- Crist R. H., Martin J. R., and Crist D. R. (1999) Interaction of Metal Ions with Acid Sites of Biosorbents Peat Moss and *Vaucheria* and Model Substances Alginic and Humic Acids. *Environmental Science and Technology* **33(13)**, 2252-2256.
- Crist R. H., Martin J. R., Guptill P. W., and Eslinger J. M. (1990) Interaction of metals and protons with algae. 2. Ion exchange in adsorption and metal displacement by protons. *Environmental Science and Technology* **24(3)**, 337-342.
- Crist R. H., Oberholser K., and McGarrity J. (1992) Interaction of metals and protons with algae. 3. Marine algae, with emphasis on lead and aluminum. *Environmental Science and Technology* **26(3)**, 496-502.
- Crist R. H., Oberholser K., Schwartz D., Marzoff J., and Ryder D. (1988) Interactions of metals and protons with algae. *Environmental Science and Technology* **22(7)**, 755-760.
- Crist R. H., Oberholser K., Shank N., and Nguyen M. (1981) Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls. *Environmental Science and Technology* **15(10)**, 1212-1217.
- Daughney C. J. and Fein J. B. (1998a) The Effect of Ionic Strength on the Adsorption of H<sup>+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, and Cu<sup>2+</sup> by *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*: A Surface Complexation Model. *Journal of Colloid and Interface Science* **198(1)**, 53-77.
- Daughney C. J. and Fein J. B. (1998b) Sorption of 2,4,6-Trichlorophenol by *Bacillus subtilis*. *Environmental Science and Technology* **32(6)**, 749-752.
- Daughney C. J., Fein J. B., and Yee N. (1998) A comparison of the thermodynamics of metal adsorption onto two common bacteria. *Chemical Geology* **144(3-4)**, 161-176.
- Dauta A. (1982) Conditions de développement du phytoplancton: Etude comparative du comportement de huit espèces en culture. I. Détermination des paramètres de croissance en fonction de la lumière et de la température. *Ann. Limnol.* **18**, 217-262.
- Davis J. A. and Kent D. B. (1990) Surface complexation modeling in aqueous geochemistry. In *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, Vol. 23 (ed. U. S. Geol. Surv.), pp. 177-260.

- Davis T. A., Llanes F., Volesky B., and Mucci A. (2003) Metal Selectivity of Sargassum spp. and Their Alginates in Relation to Their -L-Guluronic Acid Content and Conformation. *Environmental Science and Technology* **37(2)**, 261-267.
- de Lurdes M., Goncalves S., Sigg L., Reutlinger M., and Stumm W. (1987) Metal ion binding by biological surfaces: Voltammetric assessment in the presence of bacteria. *The Science of The Total Environment* **60**, 105-119.
- Dengis P. B., Gerin P. A., and Rouxhet P. G. (1995) X-ray photoelectron spectroscopy analysis of biosurfaces: examination of performances with yeast cells and related model compounds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **4(4)**, 199-211.
- Devriese M., Tsakaloudi V., Garbayo I., Leon R., Vilchez C., and Vignara J. (2001) Effect of heavy metals on nitrate assimilation in the eukaryotic microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry* **39(5)**, 443-448.
- Dixit S. S., Smol J. P., Kingston J. C., and Charles D. F. (1992) Diatoms: powerful indicators of environmental change. *Environmental Science and Technology* **26(1)**, 22-33.
- Dufrêne Y. F. and Rouxhet P. G. (1996) X-ray photoelectron spectroscopy analysis of the surface composition of *Azospirillum brasilense* in relation to growth conditions. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **7**, 271-279.
- Dufrêne Y. F., van der Wal A., Norde W., and Rouxhet P. G. (1997) X-ray photoelectron spectroscopy analysis of whole cells and isolated cell walls of gram-positive bacteria: comparison with biochemical analysis. *Journal of Bacteriology* **179(4)**, 1023-1028.
- Duke E. L. and Reimann B. E. F. (1977) The ultrastructure of the diatom cell. In *The Biology of Diatoms*, Vol. XIII (ed. D. Werner), pp. 65-109.
- Errecalde O., Seidl M., and Campbell P. G. C. (1998) Influence of a low molecular weight metabolite (citrate) on the toxicity of cadmium and zinc to the unicellular green alga *Selenastrum Capricornutum*: An exception to the free-ion model. *Water Research* **32(2)**, 419-429.
- Esposito A., Pagnanelli F., Lodi A., Solisio C., and Veglio F. (2001) Biosorption of heavy metals by *Sphaerotilus natans*: an equilibrium study at different pH and biomass concentrations. *Hydrometallurgy* **60(2)**, 129-141.
- Fein J. B. (2000) Quantifying the effects of bacteria on adsorption reactions in water-rock systems. *Chemical Geology* **169(3-4)**, 265-280.
- Fein J. B., Boily J.-F., Yee N., Gorman-Lewis D., and Turner B. F. (2005) Potentiometric titrations of *Bacillus subtilis* cells to low pH and a comparison of modeling approaches. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **69(5)**, 1123-1132.
- Fein J. B., Daughney C. J., Yee N., and Davis T. A. (1997) A chemical equilibrium model for metal adsorption onto bacterial surfaces. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **61(16)**, 3319-3328.

- Fein J. B. and Delea D. (1999) Experimental study of the effect of EDTA on cd adsorption by *Bacillus subtilis*: a test of the chemical equilibrium approach. *Chemical Geology* **161**, 375-383.
- Fein J. B., Martin A. M., and Wightman P. G. (2001) Metal adsorption onto bacterial surfaces: development of a predictive approach. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **65(23)**, 4267-4273.
- Filip Z. and Hermann S. (2001) An attempt to differentiate *Pseudomonas* spp. and other soil bacteria by FT-IR spectroscopy. *European Journal of Soil Biology* **37**, 137-143.
- Filip Z., Hermann S., and Kubat J. (2004) FT-IR spectroscopic characteristics of differently cultivated *Bacillus subtilis*. *Microbiological Research* **159**, 257-262.
- Folsom B. R., Popescu N. A., and Wood J. M. (1986) Comparative Study of Aluminum and Copper transport and Toxicity in an Acid-Tolerant Freshwater Green Alga. *Environmental Science and Technology* **20(6)**, 616-620.
- Fourest E. and Volesky B. (1996) Contribution of Sulfonate Groups and Alginate to Heavy Metal Biosorption by the Dry Biomass of *Sargassum fluitans*. *Environmental Science and Technology* **30(1)**, 277-282.
- Fowle D. A. and Fein J. B. (1999) Competitive adsorption of metal cations onto two gram positive bacteria: testing the chemical equilibrium model. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **63(19-20)**, 3059-3067.
- Fowle D. A. and Fein J. B. (2000) Experimental measurements of the reversibility of metal-bacteria adsorption reactions. *Chemical Geology* **168(1-2)**, 27-36.
- Fowle D. A., Fein J. B., and Martin A. M. (2000) Experimental Study of Uranyl Adsorption onto *Bacillus subtilis*. *Environmental Science and Technology* **34(17)**, 3737-3741.
- Franklin N. M., Stauber J. L., Markich S. J., and Lim R. P. (2000) pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Aquatic Toxicology* **48(2-3)**, 275-289.
- Gerard E., Guyot F., Philippot P., and Lopez-Garcia P. Fluorescence in situ hybridisation coupled to ultra small immunogold detection to identify prokaryotic cells using transmission and scanning electron microscopy. *Journal of Microbiological Methods* **In Press, Corrected Proof**.
- Giordano M., Kansiz M., Heraud P., Beardall J., Wood B., and McNaughton D. (2001) Fourier transform infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muellerii* (bacillariophyceae). *Journal of Phycology* **37**, 271-279.
- Gold C., Feurtet-Mazel A., Coste M., and Boudou A. (2002) Field transfer of periphytic diatom communities to assess short-term structural effects of metals (Cd, Zn) in rivers. *Water Research* **36(14)**, 3654-3664.

- Gonzalez-Davila M. (1995) The role of phytoplankton cells on the control of heavy metal concentration in seawater. *Marine Chemistry* **48(3-4)**, 215-236.
- Gonzalez-Davila M., Santana-Casiano J. M., and Laglera L. M. (2000) Copper adsorption in diatom cultures. *Marine Chemistry* **70**, 161-170.
- Gonzalez-Davila M., Santana-Casiano J. M., Perez-Pena J., and Millero F. J. (1995) Binding of Cu(II) to the Surface and Exudates of the Alga *Dunaliella tertiolecta* in Seawater. *Environmental Science and Technology* **29(2)**, 289-301.
- Gosselin M., Levasseur M., Wheeler P. A., Horner R. A., and Booth B. C. (1997) New measurements of phytoplankton and ice algal production in the Arctic Ocean. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **44(8)**, 1623-1625.
- Grassi M. and Mingazzini M. (2001)  $^{113}\text{Cd}$ -NMR and Fluorescence Studies of the Interactions between Cd(II) and Extracellular Organic Matter Released by *Selenastrum capricornutum*. *Environmental Science and Technology* **35(21)**, 4271-4276.
- Greene B., Hosea M., McPherson R., Henzl M., Alexander M. D., and Darnall D. W. (1986) Interaction of gold(I) and gold(III) complexes with algal biomass. *Environmental Science and Technology* **20(6)**, 627-632.
- Guillard R. R. L. (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In *Culture of Marine Invertebrate Animals* (ed. W. L. S. a. M. H. Chanley), pp. 26-60. Plenum Press. Gunneriusson L. and Sjoberg S. (1993) Surface complexation in the H<sup>+</sup>-goethite (-FeOOH)- Hg (II) - chloride system. *Journal of Colloid and Interface Science* **156**, 121-128.
- Hamm C. E., Merkel R., Springer O., Jurkojc P., Maier C., Prechtel K., and Smetacek V. (2003) Architecture and material properties of diatom shells provide effective mechanical protection. *Nature* **421(6925)**, 841-843.
- Harden V. P. and Harris J. O. (1953) The isoelectric point of bacterial cells. *Journal of Bacteriology* **65**, 198-202.
- Harris P. O. and Ramelow G. J. (1990) Binding of metal ions by particulate biomass derived from *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda*. *Environmental Science and Technology* **24(2)**, 220-228.
- Harrison K. G. (2000) Role of increased marine silica input on paleo-pCO<sub>2</sub> levels. *Paleoceanography* **15(3)**, 292-298.
- He L. M. and Tebo B. M. (1998) Surface charge properties of and Cu(II) adsorption by spores of the marine *Bacillus sp.* strain SG-1. *Applied and Environmental Microbiology* **64(3)**, 1123-1129.
- Hecky R. E., Mopper K., Kilham P., and Degens E. T. (1973) The amino acid and sugar composition of diatom cell-walls. *Marine Biology* **19**, 323-331.
- Helm D. and Naumann D. (1995) Identification of some bacterial cell components by FT-IR

- spectroscopy. *FEMS Microbiology Letters* **126(1)**, 75-79.
- Hochella M. F. J. (1988) Auger electron and x-ray photoelectron spectroscopies. *Rev. Mineral* **18**, 573-637.
- Hunt C. D. and Fitzgerald W. F. (1983) The capacity of marine plankton, macrophytes and particulate matter to adsorb  $\text{Cu}^{2+}$  in the presence of  $\text{Mg}^{2+}$ . *Marine Chemistry* **12**, 255-280.
- Hutchins D. A., Witter A. E., Butler A., and Luther G. W., III. (1999) Competition among marine phytoplankton for different chelated iron species. *Nature* **400(6747)**, 858-861.
- Johnston A. M., Raven J. A., Beardall J., and Leegood R. C. (2001) Carbon fixation: Photosynthesis in a marine diatom. *Nature* **412(6842)**, 40-41.
- Kaplan D., Christiaen D., and Arad S. (1988) Binding of heavy metals by algal polysaccharides. In *Algal Biotechnology* (ed. J. M. T. Stadler, M-C. Verdus, Y. Karamanas, H. Morvan and D. Christiaen), pp. 179-187. Elsevier Applied Science.
- Kates M. and Volcani B. E. (1968) Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in diatoms. In *Z. Pflanzenphysiol. Bd. 60*, pp. 19-29.
- Kelly S. D., Kemner K. M., Fein J. B., Fowle D. A., Boyanov M. I., Bunker B. A., and Yee N. (2002) X-ray absorption fine structure determination of pH-dependent U-bacterial cell wall interactions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **66(22)**, 3855-3871.
- Kiefer E., Sigg L., and Schosseler P. (1997) Chemical and Spectroscopic Characterization of Algae Surfaces. *Environmental Science and Technology* **31**, 759-764.
- Klimmek S., Stan H.-J., Wilke A., Bunke G., and Buchholz R. (2001) Comparative Analysis of the Biosorption of Cadmium, Lead, Nickel, and Zinc by Algae. *Environmental Science and Technology* **35(21)**, 4283-4288.
- Kola H. and Wilkinson K. J. (2005) Cadmium Uptake by a Green Alga Can Be Predicted by Equilibrium Modelling. *Environmental Science and Technology* **39(9)**, 3040-3047.
- Kroger N., Bergsdorf C., and Sumper M. (1994) A new calcium binding glycoprotein family constitutes a major diatom cell wall component. *EMBO journal* **13(19)**, 4676-4683.
- Kroger N., Deutzmann R., and Sumper M. (1999) Polycationic Peptides from Diatom Biosilica That Direct Silica Nanosphere Formation. *Science* **286**, 1129-1132.
- Kroger N., Lorenz S., Brunner E., and Sumper M. (2002) Self-Assembly of Highly Phosphorylated Silaffins and Their Function in Biosilica Morphogenesis. *Science* **298**, 584-586.
- Kroger N. and Sumper M. (1998) Diatom cell wall proteins and the cell biology of silica mineralization. *protist* **149**, 213-219.
- Kroger N. and Wetherbee R. (2000) Pleuralins are Involved in Theca Differentiation in the Diatom *Cylindrotheca fusiformis*. *Protist* **151(3)**, 263-273.

- Kubelka P. (1948) New Contributions to the Optics of Intensely Light-Scattering Materials. Part I. *J. Opt. Soc. Amer.* **38(5)**, 448-457.
- Kulczycki E., Ferris F. G., and Fortin D. (2002) Impact of cell wall structure on the behavior of bacterial cells as sorbents of cadmium and lead. *Geomicrobiology Journal* **19**, 553-565.
- Lane T. W. and Morel F. M. M. (2000) A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97(9)**, 4627-4631.
- Ledin M., Krantz-Rulcker C., and Allard B. (1999) Microorganisms as metal sorbents: comparison with other soil constituents in multi-compartment systems. *Soil Biology and Biochemistry* **31(12)**, 1639-1648.
- Lee H. S. and Volesky B. (1997) Interaction of light metals and protons with seaweed biosorbent. *Water Research* **31(12)**, 3082-3088.
- Liermann L. J., Guynn R. L., Anbar A., and Brantley S. L. (2005) Production of a molybdophore during metal-targeted dissolution of silicates by soil bacteria. *Chemical Geology* **220(3-4)**, 285-302.
- Lind J. L., Heimann K., Miller E., van Vliet C., and Hoogenraad N. J. (1997) Substratum adhesion and gliding in a diatom are mediated by extracellular proteoglycans. *Planta* **203**, 213-221.
- Mahan C. A., Majidi V., and Holcombe J. A. (1989) Evaluation of the metal uptake of several algae strains in a multicomponent matrix utilizing inductively coupled plasma emission spectrometry. *Analytical Chemistry* **61(6)**, 624-627.
- Mann H. and Fyfe W. S. (1984) An experimental study of algal uptake of U, Ba, V, Co and Ni from dilute solutions. *Chemical Geology* **44**, 385-398.
- Pichat S., Douchet C., and Albarede F. (2003) Zinc isotope variations in deep-sea carbonates from the eastern equatorial Pacific over the last 175 ka. *Earth and Planetary Science Letters* **210(1-2)**, 167-178.
- Marshall K. C., Pembrey R., and Schneider R. P. (1994) The relevance of X-ray photoelectron spectroscopy for analysis of microbial cell surfaces: a critical view. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2(1-3)**, 371-376.
- Martinez R. E. and Ferris F. G. (2001) Chemical Equilibrium Modeling Techniques for the Analysis of High-Resolution Bacterial Metal Sorption Data. *Journal of Colloid and Interface Science* **243(1)**, 73-80.
- Martinez R. E., Smith D. S., Kulczycki E., and Ferris F. G. (2002) Determination of Intrinsic Bacterial Surface Acidity Constants using a Donnan Shell Model and a Continuous pKa Distribution Method. *Journal of Colloid and Interface Science* **253(1)**, 130-139.
- Matheickal J. T. and Yu Q. (1999) Biosorption of lead(II) and copper(II) from aqueous

- solutions by pre-treated biomass of Australian marine algae. *Bioresource Technology* **69(3)**, 223-229.
- Matheickal J. T., Yu Q., and Woodburn G. M. (1999) Biosorption of cadmium(II) from aqueous solutions by pre-treated biomass of marine alga *Durvillaea potatorum*. *Water Research* **33(2)**, 335-342.
- Mejare M. and Bulow L. (2001) Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends in Biotechnology* **19(2)**, 67-73.
- Miles C. J., Moye H. A., Philips E. J., and Sargent B. (2001) Partitioning of Monomethylmercury between Freshwater Algae and Water. *Environmental Science and Technology* **35(21)**, 4277-4282.
- Mirimanoff N. and Wilkinson K. J. (2000) Regulation of Zn Accumulation by a Freshwater Gram-Positive Bacterium (*Rhodococcus opacus*). *Environmental Science and Technology* **34(4)**, 616-622.
- Nakajima T. and Volcani B. E. (1969) 3,4-Dihydroxyproline: A New Amino Acid in Diatom Cell Walls. *Science* **164**, 1400-1401.
- Nassiri Y., Mansot J. L., Wéry J., Ginsburger-Vogel T., and Amiard J. C. (1997) Ultrastructural and Electron Energy Loss Spectroscopy Studies of Sequestration Mechanisms of Cd and Cu in the Marine Diatom *Skeletonema costatum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **33**, 147-155.
- Ngwenya B. T., Sutherland I. W., and Kennedy L. (2003) Comparison of the acid-base behaviour and metal adsorption characteristics of a gram-negative bacterium with other strains. *Applied Geochemistry* **18(4)**, 527-538.
- Omar H. H. (2002) Bioremoval of zinc ions by *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus quadricauda* and its effect on growth and metabolism. *International Biodeterioration & Biodegradation* **50(2)**, 95-100.
- Pagnanelli F., Esposito A., Toro L., and Veglio F. (2003) Metal speciation and pH effect on Pb, Cu, Zn and Cd biosorption onto *Sphaerotilus natans*: Langmuir-type empirical model. *Water Research* **37(3)**, 627-633.
- Pichat S., Douchet C., and Albarede F. (2003) Zinc isotope variations in deep-sea carbonates from the eastern equatorial Pacific over the last 175 ka. *Earth and Planetary Science Letters* **210(1-2)**, 167-178.
- Pistocchi R., Mormile M. A., Guerrini F., Isani G., and Boni L. (2000) Increased production of extra- and intracellular metal-ligands in phytoplankton exposed to copper and cadmium. *Journal of Applied Phycology* **12(3 - 5)**, 469-477.
- Plette A. C. C., Benedetti M. F., and van Riemsdijk W. H. (1996) Competitive Binding of Protons, Calcium, Cadmium, and Zinc to Isolated Cell Walls of a Gram-Positive Soil Bacterium. *Environmental Science and Technology* **30**, 1902-1910.

- Plette A. C. C., van Riemsdijk W. H., Benedetti M. F., and van der Wal A. (1995) pH Dependent Charging Behavior of Isolated Cell Walls of a Gram-Positive Soil Bacterium. *Journal of Colloid and Interface Science* **173(2)**, 354-363.
- Poortinga A. T., Bos R., Norde W., and Busscher H. J. (2002) Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces. *Surface Science Reports* **47(1)**, 1-32.
- Rijstenbil J. W. and Gerringa L. J. A. (2002) Interactions of algal ligands, metal complexation and availability, and cell responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a gradual increase in copper. *Aquatic Toxicology* **56(2)**, 115-131.
- Rollemberg M. C., Simoes Goncalves M. L. S., Correia dos Santos M. M., and Botelho M. J. (1999) Thermodynamics of uptake of cadmium by *Chlorella marina*. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **48(1)**, 61-68.
- Rollemberg M. C. and Simoes Goncalves M. S. L. (2000) Kinetics of uptake of cadmium by *Chlorella marina* in different media. *Bioelectrochemistry* **52(1)**, 57-62.
- Santana-Casiano J. M., Gonzalez-Davila M., Perez-Pena J., and Millero F. J. (1995) Pb<sup>2+</sup> interactions with the marine phytoplankton *Dunaliella tertiolecta*. *Marine Chemistry* **48(2)**, 115-129.
- Sanudo-Wilhelmy S. A., Tovar-Sanchez A., Fu F.-X., Capone D. G., Carpenter E. J., and Hutchins D. A. (2004) The impact of surface-adsorbed phosphorus on phytoplankton Redfield stoichiometry. *Nature* **432(7019)**, 897-901.
- Savenko V. S. (1988) Elemental composition of ocean plankton. *Geokhimiya* **8**, 1084-1089.
- Scala S. and Bowler C. (2001) Molecular insights into the novel aspects of diatom biology. *Cellular and Molecular Life Science* **58**, 1666-1673.
- Schiewer S. and Volesky B. (1995) Modeling of the Proton-Metal Ion Exchange in Biosorption. *Environmental Science and Technology* **29(12)**, 3049-3058.
- Schiewer S. and Volesky B. (1996) Modeling Multi-Metal Exchange in Biosorption. *Environmental Science and Technology* **30(10)**, 2921-2927.
- Schiewer S. and Volesky B. (1997) Ionic Strength and Electrostatic Effects in Biosorption of Divalent Metal Ions and Protons. *Environmental Science and Technology* **31(9)**, 2478-2485.
- Schiewer S. and Wong M. H. (1999) Metal Binding Stoichiometry and Isotherm Choice in Biosorption. *Environmental Science and Technology* **33(21)**, 3821-3828.
- Schiewer S. and Wong M. H. (2000) Ionic strength effects in biosorption of metals by marine algae. *Chemosphere* **41(1-2)**, 271-282.
- Seki H., Suzuki A., and Iburi Y. (2000) Biosorption of Heavy Metal Ions to A Marine Microalga, *Heterosigma akashiwo* (Hada) Hada. *Journal of Colloid and Interface Science* **229(1)**, 196-198.

- Slaveykova V. I. and Wilkinson K. J. (2002) Physicochemical Aspects of Lead Bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*. *Environmental Science and Technology* **36(5)**, 969-975.
- Small T. D., Warren L. A., Roden E. E., and Ferris F. G. (1999) Sorption of Strontium by Bacteria, Fe(III) Oxide, and Bacteria-Fe(III) Oxide Composites. *Environmental Science and Technology* **33(24)**, 4465-4470.
- Smetacek V. (2000) Oceanography: The giant diatom dump. *Nature* **406(6796)**, 574-575.
- Smiejan A., Wilkinson K. J., and Rossier C. (2003) Cd Bioaccumulation by a Freshwater Bacterium, *Rhodospirillum rubrum*. *Environmental Science and Technology* **37(4)**, 701-706.
- Sokolov I., Smith D. S., Henderson G. S., Gorby Y. A., and Ferris F. G. (2001) Cell Surface Electrochemical Heterogeneity of the Fe(III)-Reducing Bacteria *Shewanella putrefaciens*. *Environmental Science and Technology* **35(2)**, 341-347.
- Strzepek R. F. and Harrison P. J. (2004) Photosynthetic architecture differs in coastal and oceanic diatoms. *Nature* **431(7009)**, 689-692.
- Stumm W. and Morgan J. J. (1996) *Aquatic chemistry*. (3rd ed.), Wiley.
- Sunda W. G. and Huntsman S. A. (1995) Iron uptake and growth limitation in oceanic and coastal phytoplankton. *Marine Chemistry* **50**, 189-206.
- Sunda W. G. and Huntsman S. A. (1998a) Control of Cd Concentrations in a Coastal Diatom by Interactions among Free Ionic Cd, Zn, and Mn in Seawater. *Environmental Science and Technology* **32(19)**, 2961-2968.
- Sunda W. G. and Huntsman S. A. (1998b) Interactions among  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , and  $\text{Mn}^{2+}$  in controlling cellular Mn, Zn, and growth rate in the coastal alga *Chlamydomonas*. *Limnology and oceanography* **43(6)**, 1055-1064.
- Sunda W. G. and Huntsman S. A. (1998c) Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: Phytoplankton as model systems. *The Science of The Total Environment* **219(2-3)**, 165-181.
- Swift D. M. and Wheeler A. P. (1992) Evidence of an organic matrix from diatom biosilica. *Journal of Phycology* **28**, 202-209.
- Tien C.-J. (2004) Some aspects of water quality in a polluted lowland river in relation to the intracellular chemical levels in planktonic and epilithic diatoms. *Water Research* **38(7)**, 1779-1790.
- Toggweiler J. R. (1999) Oceanography: An ultimate limiting nutrient. *Nature* **400(6744)**, 511-512.
- Torres E., Cid A., Herrero C., and Abalde J. (1998) Removal of cadmium ions by the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin accumulation and long-term kinetics of uptake. *Bioresource Technology* **63(3)**, 213-220.

- Treguer P. (2002) Silica and the cycle of carbon in the ocean. *Comptes Rendus Geosciences* **334(1)**, 3-11.
- Treguer P. and Pondaven P. (2000) Global change: Silica control of carbon dioxide. *Nature* **406(6794)**, 358-359.
- Twining B. S., Twiss M. R., and Fisher N. S. (2003) Oxidation of Thallium by Freshwater Plankton Communities. *Environmental Science and Technology* **37(12)**, 2720-2726.
- van der Wal A., Norde W., Bendinger B., Zehnder A. J. B., and Lyklema J. (1997) Chemical analysis of isolated cell walls of Gram-positive bacteria and determination of the cell wall to cell mass ratio. *Journal of Microbiological Methods* **28(2)**, 147-157.
- Vasconcelos M. T. S. D. and Leal M. F. C. (2001) Seasonal variability in the kinetics of Cu, Pb, Cd and Hg accumulation by macroalgae. *Marine Chemistry* **74(1)**, 65-85.
- Vigneault B., Percot A., Lafleur M., and Campbell P. G. C. (2000) Permeability Changes in Model and Phytoplankton Membranes in the Presence of Aquatic Humic Substances. *Environmental Science and Technology* **34(18)**, 3907-3913.
- Wang W.-X. and Guo L. (2000) Bioavailability of colloid-bound Cd, Cr, and Zn to marine plankton. *Marine Ecology Progress Series* **202**, 41-49.
- Warren L. A. and Haack E. A. (2001) Biogeochemical controls on metal behaviour in freshwater environments. *Earth-Science Reviews* **54(4)**, 261-320.
- Xue H.-B., Stumm W., and Sigg L. (1988) The binding of heavy metals to algal surfaces. *Water Research* **22(7)**, 917-926.
- Yang J. and Volesky B. (1999) Biosorption of uranium on *Sargassum biomass*. *Water Research* **33(15)**, 3357-3363.
- Yee N. and Fein J. (2001) Cd adsorption onto bacterial surfaces: A universal adsorption edge? *Geochimica et Cosmochimica Acta* **65(13)**, 2037-2042.
- Yee N. and Fein J. B. (2002) Does metal adsorption onto bacterial surfaces inhibit or enhance aqueous metal transport? Column and batch reactor experiments on Cd-*Bacillus subtilis*-quartz systems. *Chemical Geology* **185(3-4)**, 303-319.
- Yee N., Fowle D. A., and Ferris F. G. (2004) A Donnan potential model for metal sorption onto *Bacillus subtilis*. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **68(18)**, 3657-3664.
- Yu Q., Matheickal J. T., Yin P., and Kaewsarn P. (1999) Heavy metal uptake capacities of common marine macro algal biomass. *Water Research* **33(6)**, 1534-1537.
- Yun Y.-S., Park D., Park J. M., and Volesky B. (2001) Biosorption of trivalent chromium on the brown seaweed biomass. *Environmental Science and technology* **35**, 4353-4358.
- Zhou J. L., Huang P. L., and Lin R. G. (1998) Sorption and desorption of Cu and Cd by macroalgae and microalgae. *Environmental Pollution* **101(1)**, 67-75.

## TABLE DES FIGURES

FIGURE 1: REPRESENTATION DU FRUSTULE D'UNE DIATOMÉE PENNALE .....	8
FIGURE 2: SCHEMA DE DIVISION CELLULAIRE CHEZ LA DIATOMÉE. UNE DES DEUX CELLULES FILLES EST PLUS PETITE QUE LA CELLULE MERE.....	9
FIGURE 3: PLANS D'OBSERVATION DES DIATOMÉES : PLAN VALVAIRE (1), PLAN APICAL (2), PLAN TRANSAPICAL (3).....	10
FIGURE 4: TABLEAU PERIODIQUE DES ELEMENTS REPRESENTANT LES ELEMENTS TOXIQUES (ROUGE) ET ESSENTIELS (VERTS).....	27
FIGURE 5: STRUCTURE SCHEMATIQUE DE LA PAROI CELLULAIRE DE ARCHEA (A), DE BACTERIE GRAM POSITIVE (B) ET DE BACTERIE GRAM NEGATIVE (C) D'APRES WARREN ET HAACK, 2001).....	34
FIGURE 6: CHARGE (ABSOLUE) DE LA PAROI CELLULAIRE (FRAGMENTS) DE RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS, EN FONCTION DU pH ET A TROIS FORCES IONIQUES (PLETTE ET AL., 1995).....	39
FIGURE 7: MOBILITE ELECTROPHORETIQUE DE BACILLUS SUBTILIS EN FONCTION DU PH A FORCES IONIQUES DIFFERENTES (KNO <sub>3</sub> ) (YEE ET AL., 2004).....	40
FIGURE 8: ADSORPTION DU CD POUR DIVERSES ESPECES DE BACTERIES GRAM POSITIVES ET GRAM NEGATIVES, NON TRAITEES (EN BLANC) ET SOUMISES A UN LAVAGE ACIDE (EN NOIR). LE TRAIT PLEIN EST LE SEUIL D'ADSORPTION UNIVERSEL DEFINIT PAR YEE AND FEIN (2001). (BORROK ET AL., 2004B).....	44
FIGURE 9: CORRELATION ENTRE LES LOG K DES GROUPES CARBOXYLIQUES DE BACILLUS SUBTILIS ET LES LOG K DU LIGAND ACETATE (A) ET OXALATE (B) (FEIN ET AL., 2001).....	45
FIGURE 10: CELLULE DE THALASSIOSIRA WEISSFLOGII A PH=10.5 A 1 MINUTE D'EXPOSITION (A) ET APRES 10 MINUTES D'EXPOSITION (B). .....	66
FIGURE 11: CARBONE ORGANIQUE DISSOUS (COD) LIBERE EN FONCTION DU pH ET DU TEMPS LORS DU TITRAGE DE TW ET AMIN (CE TRAVAIL) .....	68
FIGURE 12: INCORPORATION NON REVERSIBLE VERS L'INTERIEUR DE LA CELLULE DES PROTONS ET HYDROXYLES EN FONCTION DU PH POUR TROIS ESPECES DE DIATOMÉES (CE TRAVAIL).....	69
FIGURE 13: SCHEMA DU REACTEUR DE TITRAGE FERME .....	70
FIGURE 14: TITRAGE CONTINU DE ACHNANTES MINUTISSIMUM (CE TRAVAIL) .....	71
FIGURE 15: SCHEMA DU REACTEUR A TEMPS DE RESIDENCE LIMITE .....	72
FIGURE 16: PROTOCOLE DE TITRAGE DU SURNAGEANT.....	73
FIGURE 17: MODELE SIMPLIFIE DE LA DOUBLE COUCHE A PROXIMITE D'UNE SURFACE CHARGEE .....	76
FIGURE 18: MOUVEMENT DE FLUIDE A L'INTERIEUR DE LA CELLULE D'ELECTROOSMOSE. 77	
FIGURE 19: MODES DE VIBRATION MOLECULAIRE. LE SIGNE « + » SIGNIFIE UN MOUVEMENT VERS LE DESSUS DE LA FEUILLE, LE SIGNE « - » UN MOUVEMENT VERS LE DESSOUS DE LA FEUILLE. ....	84

FIGURE 20: SCHEMA DE L'APPAREILLAGE UTILISE LORS DE MESURES DE REFLEXION DIFFUSE .....	87
FIGURE 21: SCHEMA DE L'APPAREILLAGE UTILISE LORS DE MESURES DE REFLEXION TOTALE ATTENUÉE .....	88
FIGURE 22: MODELE A CAPACITANCE CONSTANTE .....	97
FIGURE 23: MODELE DE GOUY-CHAPMAN. DESCRIPTION DE L'INTERFACE AVEC PRESENCE D'UNE « DOUBLE COUCHE » .....	98
FIGURE 24: MODELE DE STERN DANS LE CAS D'UNE ADSORPTION D'IONS A LA SURFACE. IL EXISTE UNE PREMIERE COUCHE COMPACTE JOUANT LE ROLE D'UN CONDENSATEUR DE CAPACITE C <sub>1</sub> ET UNE COUCHE DIFFUSE COMME DANS LE MODELE DE GOUY-CHAPMAN ...	99
FIGURE 25: MODELE « TRIPLE COUCHE ». DESCRIPTION DE L'INTERFACE AVEC PRESENCE DE DEUX CONDENSATEURS DE CAPACITE C <sub>1</sub> (COMPLEXES DE SPHERE INTERNE) ET C <sub>2</sub> (COMPLEXES DE SPHERE EXTERNE) ASSOCIE A UNE COUCHE DIFFUSE.....	100
FIGURE 26: SENSIBILITE DU MODELES AUX PARAMETRES : A) CAPACITANCE ET B) DENSITE DE SITES CARBOXYLIQUES.....	107
FIGURE 27: SENSIBILITE DU MODELES AUX PARAMETRES : A) LOG K <sub>COOZn</sub> ; B) LOG K <sub>SIOZn</sub> ET C) LOG K <sub>COONa</sub> .....	108
FIGURE 28: SPECTRE DRIFT DE AMIN, NMIN, MVAR (ESPECE FLUVIATILE) ET DE FRUSTULE.....	112
FIGURE 29: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES ZONES INVESTIGUEES RESPECTIVEMENT LORS DES TITRAGES ACIDO-BASIQUES (PRISE EN COMPTE DE L'ADSORPTION DES PROTONS, EN BLEU ET ORANGE, SUR TOUTE L'EPAISSEUR DE LA PAROI CELLULAIRE) ET DES MESURES ELECTROCINETIQUES (SEULS SONT PRIS EN COMPTE L'ADSORPTION DES PROTONS, EN BLEU, SUR LES GROUPES LES PLUS EXTERNES DE LA SURFACE) .....	114
FIGURE 30: ARRANGEMENT DES DIFFERENTES COUCHES ORGANIQUES DE LA PAROI CELLULAIRE DES DIATOMEES (D'APRES HECKY ET AL., 1973). .....	115
FIGURE 31: SCHEMA DE LA STRUCTURE DES COMPLEXES TETRAEDRIQUES FORMES PAR LE ZINC (A) ADSORBE A LA SURFACE DE LA DIATOMEIE AU NIVEAU D'UN GROUPE CARBOXYLIQUE ; ET (B) INCORPORE A L'INTERIEUR DE LA CELLULE POUR LES DIATOMEES D'EAU DOUCE.....	140
FIGURE 32: ADSORPTION DE Z <sub>N</sub> SUR LES SURFACES DES QUATRE ESPECES DE DIATOMEES (A) EN FONCTION DU pH ; ET (B) EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE ZINC EN SOLUTION.....	152
FIGURE 33: ADSORPTION DE Pb SUR NMIN EN FONCTION DU pH .....	210
FIGURE 34: ADSORPTION DU CADMIUM : (A) SUR DES CELLULES DE TW (35 G <sub>HUMID</sub> /L) EN FONCTION DU pH EN SOLUTION ET (B) SUR DES CELLULES DE TW CELLS (49 G <sub>HUMID</sub> /L) EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE METAL EN SOLUTION. ....	211
FIGURE 35: ADSORPTION DU CADMIUM SUR ODONTELLA ET NVRO EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN METAL DANS UNE SOLUTION DE NaNO <sub>3</sub> 0.1 M (SOUS FAIBLES CONCENTRATIONS EN METAL) pH = 6.75 ± 0.05 .....	211
FIGURE 36: ADSORPTION EN FONCTION DU pH A) DE Ga(III) (0,7.10 <sup>-6</sup> M) SUR NMIN (8,5 g/L); B) DE Ga (III) (7,5.10 <sup>-8</sup> M) SUR TW (26,5 g/L); C) DE W (0,63.10 <sup>-6</sup> M) SUR NMIN (8,5 g/L); D) DE W	

( $0,63 \cdot 10^{-6}$  M) SUR TW (36 g/L); E) DE MO ( $1,25 \cdot 10^{-6}$  M) SUR NMIN (8,5 g/L) ET F) de Cr(VI) ( $9,6 \cdot 10^{-8}$  M) sur NMIN (8,5 g/L) ..... 247

FIGURE 37 : SPECIATION DU CADMIUM ET DU ZINC DANS UN SYSTEME METAL-ARGILE-DIATOMEE : A)  $[Cd]_0 = 0,25$  ppb,  $0,01$  g<sub>HUMIDE</sub>/L DE AMIN,  $0,1$  g/L D'ARGILE ; B)  $[Cd]_0 = 0,25$  ppb,  $0,2$  g<sub>HUMIDE</sub>/L DE AMIN,  $1$  g/L D'ARGILE ; C)  $[Zn]_0 = 60$  ppb,  $0,2$  g<sub>HUMIDE</sub>/L DE AMIN,  $1$  g/L D'ARGILE..... 257

## TABLE DES TABLEAUX

TABLEAU 1:STRUCTURES PARTICULIERES ET SITES FONCTIONNELS ASSOCIES PRESENTS A LA SURFACE DE DIATOMEES.....	38
TABLEAU 2: RAPPORTS METAL : LIGAND POUR DIVERSES SURFACES BIOLOGIQUES ET METAUX.....	50
TABLEAU 3: CARACTERISATIONS DES SURFACES BACTERIENNES .....	55
TABLEAU 4: CARACTERISATIONS DES SURFACES D'ALGUES ET DE DIATOMEES .....	58
TABLEAU 5: ESTIMATION DES GAMMES DE VALEURS CORRECTES DANS L'EXEMPLE ETUDIE. ....	107
TABLEAU 6: MODELE DE SPECIATION SURFACIQUE DES INTERFACES DE QUATRE DIATOMEES .....	116
TABLEAU 7:PRINCIPAUX PARAMETRE DU MODELE D'ADSORPTION DU ZINC SUR LES SURFACES DES DIATOMEES POUR LES QUATRE ESPECES ETUDIEES. ....	152
TABLEAU 8: PARAMETRES MOYENS DU MODELE DE COMPLEXATION SURFACIQUE POUR DECRIRE LES INTERACTIONS DIATOMEES-CD. ND SIGNIFIE NON-DETERMINE. ....	212
TABLEAU 9: PARAMETRES MOYENS DU MODELE DE COMPLEXATION SURFACIQUE POUR DECRIRE LES INTERACTIONS DIATOMEES-PB. ND SIGNIFIE NON-DETERMINE.....	212
TABLEAU 10: PARAMETRES DE MODELISATION UTILISES POUR DECRIRE L'ADSORPTION DE Ga(III), W(VI), Mo(VI) ET Cr(VI) A LA SURFACE DE DEUX ESPECES DE DIATOMEES.....	248
TABLEAU 11: COMPARAISON DES CAPACITES DE COMPLEXATION DE DIVERS MICROORGANISMES .....	255
TABLEAU 12: PARAMETRES DE MODELISATION DE L'ADSORPTION DE CD ET ZN SUR UNE MONTMORILLONITE SODIQUE. $>S^S OH$ ET $S^W OH$ REPRESENTENT RESPECTIVEMENT DES SITES SURFACIQUES DE FORT ET FAIBLE AFFINITE POUR LES METAUX.....	257

▪

## **Thèse présentée par : Alexandre GELABERT**

Directeurs de thèse : Jacques SCHOTT

Oleg POKROVSKY

### **Caractérisation physico-chimique des interactions métaux-diatomées**

Cette étude expérimentale a consisté en la caractérisation de l'interaction entre les métaux et les parois cellulaire des diatomées. Une approche combinant des mesures spectroscopiques, IR et XPS, avec des titrages acido-basiques et des déterminations de mobilité électrophorétiques, ont permis l'élaboration d'un modèle thermodynamique de surface des diatomées. La complexation des cations métalliques,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ , et  $Pb^{2+}$  sur les parois cellulaires a été déterminée par des expériences d'adsorption en fonction du pH et de la concentration en métal et a permis de développer un modèle de complexation surfacique. Il indique que i) le frustule siliceux intervient très peu dans les processus d'adsorption ii) la complexation des métaux s'effectue principalement sur les groupes carboxyliques de la surface en accord avec les mesures XAFS effectuées pour l'adsorption du zinc. Des mesures d'isotopie du zinc ont mis en évidence un fractionnement induit par les diatomées.

Mots clés : diatomée, isotope, fractionnement isotopique, adsorption, FITEQL, modélisation, métaux, XAFS, XPS, infrarouge, électrophorèse

### **Physico-chemical characterization of metals-diatoms interactions**

The aim of this experimental study was to characterize the interactions between metals and diatom cell walls. Spectroscopic measurements, FT-IR and XPS, in combination with titrations and electrokinetic experiments allowed the construction of a surface thermodynamic model for diatoms. Complexation between metal cations  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  and diatom cell walls were investigated by adsorption experiments as a function of pH and a surface complexation model was developed. It indicates i) that siliceous frustule plays a minor role during adsorption process and ii) metal complexation is governed by carboxylic groups from the surface in agreement with XAFS determination for zinc adsorption. Isotopic measurements for zinc indicate an isotopic fractionation induced by diatom cells.

Keywords: diatom, isotope, isotopic fractionation, adsorption, FITEQL, modelling, metals, XAFS, XPS, infrared, electrophoresis