

# MISE EN ÉVIDENCE DU TRANSPORT DE POLLUANTS MÉTALLIQUES FACILITÉ PAR LES BACTÉRIES DANS LES SOLS

Jean M.F. Martins et Véronique Guiné

Laboratoire d'étude des transferts en hydrologie & environnement, Grenoble

De nombreux cas de pollution des eaux souterraines par des composés supposés peu ou pas mobiles ont pu être observés ces dernières années. Ceux-ci sont difficilement prédictibles sans envisager l'existence de mécanismes induisant des re-largages massifs de contaminants sur de courtes durées et non encore pris en compte dans les modèles mathématiques. C'est le cas du transport particulaire des polluants, bien que peu de preuves expérimentales existent actuellement. En particulier l'effet des bactéries sur le transport accéléré des polluants métalliques est mal connu, bien que les microorganismes soient présents partout dans les sols et les eaux et, en tant que particules colloïdales, présentent des propriétés de mobilité et de mobilisation des polluants tout à fait particulières. L'objectif de ce travail est précisément de montrer les potentialités de transport facilité de mercure, de zinc et de cadmium par deux souches bactériennes modèles bien connues : *Ralstonia metallidurans* CH34 et *Escherichia coli* dans un sol modèle simplifié : le sable de Fontainebleau. Les résultats obtenus ont montré que sous certaines conditions, le transport bio-sorbé des 3 métaux est jusqu'à 3,5 fois plus rapide et de 5 à 7 fois plus important que le transport dissous qui devient négligeable. Les principaux facteurs qui gouvernent ce type de transport ont été identifiés comme étant la force ionique de l'eau, sa vitesse ainsi que la concentration, l'hydrophobie et la charge de surface des bactéries. Les relations correspondantes ont été établies pour les deux bactéries.

Many cases of groundwater contamination by immobile pollutants have been described in the last years. These phenomena are hardly predictable if mechanisms inducing leaching of high amounts of contaminant within short periods are not taken into account. This is the case of particulate transport of pollutants, although only few experimental evidence is available to date. Especially, the effect of bacterial cells on the facilitated transport of heavy metals is not yet well characterised, although micro-organisms, as colloidal particles, can be found every where in soil and water and

present very specific mobility and pollutant mobilisation potential. The objective of the present work was to show the capability of two well known bacterial strains: *Ralstonia metallidurans* CH34 and *Escherichia coli*, to accelerate the transport of mercury, zinc and cadmium in a simple model soil: the Fontainebleau sand. The results showed that under certain conditions, bio-sorbed heavy metals were transported from 1.2 to 3.5 times faster than metals in solution and that this last transport mechanism becomes negligible (5 to 7 times lower). Furthermore, the main factors controlling accelerated pollutant transport by bacterial colloids were identified and quantified. Soil solution ionic strength and velocity control the mobility of the colloids, so do their own concentration. Hydrophobicity and cell surface charge control both adhesion to the matrix i.e. cell mobility, and heavy metal adsorption, i.e. cell carrier potential. These results demonstrate clearly that micro-organisms can mediate the transport of heavy metal pollutants in soil and that this important mechanism can become dominant under precise climatic conditions.

## INTRODUCTION

Le transport de polluants provenant d'opérations agricoles et industrielles de la surface vers les eaux souterraines est de plus en plus reconnu comme un problème environnemental majeur car ces polluants peuvent atteindre l'homme par contact direct avec le sol, par inhalation ou au travers de la chaîne alimentaire. Des études passées traitant de la migration de polluants aux niveaux des zones souterraines ont considéré le sol ou l'eau souterraine comme étant essentiellement un système à deux phases où les polluants pouvaient se distribuer entre la phase aqueuse mobile et la phase solide immobile. Il a ainsi été prévu que beaucoup de polluants soient relativement immobiles. Cependant de récentes observations suggèrent que sous certaines conditions

physico-chimiques et hydrodynamiques, des polluants réputés immobiles se retrouvent dans les nappes et seuls des processus de transport secondaires peuvent expliquer ces observations [Ryan et Elimelech, 1996...]. Un des principaux processus qui pourrait être mis en cause est le transport des polluants facilité par des colloïdes ou particules plus ou moins grossières. Toutefois, peu d'évidences expérimentales de ce processus sont encore disponibles et ne sont que très partielles (Krantz-Rülcker et al. 1996, Ledin 2000, Citeau et al. 2003). Pour mettre en évidence le rôle que peuvent jouer les colloïdes dans le transport des polluants, il faut considérer d'une part les mécanismes de transport des colloïdes eux mêmes et d'autre part le mécanisme de sorption du contaminant sur ces colloïdes. En particulier l'effet des bactéries sur le transport accéléré des polluants métalliques est mal connu, bien que les microorganismes soient présents partout dans les sols et les eaux et, en tant que particules colloïdales présentent des propriétés de mobilité et de mobilisation des polluants tout à fait importantes. Les objectifs de ce travail étaient précisément de déterminer les facteurs qui peuvent influencer ces deux mécanismes parmi des paramètres chimiques (chimie de la solution, structure des colloïdes et des surfaces, ...) et physiques (vitesse du fluide, ...), afin d'améliorer les connaissances sur le transport accéléré des polluants métalliques dans les sols. Nous avons ainsi étudié le transport de deux bactéries (*Ralstonia metallidurans* CH34 et *Escherichia coli*) et leur effet sur le transport du Zn, Cd, et Hg. D'autre part, nous avons caractérisé les relations liant l'ambiance géochimique dans le sol aux propriétés des micro-organismes (force ionique, concentration, hydrophobie, potentiel zêta) qui contrôlent leur mobilité et la fixation de polluants métalliques. Ainsi nous avons mis en évidence une accélération importante (jusqu'à 3,5 fois) du transport de métaux par les cellules bactériennes.

## MATERIEL ET MÉTHODES

### Les métaux lourds

Les métaux lourds modèles que nous avons étudiés sont le zinc, le cadmium et le mercure, choisis pour leurs propriétés chimiques contrastées leur conférant une toxicité, réactivité et mobilité variables. De plus ils sont présents en abondance dans de nombreux sites et friches industriels. Ces métaux sont utilisés sous la forme de nitrate hydraté :  $Zn(NO_3)_2$ ,  $Cd(NO_3)_2$  et  $Hg(NO_3)_2$  à des concentrations allant de 9 à 306  $\mu M$ . Les métaux ont été dosés par ICP-AES (Perkin Elmer), dans les surnageants ou les cultures après extraction par  $H_2O_2$  ou NaOH/SDS.

### Les colonnes de milieux poreux

Nous avons utilisé une matrice modèle simple : le sable de Fontainebleau (Prolabo - n° lot : 144YR). Ce sable possède peu de sites d'adsorption (fer : 70  $mg.kg^{-1}$  et

aluminium : 340  $mg.kg^{-1}$  [Martins, 1993]) et présente une granulométrie comprise entre 150 et 210  $\mu m$ , une surface spécifique d'environ 0,0190  $m^2.g^{-1}$  et une masse volumique de grains de 2,7  $g/cm^3$ . Les procédés de préparation et d'utilisation des colonnes sont ceux décrits par Martins et al. [1999]. Les expériences de transfert consistent à introduire dans une colonne soumise à un écoulement d'eau permanent à saturation, un créneau de métaux ou de suspension colloïdale et à suivre et analyser au cours du temps le volume et la concentration du liquide écoulé en sortie de colonne. L'analyse des échantillons collectés permet de tracer les courbes d'éluion  $C = F(t)$  qui sont présentées sous forme adimensionnelle de façon à pouvoir les comparer et les analyser pour identifier les mécanismes de transfert.

### Les colloïdes bactériens

Les souches bactériennes retenues pour cette étude sont : *Ralstonia metallidurans* CH34 (anciennement *Alcaligenes eutrophus* CH34) et *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ). Aérobies et à gram négatif, ces deux bactéries ont une forme de bâtonnets de 0,8-1  $\mu m$  / 0,3-0,5  $\mu m$ . *Ralstonia metallidurans* CH34 est une bactérie du sol présente sur de nombreux sites pollués par les métaux dans de nombreuses régions du globe [Mergey et al., 1985] et résistante à une large gamme de métaux lourds ( $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,...). Les bactéries sont cultivées à 28°C en milieu Luria broth (LB) liquide ou solide [Andrès et al., 2000]. Le dénombrement des bactéries est effectué par la méthode indirecte de dilution et étalement sur milieu LB et sélection par ampicilline. De plus des relations ont été établies entre la densité optique (DO à 600 nm) des cultures bactériennes et le nombre de cellules présentes (unité formant colonie, UFC), ce qui permet de dénombrer rapidement les bactéries à l'aide d'un spectrophotomètre (Lambda 25 Perkin Elmer) en routine dans le surnageant des cultures.

### Propriétés de surface des colloïdes bactériens

#### Le potentiel zêta

Les potentiels de surface des particules ne pouvant être mesurés directement, ils sont estimés par la mesure de la charge de la double couche externe (potentiel zêta) à partir de la mesure de mobilité électro-phorétique des particules par zétamétrie (Zétasizer 3000HS, Malvern).

#### L'hydrophobie

Le test BATH [Al Tahhan et al., 2000] a été modifié pour pouvoir mesurer le coefficient de partage des bactéries entre une phase aqueuse et une phase organique. Ce test consiste à mélanger fortement 4 ml d'une suspension bactérienne ( $DO_{600} \sim 1$ ) et 1 ml d'hexadécane et à laisser reposer le mélange 15 min. On procède ainsi plusieurs fois jusqu'à équilibre de la  $DO_{600}$  dans la phase aqueuse, ce qui permet de calculer un coefficient de partage eau/hexadécane, indicateur de l'hydrophobie cellulaire relative.

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Propriétés des colloïdes bactériens

#### Potentiel de surface

Les résultats des mesures de potentiels zêta sont présentés dans la figure 1.

Nous avons observé que *E. coli* présente un potentiel zêta dans l'eau déminéralisée plus négatif (-54 mV) que *R. metallidurans* (-14 mV). Il existe une relation logarithmique entre le potentiel zêta des bactéries et la force ionique de la solution. On voit en effet que l'augmentation de la force ionique (de 0 à 0.1 M) entraîne une augmentation des potentiels zêta de -54 à -28 mV pour *E. coli* et de -14 à -3 mV pour *R. metallidurans*. Ceci est en accord avec d'autres travaux [Jucker et al., 1996 ; Vigeant et al. 1997, Otto et al., 1999] et peut s'expliquer par l'existence de groupements de surface différents pour *E. coli* et *R. metallidurans* induisant une charge différente.

#### Hydrophobie

Les résultats des mesures d'hydrophobie sont présentés dans la figure 2. Ces mesures représentent des valeurs relatives d'hydrophobie permettant de classer les souches entre elles.

Dans les différentes solutions testées, *E. coli* présente un caractère plus hydrophobe que *R. metallidurans*, ce qui signifierait une meilleure adhésion sur les surfaces solides et donc une plus faible mobilité. Ces résultats ont permis de calculer le coefficient de partage hexadécane/eau (K<sub>HW</sub>) des deux bactéries :

$$K_{HW} = \frac{[C_{bact}]_{Hexadécane}}{[C_{bact}]_{Eau}}$$

Ainsi le coefficient de partage K<sub>HW</sub> d'*E. coli* est de 0.25 et celui de *R. metallidurans* de 0.05. D'autre part, nous avons observé (résultats non présentés) que l'augmentation de la force ionique de la phase aqueuse dans l'eau a pour effet de réduire très fortement (4 à 20 fois) l'hydrophobie apparente des deux bactéries.

#### Capacité de bio-sorption des colloïdes bactériens

Les essais de bio-sorption des polluants sur les colloïdes bactériens ont été menés avec les protocoles décrits par Martins and Mermoud [1998] autant pour les cinétiques que pour les isothermes. Les résultats des cinétiques d'adsorption ont montré que les temps d'équilibre de l'adsorption sont très rapides, entre 15 et 30 minutes, quelle que soit la bactérie et le métal. Les isothermes d'adsorption (fig. 3) montrent que l'adsorption des métaux par *R. metallidurans* se fait suivant un isotherme linéaire. Les coefficients de distribution (K<sub>d</sub>) calculés sont de 98,

286 et 324 340 cm<sup>3</sup>/g pour le cadmium, le zinc et le mercure respectivement.

*E. coli* montre une capacité d'adsorption élevée mais avec des isothermes qui ne sont plus linéaires sur la gamme de concentrations utilisées mais suivent une loi de type Langmuir qui est un modèle mono-couche, justifiant l'observation d'un plateau qui correspond à la

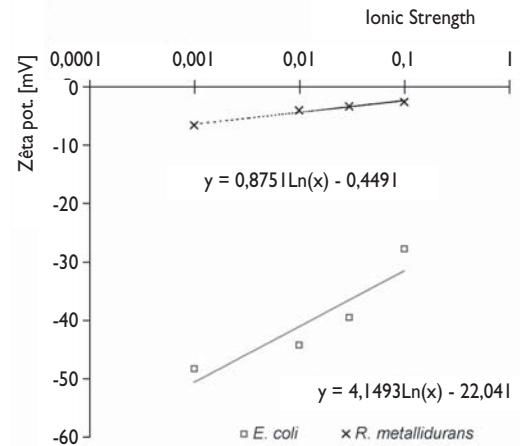


Figure 1 : Evolution des potentiels zêta de *R. metallidurans* CH34 et *E. coli*.

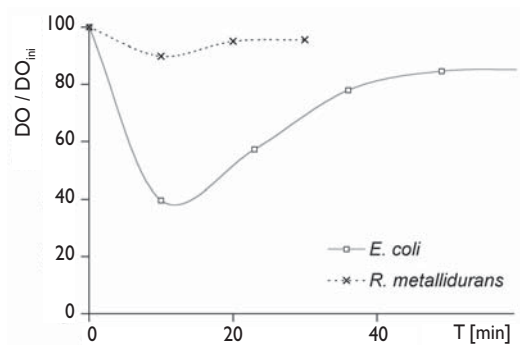


Figure 2 : Hydrophobie relative de *R. metallidurans* CH34 et *E. coli* mesurée à l'aide du test Bath modifié

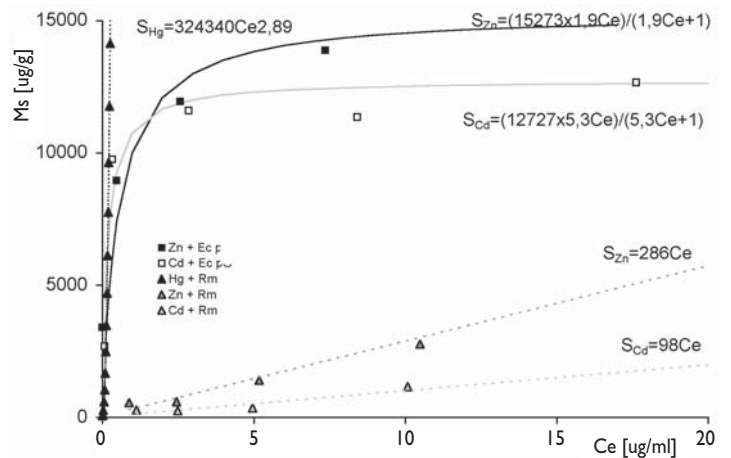


Figure 3 : Isothermes d'adsorption de Zn, Cd et Hg sur *R. metallidurans* et *E. coli* à pH6

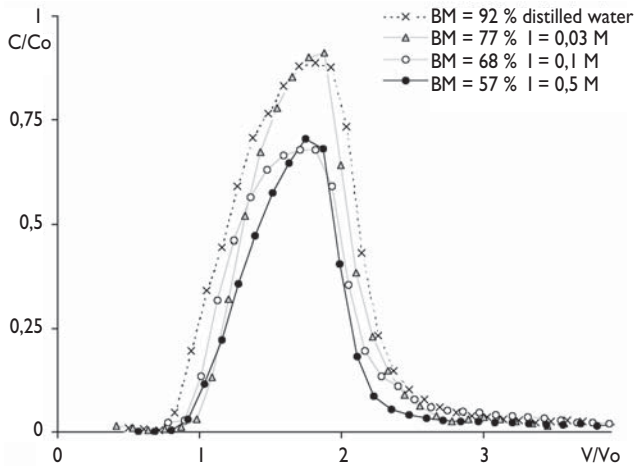


Figure 4 : Effet de la force ionique sur le transport de *R. metallidurans* CH34. (BM = bilan de masse)

saturation des sites de sorption.

Ces résultats confirment la très forte affinité des métaux lourds pour les cellules bactériennes et montrent que celles-ci peuvent accumuler des grandes quantités de métaux et sont donc susceptibles de servir de vecteur dans les sols.

#### Transport des colloïdes bactériens

Le transport des bactéries a été étudié indépendamment pour chaque bactérie et nous avons pu montrer que la force ionique et la concentration cellulaire affectent largement le transport de ces colloïdes (figures 4 et 5). Les courbes de percée d'*E. coli* et de *R. metallidurans* présentent peu de retard (R) par rapport au transport de l'eau (R = 1.1 pour *E. coli* et 1.3 pour *R. metallidurans*). L'effet de l'augmentation de la force ionique de l'eau (fig. 4, seuls les résultats avec *R. metallidurans* sont présentés, ceux avec *E. coli* étant similaires) est d'une part, une diminution forte (selon une relation logarithmique) de la mobilité (représentée par le bilan de masse ([UFC]s/[UFC]e), et, d'autre part, une augmentation du facteur de retard de 1,3 à 1,5. Nous avons vu précédemment que l'augmentation de la force ionique diminue l'hydrophobie des bactéries (favorisant ainsi leur transport), mais que cela augmente simultanément le potentiel zêta (favorisant au contraire l'agglomération et donc la rétention des

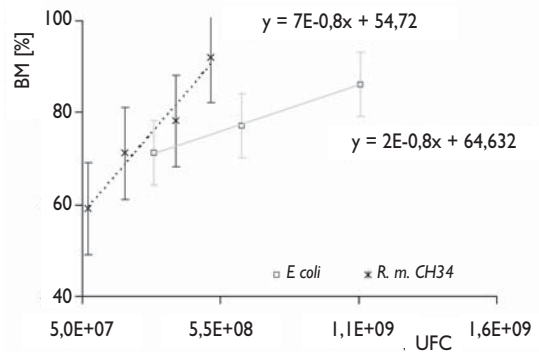


Figure 5 : Taux de transport des colloïdes bactériens en fonction de la concentration cellulaire

bactéries). Il semble donc que c'est l'effet sur le potentiel zêta c'est à dire sur la charge de surface qui domine. Des résultats similaires ont été observés par Ryan et al. [1996] et Gannon et al. [1991] qui peuvent s'expliquer par la théorie DLVO selon laquelle la charge apparente des particules est liée à l'ambiance ionique de la solution favorisant ou non la coagulation de ces particules.

Pour les deux types de bactéries, l'effet de la concentration colloïdale se traduit par le fait que plus il y a de cellules et plus leur mobilité est importante. Cela s'explique par le fait que les sites de fixation des bactéries dans le sol étant rapidement saturés le surplus de cellules peut transiter sans s'adsorber sur la matrice. La relation entre ces deux paramètres est linéaire (fig. 5).

#### Transport de métaux lourds

Les courbes de percée de Hg, Zn et Cd dans le sable de Fontainebleau sont présentées figure 6 (■). Ces courbes sont différentes pour les trois métaux et elles montrent l'existence d'interactions entre le sable et les polluants. La courbe d'élution du cadmium présente un facteur de retard (R) de 3,5 (il se déplace donc 3,5 fois plus lentement que l'eau), beaucoup plus important que celui du zinc (2,5) et du mercure (1,4). Pour ce qui est des bilans de masse, le zinc est d'avantage retenu dans le milieu poreux avec un bilan de masse de 53 % contre 67 %

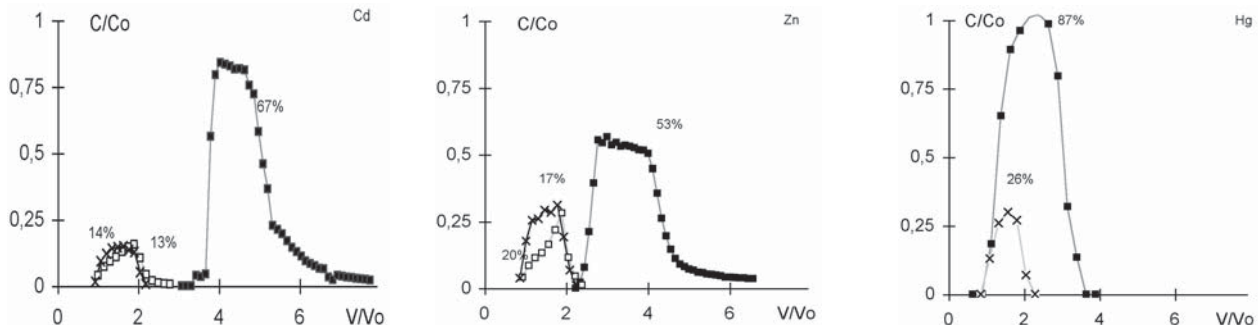


Figure 6. Courbe d'élution de Cd, Zn et Hg sans (■) et avec *R. metallidurans* CH34 (x) ou *E. coli* (□) (DH5a) à pH6



pour le cadmium et 74 % pour Hg. Il existe donc deux types d'interactions avec la matrice solide : des interactions réversibles et non réversibles.

### Transfert des métaux facilité par les bactéries

Les résultats du transfert simultané de métaux et de bactéries en colonnes (figure 6) montrent clairement l'influence de ces dernières sur le transport des 3 métaux lourds étudiés. En effet, les facteurs de retard des métaux deviennent proches de ceux des bactéries (environ 1), signe que les métaux sont transportés par les bactéries et quasiment à la vitesse de l'eau. De plus, la quantité de métal bio-sorbé détectée en sortie de colonne est 4 à 6 fois plus importante que celle de métal dissout dans la phase aqueuse (processus de transport devenant quasiment négligeable). Toutefois les bilans de masse ont tendance à diminuer fortement pour chacun des métaux (par rapport aux essais sans bactéries) en raison de la rétention d'une partie des colloïdes bactériens dans le sol qui piègent des quantités importantes de métaux. Ces cellules bactériennes peuvent ensuite subir une remobilisation si les conditions géochimiques deviennent favorables à la déstabilisation des floccs cellulaires (diminution de la force ionique de la solution du sol par exemple).

### CONCLUSION

De nombreux cas de pollution des nappes sont encore mal prédits du fait du rôle que peuvent jouer certains mécanismes qui ne sont pas encore pris en considération dans les modèles. C'est le cas du transfert des polluants facilité par des colloïdes. L'objectif principal de cette étude était de caractériser le rôle des colloïdes bactériens modèles dans le transfert de métaux lourds (mercure, zinc et cadmium) en milieu poreux saturé. Les deux souches bactériennes utilisées étaient *E. coli* et *R. metallidurans*. Dans un premier temps, des expériences en batch ont permis de caractériser les propriétés spécifiques de ces deux colloïdes bactériens à savoir, la taille, les propriétés optiques, le potentiel zêta, l'hydrophobie et leur affinité pour les métaux modèles via la caractérisation des isothermes d'adsorption. Dans un second temps des expériences en colonnes ont permis de mettre en évidence les mécanismes de transport de bactéries et leur rôle dans le transfert des métaux ainsi que le contrôle exercé par les propriétés de surface des colloïdes et de la matrice. Les résultats observés ont mis en lumière l'importance du transport particulaire des polluants puisqu'en présence de *R. metallidurans* et *E. coli*, les facteurs de retard des métaux lourds sont considérablement réduits (jusqu'à 3.5 fois) et le transport est dominé par le transport particulaire alors que le transport en phase aqueuse devient négligeable. Les résultats de cette étude ouvrent une perspective pour la biore-médiation par l'apport de bactéries dans les sols pollués aux métaux lourds grâce à leur faculté à bio-concentrer

les métaux que l'on pourrait coupler à une lixiviation ultérieure des bactéries par des procédés faisant appel par exemple à des variations de force ionique.

### Jean M.F. Martins et Véronique Guiné

Laboratoire d'étude des transferts en hydrologie & environnement, UMR 5564, Grenoble (F), martins@hmg.inpg.fr, tél. : +33- (0)476 82 70 52

### Références bibliographiques

- Al Tahhan B., Todd E., Adria A. et Maier M. (2000) : *Rhamnolipid induced removal of lipopolysaccharide from Pseudomonas aeruginosa: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates* - App. Environ. Microbiol. 66: 3262-3268.
- Andrès Y., Thouand G., Boualam M. et Mergeay M. (2000) : *Factors influencing the biosorption of gadolinium by micro-organisms and its mobilisation from sand* - App. Microbiol. Biotech. 54: 262-267
- Citeau L., Lamy I., van Oort F. (2003) : *Colloidal facilitated transport of metals in soil under different land use. Colloids and Surfaces, Colloids and Surfaces, A: Physicochem. Eng. Aspects*, 217, 11-19
- Gannon J., Tan Y. H., Baveye P. et Alexander M. (1991) : *Effect of sodium chloride on transport of bacteria in a saturated aquifer material* - Applied of Environmental Microbiology
- Jucker B.A., Harms H. et Zehnder A. J. B. (1996) : *Adhesion of the positively charged bacterium Stenotrophomonas maltophilia 70401 to glass and teflon* - J. Bac. 178: 5472-5479
- Krantz-Rülcker, C., Allard, B. and Ledin, M. (1996) : *Zn, Cd and Hg accumulation by microorganisms, organic and inorganic soil components in multi-compartment systems* - Soil Bio. Biochem. 28:791-799
- Ledin M. (2000) : *Accumulation of metals by micro-organisms : processes and importance for soil systems*. Earth Sci. Rev. 1-31
- Martins J.M.F. (1993) : *Aspects hydrodynamiques, physico-chimiques et biologiques du devenir des pesticides dans les sols : application au pentachlorophénol en colonnes* - Thèse de doctorat de l'Université Joseph Fourier Grenoble I
- Martins J.M.F. and A. Mermoud (1998) : *Sorption and biodegradation of four nitroaromatic herbicides in mono and multi-solute saturated/unsaturated soil batch systems* - J. Contam. Hydrology. 33: 187-210
- Martins J.M.F. and A. Mermoud. (1999) : *Transport of rimsulfuron and its metabolites in alluvial soil columns* - Chemosphere. 38: 601-616.
- Mergeay M., Nies D., Schlegel H. G., Gertis J., Charles P. et Van Gijsegem F. (1985) : *Alcaligenes eutrophus CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals* - Journal of Bacteriology 162: 328-334
- Miquel G. (2001) : *Effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé* - Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques : rapport n°261
- Otto K., Elwing H. and Hermansson M. (1999) : *Effect of ionic strength on initial interactions of Escherichia coli with surfaces, studied on line by a novel quartz crystal microbalance technique* - J. Bac. 181: 5210-5218
- Ryan J. N. et Elimelech M. (1996) : *Colloid mobilization and transport in groundwater (Review)* - Colloids and Surfaces 107 : 1-56
- Vigeant M. A. S. et Ford R.M. (1997) : *Interactions between motile Escherichia coli and glass in media with various ionic strengths, as observed with a three-dimensional-tracking microscope* - App. Environ. Microbiol. 63 : 3474-3479