

Effet des bactéries sur les sols riches en uranium

Bioremédiation

Diversité des bactéries et des métabolismes

Solubilisation : biolixiviation

Fixation : réduction sous forme insoluble
biominéralisation
chélation

Projet du LIPM

Diversité bactérienne



- Bactéries ubiquistes majorité de la biodiversité
- 10^9 bactéries par g de sol.
10 000 espèces <3 % sont cultivables
- Adaptation à des environnements extrêmes
 - Naturels (fumeurs noirs, ...)
 - Pollués – activité anthropique
- Diversité de métabolismes



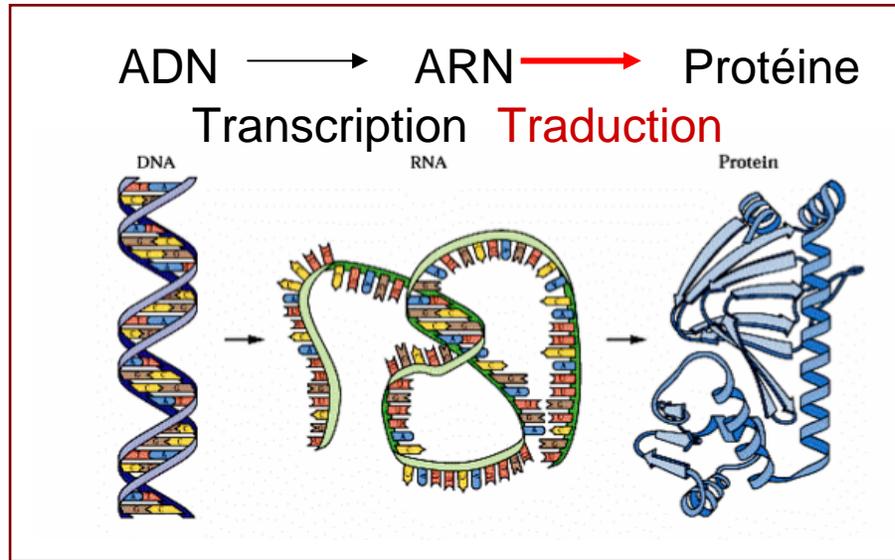
Diversité bactérienne



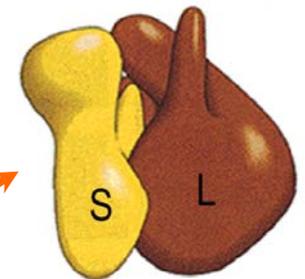
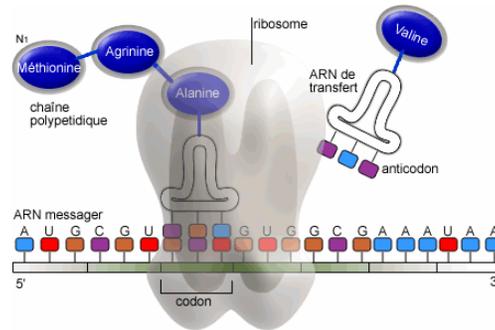
LES CONDITIONS EXTREMES DE VIE

<i>Catégorie</i>	<i>Record</i>	<i>Organisme</i>	<i>Lieu</i>
Chaud	121 °C	Strain 121	Fumeurs du Pacifique
Froid	-15°C	Cryptoendoliths	Antarctique
Radiation	1500 fois la tolérance humaine	Deinococcus radiodurans	Site de stockage nucléaire, Washington
Gravité	1 million de g	E. Coli	Centrifugeuse (laboratoire)
Profondeur	3,2 km sous terre 11000 m sous la mer	Bacillus infernus	Mines d'or, Afrique du Sud Fosse des Mariannes
Acide	pH=0,0	Thiobacillus	Glaces du Groenland
Basique	pH=12,8	Bacillus subtilis	
Espace	6 ans		Satellite de la Nasa
Pression	1090 fois la pression atmosphérique		Fosse des Mariannes
Salinité	300 g/l (10 fois la salinité de l'océan)	Haloarcula	Mer morte

Techniques moléculaires pour décrire la biodiversité



Ribosome :
machinerie universelle
de synthèse des protéines



ADNr16s : l'ADN qui code pour une sous unité

ADNr16s

Techniques moléculaires pour décrire la biodiversité

Extraction directe de l'ADN du sol

Amplification de l'ADNr16s

Régions très conservées et régions variables

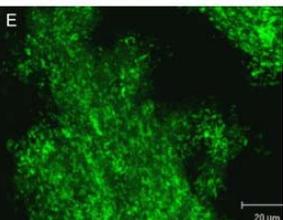
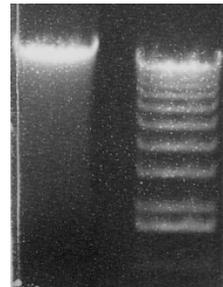
Séquençage direct de l'ADNr16s (ht débit) + analyse phylogénétique

Séquençage après **séparation** (DGGE)

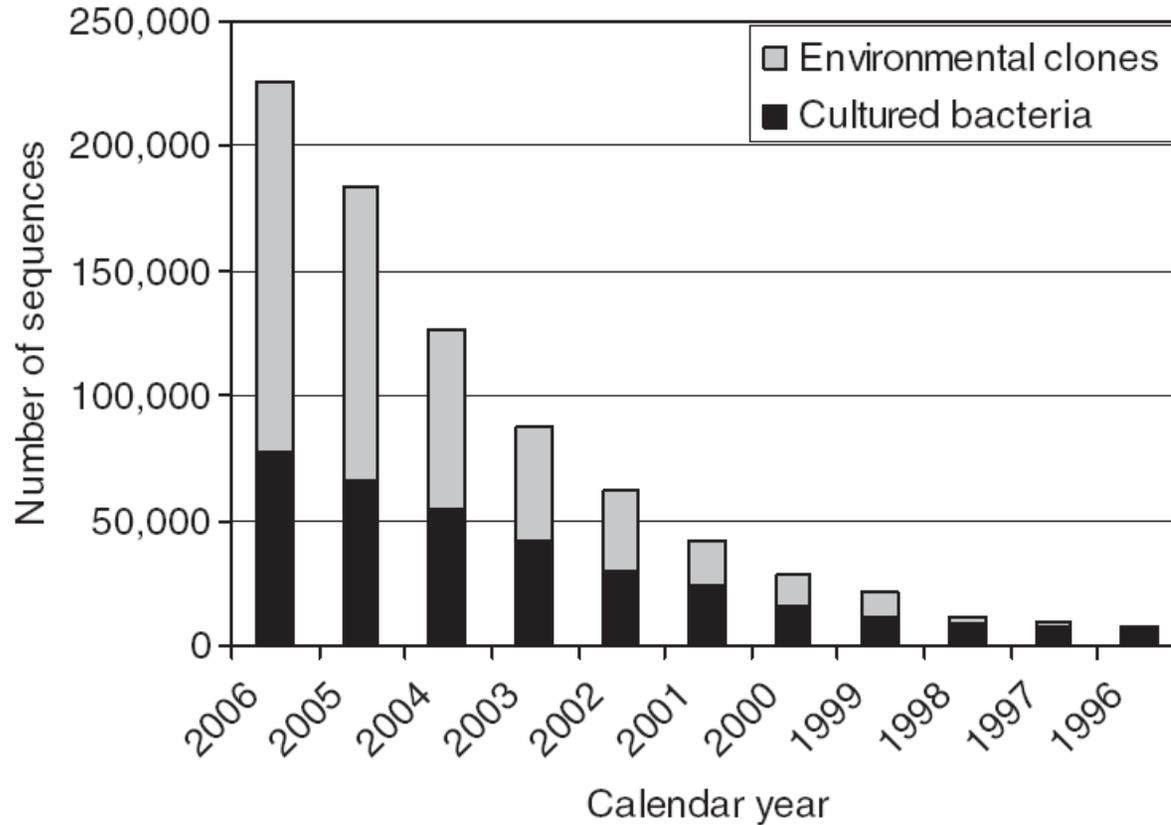
Bactéries présentes dans l'environnement étudié :

Hybridation avec des sondes fluorescentes

Analyse de l'ARN : indique les **populations actives** dans le milieu



Évolution des données de diversité bactérienne en 10 ans



Diversité des microorganismes = diversité des métabolismes



**Diversité de métabolismes
énergétiques**

Diversité de synthèse de métabolites
secondaires

Synthèse d'**ATP** • directe (**fermentation**)

• indirecte: oxydation d'un substrat et réduction d'un accepteur

→ transfert d'e⁻ à travers la membrane et gradient de proton
source d'énergie pour l'ATP synthase

Respiration aérobie

anaérobie

accepteur final d'électron : oxygène

sulfate, nitrate, CO₂, Fe³⁺

Énergie lumineuse : **Photosynthèse** bactérienne anoxygénique,
Photohétérotrophie

Énergie par oxydation de substrats inorganiques : **lithotrophie**

Bactéries chimiolithotrophes

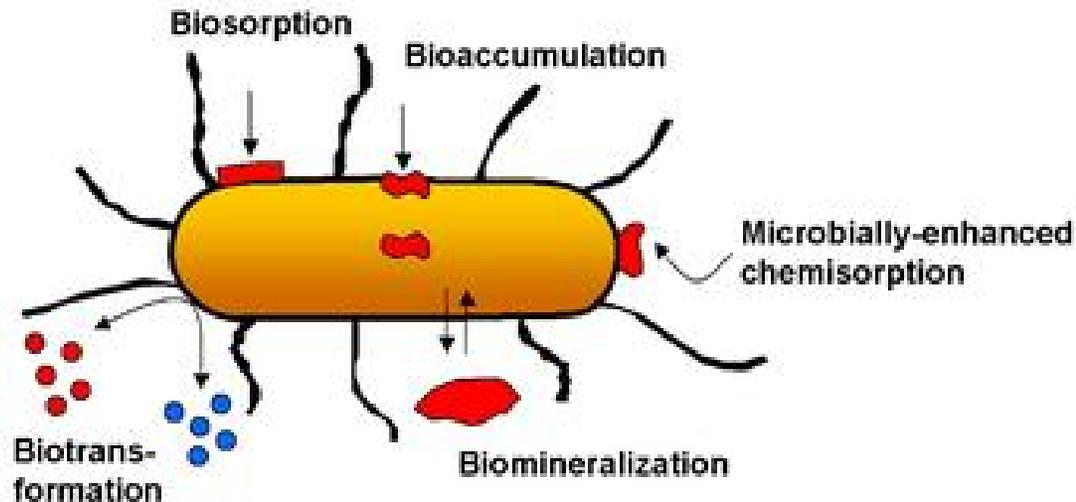


Bactéries chimiolithotrophes	Substrat(s) Oxydé(s) inorganique	Produit d'oxydation	Accepteur terminal d'électron
Bactéries nitrifiantes	NH ₃	NO ₃ ⁻	O ₂
	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	O ₂
<i>Thiobacillus denitrificans</i> Bactéries oxydant le Soufre	H ₂ S, S, S ₂ O ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	O ₂ / NO ₃ ⁻ / Fe ³⁺
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i> Bactéries oxydant le Fe ²⁺	Fe ²⁺	Fe ³⁺	O ₂
<i>Shewanella</i> Bactéries oxydant H ₂	H ₂	H ₂ O	O ₂ / NO ₃ ⁻ Fe ³⁺ / Mn ^{IV}

→ Réactions d'oxydoréduction qui impliquent directement ou indirectement les métaux, les sulfures ou le soufre inorganique, les nitrates

Croissance dans des milieux pauvres en matière organique

Différents types d'interactions bactéries - métal



Biotransformation: catalyse de la réduction/oxydation de radionucléides

Bio-sorption : sorption de radionucléides en formant des complexes avec des ligands cellulaires à la surface des cellules

Chimie-sorption: inclusion de cations métalliques dans des précipités inorganiques catalysé par bactéries.

Bio-accumulation: accumulation des métaux dans la cellule.

Biominéralisation: formation de précipités insolubles (phosphates)

Oxydation : biolixiviation

- Extraction par lessivage chimique ou biologique pour supprimer les contaminants



Processus indirect

bactéries



(Zn, Cd, Ni, Pb, Cu, Au, Mn, U)

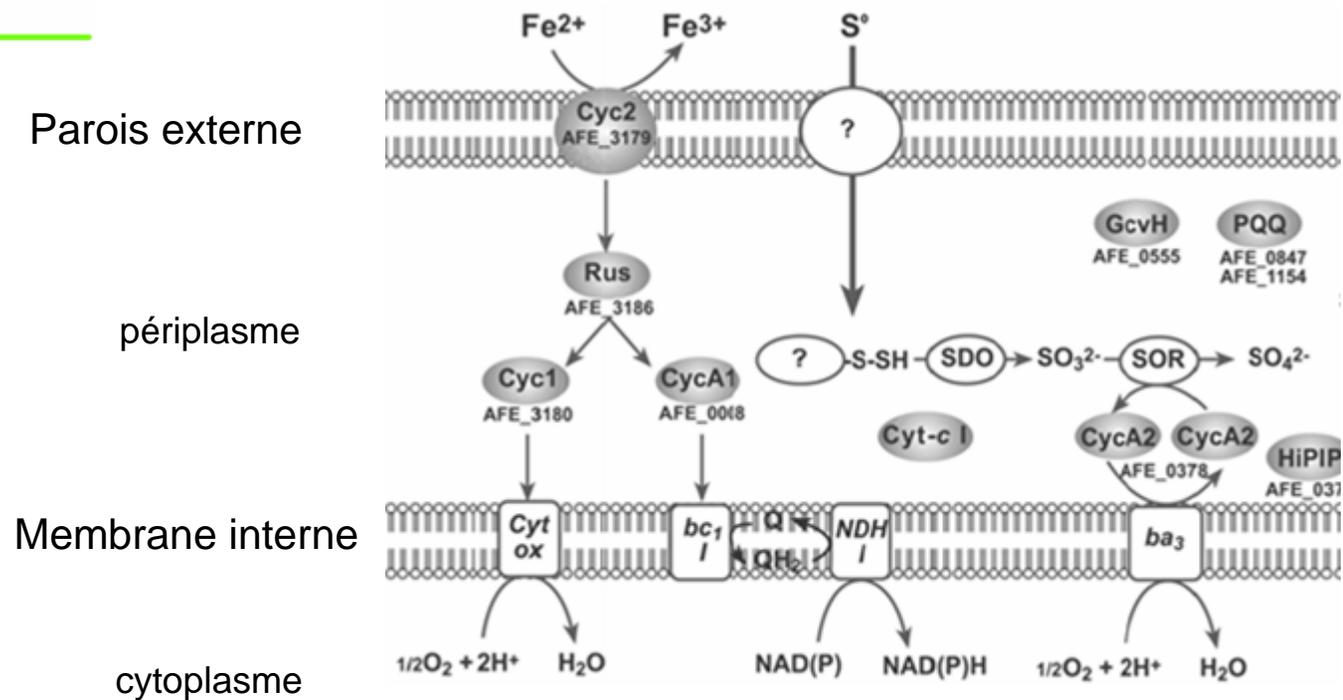
ou processus « direct »

bactéries



- *Acidithiophilus ferrooxidans* est une des bactéries les plus utilisées pour la bio-solubilisation
- découverte en 1947 des écoulements acides de mines de houille grasse

Acidithiobacillus ferrooxidans : le Fe²⁺ ou le S comme source d'énergie



Sources d'électrons pour la réduction de l'oxygène

T. ferrooxidans peut aussi réduire le Fe³⁺ en présence de sulfure en anaérobie

Microorganismes impliqués dans la biolixiviation de minerais d'uranium.



Substrat oxydé

pH

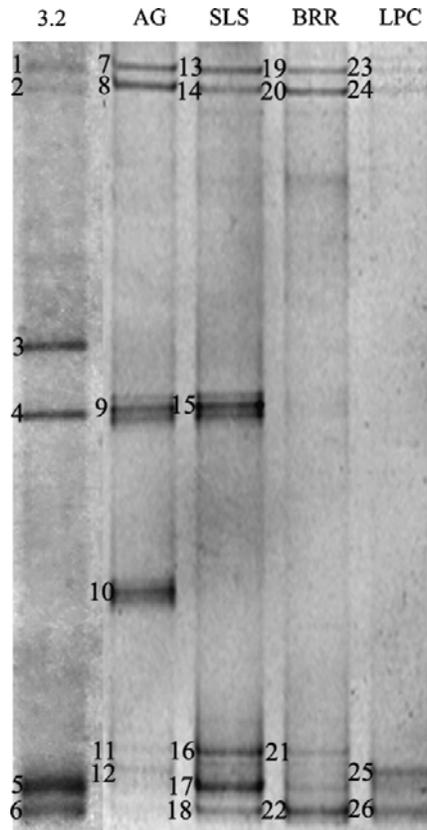
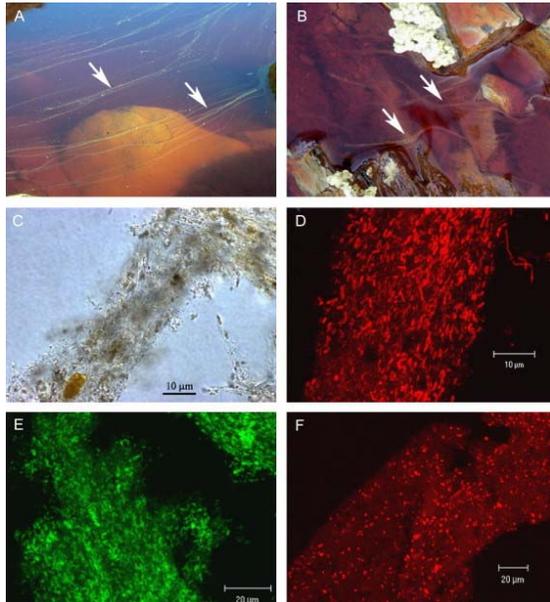
temp.

<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	Fe ²⁺ , S ⁰ , U ⁴⁺ , Cu ⁺ , Se ²⁺ , thiosulphate, tetrathionate, S ⁻	1.8-2	< 40°C
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	S ⁰ , thiosulphate, tetrathionate	0.5-5.5	
<i>Thiobacillus caldus</i>	idem		45-50°C
<i>Thiobacillus acidophilus</i>	S ⁰ , composés organiques		
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	Fe ²⁺ , Pyrite <i>fonctionne à haut potentiel (forte [Fe³⁺])</i>	1.5-1.8	
<i>Sulfolobus thermosulfiooxidans</i>	Fe ²⁺ , S ⁰ , S ⁻		45-55°C
<i>Sulfolobus metallicus</i>	Fe ²⁺ , S ⁰ , S inorganique		70-80°C
<i>Acidianus brierleyi</i>	S ⁰ , carbone organique	1.5-2	70-90°C

Chemolithotrophes obligatoires ou facultatifs, aérobie

Biolixiviation : bactéries des environnements acides

Rio Tinto



pH <3 analyse de la diversité :

30^{taine} d'espèces dominé par

Acidithiobacillus ferrooxidans

Leptospirillum ferrooxidans

Acidiphillum spp.

+

Desulfosporinosus et *Clostridium*
qui réduisent
le fer et les sulfates

+ bactéries hétérotrophes

Rouge : forte [Fe³⁺] due à la biolixiviation des minéraux par les microorganismes.

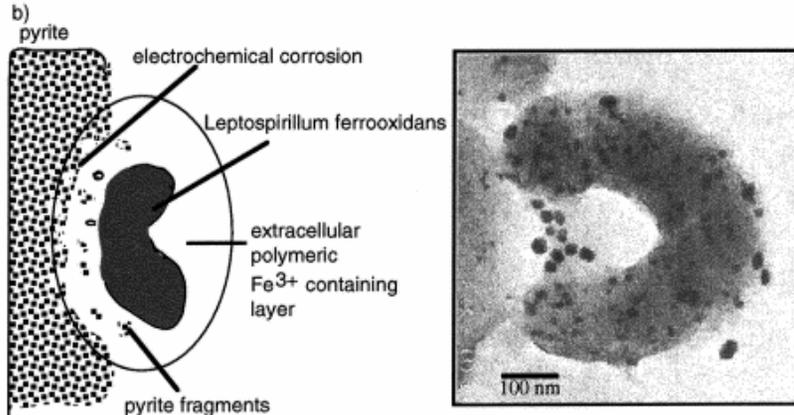
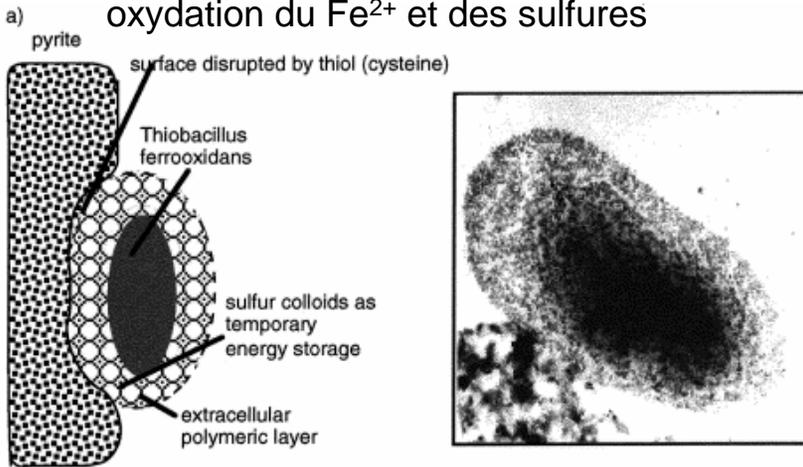
pH 2.3, cette eau permet d'extraire le Cu²⁺ de minerais à Cu.

A. Garcia-Moyano, et al., (2007) Syst. Appl. Microbiol. Sous presse

Stratégies d'attaque de la pyrite

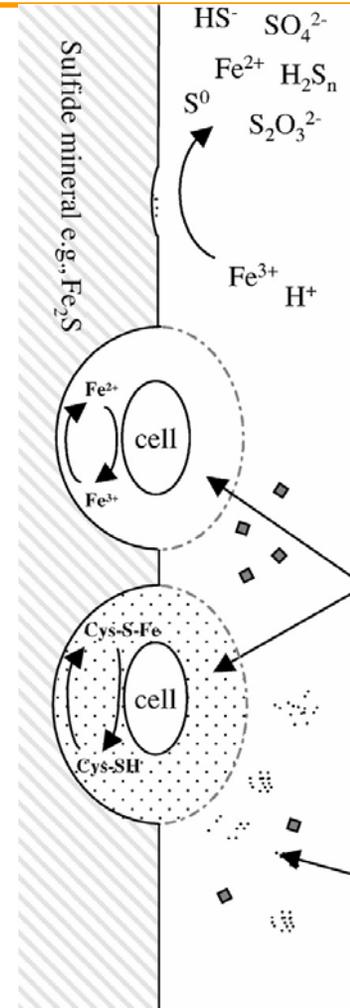
Thiobacillus ferrooxidans:

oxydation du Fe^{2+} et des sulfures



Leptospirillum ferrooxidans :

accumulation de Fe^{3+} dans les EPS
attaque électrochimique.



Biolixiviation sans contact
oxydation Fe , S_2^-

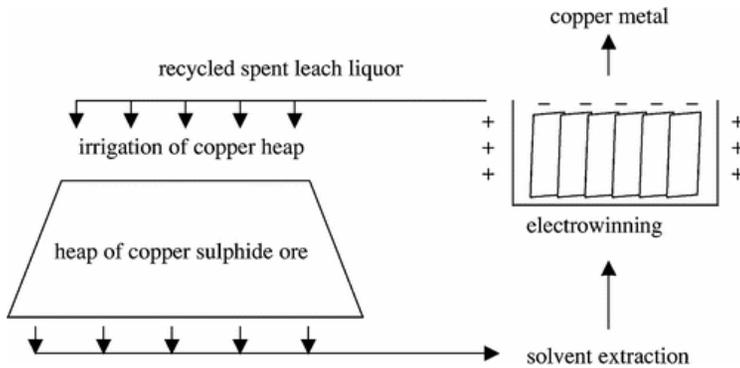
Attaque par contact :
Microenvironnement résultant

- de l'oxydation du Fe et pH très acide
- de l'oxydation des sulfures (thiols organiques cys)

Coopérativité :
utilisation des dérivés des sulfures
production de Fe^{3+}

H. Tributsch (2001) Hydrometallurgy 59, 177–185.

Biolixiviation de dépôts



Arrosage par la liqueur recyclée après récupération du Cu^{2+} (+ phase d'électrochimie)



Film thermo et irrigation, Cerro Colorado, Chili

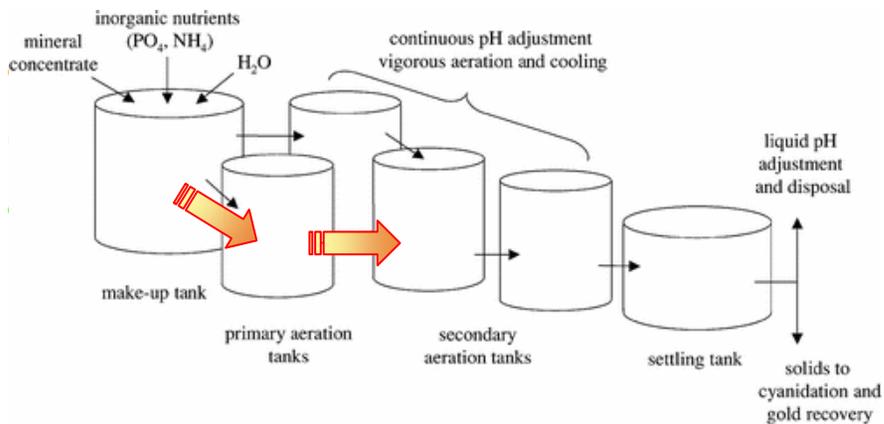
pH acide, chemilitotrophes :

At thiooxidans et *L. ferrooxidans* + *At. ferrooxidans* en présence de Fe^{2+}

Revue : Rawlings D.E. (2002) Annu. Rev. Microbiol. 56, 65-91.

Rawlings D.E. et al. (2003) Trends in Biotechnology 21, 38-44.

Procédé par agitation continue dans des tanks



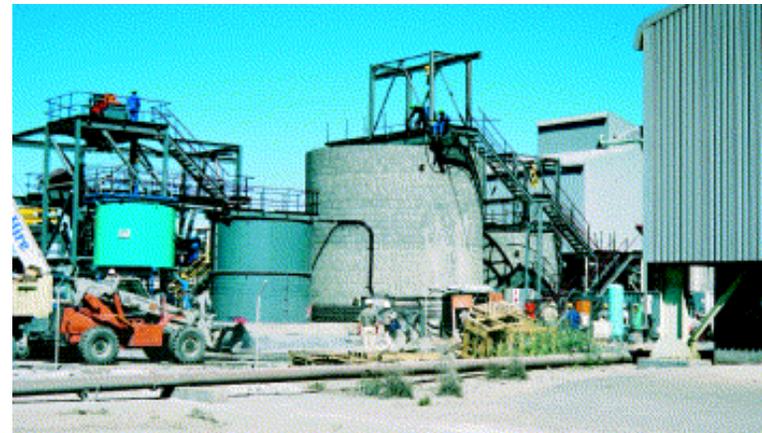
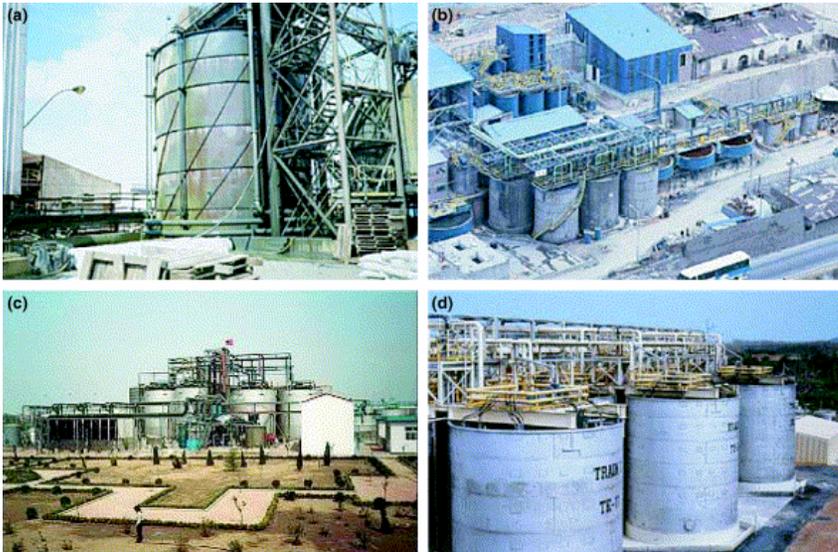
Bio-oxydation à flux continu : Au (arseno)pyrite.

Minerais finement broyé - concentré aurifère

Ajout d'eau et de substrats inorganiques, forte aération
Refroidissement

Tank de déposition et récupération de l'or avec du cyanure. (4-5 j)

L. ferrooxidans, At. Caldus, At. ferrooxidans

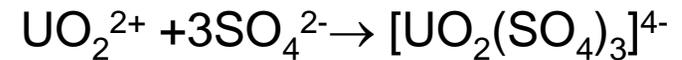
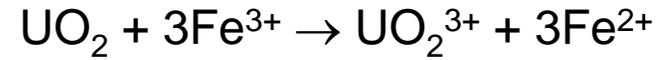


Opérations commerciales de biolixiviation
Au Brésil, en Chine, au Pérou, au Ghana

Au, Co, Ni, Al, Cu, Zn

Tanks en céramique composite
pour **bactéries thermophiles**
300 m³ Perring, Afrique du Sud.

Biolixiviation de minerais d'uranium



Importance des sulfates pour éviter la précipitation sous forme d'hydroxydes.

Utilisation de sulfate ferrique produit par biolixiviation de la pyrite par *T. ferrooxidans* et *L. ferrooxidans*.
pH 1-2, fortes teneur en U, Th.

Ajout de 5kg/t de pyrite

Rentable économiquement pour des minerais contenant 0.05% à 0.15% U_3O_8

J.A. Munioz et al. (1995) Hydrometallurgy 38, 39-57

Remédiation par immobilisation de l'uranium : réduction



Réduction dissimilatrice:

U^{IV} comme source d'énergie

Geobacter metallireducens

Shewanella oneidensis

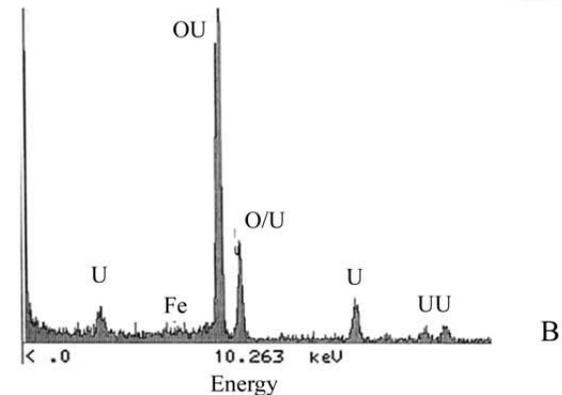
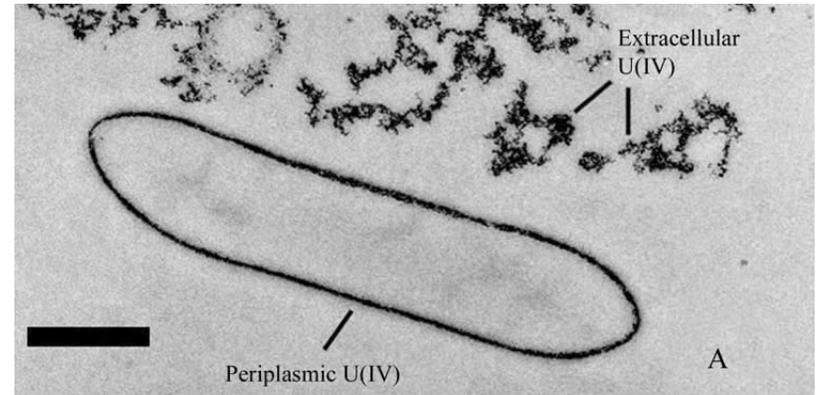
Desulfotomaculum reducens

Thermoterrabacterium ferrireducens

Réduction sans apport d'énergie

D. Desulfuricans

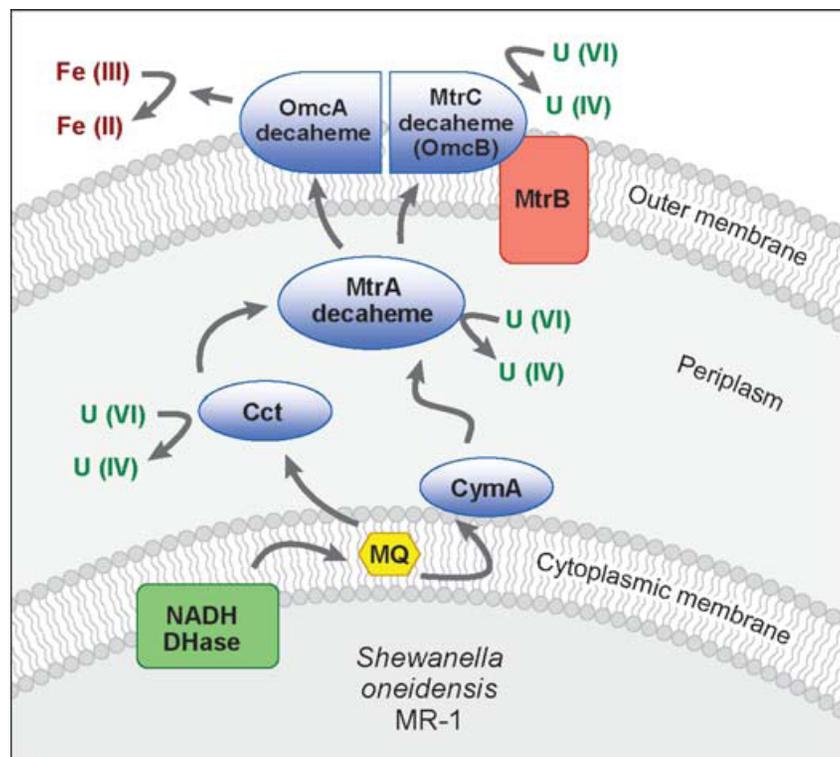
Desulfovibrio vulgaris



Geobacter sulfurreducens

U(IV) par bioreduction, Lloyd et al., 2002.

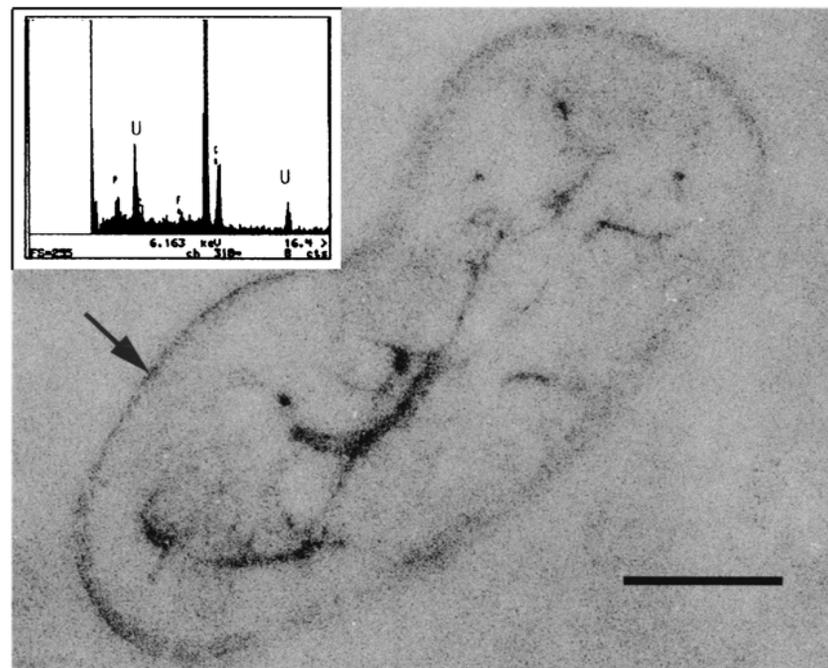
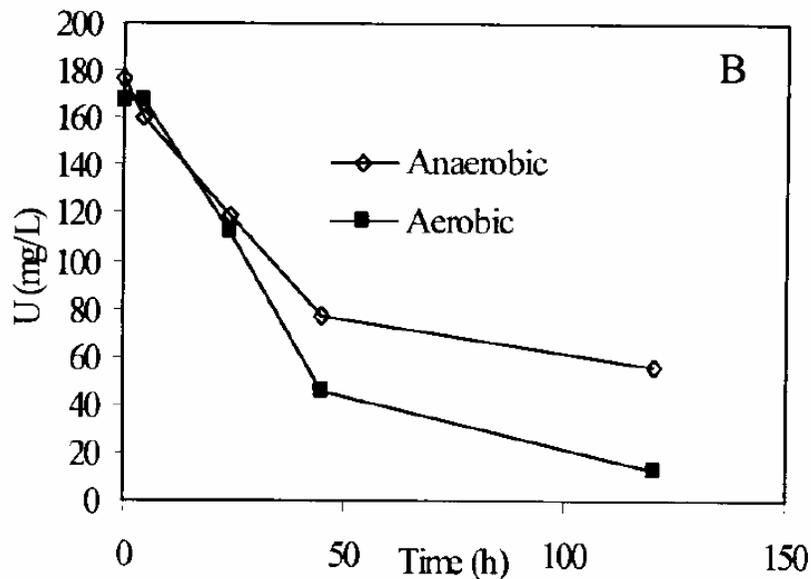
Anaérobiose





Pseudomonad CRB5 : réduction anaérobie et aérobie

Présence d'U dans le cytoplasme –
associé à des granules de polyphosphate



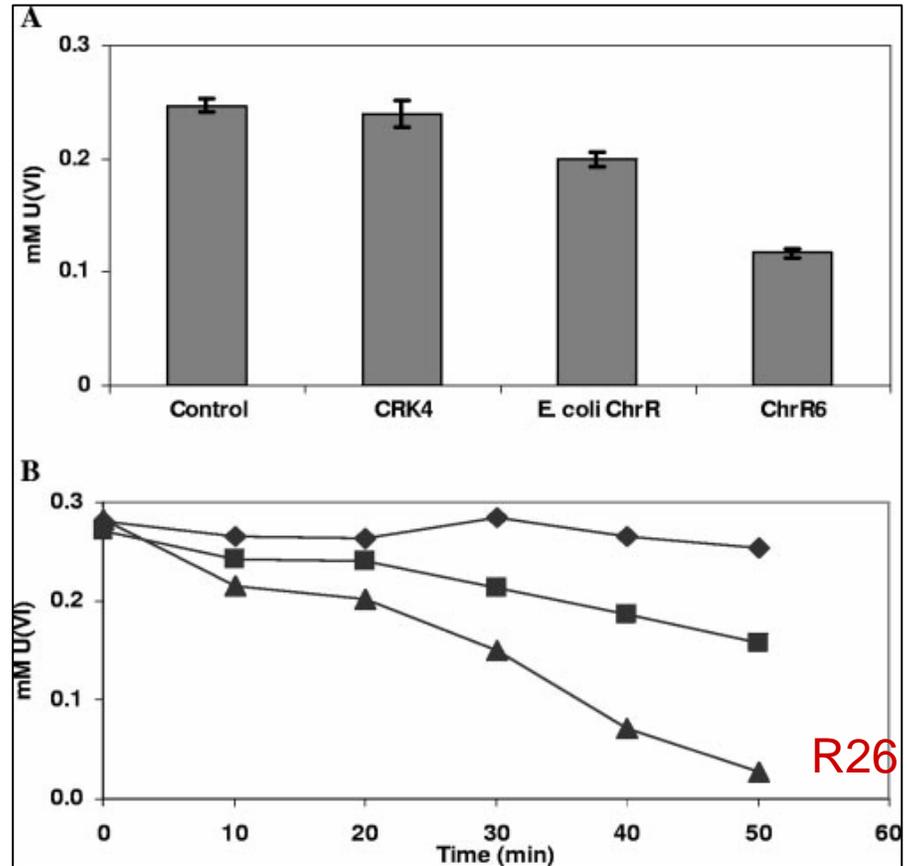
McLean & Beveridge (2001) AEM 67, 1076-1084.



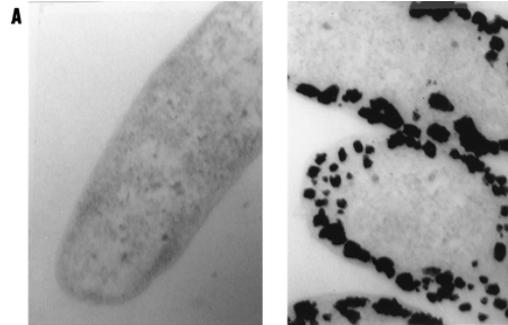
Activité enzymatique :

Chromate réductase

capable de réduire l'uranyle
Optimisation de cette activité
par mutagénèse R26



Réduction d'autres métaux lourds ou radionucléides



Accumulation de Pd
bact. sulfato-réductrice



Réduction et accumulation de technetium
À la périphérie de *Shewanella*

Bioprécipitation de l'uranium

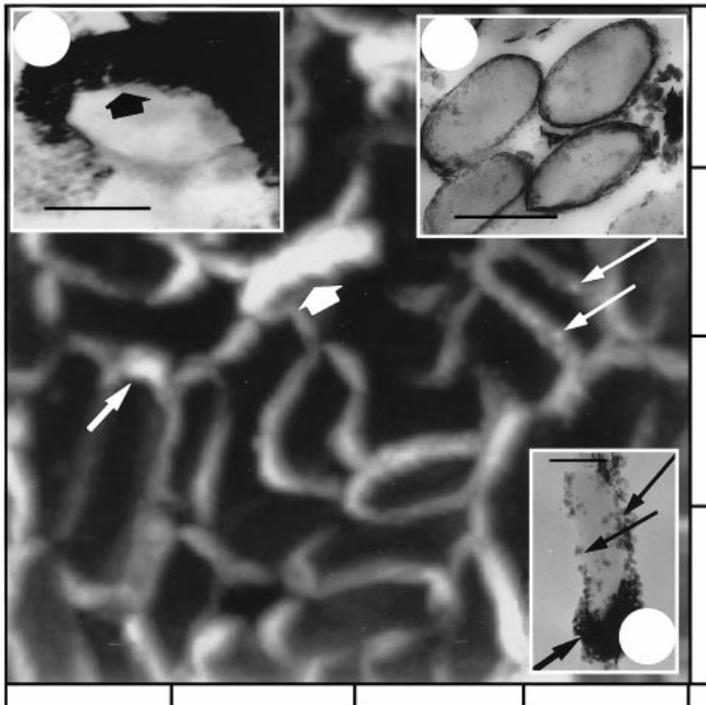
Catalysée par une phosphatase

Initiation implique les monophosphates
des lipopolysaccharides de la paroi

Forme des complexes UO_2PO_4

Accélération de la bioprécipitation en
présence de NH_4^+

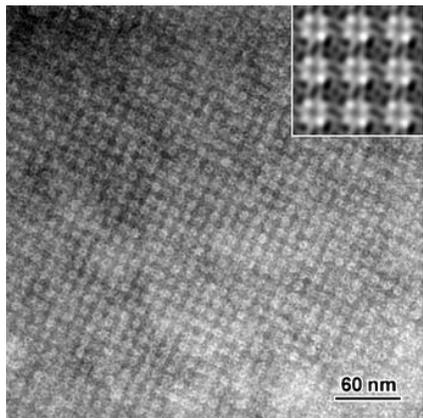
Formation de $\text{NH}_4\text{UO}_2\text{PO}_4$,



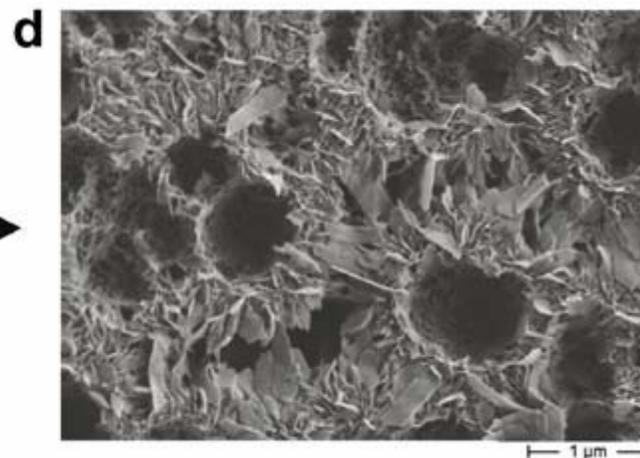
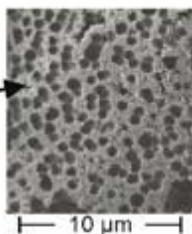
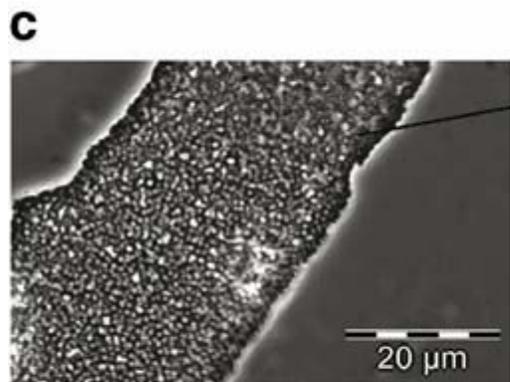
Citrobacter

L. E. Macaskie, et al. 2000 *Microbiology* 146, 1855–1867.

Bio-sorption au niveau de protéines de surface



Bacillus sphaericus



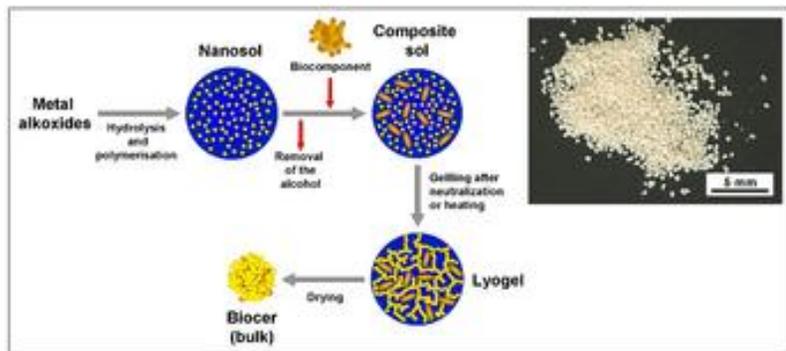
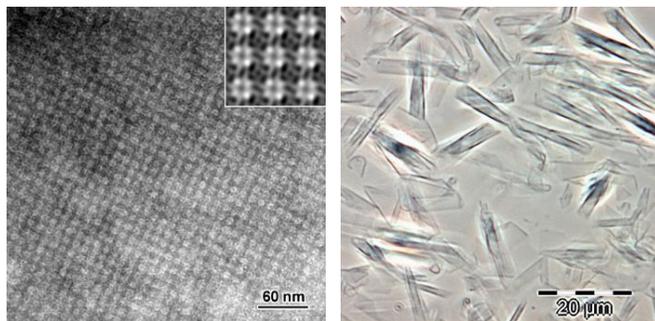
K. Pollman et al. (2006) *Biotechnology Advances* 24, 58– 68

J. Raff S. Selenska-Pobell, Institute of Radiochemistry,
Forschungszentrum Rossendorf

Bio-sorption au niveau de protéines de surface



Dépollution des eaux / sols

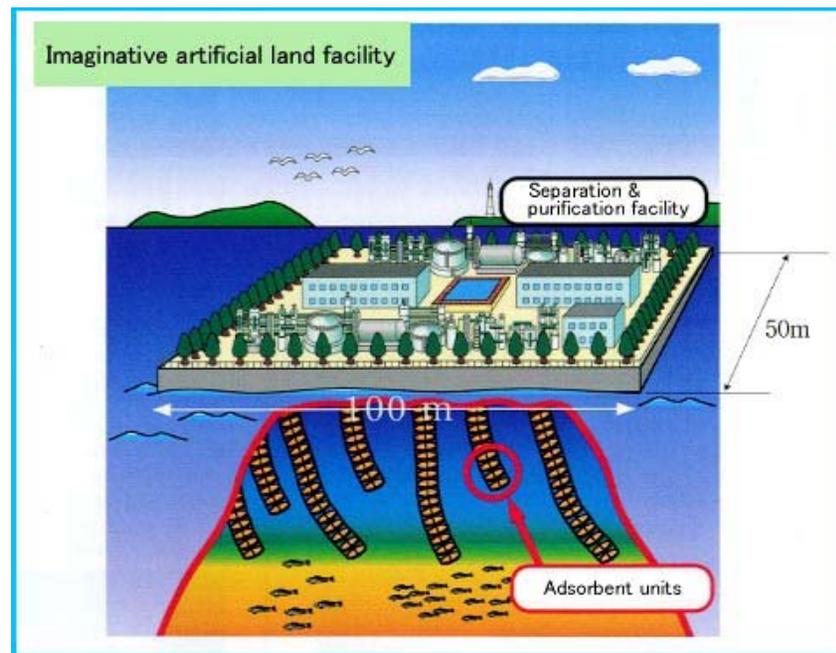


Inclusion de bactéries dans un polymère

Récupération d'éléments



Vanadium Uranium



Amidoxime sur un substrat

J. Raff S. Selenska-Pobell, Institute of Radiochemistry,
Forschungszentrum Rossendorf

T. Sugo, Radiation Processing Development Lab.,
Takasaki Radiation Chemistry Research Establishment, Japan



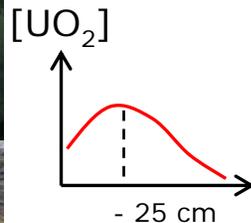
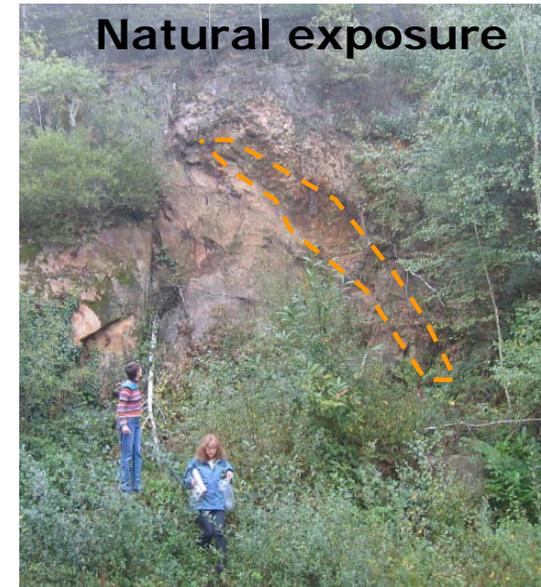


1-Etude des interactions bactéries uranium

Sols uranifères et sols témoins

$U_c = 40 \text{ ppm}$
 $U_r = 2500 \text{ ppm}$

Concentrations et compositions de sols contrastés



$U_r = 440 \text{ ppm}$



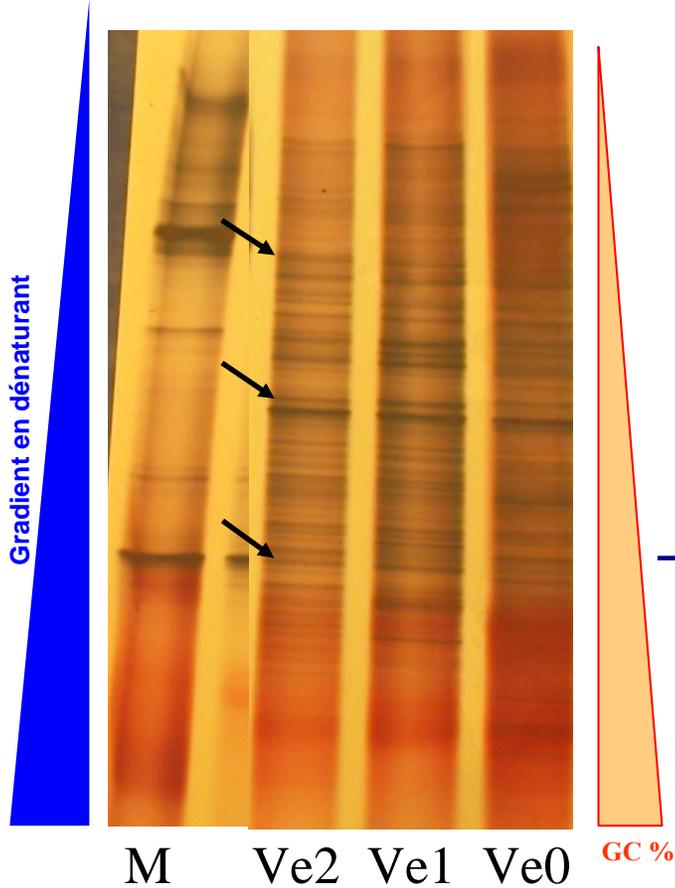
$U_c = 30 \text{ ppm}$
 $U_r = 37000 \text{ ppm}$

Limousin

Effet de l'uranium sur la biodiversité ?



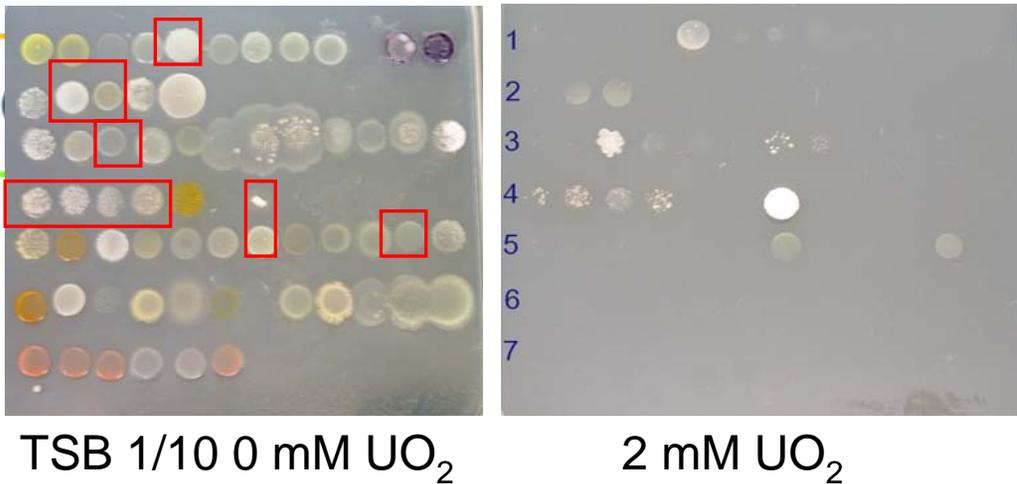
DGGE ADNrs16s isolé-amplifié à partir des sols



Comparaison des profils :
Spécificité des profils sols Ve U

Séquençage ADNr 16s
Arbre phylogénétique

Sélection de bactéries résistantes à l'uranium



7 espèces identifiées
phylogénétiquement

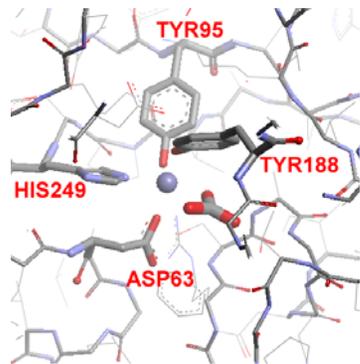
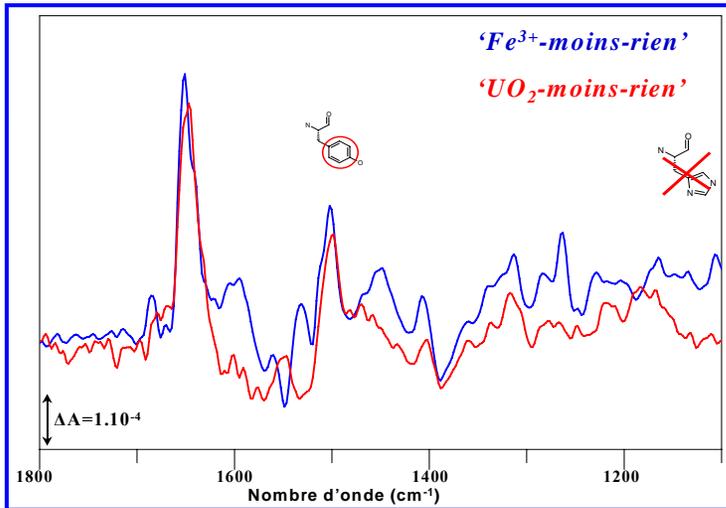
→ Analyse génomique
Facteurs génétiques
de la résistance

- Cribles pour la **réduction** et la **chélation** intracellulaire de l'uranium
- Modèle pour l'analyse de cibles de l'uranium
l'étude du mécanisme de réduction
- Croiser les résultats des différents cribles

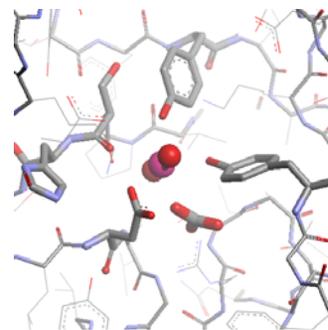
Chromate réductase : réduction intracellulaire / protection stress oxydant

2- Interactions protéines - uranium

Analyse des sites métalliques

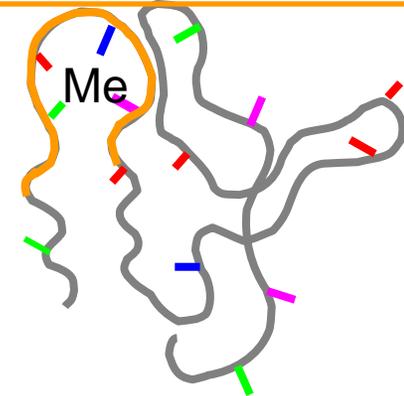


Fixation du fer



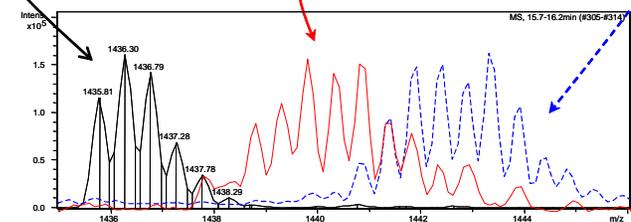
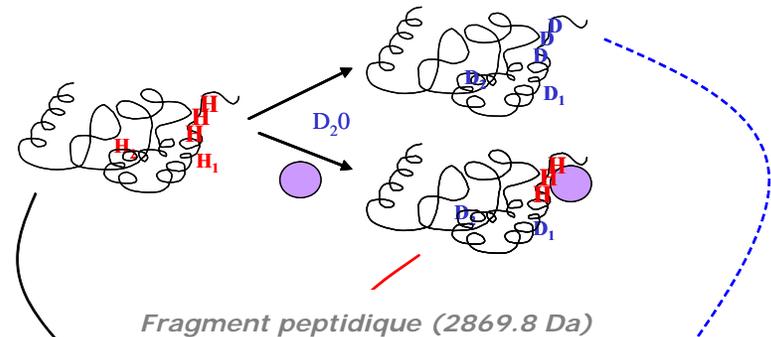
Fixation de l'uranyle

Propriétés liaisons Me-L : IR lointain



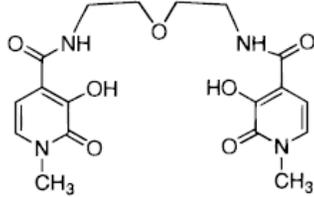
Spectrométrie de masse

Suivi d'interactions protéine-cofacteur par échange H/D

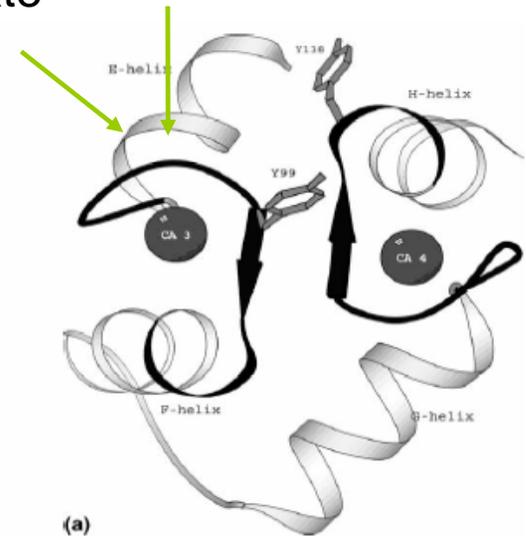
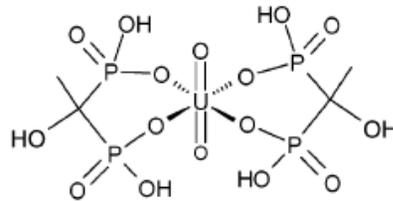


Ingénierie d'architectures chélatantes spécifiques / affines

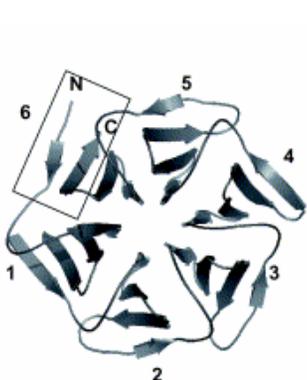
- Test de l'apport de ligands tyrosine et phosphate



5LIO-Me-3,2-HOPO, H₂L⁷



- Plateforme protéine sélectionnée par une approche prédictive :
domaine extracellulaire serine/thrénine kinase Pkn_D



	Strand 1	Strand 2	Strand 3	Strand 4		
1	G V A V D S A G N V Y V T S E G M Y G R V V K L A T G S T G T T V L P F N G L Y - - - Q P Q				430-472	
2	G L A V D G A G T V Y V T D F - - N N R V V T L A A G S N N Q T V L P F D G L N - - - Y P E				473-513	
3	G L A V D T Q G A V Y V A D R G - - N N R V V K L A A G S K T Q T V L P F T G L N - - - D P D				514-555	
4	G V A V D N S G N V Y V T D T D - - N N R V V K L E A E S N N Q V V L P F T D I T - - - A P W				556-597	
5	G I A V D E A G T V Y V T E H N - T N Q V V K L L A G S T T S T V L P F T G L N - - - T P L				598-639	
6	A V A V D S R T V Y V A D R G - N D R V V K L T S Q A S G Q T V L P F T G I D F R L S P S				640-664, 410-429	
	1	10	20	30	40	46