

Phases minérales associées aux biofilms microbiens prélevés en Seine

Alexandre Gélabert^{1*}, Thierry Berthe², Guillaume Morin³, Yannick Colin², Pierre Le Pape³,
Fulvia Baratelli⁴, Benjamin Janvier², Claire Da Costa², Fabienne Petit², Laure Cordier¹

¹Université de Paris, Institut de Physique du Globe de Paris, UMR 7154, 1 rue Jussieu, 75005 Paris

²UMR CNRS, M2C, Normandie Université, 76821 Rouen, France

³Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie (IMPMC), UMR 7590, CNRS-Sorbonne Université-MNHN-IRD, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05

⁴Milieus environnementaux, transferts et interactions dans les hydrosystèmes et les sols (METIS), UMR 7619, Sorbonne Université-CNRS-EPHE, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05

*gelabert@ipgp.fr

Résumé

Les biofilms microbiens sont considérés comme un compartiment majeur des milieux naturels capables de contrôler le devenir des éléments traces métalliques dans l'environnement. En particulier, l'immobilisation des métaux sous forme dissoute ou particulaire constitue un processus majeur de ce cycle, et pourrait s'avérer importante dans le bassin de la Seine. Ce rapport se propose ainsi de présenter les premières données minéralogiques obtenues sur une série de biofilms microbiens collectés sur quatre sites de l'axe Seine, de Marnay-sur-Seine en amont à Poses en aval. Les analyses de diffraction de rayons X effectuées sur les quatre biofilms prélevés montrent tout d'abord la présence de nombreuses phases minérales, de nature similaire aux matières en suspension (MES) présentes dans la colonne d'eau. Cela suggère une forte capacité de piégeage des biofilms pour les particules minérales, cette capacité de piégeage étant corrélée à l'épaisseur du biofilm. De plus, des mesures en microscopie électronique à balayage (MEB) ont permis de détecter la présence de phases précipitées riches en fer et en manganèse. En particulier, la présence de pyrite framboïdale (FeS₂) pourrait être un indicateur de la mise en place dans l'épaisseur du biofilm de microenvironnements anoxiques et de processus de sulfato-réduction associés à des souches microbiennes présentes localement. D'autres observations sont en cours et permettront d'aller plus loin dans la compréhension de la mise en place de ces microenvironnements et de leur impact sur la formation de minéraux secondaires au sein de ces structures microbiennes.

Points clefs

- ✓ *Les biofilms microbiens présentent de fortes capacités d'accumulation des matières en suspension présentes dans la colonne d'eau de Seine.*
- ✓ *Présence de pyrite framboïdale (FeS₂) détectée dans l'épaisseur des biofilms échantillonnés, potentiel marqueur d'une activité de sulfato-réduction se mettant rapidement en place dans ces structures microbiennes.*
- ✓ *Les biofilms échantillonnés à Marnay-sur-Seine (amont du bassin) ne sont pas tout à fait équivalents à ceux prélevés à Poses (entrée de l'estuaire de la Seine), notamment du point de la quantité de minéraux détectés dans le biofilm.*

Abstract

Microbial biofilms are considered as a major compartment of natural environments capable of controlling the fate of trace metals. In particular, immobilization of metals in dissolved or particulate form constitutes a major process of this cycle, and could prove important in the Seine basin. This report presents the first mineralogical data obtained on a series of microbial biofilms collected on 4 sites of the Seine axis, from Marnay-sur-Seine upstream to Poses downstream. X-ray diffraction analyses performed on the four biofilms collected show the presence of numerous mineral phases, similar in nature to the suspended fraction present in the water column. This suggests a strong trapping capacity of the biofilms for mineral particles, this trapping capacity being correlated to the thickness of the biofilm. In addition, scanning electron microscopy (SEM) measurements detected the presence of precipitated phases rich in iron and manganese. In particular, the presence of framboidal pyrite (FeS_2) could be an indicator of the establishment of anoxic microenvironment and sulfate-reduction processes associated with locally present microbial strains. Other observations are in progress and will allow to go further in the understanding of the establishment of these microenvironments and their impact on the formation of secondary minerals within these microbial structures.

Key points

- ✓ Microbial biofilms have a strong accumulation capacity for suspended matter present in the Seine water column.
- ✓ Presence of framboidal pyrite (FeS_2) detected in the thickness of the sampled biofilms, a potential marker of a sulfate-reduction activity rapidly taking place in these microbial structures.
- ✓ The biofilms sampled at Marnay-sur-Seine (upstream of the basin) are not quite equivalent to those sampled at Poses (beginning of Seine estuary), particularly in terms of minerals quantity detected in the biofilm.

Introduction

Les microorganismes constituent un compartiment majeur des milieux naturels. Du fait de leur activité métabolique associée à une densité de sites fonctionnels importante, la biomasse microbienne est capable d'interagir avec les métaux lors de réactions d'adsorption, d'oxydo-réduction ou encore de biominéralisation (Wang et al., 2016a ; Wang et al., 2016b ; Couasnon et al., 2018). Les microorganismes sont ainsi considérés comme exerçant un fort contrôle du cycle des métaux dans les milieux naturels. En particulier, ces microorganismes (bactéries, archées, microalgues) sont la plupart du temps organisés sous forme de biofilm, structures dans lesquelles les cellules sont encapsulées dans une matrice d'exopolymères auto-sécrétée. Ces structures tri-dimensionnelles, semblables aux gels, imposent un transport limité pour les éléments chimiques (Desmau et al., 2020). Cette faible perméabilité des biofilms, associée à l'activité métabolique des microorganismes qui les composent et à la forte densité de sites fonctionnels qu'ils contiennent, permet une réactivité forte de l'interface biofilm/minéral. En particulier, plusieurs études réalisées en laboratoire montrent que les biofilms microbiens ont la capacité d'accumuler les éléments traces métalliques, et qu'ils jouent aussi un rôle de « réacteur » en modifiant la spéciation de ces derniers, notamment en favorisant la formation de minéraux secondaires. Cependant, la quantification précise et l'impact réel des biofilms sur le devenir des éléments traces métalliques et des colloïdes et particules minérales dans les milieux naturels et dans le bassin de la Seine en particulier reste mal estimé.

L'objectif de ce rapport est de présenter les premières données effectuées sur la campagne 2021 de prélèvement de biofilms en Seine. Il s'agit ici d'identifier les phases minérales présentes dans l'épaisseur des biofilms afin de mieux comprendre les processus d'accumulation de minéraux dans ces structures, mais aussi pour définir les mécanismes permettant la précipitation et donc l'immobilisation d'éléments traces métalliques au niveau de l'interface biofilm/minéral. Ceci sera ainsi une première étape pour quantifier l'impact réel des biofilms microbiens en Seine sur le cycle des polluants métalliques.

1. Matériels et méthodes

1.1. Sites de prélèvement

Dans le cadre de cette action, un réseau de piège à biofilm a été positionné sur l'ensemble de l'axe Seine et sur l'Orge (Fig. 1). Les résultats obtenus dans le cadre du projet PANDORE (ANSES/PIREN-Seine) ont permis de valider ce système (voir bilan A. 5 4.6).

Brièvement, chaque piège à biofilm consiste en cinq plaques de granite (25x25x2 cm³) polies sur le recto et rugueuses sur le verso, accrochées entre elles par une tige métallique. Lors de leur déploiement, elles ont été immergées à environ 1 à 2 m de profondeur. Après prélèvement ces plaques ont été séparées de leur tige métallique et immergées dans des bacs plastiques remplis d'eau de Seine durant leur transport jusqu'aux laboratoires, afin d'éviter tout séchage mais aussi pour ne conserver sur les plaques de granite que le biofilm réellement lié au substrat (l'éventuelle biomasse faiblement liée étant alors « lessivée » vers la solution).

Pour la partie aval (Poses), les pièges à biofilms ont été mis en place le 13 juillet 2020 puis échantillonnés entre le 25 et le 31 mai 2021 (biofilms âgés de 10,5 mois). Pour la partie amont, les pièges à biofilms ont été positionnés sur les sites Marnay, Bougival, Triel et Poses le 18 novembre 2020. Une campagne d'échantillonnage commune à l'ensemble des laboratoires participant à cette action a ensuite été menée le 31 mars 2021 (biofilms âgés de 4,5 mois). Les sites les plus en aval sont donc soumis à une contamination urbaine diffuse (retombées atmosphériques combinées aux débordements des égouts). Ils ont été prélevés suivant un gradient de pression anthropique : le premier site d'échantillonnage est situé à Marnay-sur-Seine, très en amont sur la rivière Seine, et n'est donc pas affecté par le Grand Paris ; le second (la Seine à Bougival) est impacté par l'agglomération parisienne sans l'influence de la grande STEP Seine-Aval, le site de Triel-sur-Seine reçoit les rejets traités de cette STEP et le site Poses est située à l'entrée de l'estuaire.



Figure 1. Positionnement des pièges à biofilms le long de l'axe Seine et de l'un de ses affluents (Orge). Conception et instrumentation des sites par l'UMR M2C.

1.2. Préparation des échantillons au laboratoire

Les échantillons des quatre pièges de granite correspondant aux sites de Marnay, Bougival, Triel et Poses ont été préparés à l'IMPMC. La face polie des supports a été grattée à l'aide d'un outil en plastique, et les biofilms ont été directement placés dans des flacons en plastique et séchés à pression atmosphérique dans une boîte à gants (BAG) Jacomex® sous atmosphère de N₂ (< 5 ppm O₂) afin d'éviter toute oxydation. Des échantillons ont également été collectés, pour comparaison, sur la face rugueuse des plaques de granite. Par ailleurs, plusieurs échantillons ont été prélevés en utilisant un scalpel afin de conserver la structure tridimensionnelle et l'organisation des biofilms.

Il est à noter que pour la partie microbiologie de cette action biofilms, ceux-ci ont été prélevés stérilement à partir des plaques en granite selon un protocole développé dans le cadre du projet PANDORE-PIREN-ANSES (voir bilan A. 5 4.6) puis stabilisés à -80°C. Les ADN extraits à partir des biofilms permettront la caractérisation haut-débit des communautés bactériennes totales présentes dans ces biofilms par séquençage de la région variable V3-V4 du gène codant l'ARNr 16S. En parallèle, la présence de gènes conférant la résistance aux éléments traces métalliques sera d'abord effectuée par PCR en point final. Pour les gènes détectés dans les échantillons, une quantification sera ensuite réalisée par qPCR. Ce travail est en cours de finalisation.

1.3. Analyses minéralogiques et géochimiques

1.3.1. Diffraction des rayons X sur poudre

Les diffractogrammes de rayons X sur poudre ont été acquis avec un diffractomètre Panalytical™ X'Pert Pro équipé d'une anode Co. L'appareil a été utilisé en configuration Bragg-Brentano. Les données ont été enregistrées sur une gamme angulaire allant de 5 à 60° 2theta. Les mesures ont été réalisées en cellule anoxique sur quelques dizaines de mg de poudre finement broyées au mortier d'agate en BAG et déposés sur une plaque de Si monocristallin zéro-bruit-de-fond. L'indexation des pics des diffractogrammes a été faite avec le logiciel Highscore Plus® et la base de données PDF-2®.

1.3.2. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les observations MEB ont été réalisées avec le Zeiss® Ultra 55 de l'IMPMC équipé d'un canon à émission de champ (FEG) et d'un détecteur de rayons X Bruker® pour la spectrométrie X en dispersion d'énergie (EDX). La tension d'accélération utilisée a été de 15 kV avec une distance de travail de 7,5 mm. Les cartographies présentées sont non-corrigées du bruit de fond et représentent les intensités mesurées dans les régions d'intérêt autour des raies Kalpha de Al, Si, S, Ca, Mn et Fe.

Les observations présentées ici ont été réalisées sur des sections polies obtenues après enrobage des échantillons dans une résine epoxy. Afin d'éviter tout contact avec l'oxygène, les échantillons ont été sortis de la boîte à gants dans des GenBag, puis mis dans une boîte sous flux d'azote pour chasser l'oxygène présent. L'air a ensuite été aspiré et une seringue remplie de résine a été introduite dans le trou du couvercle de la boîte. Sous l'effet de la dépression, la résine a été aspirée et a recouvert l'échantillon. Les échantillons inclus ont ensuite été remis dans les GenBag et en boîte à gants (BAG) après durcissement de la résine. Les échantillons ont alors été polis manuellement en BAG et collés sur des plots MEB. Deux cycles de métallisation au C ont été effectués sous vide afin d'assurer une bonne évacuation des charges sur ces matériaux isolants.

2. Résultats et discussion

2.1. Phases cristallines majeures sur les quatre sites échantillonnés

Les phases cristallines majeures observées par DRX sont le quartz et la calcite, accompagnées par de faibles quantités de feldspath alcalins et de minéraux argileux (Fig.2). La calcite domine très largement en amont à Marnay, puis diminue sensiblement vers l'aval, à Bougival puis encore à Triel, avant de ré-augmenter modérément à Poses. Ces compositions minéralogiques sont assez voisines de celles des matières en suspension (MES) (Priadi et al. 2012) et reflètent les contributions variables des roches carbonatées, marneuses, argileuses et gréseuses aux MES transportées par la Seine (Meybeck et al. 1999). La fraction minérale cristalline trouvée dans les biofilms semble donc majoritairement provenir du dépôt/piégeage de MES.

Les diffractogrammes obtenus pour les biofilms récoltés sur la face rugueuse des plaques de granite (données non présentées) sont marqués par une plus forte présence de feldspaths et de quartz, qui témoignent d'une contamination par le granite. Les échantillons prélevés sur la face rugueuse n'ont donc pas été retenus pour la suite de l'étude.

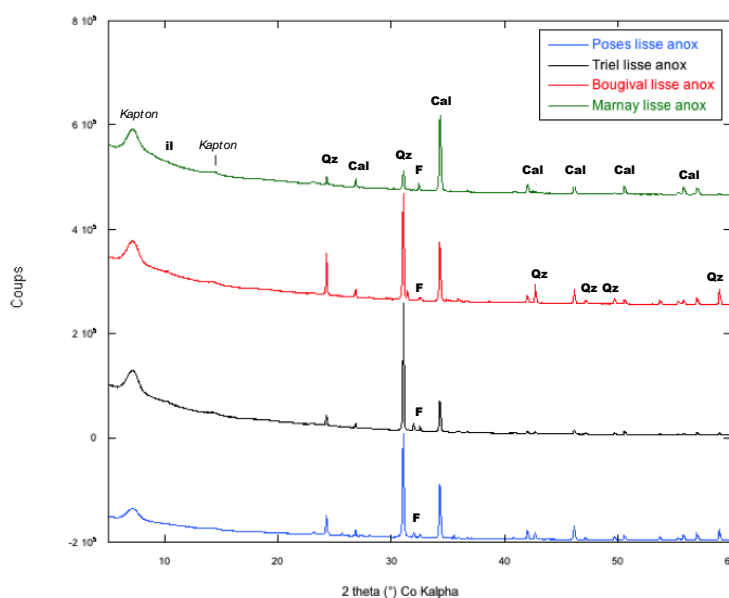


Figure 2. Diffractogrammes de rayons X sur poudre obtenus en cellule anoxique sur les échantillons de biofilm séchés en BAG.

Kapton : signal de la fenêtre de la cellule anoxique ; Qz : quartz ; Cal : calcite ; F : feldspaths ; il : illite.

2.2. Comparaison entre les phases minérales retrouvées à Poses et à Marnay

Seuls les échantillons de Marnay (Fig. 3) et Poses (Fig. 4) ont pour l'instant été analysés au MEB. Dans l'échantillon de Marnay-sur-Seine, on note la présence de calcite et de tests de diatomées, associés à une matrice contenant des minéraux argileux. De rares grains contenant du manganèse ou du fer ont pu être observés et pourraient correspondre à des oxydes de Mn ou des oxyhydroxydes de Fe. Les quantités de ces minéraux sont trop faibles pour qu'ils soient détectés par DRX dans cet échantillon.

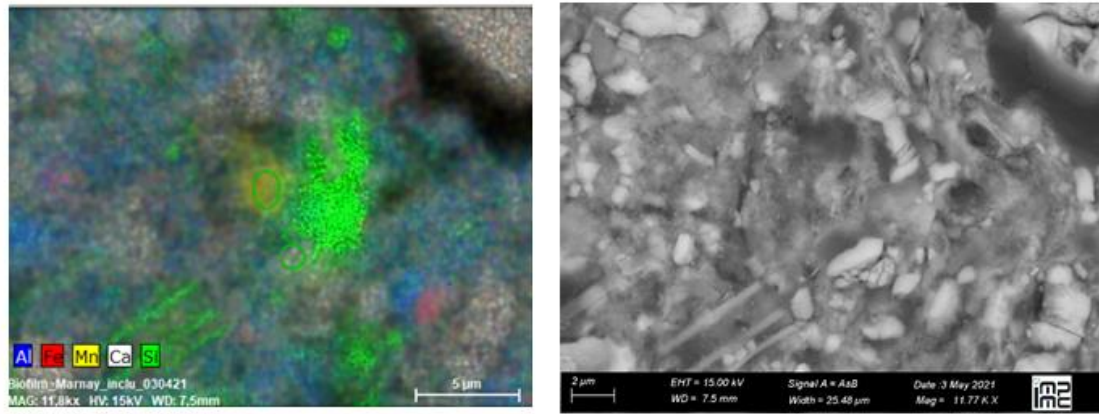


Figure 3. Cartographie EDX (gauche) et image MEB (droite) d'une section du biofilm prélevé à Marnay. On note la présence de tests de diatomées dans une matrice contenant des minéraux argileux et des grains de calcite. Un grain contenant du manganèse et un autre contenant du fer sont observés.

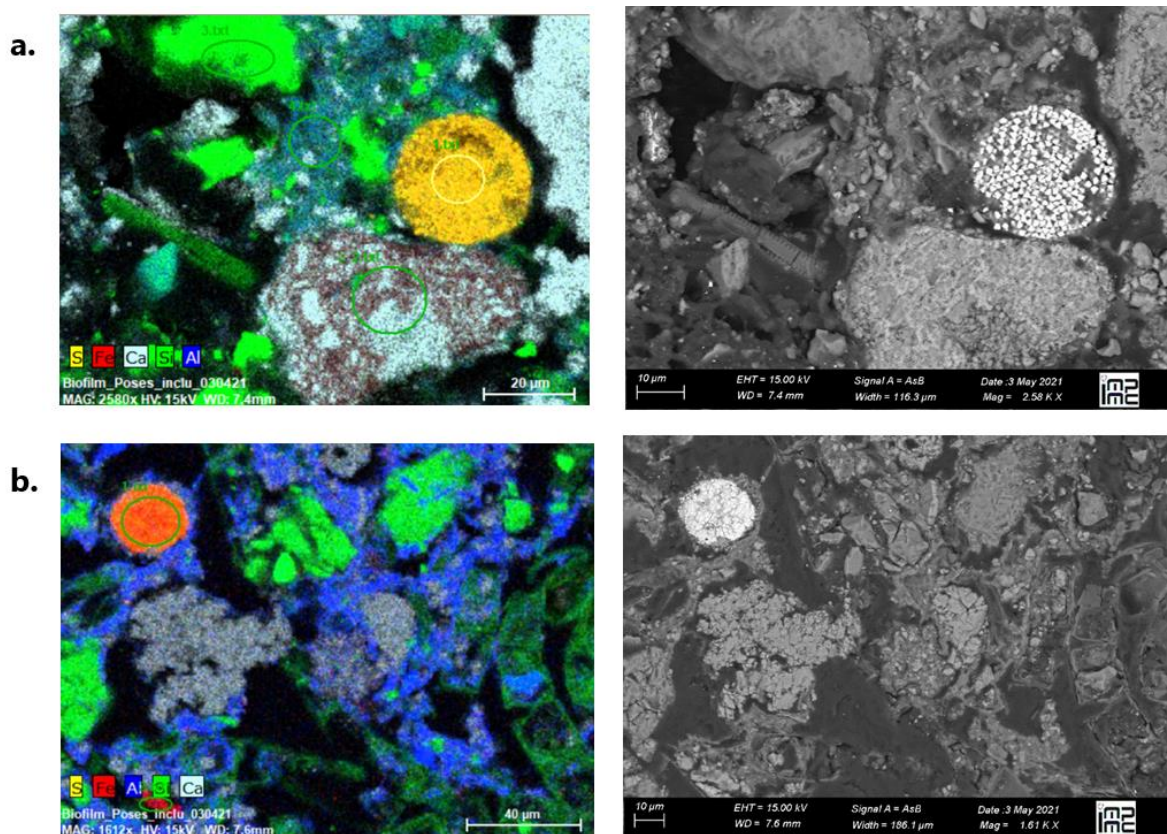


Figure 4. Cartographies EDX (gauche) et image MEB (droite) d'une section polie du biofilm prélevé à Poses. On note la présence de pyrites framboïdales associées à une matrice argileuse, des grains de calcite et de quartz ainsi que des tests de diatomées.

Dans l'échantillon de Poses, les associations entre calcite, quartz et tests de diatomées sont également observées. On note la présence assez fréquente de pyrites framboïdales. La présence de ces pyrites pourrait suggérer que la sulfato-réduction en milieu anoxique (Berner, 1970) se développe d'ores et déjà au sein du biofilm à Poses. La concentration en matières organiques et en nutriments pourrait être élevée à Poses, le site étant situé à l'aval de l'agglomération parisienne et de la station d'épuration Seine-aval. Ceci pourrait favoriser l'activité microbienne et les réactions de diagenèse précoce, expliquant ainsi la formation de pyrite

framboïdale. On peut en outre faire l'hypothèse qu'un gradient d'oxygénation pourrait se développer au sein du biofilm, qui est épais de plusieurs millimètres à Poses (biofilm développé sur 10,5 mois), permettant le développement de conditions anoxiques en profondeur, du fait d'une faible perméabilité du biofilm et d'une diffusion d'O₂ limitée dans ces structures complexes. D'une manière générale, cette structure à faible porosité permet aussi le développement de microenvironnements, puisque les produits du métabolisme des cellules, ne pouvant que faiblement être évacués à l'extérieur du biofilm, tendent à s'accumuler localement (Desmau et al., 2020 ; Flemming and Wingender, 2010). A l'inverse, des molécules provenant de la solution (ici l'eau de Seine) peuvent être consommées rapidement par les cellules les plus en surface (comme c'est le cas de l'O₂) avec pour résultat une mise en place de conditions anoxiques rapide. A titre d'exemple, dans des études en laboratoire sur des cultures axéniques (Fulaz et al., 2019) de *Pseudomonas fluorescens* WCS 365, il a pu être montré que des modifications de pH allant jusqu'à 3 unités se mettaient en place sur seulement quelques dizaines de micromètres (typiquement autour de 40 µm). De la même manière, de forts gradients d'O₂ ont été mis en évidence, avec le passage de conditions oxiques à anoxiques dans des biofilms aérobies, et sur seulement quelques dizaines de micromètres (de Beer et al., 1994). En outre, une diversité de métabolismes différents (associée à des consortiums microbiens comportant de multiples souches microbiennes) a fréquemment été mise en évidence dans les biofilms naturels. A titre d'exemple, des biofilms prélevés sur des filtres d'une installation aquacole (Danemark) montrent que des bactéries oxydantes de nitrite (comme *Nitrobacter*) et des souches oxydantes d'ammoniac (comme *Nitrosomonas*) peuvent coexister au sein de niches distinctes de biofilms (Schramm et al., 1996).

Ces premières observations suggèrent qu'une activité microbienne affectant les cycles redox et la spéciation des éléments métalliques est susceptible de se développer dans les biofilms étudiés, notamment lorsqu'ils sont épais comme ceux prélevés sur le site de Poses.

Une nouvelle campagne de prélèvement, prévue en décembre 2021 permettra de confirmer ces observations. Par ailleurs, des mesures chimiques actuellement en cours (sur les échantillons collectés durant cette campagne de mai 2021) permettront de quantifier le niveau de séquestration des biofilms vis-à-vis des métaux mais aussi des contaminants organiques par rapport à la colonne d'eau, pour en déduire dans quelle mesure ces communautés microbiennes jouent le rôle d'accumulateurs de polluants dans le bassin de la Seine, et s'ils sont à même de dégrader ou modifier la spéciation de ces derniers. Enfin, ces données de concentration de contaminants seront systématiquement comparées aux travaux de métagénomique, et visant notamment à identifier des gènes de résistance aux métaux et antibiotiques.

Bibliographie

- De Beer et al., (1994) "Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport"; *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 1131-1138
- Berner R. A. (1970) "Sedimentary pyrite formation". *Amer. J. Sci.* 268,1–23.
- Couason T., Gélalbert A., Ona-Nguema G., Zanna S., Ménez B., Guyot F. (2019) "Experimental assessment of occurrences and stability of lead-bearing minerals in bacterial biofilms", *Chemical Geology*, 505, 23-35
- Desmau M., Carboni A., Le Bars M., Doelsch E., Benedetti M.F., Auffan M., Levard C., Gélalbert A. (2020) "How microbial biofilms control the environmental fate of engineered nanoparticles?", *Frontiers in Environmental Science*, 8, 82, doi: 10.3389/fenvs.2020.00082
- Flemming, H. C., and Wingender, J. (2010). "The biofilm matrix". *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623–633
- Fulaz, S., Hiebner, D., Barros, C. H. N., Devlin, H., Vitale, S., et al. (2019a). "Ratiometric imaging of the in situ pH distribution of biofilms by use of fluorescent mesoporous silica nanosensors". *ACS Appl. Mater. Interfaces* 11, 32679–32688.
- Meybeck et al. (1999) "Spatial and temporal variability of total suspended solids in the Seine basin", *Hydrobiologia*, 410, 295-306.
- Priadi et al. (2012) "X-ray absorption fine structure evidence for amorphous zinc sulfide as a major zinc species in suspended matter from the Seine river downstream of Paris, Ile-de-France, France". *Environmental Science & Technology* 46, 3712–3720.

Wang Y., Gélabert A., Michel F.M., Choi Y., Gescher J., Ona-Nguemag G., Eng P.J., Bargar J.R., Farges F., Spormann A.M., Brown G.E. Jr (2016a) “Effect of biofilm coatings at metal-oxide/water interfaces I: Pb(II) and Zn(II) partitioning and speciation at *Shewanella oneidensis*/metal-oxide/water interfaces”, *Geochimica Cosmochimica Acta*, 188, 368-392

Wang Y., Gélabert A., Michel F.M., Choi Y., Eng P.J., Spormann A.M., Brown G.E. Jr (2016b) “Effect of biofilm coatings at metal-oxide/water interfaces II: Competitive sorption between Pb(II) and Zn(II) at *Shewanella oneidensis*/metal-oxide/water interfaces”, *Geochimica Cosmochimica Acta*, 188, 393-406