

Géochimie

# Mise au point d'un milieu de culture pour l'étude de l'altération de silicates en présence de *Pseudomonas aeruginosa*

Georges Aouad <sup>a</sup>, Valérie Geoffroy <sup>b</sup>, Jean-Marie Meyer <sup>b</sup>, Jean-Louis Crovisier <sup>a,\*</sup>,  
Denis Damidot <sup>c</sup>, Peter Stille <sup>a</sup>

<sup>a</sup> *École et Observatoire des Sciences de la Terre, Centre de Géochimie de la Surface/CNRS UMR 7517, 1, rue Blessig, 67084 Strasbourg cedex, France*

<sup>b</sup> *Laboratoire de Microbiologie et de Génétique, Université Louis-Pasteur/CNRS UMR 7156, 28, rue Goethe, 67083 Strasbourg cedex, France*

<sup>c</sup> *Département « Génie Civil », École des Mines de Douai, 941, rue Charles-Bourseul, 59500 Douai cedex, France*

Reçu le 11 avril 2005 ; accepté après révision le 17 août 2005

Disponible sur Internet le 13 septembre 2005

Présenté par Georges Pédro

## Résumé

La difficulté d'obtenir des données quantitatives sur l'altération de minéraux dans le milieu naturel en présence de microorganismes est principalement due à l'impossibilité de comparer avec des systèmes identiques, mais stériles. Une autre difficulté consiste à trouver des traceurs fiables permettant une évaluation correcte de la vitesse d'altération des silicates au cours d'expériences au laboratoire. Pour ces raisons, nous avons développé un milieu de culture préparé à partir d'acide succinique et de phosphates, qui permet une bonne croissance de *Pseudomonas aeruginosa* à 25 °C en présence de silicates. Un protocole de séparation sur colonne chromatographique a été mis au point pour séparer sélectivement le sodium du milieu de culture et permettre ainsi l'analyse des éléments traces libérés par l'altération des silicates par ICP-MS. Cette méthode nous permet de séparer sélectivement 99% de sodium, tout en conservant entre 96 et 99% des éléments traces. **Pour citer cet article : G. Aouad et al., C. R. Geoscience 337 (2005).**

© 2005 Académie des sciences. Publié par Elsevier SAS. Tous droits réservés.

## Abstract

**Definition of a growth medium to study the alteration of silicates in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*.** The influence of microorganisms on mineral alteration is not easy to determine in environmental conditions, because of the difficulty to raise for comparison purposes an identical but abiotic system. Another problem in this context is the choice of reliable tracers to evaluate the alteration rate of materials during in vitro experiments. To face such difficulties, we elaborated a defined medium allowing both the growth of *Pseudomonas aeruginosa* and a precise measurement of the elements solubilized from the minerals. Thanks to this medium, we were able to quantitatively determine the amounts of major elements solubilized from the materials in the presence of bacterial growth, compared to a sterile system. Moreover, the analysis by ICP-MS of trace elements was possible after a chromatographic treatment, which selectively eliminated 99% of the sodium content of the medium. **To cite this article: G. Aouad et al., C. R. Geoscience 337 (2005).**

© 2005 Académie des sciences. Publié par Elsevier SAS. Tous droits réservés.

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [jlc@illite.u-strasbg.fr](mailto:jlc@illite.u-strasbg.fr) (J.-L. Crovisier).

*Mots-clés* : Milieu de culture ; Altération ; Biocorrosion ; Silicates complexes ; Bactéries ; *Pseudomonas aeruginosa* ; Ciments

*Keywords* : Culture medium ; Alteration ; Biocorrosion ; Complex silicates ; Bacteria ; *Pseudomonas aeruginosa* ; Cement

## Abridged English version

### 1. Introduction

Bacterial influence on minerals or complex silicates alteration has been studied for several years. However, few studies were able to show results on the alteration rate of these materials and on the mechanisms of interaction between water, materials and microorganisms. Some studies on bioalteration were limited to a physical description of materials altered by bacteria [4,31,33–35]. In other studies where the elements contained in the leaching solutions were analysed, aluminium was used as a tracer [18,26]. The reliability of this element is subject, however, to caution, since it can be partly incorporated into secondary minerals [12,13,27], and also can be complexed by siderophores [30]. In this last case, its apparent solubility could be increased and not be consistent with an increased alteration rate.

The incubation medium used in bioalteration studies should allow a good bacterial growth and also a precise measurement of the alteration rate of the materials. Most media commonly used by microbiologists contain high amounts of carbon, nitrogen, major elements like phosphates, iron, magnesium, and energy sources [25], but also quantitatively undefined trace elements present as contaminants, among them those usually used as reliable tracers in alteration rate studies, e.g., strontium or calcium.

Moreover, most incubation media are heavily buffered to maintain a physiological pH favourable to bacterial growth. Indeed, when materials under study can supply elements required for bacterial growth, then the composition of the defined medium should not include these elements, but should contain, however, the ones absent in the materials.

In the present study, the bacteria *P. aeruginosa* has been chosen because it is widespread in nature (e.g., [2,11,17]), and often used in bioremediation studies [1,2,16,23,32]. Alteration of two type of material were studied: a basaltic glass originating from the Fidji's in the South Pacific [14,15], and a reference french bottom ash given by the 'École des Mines de Douai'. These materials are referred to as 'basalte' and 'mâchefer', respectively, in the present study.

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Elaboration of the incubation medium

The incubation medium, called Phosphate/Succinate or PS medium, was composed of succinic acid  $4 \text{ g l}^{-1}$ ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   $9 \text{ g l}^{-1}$ ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $1 \text{ g l}^{-1}$  and NaOH  $1.52 \text{ g l}^{-1}$ . No magnesium source was added since bacteria are able to use the magnesium present in materials [5].  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , together with NaOH, were used to buffer the medium at pH 6.7, and also as a source of phosphorus and sodium for the bacteria. Sterilization was done by filtration on  $0.2\text{-}\mu\text{m}$  filters.

#### 2.2. Bacterial growth

The growth of *P. aeruginosa* was followed by measuring the optical density at 610 nm using  $18 \times 180\text{-mm}$  tubes containing 7.5 ml of PS medium under shaking (200 rpm) during 48 h at  $25^\circ\text{C}$ . Materials were added as grains of 100 to 125  $\mu\text{m}$  in diameter (100 mg/tube), previously heat-sterilized at  $180^\circ\text{C}$  during 2 h. Their compositions are given in Table 1.

#### 2.3. Chromatography

In order to remove the sodium from the incubation medium, allowing the analysis of trace elements, the cationic resin AG50W-X8 was chosen for its relatively low selectivity for sodium [9]. Chromatography was conducted in a quartz column of 0.5-cm diameter and 23.5-cm height, with a resin volume of  $4.61 \text{ cm}^3$ . Calibration was made with PS medium supplemented with 100 ppb of each of the following elements: Cr, Co, Ni, Cu, Zn, Rb, Sr, Y, Zr, Mo, Cd, Sn, Sb, Cs, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Pb. 40 ml of this solution were evaporated to dryness. The residue, solubilized in 1.5 ml HCl 1 N, was loaded on the column and eluted successively with  $13 \times 1 \text{ ml}$  HCl 1 N followed by  $2 \times 30 \text{ ml}$  HCl 6 N. Each one of the resulting fractions was analysed by ICP/AES (Jobin-Yvon JY 124 spectrometer) and ICP/MS (Fisons VG PQ2+ spectrometer).

### 3. Results

#### 3.1. Validity of the chromatographic procedure

In order to reach an accurate quantification of trace elements in the incubation medium and thus, to validly estimate part of the elements solubilized during the

bioalteration process, the removal of most of the sodium content of the incubation medium was necessary. Results of the calibration control of the chromatographic procedure are reported in Table 2. It is shown that phosphates are not retained by the resin since eluted within the first fractions, while sodium was excluded a few fractions later, as expected. On the contrary, trace elements were quantitatively retained on the resin, and required a 6 N HCl elution to be excluded (fraction 14). Thus, the method allowed to selectively separate up to 99% of the sodium from the trace elements, which were recovered with a yield of 96–99%, depending on the element.

### 3.2. Analysis of the elements contained in the PS medium

Preliminary experiments were conducted using a culture medium commonly used for growing *P. aeruginosa*, which is the CAA medium (Casamino acids  $5 \text{ g l}^{-1}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $1.18 \text{ g l}^{-1}$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$   $0.25 \text{ g l}^{-1}$ ). Chemical analysis of this medium revealed unexpected high contents in silicon and calcium (Table 3), and also a huge discrepancy in trace elements from one batch of casaminoacids to another (data not shown). Such medium is then unsuitable for our studies. As shown in Table 3, the ICP/AES analysis of the PS and CAA media revealed on the contrary very low concentrations of most of the contaminating major elements in PS medium (except Na and P).

Moreover, the trace element concentrations in the PS medium were found near or below the detection limit for a majority of them (Table 4). The PS medium is then more suitable than the CAA medium for our experiments.

### 3.3. Bacterial growth

A very faint growth of *P. aeruginosa* was observed following 48-h incubation at  $25^\circ\text{C}$  in the PS medium (Fig. 1). As expected, the growth was considerably enhanced when iron and magnesium ( $100 \mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$  and  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$  at  $0.25 \text{ g l}^{-1}$ ) were added before inoculation, or when materials were supplemented ( $100 \text{ mg/tube}$ ), suggesting, indeed, that bacteria were able to fulfill their iron and magnesium requirements from the materials. Interestingly, from the growth curves reached respectively for basalt- and bottom ash-supplemented PS media compared to the Fe/Mg supplemented one (Fig. 1), it could be suggested that the two elements were provided to the bacteria in sufficient amounts from both materials. However, it could be postulated that another unknown element is specifi-

cally provided by bottom ash to the bacteria, resulting in a better growth (Fig. 1).

## 4. Discussion and conclusions

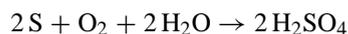
- The PS medium developed in this study allowed a good growth of *P. aeruginosa* when it was supplemented with iron and magnesium, or supplemented with materials, basalt or bottom ash, able to furnish these elements to the bacteria.
- The PS medium contains very little amounts of Si, Al, Mg, Ca, Fe, Mn, K, as well as most of the trace elements quoted for a majority of them in concentrations equal or lower than the detection limits ( $0.01 \text{ ppb}$ ). Thus, the flux of such elements during biotic or abiotic alteration processes could be accurately measured by ICP/MS when the chromatographic procedure developed in the present study is used.
- Long-term alteration assays on waste confinement matrix with or without the presence of bacteria are now in progress to evaluate the exact role of bacteria as well as their influence on the alteration rate of such materials. First experiments on bottom ash showed already that the alteration rate in the presence of *P. aeruginosa* was lower than in sterile assay. We are presently testing the hypothesis that such effect could be due to the formation of a biofilm protecting the material [6].

## 1. Introduction

L'influence des bactéries sur l'altération de minéraux ou de silicates complexes a fait l'objet de nombreux travaux. Peu d'entre eux, cependant, donnent des informations sur la vitesse d'altération et sur les mécanismes d'interaction entre l'eau, les matériaux et les microorganismes. Ceci provient de la difficulté qu'il y a à obtenir des données quantitatives sur l'altération de minéraux dans le milieu naturel en présence de microorganismes, principalement à cause de l'impossibilité de comparer des systèmes identiques, mais stériles. Une autre difficulté consiste à trouver des traceurs fiables permettant une évaluation correcte de la vitesse d'altération au cours des expériences en laboratoire.

Certains travaux se référant à la bioaltération se limitent à la description de l'état physique des matériaux supposés altérés par des bactéries [4,31,33–35] et qui associent la vitesse d'altération à la colonisation bactérienne [8]. La présence de structures particulières, telles que les *hair channels*, est attribuée à cette activité bactérienne [7], mais aucune information sur la solution

altérante n'est donnée par les auteurs. Des travaux expérimentaux [10] impliquant la participation de sidérophores [3,21,22,28] (ligands synthétisés par la majorité des bactéries pour complexer le fer et le rendre biodisponible), traitent la dissolution d'oxydes de fer en présence de desferrioxamine B ou d'acide oxalique comme complexants du fer, mais sans la présence de bactéries. D'autres travaux expérimentaux faisant intervenir des bactéries, et dans lesquels la solution est analysée, utilisent l'aluminium comme traceur [18,26]; ces travaux montrent une augmentation de la concentration en aluminium en présence de bactéries et concluent que ces bactéries provoquent une augmentation de la vitesse d'altération. Cependant, l'aluminium ne peut pas être considéré comme un bon traceur, puisque dans des essais stériles il entre facilement dans la structure de minéraux secondaires [12,13,27], alors qu'il peut rester en solution en présence de microorganismes, parce qu'il est complexé par des sidérophores [30]. Dans le second cas, la concentration de l'aluminium est élevée en solution, sans pour autant que l'on puisse conclure à une augmentation de la vitesse d'altération. Enfin, des travaux ont été conduits sur l'interaction ciments-bactéries de type *Thiobacillus thiooxidans* [19,20,24,29]. Ces bactéries sont connues pour leur capacité à produire des acides, tels que l'acide sulfurique, durant leur phase de croissance selon la réaction simplifiée :



Dans ces travaux, les auteurs comparent la vitesse de dissolution en présence de bactéries à celle du milieu stérile acidifié par de l'acide sulfurique. Ils concluent que le rôle de la bactérie se limite à la production d'acide sulfurique, qui augmente la vitesse d'altération de conduites en béton, mais sans aucun autre effet, tel par exemple que la complexation ionique.

Dans les expérimentations faisant intervenir des bactéries, le choix d'un milieu d'incubation doit répondre à deux exigences : permettre une croissance bactérienne conséquente et une évaluation de la vitesse d'altération des matériaux. Dans le cas des travaux publiés, les milieux d'incubation utilisés favorisent une croissance bactérienne, mais ne présentent pas un degré de pureté suffisant pour permettre, grâce à des traceurs fiables, une évaluation correcte de la vitesse de dissolution des matériaux [25]. Le problème majeur est que la plupart des milieux d'incubation proposés par les bactériologistes contiennent de fortes proportions d'éléments traces, candidats potentiels au traçage de la vitesse comme le strontium ou le calcium, par exemple.

Un milieu d'incubation doit contenir une source de carbone et d'énergie, une source d'azote, et des élé-

ments minéraux tels que phosphore, magnésium, fer, sodium, potassium [25]. De plus, la majorité des milieux d'incubation sont tamponnés pour rester dans la gamme de pH favorable à une croissance bactérienne.

Il est à noter que les matériaux testés peuvent apporter tout ou partie des oligoéléments nécessaires à une croissance bactérienne [5]. De ce fait, le milieu de culture choisi doit simplement fournir aux bactéries les constituants absents du solide considéré, ou éventuellement présents en quantité trop faible.

La bactérie *P. aeruginosa* a été retenue pour cette étude parce qu'elle est très répandue dans la nature (par exemple, [2,11,17]), et qu'elle a déjà fait l'objet de plusieurs études dans le domaine de la bioremédiation [1,2,16,23,32]. C'est une bactérie à Gram négatif, mobile par flagellation polaire, à métabolisme respiratoire et hétérotrophe. Pour tester la croissance de la bactérie dans le milieu d'incubation élaboré, deux matériaux pourvoyeurs potentiels d'oligoéléments, ont été étudiés : un verre basaltique d'origine marine, provenant de l'Arc des Fidji dans le Pacifique sud [14,15] et un mâchefer d'incinération d'ordures ménagères (MIOM) de référence fourni par l'École des Mines de Douai, nommés respectivement « basalte » et « mâchefer » dans le présent travail.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Élaboration du milieu d'incubation

Le milieu d'incubation proposé au cours de cette étude contient les composés suivants : acide succinique  $4 \text{ g l}^{-1}$ ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   $9 \text{ g l}^{-1}$ ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $1 \text{ g l}^{-1}$  et  $\text{NaOH}$   $1,52 \text{ g l}^{-1}$ . Ce milieu, appelé phosphates/succinate ou milieu PS, ne contient pas de source de magnésium, puisqu'il a été montré que la bactérie est capable d'utiliser celui apporté par les matériaux [5].  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et  $\text{NaOH}$  permettent de tamponner le milieu à pH 6,7 et jouent également le rôle de sources de phosphore et de sodium pour les bactéries. Le milieu a été stérilisé par filtration à  $0,2 \mu\text{m}$  dans des bouteilles stériles en polypropylène et stocké à  $4^\circ\text{C}$ .

Les sels de sodium plutôt que de potassium ont été préférés dans l'élaboration du milieu PS, pour deux raisons majeures :

- (i) permettre de séparer sur colonne chromatographique le sodium et les phosphates et récupérer tous les autres éléments majeurs et traces pour les doser par ICP/AES (spectromètre Jobin-Yvon JY 124) et par ICP/MS (spectromètre Fisons VG PQ2+) – la

Tableau 1

Analyse chimique du verre basaltique (basalte) et du mâchefer d'incinération d'ordure ménagère (mâchefer)

Table 1

Chemical analysis of the basaltic glass (basalte) and the bottom ash (mâchefer)

% masse	SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	CaO	MgO	Na <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> O	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	MnO	TiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>			
Basalte	50,10	14,60	12,00	7,42	2,39	0,11	11,50	0,18	1,31	0,12			
Mâchefer	51,30	7,00	13,60	1,98	5,96	1,20	7,90	0,09	0,46	1,03			
mg kg <sup>-1</sup>	Rb	Cs	Sr	Ba	Sc	V	Cr	Co	Ni	Cu	Zn	Y	Zr
Basalte	0,67	0,07	99	35,00	40,60	294	293	45,49	82	65	81	29,60	75
Mâchefer	32,27	1,92	269	824	4,10	263	514	25,13	220	988	1626	12,40	142
mg kg <sup>-1</sup>	Nb	Mo	Cd	Sn	Sb	W	Pb	La	Ce	Nd	Th	U	
Basalte	1,61	0,42	0,07	0,95	0,14	0,37	1,78	2,63	8,11	8,07	0,28	0,07	
Mâchefer	6,74	9,59	0,52	156	16,65	2,90	768	20,14	38,16	13,56	4,70	2,33	

limite de détection est de 10 ppb pour les majeurs et de 10 ppt pour les traces ;

- (ii) permettre de doser la quantité de potassium issue des matériaux par les méthodes conventionnelles d'analyse.

## 2.2. Croissance bactérienne

La croissance de *P. aeruginosa* a été suivie par mesure de la densité optique à 610 nm, dans des tubes de 18 × 180 mm contenant 7,5 ml de milieu PS sous agitation (200 rpm) pendant 48 h à 25 °C, avec ou sans matériau ajouté (100 mg/tube). Les matériaux dont la composition est donnée dans le [Tableau 1](#) ont été utilisés sous forme de grains obtenus par broyage, tamisage entre 100 et 125 µm de diamètre, lavage à l'alcool, puis stérilisation par chauffage à 180 °C pendant 2 h.

## 2.3. Chromatographie

La teneur en sels dissous du milieu PS étant de 15,52 g l<sup>-1</sup>, il faut le diluer au moins 10 fois en vue de son analyse chimique par ICP/MS, ce qui rend le plus souvent impossible la détection d'éléments traces dissous durant l'altération des matériaux. Une diminution de la charge pondérale sans dilution est alors indispensable pour la détection des éléments traces. Ainsi, un traitement par colonne chromatographique a été élaboré pour éliminer sélectivement le sodium et les phosphates de la solution d'altération, tout en conservant les traces.

La résine cationique AG50W-X8 a été choisie pour sa faible sélectivité relative pour le sodium [9]. Les anions, en particulier les phosphates et les sulfates, ne sont pas retenus par la résine. Celle-ci, ayant une sélectivité de 1,5 pour le sodium, permettra son élution, alors

que tous les autres cations, ayant une sélectivité supérieure à 2,35, seront retardés.

La chromatographie a été conduite dans une colonne en quartz de 0,5 cm de diamètre et de 23,5 cm de hauteur, le volume occupé par la résine étant de 4,61 cm<sup>3</sup>. La résine a été préconditionnée par une succession de lavages faisant intervenir successivement 10 ml des solutions suivantes : HNO<sub>3</sub> 0,25 N ; HNO<sub>3</sub> 7,5 N ; H<sub>2</sub>O ; HCl 0,5 N ; HCl 6 N et H<sub>2</sub>O. Ce traitement a été répété trois fois. Les solutions utilisées ont été préparées à partir de produits de qualité Suprapur (Merck).

En utilisant des solutions standard, nous avons préparé pour des essais de calibration une solution de milieu PS enrichie à 100 ppb pour chacun des éléments suivants : Cr, Co, Ni, Cu, Zn, Rb, Sr, Y, Zr, Mo, Cd, Sn, Sb, Cs, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Pb. Un volume de 40 ml de cette solution a été évaporé et le résidu, repris par 1,5 ml d'HCl 1 N, a été traité sur la colonne par élution fractionnée (13 × 1 ml HCl 1 N, puis 2 × 30 ml d'HCl 6 N). Pour chaque fraction tous les éléments traces cités ci-dessus ont été dosés par ICP/AES et ICP/MS.

## 3. Résultats

### 3.1. Validité de la séparation par chromatographie

Afin d'analyser les éléments traces du milieu d'incubation et estimer la quantité solubilisée pendant le processus de bioaltération, la séparation de la majeure partie du sodium du milieu d'incubation était nécessaire. Les résultats de la calibration de la colonne sont reportés dans le [Tableau 2](#). On remarque que le phosphore, qui est sous forme anionique, n'est pas retenu par la résine, son élution s'effectue dans les premiers millilitres de HCl 1 N. L'élution du sodium commence

Tableau 2  
Résultat de la calibration de la colonne

Table 2  
Column calibration result

Fraction	Elution	P %	Na %	Éléments traces %
1	1 ml HCl 1 N	< 0,01	< 0,01	< 0,01
2	1 ml HCl 1 N	3,23	< 0,01	< 0,01
3	1 ml HCl 1 N	74,14	< 0,01	< 0,01
4	1 ml HCl 1 N	22,47	< 0,01	< 0,01
5	1 ml HCl 1 N	0,09	< 0,01	< 0,01
6	1 ml HCl 1 N	0,02	< 0,01	< 0,01
7	1 ml HCl 1 N	0,03	< 0,01	< 0,01
8	1 ml HCl 1 N	0,01	13,99	< 0,01
9	1 ml HCl 1 N	< 0,01	65,74	< 0,01
10	1 ml HCl 1 N	< 0,01	13,07	< 0,01
11	1 ml HCl 1 N	< 0,01	6,45	< 0,01
12	1 ml HCl 1 N	< 0,01	0,53	< 0,01
13	1 ml HCl 1 N	< 0,01	0,20	< 0,01
14	30 ml HCl 6 N	< 0,01	< 0,01	96 < E* < 99
15	30 ml HCl 6 N	< 0,01	< 0,01	0,45

\* Éléments traces.

à partir du huitième millilitre de HCl 1 N et se termine au treizième millilitre. En revanche, les éléments traces, fortement retenus par la résine, sont élués par HCl 6 N dans la quatorzième fraction, avec un rendement qui varie entre 96 et 99% suivant l'élément. La concentration initiale étant de 3788 ppm de sodium et 0,1 ppm d'éléments traces, nous estimons satisfaisante la calibration de la colonne, qui permet de séparer sélectivement 99% de sodium, tout en conservant entre 96 et 99% des éléments traces.

### 3.2. Analyse chimique du milieu PS de référence

Les premières expériences ont été faites à partir d'un milieu de culture (milieu CAA) formé de : casaminoacides  $5 \text{ g l}^{-1}$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $1,18 \text{ g l}^{-1}$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$   $0,25 \text{ g l}^{-1}$ . Ce milieu contient des quantités non négligeables de Si, Ca, Na et K (Tableau 3), qui rendent impossible la détection de ces éléments libérés en faible quantité durant l'altération. Les casaminoacides résultent d'un hydrolysate de caséine, dont la composition en acides aminés ainsi qu'en éléments traces n'est pas stable d'un lot de production à l'autre, comme nous avons pu le constater, ce qui rend impossible l'utilisation de ce milieu dans nos études. Le dosage par ICP/AES du milieu PS (Tableau 3) montre une faible concentration de l'ensemble des éléments majeurs par rapport au milieu CAA, à l'exception du sodium et du phosphore, ce qui était recherché. Le milieu PS étant dépourvu des oligoéléments tels que Fe, Mg, K, et Ca, la bactérie doit satisfaire ses besoins en les recherchant dans les matériaux testés.

Tableau 3  
Composition en éléments majeurs du milieu CAA et du milieu PS (ppm)

Table 3  
Composition of CAA and PS medium (ppm)

	CAA	PS
Si	3,40	< 0,01
Al	0,02	0,02
Mg	20,40	0,02
Ca	0,33	< 0,01
Fe	0,01	0,01
Mn	< 0,01	< 0,01
Na	726	3788
K	496	1,03
P	258	2032

La teneur de ce milieu en éléments traces (Tableau 4) montre que la concentration de la majorité de ces éléments est proche de la limite de détection (0,01 ppb), voire inférieure. La pureté du milieu PS est donc satisfaisante pour étudier quantitativement l'influence des bactéries sur l'altération des silicates complexes.

### 3.3. Croissance bactérienne

Comme il fallait s'y attendre, une très faible croissance bactérienne est observée dans le milieu PS de référence après 48 h d'incubation à  $25^\circ\text{C}$  (Fig. 1). La croissance est considérablement augmentée lorsque du fer et du magnésium ( $100 \mu\text{M FeCl}_3$  et  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$  à  $0,25 \text{ g/l}$ ) sont ajoutés au milieu PS. Par ailleurs, l'ajout des matériaux (mâchefer ou basalte,  $100 \text{ mg/tube}$ ) au milieu PS provoque aussi une stimulation de la crois-

Tableau 4  
Composition en éléments traces du milieu PS (ppb)

Éléments	ppb	Éléments	ppb
Cr	4,75	La	0,01
Co	0,06	Ce	0,02
Ni	0,074	Pr	< 0,01
Cu	4,14	Nd	< 0,01
Zn	6,52	Sm	< 0,01
Rb	0,16	Eu	< 0,01
Sr	3,06	Gd	< 0,01
Y	0,01	Tb	< 0,01
Zr	1,52	Dy	< 0,01
Mo	0,95	Ho	< 0,01
Cd	0,06	Er	< 0,01
Sn	0,08	Tm	< 0,01
Sb	0,45	Yb	< 0,01
Cs	0,01	Lu	< 0,01
Ba	1,46	Th	< 0,01
Pb	0,01	U	0,33

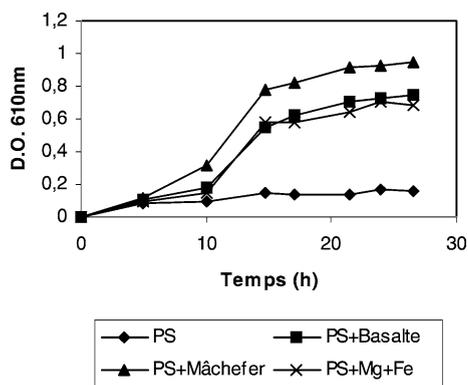


Fig. 1. Suivi de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* à 25 °C.

Fig. 1. Growth of *Pseudomonas aeruginosa* at 25 °C.

sance, ce qui suppose que les bactéries utilisent le fer et le magnésium des matériaux. D'autres éléments sont probablement fournis aux bactéries spécifiquement par le mâchefer ce qui expliquerait la plus forte croissance bactérienne en sa présence (Fig. 1).

#### 4. Conclusions et discussion

- Le milieu PS développé pour cette étude à partir de produits chimiques purs permet une bonne croissance de *P. aeruginosa*, à condition qu'il soit supplémenté par du magnésium et du fer. La présence de verre basaltique ou de mâchefer d'incinération d'ordure ménagère dans le milieu PS peut pallier à cette carence, les éléments (Fe, Mg) pouvant être fournis par la dissolution de ces matériaux [5].

- Le milieu PS est « carencé » en Si, Al, Mg, Ca, Fe, Mn, K, ainsi qu'en la majorité des éléments traces, ce qui permet d'analyser avec précision ces éléments au cours de l'altération des matériaux.
- Une colonne chromatographique a été développée pour séparer le phosphore et le sodium présents dans le milieu d'incubation, tout en gardant les éléments traces, ce qui permet leur détection par ICP/MS sans aucune dilution.
- Des essais d'altération à long terme de matrices de confinement de déchets en présence de bactéries sont en cours afin d'évaluer le rôle exact des bactéries ainsi que leur influence sur la vitesse d'altération. Des expériences réalisées avec des mâchefers montrent que la vitesse d'altération en présence de *P. aeruginosa* est plus faible qu'en milieu stérile. Ceci pourrait être attribué à la formation d'un biofilm protecteur [6].

#### Remerciements

Ce travail a été supporté financièrement par le programme REALISE (Réseau Alsace de Laboratoires en Ingénierie et Sciences pour l'Environnement). Nous remercions Christelle Gruffaz et Alain Arth pour leur assistance technique ainsi que René Boutin pour les analyses ICP-MS. Merci également à Alain Decarreau et à un expert anonyme pour leurs remarques constructives du manuscrit. Cette note constitue la contribution EOST 2005.402 (UMR7517).

#### Références

- [1] A. Abdelouas, B. Grambow, M. Fattahi, Y. Andres, E. Leclerc-Cessac, Microbial reduction of  $^{99}\text{Tc}$  in organic matter-rich soils, *Sci. Total Environ.* 336 (2005) 255–268.
- [2] A. Abdelouas, Y. Lu, W. Lutze, H.E. Nuttal, Reduction of U(VI) to U(IV) by indigenous bacteria in contaminated ground water, *J. Contam. Hydrol.* 35 (1998) 217–233.
- [3] A.M. Albrecht-Gary, A.L. Crumbliss, Coordination chemistry of siderophores: thermodynamics and kinetics of iron chelation and release, *Metal Ions Biol. Syst.* 35 (1998) 239–327.
- [4] J.C. Alt, P. Mata, On the role of microbes in the alteration of submarine basaltic glass: a TEM study, *Earth Planet. Sci. Lett.* 181 (2000) 301–313.
- [5] G. Aouad, V. Geoffroy, J.-M. Meyer, J.-L. Crovisier, P. Stille, D. Damidot, Experimental evidence for a direct use of nutrients (Fe, Mg) from basaltic glass, and MWI bottom ash by *Pseudomonas aeruginosa*, in: Goldschmidt Conference, Copenhagen, June 2004 (communication orale).
- [6] G. Aouad, J.-L. Crovisier, D. Damidot, P. Stille, E. Hutchens, J. Mutterer, J.-M. Meyer, V.A. Geoffroy, Interaction between MSWI bottom ash and *Pseudomonas aeruginosa*, *Appl. Geochem.*, submitted for publication.

- [7] N.R. Banerjee, K. Muehlenbachs, Tuff life: bioalteration in volcanoclastic rocks from the Ontong Java Plateau, *Geochem. Geophys. Geosyst.* G3 4 (2003) 1–22.
- [8] P.C. Bennett, F.K. Hiebert, W.J. Choi, Microbial colonization and weathering of silicates in a petroleum-contaminated groundwater, *Chem. Geol.* 132 (1996) 45–53.
- [9] A.N. Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA 94547, AG 50W and AG MP-50 Cation Exchange Resins, LIT203 Rev. B.
- [10] S.F. Cheah, S.M. Kraemer, J. Cervini-Silva, G. Sposito, Steady-state dissolution kinetics of goethite in the presence of desferrioxamine B and oxalate ligands: implications for the microbial acquisition of iron, *Chem. Geol.* 198 (2003) 63–75.
- [11] I. Conrot, Le biofilm et l'adhésion de *Pseudomonas aeruginosa* sur des surfaces, UFR des sciences pharmaceutiques, université Louis-Pasteur, Strasbourg, 1993.
- [12] J.-L. Crovisier, B. Fritz, B. Grambow, J.-P. Eberhart, Dissolution of basaltic glass in seawater: experiments and thermodynamic modelling, in: L.O. Werme (Ed.), *Scientific Basis for Nuclear Waste Management*, vol. IX, Materials Research Society, Stockholm, 1985, pp. 273–280.
- [13] J.-L. Crovisier, J.-H. Thomassin, T. Juteau, J.-P. Eberhart, J.-C. Touray, P. Baillif, Experimental seawater basaltic glass interaction at 50 °C: study of early developed phases by electron microscopy and X-ray photoelectron spectrometry, *Geochim. Cosmochim. Acta* 47 (1983) 377–387.
- [14] J.-P. Eissen, C. Lefèvre, P. Maillet, G. Morvan, M. Noharae, Petrology and geochemistry of the central North Fiji Basin spreading centre (Southwest Pacific) between 16°S and 22°S, *Mar. Geol.* 98 (1991) 201–239.
- [15] J.-P. Eissen, M. Noharae, J. Cottenc, K. Hirose, North Fiji Basin basalts and their magma sources: Part I. Incompatible element constraints, *Mar. Geol.* 116 (1994) 153–178.
- [16] C. Garbisu, T. Ishii, T. Leighton, B.B. Buchanan, Bacterial reduction of selenite to elemental selenium, *Chem. Geol.* 132 (1996) 199–204.
- [17] A. Hassen, N. Saidi, M. Cherif, A. Boudabous, Effects of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*, *Bioresour. Technol.* 65 (1998) 73–82.
- [18] E. Hutchens, E. Valsami-Jones, S. McEldowney, W. Gaze, J. McLean, The role of heterotrophic bacteria in feldspar dissolution – an experimental approach, *Mineral. Mag.* 67 (2003) 1157–1170.
- [19] M.A. Idachaba, K. Nyavor, N.O. Egiebor, Kinetic analysis of data obtained from studies on microbial degradation of cement waste forms, using shrinking core models, *J. Hazard. Mater.* 99 (2003) 57–69.
- [20] M.A. Idachaba, K. Nyavor, N.O. Egiebor, Microbial stability evaluation of cement-based waste forms at different waste to cement ratio, *J. Hazard. Mater.* 96 (2003) 331–340.
- [21] B.E. Kalinowski, L.J. Liermann, S.L. Brantley, A. Barnes, C.G. Pantano, X-ray photoelectron evidence for bacteria-enhanced dissolution of hornblende, *Geochim. Cosmochim. Acta* 64 (2000) 1331–1343.
- [22] B.E. Kalinowski, L.J. Liermann, S. Givens, S.L. Brantley, Rates of bacteria-promoted solubilization of Fe from minerals: a review of problems and approaches, *Chem. Geol.* 169 (2000) 357–370.
- [23] S. Karthikeyan, T.J. Beveridge, *Pseudomonas aeruginosa* biofilms react with and precipitate toxic soluble gold, *Environ. Microbiol.* 4 (2002) 667–675.
- [24] J. Knight, C. Cheeseman, R. Rogers, Microbial influenced degradation of solidified waste binder, *Waste Manage.* 22 (2002) 187–193.
- [25] P.A. Maurice, M.A. Vierkorn, L.E. Hersman, J.E. Fulghum, Dissolution of well and poorly ordered kaolinites by an aerobic bacterium, *Chem. Geol.* 180 (2001) 81–97.
- [26] P.A. Maurice, M.A. Vierkorn, L.E. Hersman, J.E. Fulghum, A. Ferryman, Enhancement of kaolinite dissolution by an aerobic *Pseudomonas mendocina* bacterium, *Geomicrobiol. J.* 18 (2001) 21–35.
- [27] C. Mevel, Mineralogy and chemistry of secondary phases in low temperature altered basalts from Deep Sea Drilling Project Legs. 51, 52 and 53, U.S. Gov. Print. Office, Washington D.C., 1980, pp. 1299–1317.
- [28] J.M. Meyer, A. Stintzi, Iron metabolism and siderophores in *Pseudomonas* and related species, in: E.T. Montie (Ed.), *Biotechnology Handbook: Pseudomonas*, Plenum Publishing Co., New York, London, 1998, pp. 201–243.
- [29] R.D. Rogers, J.J. Knight, C.R. Cheeseman, J.H. Wolfram, M. Idachaba, K. Nyavor, N.O. Egiebor, Development of test methods for assessing microbial influenced degradation of cement-solidified radioactive and industrial waste, *Cem. Concr. Res.* 33 (2003) 2069–2076.
- [30] D.R. Rosenberg, P.A. Maurice, Siderophore adsorption to and dissolution of kaolinite at pH 3 to 7 and 22 °C, *Geochim. Cosmochim. Acta* 67 (2003) 223–229.
- [31] H. Staudigel, R.A. Chastain, A. Yayanos, W. Bourcier, Biologically mediated dissolution of glass, *Chem. Geol.* 126 (1995) 147–154.
- [32] A.C. Texier, Y. Andrès, C. Faur-Brasquet, P. Le Cloirec, Fixed-bed study for lanthanide (La, Eu, Yb) ions removal from aqueous solutions by immobilized *Pseudomonas aeruginosa*: experimental data and modelization, *Chemosphere* 47 (2002) 333–342.
- [33] I.H. Thorseth, H. Furnes, M. Heldal, The importance of microbiological activity in the alteration of natural basaltic glass, *Geochim. Cosmochim. Acta* 56 (1992) 845–850.
- [34] I.H. Thorseth, H. Furnes, O. Tumyr, Textural and chemical effects of bacterial activity on basaltic glass: an experimental approach, *Chem. Geol.* 119 (1995) 139–160.
- [35] T. Torsvik, H. Furnes, K. Muehlenbachs, I.H. Thorseth, O. Tumyr, Evidence for microbial activity at the glass-alteration interface in oceanic basalts, *Earth Planet. Sci. Lett.* 162 (1998) 165–176.