

Sous-action 3.3.3 Sols radiocontaminés

Responsable : Olivier Péron

Les résultats obtenus dans cette sous-action sont issus de la Thèse de doctorat d'Alice Hazotte soutenue le 15 janvier 2016. Une partie des résultats des travaux de thèse sont présentés dans ce rapport.

Tout d'abord, la mobilité du césium retenu sur les feuillets d'une illite purifiée, choisie comme modèle d'étude, a été étudiée en considérant l'action de métabolites, comme les acides organiques (acides citrique et oxalique), les complexants commerciaux (desferrioxamine mésylate (DFOM) et acide acétohydroxamique (AAH)) et un sidérophore (pyoverdine : PVD) produit par *Pseudomonas fluorescens* (Fig. 1). Les interactions directes entre les métabolites bactériens et le césium par échange ionique (Fig. 4), ou indirectes ((Fig. 2) par altération de la matrice les contenant (Fig. 3), ont fait l'objet d'une analyse approfondie. La comparaison du rôle de ces métabolites bactériens, en particulier les sidérophores, avec celui de complexants commerciaux complète ce volet mécanistique.

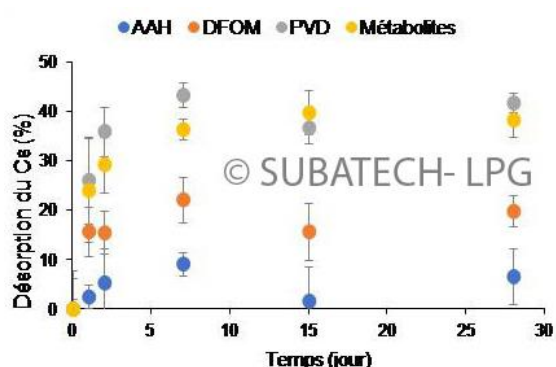


Fig. 1. Mobilisation du Cs de l'illite après ajout de 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'acide acétohydroxamique (AAH), de desferrioxamine mésylate (DFOM), de pyoverdine purifiée (PVD) ou de métabolites bactériens (Métabolites) en présence d'une illite dopée en Cs à 10 mmol.kg^{-1} . Les valeurs sont calculées par rapport à la concentration initiale en Cs sur l'illite et une fois les valeurs du témoin sans complexant déduites.

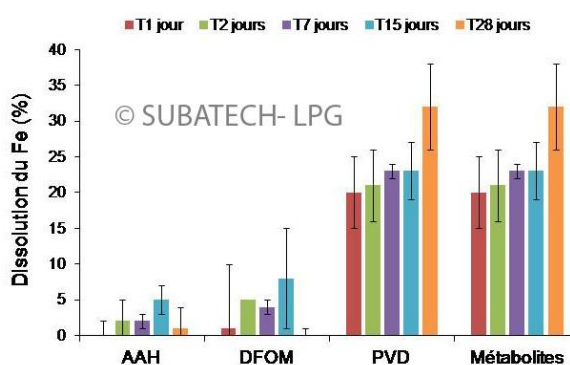


Fig. 2. Mobilisation du fer de l'illite au cours du temps après l'ajout de 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'acide acétohydroxamique (AAH), de desferrioxamine mésylate (DFOM), de pyoverdine purifiée (PVD) ou de l'ensemble des métabolites bactériens (Métabolites) en présence d'une illite dopée avec 100 mmol.kg^{-1} de Cs (résultats similaires à 10 mmol.kg^{-1}). Les valeurs sont calculées par rapport à la concentration initiale en fer dans l'illite et une fois les valeurs du témoin sans complexant déduites.

La pyoverdine purifiée (PVD) et les métabolites produits par *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400 ont un effet important dans la désorption du Cs de l'illite (jusqu'à 43 % pour la PVD). Ces résultats suggèrent que parmi l'ensemble des métabolites produits par *P. fluorescens*, la PVD est la plus impliquée dans la désorption du Cs de l'illite. Cette libération dans la solution du Cs de l'illite est accompagnée d'une dissolution de 30 % du fer de l'illite par ce même sidérophore. Ces résultats suggèrent une mobilisation indirecte du Cs par complexation du Fe par la PVD entraînant l'altération de l'illite. Cependant cette altération n'a pas pu être observée ni au MET ni au MEB.

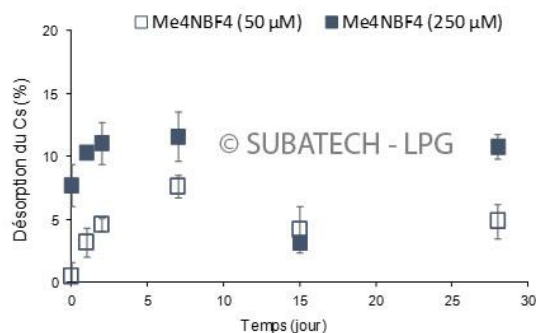
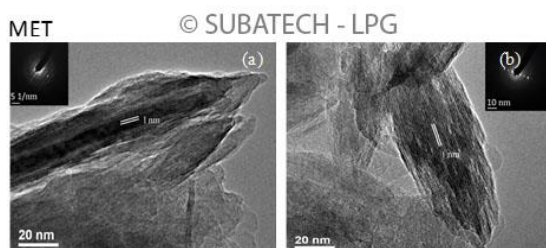


Fig. 3. Image MET de feuillets d'illite après 28 jours (a) sans sidérophore et (b) avec 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de PVD purifiée

Fig. 4. Mobilisation du Cs de l'illite après ajout de 50 et 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de tétraméthylammonium tétrafluoroborate (Me_4NBF_4) en présence d'une illite dopée à 10 mmol.kg^{-1}

En plus de cette libération indirecte du Cs de l'illite, une désorption directe par échange ionique entre le Cs^+ et le carbocation du chromophore de la PVD est possible. Ceci a été mis en évidence par l'utilisation de tétraméthylammonium tétrafluoroborate (Me_4NBF_4) qui est utilisé dans les mêmes conditions expérimentales que les sidérophores. C'est une molécule qui peut interagir avec le Cs uniquement par échange ionique grâce à son atome d'azote chargé positivement qui est un plus fort compétiteur du Cs^+ que le carbocation de la PVD. On devrait donc s'attendre à une meilleure désorption du Cs avec Me_4NBF_4 . Or, les pourcentages de Cs libéré dans la solution sont plus faibles que ceux qui ont été mesurés en présence de PVD purifiée et des métabolites. Le Cs peut donc être libéré en solution par l'action de la PVD via deux actions concomitantes : la complexation correspondant à un mécanisme indirect et l'échange ionique correspondant à un mécanisme direct.

Ensuite, le rôle des bactéries avec et sans contact avec l'illite sur la désorption du césium de l'illite est étudié en utilisant la technique de la membrane de dialyse. Les pores de 12000 à 14000 Da de la membrane de dialyse laissent passer les métabolites bactériens tout en retenant l'illite. Ainsi, en présence de la membrane de dialyse, les bactéries en croissance restent en suspension (bactéries dites « libres ») dans le milieu environnant (NaCl , 1 mmol.L^{-1}) alors qu'en son absence, elles forment naturellement un biofilm qui recouvre les particules d'illite ; les bactéries sont donc en contact direct avec l'illite (Fig. 5). L'objectif de l'étude est de comparer l'action « directe » des bactéries sous forme de biofilm sur la mobilisation du Cs à l'action « indirecte » des métabolites bactériens produit par des bactéries en suspension et qui diffusent à l'intérieur de la membrane de dialyse.

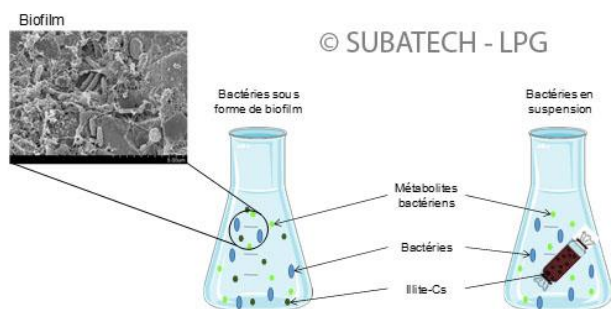


Fig. 5. Représentation schématique des 2 systèmes étudiés (bactéries libres et biofilm)

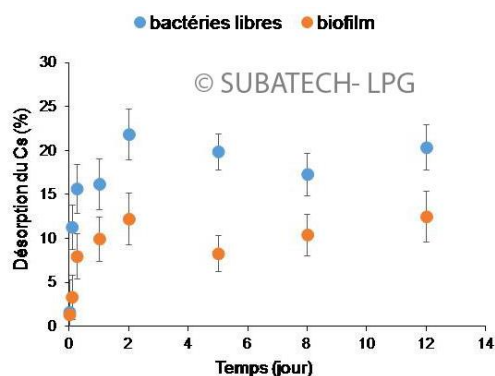


Fig. 6. Désorption du Cs de l'illite dopée à 10 mmol.kg^{-1} de Cs et en présence de *P. fluorescens* cultivées dans du NaCl (1 mmol.L^{-1}) et présentes sous forme de biofilm (sans membrane de dialyse) ou de cellules libres en suspension (illite enfermée dans une membrane de dialyse)

Les résultats montrent jusqu'à 21 % de désorption du césium de l'illite lorsque les bactéries sont libres dans la solution, donc sans nécessité d'un contact direct avec l'illite dopée avec 10 mmol.kg^{-1} . Jusqu'à 12 % de désorption du Cs sont également observés lorsque les bactéries ont la possibilité de former un biofilm directement autour de l'illite (Fig. 6). La légère différence de désorption du Cs selon que les bactéries sont en contact ou non avec l'illite peut être due à : i) une plus faible production de métabolites bactériens en présence de biofilm, ii) la resorption du Cs dans le biofilm, qui constitue l'autre hypothèse.

Enfin, le système complet de phytoextraction du Cs par le trèfle violet, cultivé en hydroponie (Cs en solution ou sorbé sur de l'illite) ou en sol, associé ou non à l'ajout de *P. fluorescens* et/ou de pyoverdine (Fig. 7). Le système de phytoextraction associée à l'ajout de *P. fluorescens* et/ou de pyoverdine est testée sur du Cs de moins en moins

biodisponible : entièrement biodisponible en solution (CsCl), bioaccessible sorbé sur l'illite et adsorbé sur un sol vieilli.

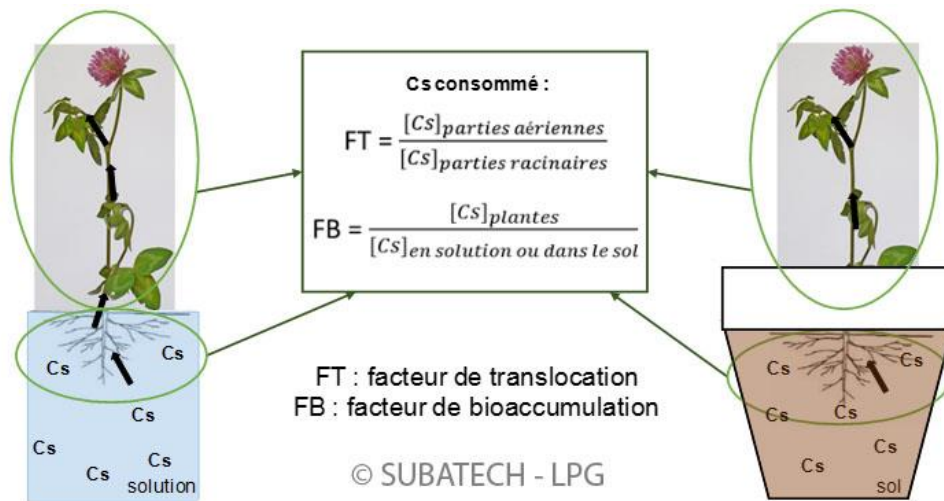


Fig. 3.7. Représentation schématique du système complet en hydroponie et en pot de sol

- en hydroponie :

Après une pré-culture du trèfle violet en hydroponie dans du milieu Hoagland, les plants sont transférés dans une solution NaCl (1 mmol.L⁻¹) en présence de Cs soluble, CsCl ou adsorbé à l'illite. Le rôle du biofilm de *P. fluorescens* est étudié en utilisant, ou non, une membrane de dialyse pour confiner l'illite dopée et ainsi éviter aux bactéries inoculées de former un biofilm qui ralentirait la libération du Cs en solution et par conséquent son accumulation par la plante.

Le trèfle violet est capable d'accumuler le Cs dans ses racines de façon plus importante que dans ses parties aériennes, que le Cs soit entièrement biodisponible en solution ou adsorbé sur l'illite et, sans ou avec ajout de bactéries ou de métabolites bactériens.

© SUBATECH - LPG	FT	FB	Biomasse (% par rapport au témoin)	Cs prélevé par la plante (%)	Cs prélevé par les parties aériennes (%)
CsCl	0,5	152,3	100	75,3	53,2
CsCl + <i>P. fluorescens</i>	0,5	124,9	86	50,9	33,2
CsCl + PVD 50 µmol.L⁻¹	1,1	112,6	56	40,0	33,2

Tableau 1 : Pourcentage de dépollution, facteur de translocation (FT) et facteur de bioaccumulation (FB) du trèfle violet après 12 jours de culture dans une solution NaCl (1 mmol.L⁻¹) dopée en Cs en solution (0,1 mmol.L⁻¹), en présence ou non de *P. fluorescens* ou de PVD purifiée ajoutée à 50 µmol.L⁻¹.

© SUBATECH - LPG	FT	FB	Biomasse (% par rapport au témoin)	Cs prélevé par la plante (%)	Cs prélevé par les parties aériennes (%)
Illite	0,25	2,5	100	0,86	0,45
Illite + <i>P. fluorescens</i>	0,46	1,6	97	0,68	0,45
Illite + PVD 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	0,62	1,2	78	0,44	0,32
Illite confinée	0,18	3,1	87	0,94	0,38
Illite confinée + <i>P. fluorescens</i>	0,34	2,8	94	0,96	0,60

Tableau 2 : Pourcentage de dépollution, facteur de translocation (FT) et facteur de bioaccumulation (FB) du trèfle violet après 12 jours de culture dans une solution NaCl (1 mmol.L⁻¹) dopée en Cs sorbé à l'illite (10 mmol.kg⁻¹), en présence ou non de *P. fluorescens* ou de PVD purifiée ajoutée à 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

La différence de biodisponibilité du Cs entraîne une diminution importante du pourcentage de dépollution de la solution par phytoextraction (uniquement dans les parties aérienne de la plante). Lorsque le Cs est entièrement biodisponible, les parties aériennes du trèfle violet peuvent extraire jusqu'à 53.2 % du Cs en 12 jours contre 0,45 % lorsque le Cs est sorbé sur l'illite (Tableau 1 et 2). Cette plante peut alors être un bon candidat pour la phytostabilisation ou la rhizofiltration du Cs des eaux contaminée en Cs. En effet, ces techniques consistent en l'accumulation ou la séquestration de polluants dans les racines d'une plante et est utilisée notamment pour filtrer les eaux polluées. Dans un but de phytoextraction, où le Cs doit être transloqué vers les parties aériennes de la plante, le trèfle violet est potentiellement un bon candidat lorsque la PVD est ajouté au milieu puisqu'elle permet d'augmenter celle translocation en termes de concentration en Cs. En effet, des facteurs de translocation (FT) plus élevés ont été obtenus en présence de PVD. Toutefois, la PVD ayant montré une toxicité sur le trèfle violet (diminution de la biomasse), il est intéressant de voir si dans un sol où elle peut être moins bioaccessible et moins en contact avec les racines de la plante, sa toxicité peut être réduite permettant ainsi son utilisation en phytoextraction.

- en pot de sol :

Après une pré-culture de 40 jours du trèfle violet en hydroponie dans le milieu Hoagland sans Cs, 4 à 5 plants sont repiqués dans des pots de sols dopés ou non en Cs à 10 mmol.kg⁻¹ et ayant subi un vieillissement de 6 semaines. Après 7 jours de culture, un ajout de PVD à 50 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ est réalisé pour l'une des modalités, puis les plants sont récoltés 5 jours plus tard (12 jours de culture au total).

© SUBATECH - LPG	FT	FB	Biomasse (% par rapport au témoin)	Cs prélevé par la plante (%)	Cs prélevé par les parties aériennes (%)
Sol dopé	0,33	12,9	100	0,43	0,02
Sol dopé + PVD (50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$)	0,29	6,4	66	0,10	0,01

Tableau 3 : Pourcentage de dépollution, facteur de translocation (FT) et facteur de bioaccumulation (FB) du trèfle violet après 12 jours en présence de sol dopé en Cs à 10 mmol.kg⁻¹ et avec ou sans PVD purifiée ajoutée à 50 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$

L'hypothèse de la diminution de la toxicité de la PVD en raison de sa sorption sur le sol n'est donc pas vérifiée. Le FT est également plus faible (0,29 comparé à 0,33 dans le témoin) conduisant à un pourcentage de dépollution encore plus faible de 0,01 %. La PVD n'augmente donc pas les niveaux de concentration de Cs dans le trèfle violet,

et est aussi toxique. Contrairement à ce qui a été observé en culture hydroponique, la PVD ne favorise pas la translocation du Cs vers les parties aériennes.

Articles:

Cornu, J.Y., Ferret C., Elhabiri M., Lollier M., Geoffroy V.A., Jezequel K., Lebeau T. (2014). Pyoverdine promotes the mobilisation and the phytoextraction of Cu in calcareous sediment. *Chemosphere*, **103**, 212-219.

Braud A., Hubert M., Gaudin P., Lebeau T. (2015). A quick rhizobacterial selection tool to be used in phytoextraction-assisted bioaugmentation of metal contaminated soils, *Journal of Applied Microbiology*, **119**, 435-445.

Hazotte A.A., Péron O., Abdelouas A., Montavon G., Lebeau T. Microbial mobilization of cesium from illite: role of organic acids and siderophores, *Chemical Geology* (en révision)

Communications:

Cornu J.Y., Ferret C., Elhabiri M., Lollier M., Geoffroy V., Jezequel K., Lebeau T. Pyoverdine interactions with trace elements in sediment: which prospect for phytoremediation? EUROSOIL, 2-7 July 2012, Bari, Italy

Hazotte A., Lebeau T., Péron O., Saïto T., Abdesselam A. Role of bacteria on the release of cesium from illite. Goldschmidt, 25-30 august 2013, Florence, Italy.

Braud A., Gaudin P., Hubert M., Lebeau T. Rhizo-phytoextraction of metal contaminated soils: An innovative selection tool for rhizobacteria. 20th World Congress of Soil Science, 8-13 june 2014, Jegu, South Korea.

Cornu J.Y., Elhabiri M., Ferret C., Geoffroy V.A., Jezequel K., Leva Y., Lollier M., Schalk I.J., Lebeau T. Phytoextraction-assisted bioaugmentation of soils contaminated by Cu and Cd: role of the bacterial siderophore pyoverdine. 20th World Congress of Soil Science, 8-13 june 2014, Jegu, South Korea

A. Hazotte, O. Péron, A. Abdelouas, T. Lebeau, Phytoextraction associated with bioaugmentation of contaminated soils by caesium, REIMEI Workshop 2015, (Nantes – France - Janvier 2015)

A.A. Hazotte, O. Péron, A. Abdelouas, T. Lebeau, Microbial mobilization of cesium from illite: Role of organic acids and siderophores, EGU 2015 (Vienna – Austria- Avril 2015)

A.A. Hazotte, O. Péron, P. Gaudin, A. Abdelouas, T. Lebeau. **Role of *Pseudomonas fluorescens* and the siderophore pyoverdine on the phytoextraction of cesium by red clover in hydroponics and soil, EUROSOIL 2016 (Istanbul – Turquie – juillet).**