

BIOREMEDIATION DES MÉTAUX LOURDS PAR LES BACTÉRIES SULFATO-REDUCTRICES

Caroline Michel, Bruno Chardin, Mireille Bruschi

CNRS Marseille

Le traitement des sols et nappes pollués par des métaux lourds constitue un enjeu économique et environnemental. Le développement de nouveaux procédés impliquant des micro-organismes pourrait permettre d'apporter des solutions alternatives écologiques et moins coûteuses que les procédés chimiques actuellement utilisés. De par leur activité métal-réductase, les bactéries sulfato-réductrices sont de bonnes candidates pour une dépollution à l'échelle industrielle. La caractérisation des enzymes compétentes pour la réduction des métaux par ces bactéries permettra d'améliorer le processus de bioremédiation.

The treatment of soils and ground water polluted by heavy metals is of economical and environmental interest. The development of new processes using micro-organisms may offer alternative ecological solutions less expensive than usual chemical processes. In addition to the chemical indirect reduction due to the production of H₂S, sulfate-reducing bacteria can also reduce metals directly by an enzymatic way. So, these bacteria are good candidates for industrial metal removal. The characterization of competent enzymes for metal reduction will improve the bioremediation process. Among them, a low redox potential tetrahemic cytochrome c₃ is a constitutive enzyme of the sulfate-reducing bacteria. The reduction of U (VI) and Cr (VI) by this cytochrome has already been demonstrated. Studies presented here show that others homologous cytochromes can reduce V (V), Mn (IV), Fe (III) and Cr (VI). The results indicate that only the low redox potential cytochromes present in sulfate-reducing bacteria can act as metal-reductases. We also observed that sulfate-reducing bacteria rapidly reduce chromate. Growth with Cr (VI) induces morphological changes and a decrease in the growth rate of the bacteria.

Les métaux toxiques représentent une des sources de pollution les plus difficiles à éliminer au niveau des sols, des sédiments et des effluents. En effet, les métaux tels que le mercure, le cadmium, l'arsenic, le plomb, le cuivre, le chrome... sont particulièrement dangereux, de même

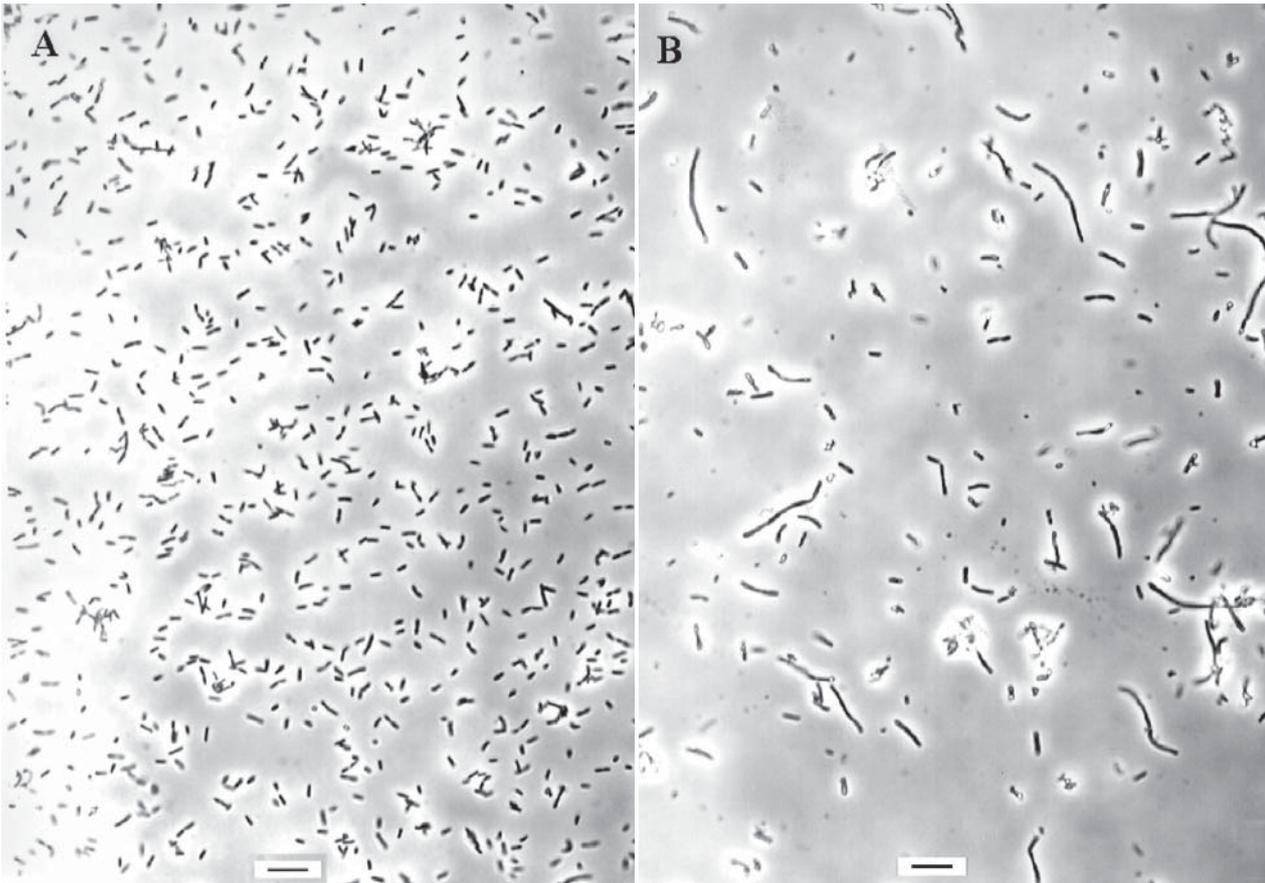
que leurs composés. Dans le cas du chrome, par exemple, l'ion Cr(VI) est un oxydant puissant qui s'accumule dans tous les organes. L'exposition chronique provoque des cancers parfois 20 à 30 ans après exposition.

Le développement industriel (chimie, pétrochimie, métallurgie, automobile, traitement de surface...) est responsable de l'augmentation des rejets comportant des métaux lourds toxiques aussi bien pour l'environnement au sens général que pour l'homme. Pour les mines pratiquant l'extraction des métaux de base, les eaux de drainage acides présentent un pH compris entre 2 et 4, et des concentrations élevées en sulfate et métaux (Fe, Al, Cu, Zn, As, Ni, Co, Cd, Pb...).

Contrairement aux polluants organiques, les métaux et métalloïdes ne sont pas dégradés. La neutralisation à la chaux, couramment appliquée, est efficace mais relativement coûteuse. De plus, ce traitement chimique génère des quantités non négligeables de résidus solides non valorisables. À l'heure actuelle, il n'existe pas de procédé économiquement rentable permettant une réutilisation des sols ou des matériaux contaminés par des métaux toxiques. Les techniques existantes impliquent soit un traitement chimique (mise en solution des ions métalliques toxiques par lixiviation en réacteur ou fixation des ions métalliques dans les matériaux conduisant à l'inertage des sols), soit un confinement pur et simple des sols et matériaux sur le site par encapsulation ou hors-site dans un site d'enfouissement technique. Dans tous les cas, les solutions existantes interdisent une réutilisation des sols et des matériaux, qui contiennent toujours (en absence de lixiviation) les métaux polluants ou les produits chimiques utilisés pour les éliminer. La réduction des métaux par les bactéries pourrait donc être une technique alternative efficace, écologique et moins coûteuse que les techniques chimiques, pour détoxifier les milieux pollués.

INTÉRÊT DES BACTÉRIES SULFATO-REDUCTRICES

Les bactéries sulfato- et soufre-réductrices constituent un groupe de bactéries anaérobies dont la caractéristique commune est l'utilisation du soufre et/ou de ses formes



Observation en microscopie optique de *Desulfomicrobium norvegicum* a/en absence de Cr (VI),

b/en présence de 250 µM Cr (VI). Référence = 10 µm

oxydées comme accepteur d'électrons. Cette respiration des sulfates se distingue des autres types de respiration par l'implication de cytochromes c multihémiques de très bas potentiels. Un grand nombre de cytochromes c possédant 4, 8 ou 16 hèmes ont été découverts chez les bactéries soufre- et sulfato-réductrices, conduisant à la définition d'une superfamille de cytochromes c₃. Divers traitements biologiques utilisant des bactéries sulfato-réductrices (BSR) ont été élaborés depuis plusieurs dizaines d'années. Mais, jusqu'à une date récente, il était généralement admis que la précipitation des métaux résultait du métabolisme bactérien de façon indirecte, par l'effet conjugué d'une alcalinisation du milieu et de la production d'hydrogène sulfuré. En 1991, Lovley et al.^[1,2] signalent que la réduction des métaux dans les milieux anaérobies est souvent le résultat d'une réduction enzymatique directe par les bactéries. Ainsi, *Desulfovibrio desulfuricans*, une BSR, est capable de réduire enzymatiquement l'uranium qui précipite sous forme d'uranite (UO₂). L'étude de ce mécanisme de réduction a établi que le cytochrome c₃, caractéristique des BSR du genre *Desulfovibrio*, était responsable de la réduction enzymatique de l'uranium. En présence d'hydrogénase, son partenaire physiologique, et d'hydrogène, il réduit l'U(VI), et entraîne sa précipitation. Ce même processus peut être

étendu à la réduction du chrome^[3] et du méthyl-mercure^[4]. Ce cytochrome peut être considéré comme le premier enzyme modèle pour la réduction de métaux lourds. Aussi, il est envisageable d'utiliser des cellules entières, libres ou fixées, en bioréacteurs ou de mettre en œuvre des enzymes efficaces dans des réacteurs à enzymes fixées. Lorsque des cellules entières seront utilisées, les deux mécanismes de précipitation, réduction enzymatique et réaction avec l'H₂S d'origine bactérienne seront combinés.

ÉTUDE DE L'IMPACT DU CR (VI) SUR LES BACTÉRIES SULFATO-RÉDUCTRICES

Malgré la toxicité des métaux lourds, la présence de micro-organismes, notamment de BSR, a été mise en évidence dans des milieux contaminés. Notre démarche a donc été d'étudier les effets du Cr(VI) sur la croissance et la morphologie des BSR.

Pour cette étude, *Desulfomicrobium norvegicum* a été cultivée (inoculation à 10 % (vol/vol)) sur milieu de Starkey (pH 7,2) en conditions anaérobies à 37 °C en présence de Cr (VI) à diverses concentrations. Il a été observé que cette souche est capable de croître en présence d'une concentration de Cr(VI) pouvant aller jusqu'à 500 µM, et ceci pendant plusieurs repiquages successifs. Cependant la croissance est ralentie en présence du

métal : la phase stationnaire est atteinte après 24 heures de croissance (au lieu de 20 heures en absence de Cr(VI)). L'observation par microscopie optique des cellules a montré un changement de morphologie (photos 1a et 1b) : en présence de Cr(VI), les bactéries forment de longs filaments. On peut donc supposer que le Cr(VI) affecte la séparation des cellules après leur division. On peut également observer un allongement et un épaississement des cellules en présence de Cr(VI).

L'activité chromate réductase de *Desulfomicrobium norvegicum* a été mesurée à 37 °C en suivant la disparition du chrome hexavalent réduit en Cr(III) dans un milieu (tampon bicarbonate, pH 6,8) ne contenant pas de sulfate afin d'éviter une production d'H₂S par les bactéries (figure 1). Le dosage du Cr(VI) se fait par la méthode du diphénylcarbazide^[3]. Les résultats montrent que la réduction du Cr(VI) par *Desulfomicrobium norvegicum* (10¹⁰ cellules environ) a lieu dès les premières minutes; tout le Cr(VI) disparaît en 30 minutes. *Desulfomicrobium norvegicum* cultivée en présence de chromate (sur milieu de Starkey) pendant plusieurs générations possède toujours la capacité de réduire le métal. L'activité Cr(VI) réductase est cependant plus faible que celle obtenue lorsque la souche est cultivée en absence de chromate. Nous avons aussi étudié l'activité Cr(VI) réductase de la souche en fonction du donneur d'électrons (figure 2) : *Desulfomicrobium norvegicum* est capable de réduire le Cr(VI) en utilisant le lactate (6 g/l) ou l'hydrogène (présent en excès) comme donneurs d'électrons. Ce dernier résultat est intéressant d'un point de vue industriel, l'H₂ étant un substrat industriel peu onéreux.

ÉTUDE DE LA RÉDUCTION DES MÉTAUX PAR LES CYTOCHROMES C₃

Les cytochromes c₃ sont des protéines périplasmiques présentes chez toutes les BSR du genre *Desulfovibrio* et sont les partenaires physiologiques (accepteurs d'électrons) des hydrogénases également périplasmiques. La présence de trois types différents de cytochromes c multihémiques formant la superfamille des cytochromes c₃ a été mise en évidence dans notre laboratoire^[5] :

- le cytochrome c₃ tétrahémique (Mr 13000), possédant 4 hèmes par molécule ;
- le cytochrome c₃ octahémique (Mr 26000), composé de deux sous-unités identiques et huit hèmes par molécule ;
- et le cytochrome Hmc de poids moléculaire 65500 Da, comportant 16 hèmes par molécule.

Ces cytochromes ont été purifiés selon le protocole décrit dans la référence 5.

Tous ces cytochromes sont homologues et sont le résultat de mutations et/ou de fusions de gènes produits au cours de l'évolution de ces bactéries anciennes (environ 3 milliards d'années). Le cytochrome c₃ tétrahémique est l'unité structurale de base de la superfamille des cytochromes c₃. Tous les hèmes de ces cytochromes sont caractérisés par les mêmes ligands axiaux du fer, qui sont

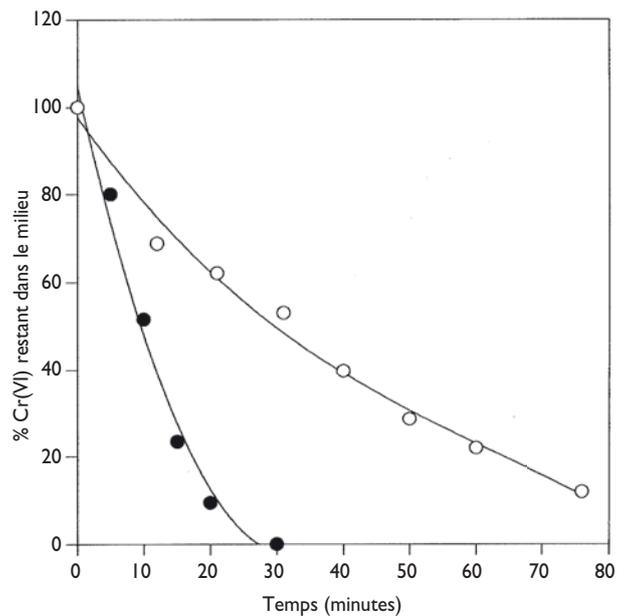


Figure 1 : Activité chromate réductase de *Desulfomicrobium norvegicum* cultivée en absence (●) ou en présence (○) de 250 μM Cr(VI).

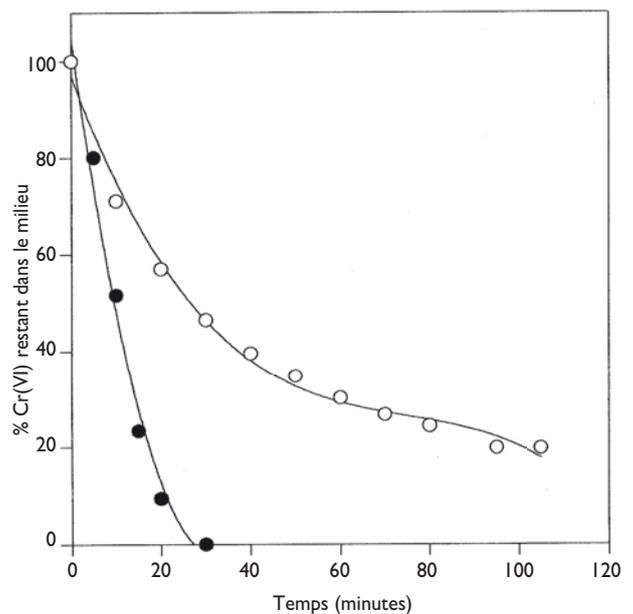


Figure 2 : activité chromate réductase de *Desulfomicrobium norvegicum* en fonction du donneur d'électrons : lactate (●), H₂ (○). Aucune réduction du Cr(VI) n'est observée en absence de donneurs d'électrons

deux résidus d'histidine au lieu d'histidine et méthionine dans les cytochromes mitochondriaux, et qui sont responsables de leur potentiel d'oxydoréduction très bas (-200 à -400 mV). Ces cytochromes possèdent de plus des propriétés de conductivité et de thermostabilité remarquables (température de dénaturation supérieure à 100 °C)^[6], ce qui présente des avantages certains au niveau d'une utilisation industrielle. Leur structure tridimensionnelle ne montre aucune similarité structurale avec le cytochrome c mitochondrial.

Un autre cytochrome n'appartenant pas à la superfamille des cytochromes c_3 a été mis en évidence chez les BSR. Le cytochrome c_{553} ^[7] est un cytochrome monohémique ayant un potentiel positif (+40 mV) et dont l'hème possède une coordination histidine-méthionine du fer.

Une approche électrochimique (études cinétiques du transfert d'électrons entre protéines et métaux par voltamétrie cyclique) a été utilisée afin d'étudier la réduction de métaux, comme le Fe(III), le V(V), le Mn(IV) et le Cr(VI) par des cytochromes purifiés^[8,9,10]. Ces cytochromes appartiennent soit à la superfamille des cytochromes c_3 (cytochrome c_3 tétrahémique de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, de *Desulfomicrobium norvegicum* et *Desulfovibrio gigas*, cytochrome c_7 de *Desulfuromonas acetoxidans*), soit à la classe I des cytochromes (cytochrome c_{553} de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, cytochrome c mitochondrial du cœur de cheval). La classe I regroupe des cytochromes monohémiques de potentiel positif, avec une coordination histidine-méthionine du fer de l'hème.

Le processus de réduction catalytique d'un complexe soluble du métal par les cytochromes multihémiques permet de mesurer une constante de vitesse de second ordre d'environ $5.10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Les résultats obtenus^[8,9] montrent que les cytochromes c de type mitochondrial et le cytochrome c_{553} de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough n'ont pas d'activité métal-réductase, contrairement aux cytochromes de la superfamille des cytochromes c_3 , ce qui suggère que la réduction des métaux nécessite la présence de centres hémiques de bas potentiel coordonnés par deux histidines au fer de l'hème.

PERSPECTIVES

La sélection de différentes souches de BSR, isolées de bassins miniers, ou de bactéries thermophiles, issues de sources hydrothermales à grande profondeur, est en cours afin de choisir les souches les plus performantes pour la réduction de différents métaux lourds toxiques. Un approfondissement de l'étude de l'impact du Cr(VI) sur la croissance bactérienne et de la cinétique de réduction du Cr(VI) en conditions environnementales sont également en réalisation par utilisation de la microcalorimétrie.

D'une manière plus fondamentale, le mécanisme de réduction enzymatique est en cours d'étude. Des essais préliminaires en bioréacteurs ensemencés par des BSR montrent un processus rapide de dépollution par passage à travers le bioréacteur d'un effluent contaminé par des métaux.

Caroline Michel, Bruno Chardin, Mireille Bruschi

CNRS - Bioénergétique et ingénierie des protéines - Institut de biologie structurale et microbiologie - 31, chemin Joseph Aiguier - 13402 Marseille cedex 20

Cette étude a pu être réalisée grâce au soutien de l'ADEME et du BRGM.

Bibliographie

- Lovley D.R., Widman P.K., Woodward J.C. and Phillips E.J.P. (1992). Reduction of uranium by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 850-856.
- Lovley D.R., Widman P.K., Woodward J.C. and Phillips E.J.P. (1993). Reduction of uranium by cytochrome c3 of *Desulfovibrio vulgaris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3572-3576.
- Lovley D.R. and Phillips E.J.P. (1994). Reduction of chromate by *Desulfovibrio vulgaris* and its c3 cytochrome. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 726-728.
- Choi S.C., Chase T. and Bartha R. (1994). Enzymatic catalysis of mercury methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* LS. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1342-1346.
- Bruschi M. (1994). Octaheme cytochromes from sulfate-reducing bacteria in organic microbial sulfur metabolism. A volume of methods in enzymology. John N. Abelson and Melvin I. Simon Editors-In-Chief (edited by H.D. Peck and J. Le Gall) 243, 140-155.
- Florens L., Bianco P., Haladjian J., Bruschi M., Protasevich I. and Makarov A. (1995). Thermal stability of the polyheme cytochrome c3 superfamily. *F.E.B.S. Lett.* 373, 280-284.
- Bruschi M. and LeGall J. (1972). C-type cytochromes of *D. vulgaris*: the primary structure of cytochrome c553. *Biochim. Biophys. Acta* 270, 48-60.
- Lojou E., Bianco P. and Bruschi M. (1998). Kinetic studies on the electron transfer between bacterial c-type cytochromes and the metal oxides. *J. of Electroanal. Chem.* 452, 167-177.
- Lojou E., Bianco P. and Bruschi M. (1998). Kinetic studies on the electron transfer between various c-type cytochromes and iron (III) using a voltametric approach. *Electrochim. Acta* 43, 2005-2013.
- Aubert C., Lojou E., Bianco P., Rousset M., Durand M.C., Bruschi M. and Dolla A. (1998). The *Desulfuromonas acetoxidans* triheme cytochrome c7 produced in *Desulfovibrio desulfuricans* retains its metal reductase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1308-1312.

Déchets Design

Les ambassadeurs du futur

Gérard Bertolini



Rapprocher déchet et design peut paraître singulier. Pourtant, le déchet intervient comme mécanisme de rappel; au-delà, il interpelle les designers, et plus largement les créateurs. De plus en plus, ils devront avoir une démarche prospective, anticipatrice, préventive, remettre en cause la conception des produits pour mieux tenir compte de l'après-usage et des préoccupations environnementales, qui constituent des valeurs d'avenir.

Et puis, une fois n'est pas assez. Réemploi, réutilisation, recyclage, boucles et cascades, les produits doivent devenir des re-produits, les créateurs des re-créateurs. Enfin, le produit doit être efficace dans sa mission, ainsi que dans sa démission. Pour les déchets ultimes (à réduire autant que possible), leur concours peut là encore être précieux.

Pour libérer l'avenir, le design doit investir le champ du déchet nous dit Gérard Bertolini, économiste, directeur de recherche au CNRS et spéculateur sur l'avenir des déchets.

Format 15,5*24 - 204 pages - 179 F TTC franco de port
(169,67 F HT - TVA 5,5 % : 9,33 F)

Société Alpine de Publications
7, chemin de Gordes - 38100 Grenoble
Tél. : 04 76 43 28 64 - Fax : 04 76 56 94 09