

Comment certaines bactéries oxydent le fer en l'absence de dioxygène

Implications pour l'environnement et la recherche de traces de vie ancienne

Karim Benzerara, Jennyfer Miot et Guillaume Morin

Résumé Les micro-organismes jouent depuis plusieurs milliards d'années un rôle majeur dans le fonctionnement chimique de la surface de la Terre en catalysant de nombreuses réactions chimiques. Cet article présente une synthèse d'études réalisées sur des bactéries capables d'oxyder du fer(II) en l'absence de dioxygène et à pH neutre. Un tel processus peut avoir des implications environnementales *via* le piégeage de métaux lourds polluants et/ou pour l'étude du fonctionnement de la biosphère ancienne, notamment lorsque l'atmosphère et les océans n'étaient pas encore oxygénés. La formation de fer(III) induite par cette oxydation bactérienne conduit à la précipitation de phases minérales qui encroûtent les cellules. Le rayonnement synchrotron et en particulier l'utilisation de la microscopie des rayons X, en offrant la possibilité de mesurer et de cartographier le degré d'oxydation du fer et la spéciation du carbone, permet de progresser de manière significative dans la compréhension des mécanismes impliqués et de discuter l'impact de ces réactions biominéralisatrices sur la vie de ces micro-organismes grâce à la caractérisation des produits finaux.

Mots-clés Microscopie, rayonnement synchrotron, bactéries, état d'oxydation du fer, biominéralisation.

Abstract **How some bacteria can oxidize iron in the absence of dioxygen: implications for environmental science and the search of ancient traces of life**

Microorganisms have significantly impacted global chemical cycles on the Earth for several billions of years by catalyzing numerous chemical reactions. This article presents a review of studies performed on bacteria that can oxidize Fe(II) in the absence of dioxygen and at neutral pH. Such a process might have major environmental implications such as trapping of pollutant heavy metals and/or implications for the study of the ancient biosphere, when oceans and atmosphere were not oxygenated yet. The formation of Fe(III) induced by this bacterial oxidation leads to the precipitation of mineral phases that encrust cells. The use of synchrotron radiation, and in particular X-ray microscopy, by offering the capability to measure and map iron redox state and carbon speciation allows significant progress on the understanding of the mechanisms involved. The characterization of final products finally questions the impact of these biomineralizing reactions on the survival of microorganisms.

Keywords Microscopy, synchrotron radiation, bacteria, iron redox state, biomineralization.

Les micro-organismes jouent un rôle majeur dans le fonctionnement chimique de la surface de la Terre : ils peuvent catalyser de nombreuses réactions impliquant la quasi-totalité des éléments chimiques du tableau périodique et représentent une biomasse importante et diversifiée partout à la surface de la Terre, même dans les environnements les plus hostiles [1-2]. Enfin, ils sont présents sur Terre depuis peut-être plus de 3,8 milliards d'années (Ga). Le rôle du vivant a été rapidement admis pour des transformations chimiques d'ampleur globale comme l'oxygénation des océans et de l'atmosphère par la photosynthèse oxygénique il y a environ 2,3 Ga [3-4]. Cette transformation a conduit à une modification profonde de la spéciation et de la mobilité de nombreux éléments chimiques et a induit un tournant décisif dans le cours de l'histoire de la vie.

L'implication du vivant dans d'autres processus géochimiques a été en revanche plus longue à découvrir, notamment du fait de notre connaissance trop limitée de l'extraordinaire biodiversité des micro-organismes. Par exemple, l'existence de métabolismes bactériens catalysant l'oxydation du fer en conditions anoxiques (absence de dioxygène) et en milieu neutrophile (pH = 7) n'a été découverte qu'il y a quinze ans [5]. Certaines bactéries sont ainsi capables d'utiliser la lumière pour oxyder le Fe(II) en Fe(III) et réduire le CO₂ en carbone organique selon une photosynthèse qui ne produit pas d'O₂ [5]. D'autres catalysent l'oxydation de Fe(II) couplée à la réduction de nitrates [6]. Cette dernière réaction, thermodynamiquement favorable dans les conditions de l'environnement, est très lente en l'absence de bactéries. L'existence de tels métabolismes a plusieurs implications majeures [7] : ces micro-organismes

offrent un premier potentiel de dépollution en réduisant les nitrates en N_2 . Le Fe(III) étant très insoluble à pH neutre, ces métabolismes conduisent de plus à la formation d'oxydes et d'oxyhydroxydes de fer qui piègent par adsorption divers métaux lourds polluants dans les sols et cours d'eau, offrant ainsi un potentiel de dépollution supplémentaire [8-10]. Enfin, l'étude de tels métabolismes bactériens ouvre une fenêtre sur le fonctionnement de la biosphère d'il y a plusieurs milliards d'années lorsque l'atmosphère terrestre ne contenait pas de dioxygène et que les océans étaient riches en Fe(II) dissous.

Pourtant notre compréhension du fonctionnement de ces organismes reste très imparfaite. Où l'oxydation se produit-elle par rapport aux structures cellulaires ? Les cellules accommodent-elles ou non la production de composés hautement insolubles, et si oui, comment ? C'est grâce à l'apport unique du rayonnement synchrotron couplé à des études en microscopie électronique et des approches de microbiologie que nous avons pu apporter des réponses à ces questions.

Méthodologie et résultats

Nous avons utilisé une souche bactérienne isolée à partir de sédiments lacustres anoxiques, cultivée dans un milieu contenant des nitrates (10 mM) et du Fe(II) dissous (5,4 mM). Ces bactéries dites Gram- ont une paroi composée de deux membranes phospholipidiques. Un échantillon témoin du même milieu non inoculé montre qu'il n'y a pas d'oxydation du Fe(II). En revanche, en présence de bactéries, le Fe(II) est oxydé entièrement en trois jours environ et précipite sous la forme d'un dépôt minéral orangé. Les analyses à l'échelle macroscopique montrent que la diminution de la concentration de Fe(II) en solution est anti-corrélée à l'augmentation de biomasse. Bien qu'intéressante, cette approche macroscopique ne fournit cependant que peu d'informations sur les mécanismes impliqués. Pour aller plus loin, nous avons donc cartographié à l'échelle submicrométrique le Fe(II) et le Fe(III) et observé les relations spatiales avec les cellules.

Le défi méthodologique était important. Une seule technique permettait de le relever : la microscopie X qui utilise la lumière produite par le rayonnement synchrotron dans le domaine spectral des rayons X de basse énergie [11]. Il s'agit d'une microscopie en transmission avec une résolution spatiale de 25 nm qui permet de résoudre facilement les structures cellulaires (une cellule mesure environ 500 nm x 1-2 μ m). Elle permet de plus d'obtenir, pour chaque pixel d'une image, un spectre d'absorption des rayons X qui renseigne sur la spéciation des éléments présents. Il est possible de sonder le seuil K du carbone (280-320 eV) et d'obtenir ainsi la distribution de différents polymères bactériens. Sur les mêmes zones, il est aussi possible de sonder les seuils $L_{2,3}$ du fer (700-740 eV) et de cartographier le Fe(II) et le Fe(III). Enfin ces échantillons, extrêmement sensibles à l'oxydation par le dioxygène de l'air, peuvent être étudiés dans des conditions anoxiques et avec peu de dégâts dus à l'irradiation.

Les analyses réalisées à différents temps d'incubation ont montré plusieurs choses [12-13] : premièrement, une partie du fer est oxydée au niveau des cellules et conduit à la précipitation dans les parois bactériennes de phases riches en fer avec une valence mixte (Fe(II) et Fe(III)) dans un premier temps, puis entièrement oxydé (figure 1). Ceci est en accord avec les travaux des généticiens qui pensent que l'oxydation du fer est catalysée par des enzymes situées sur la membrane interne de ces bactéries. De manière plus étonnante, nous

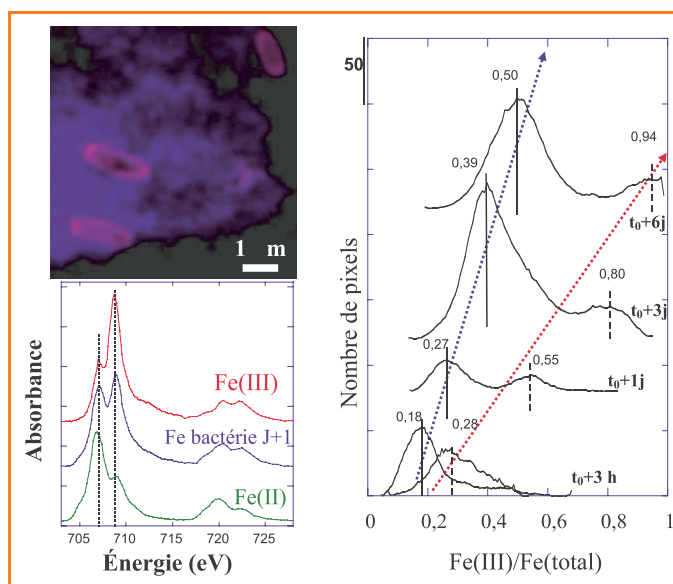


Figure 1 - Analyses en « scanning transmission X-ray microscopy » (STXM) aux seuils $L_{2,3}$ du fer de cultures de bactéries ferroxydantes.

En haut à gauche : cartographie du Fe(II) en bleu et du Fe(III) en rouge. Trois cellules sont visibles dans un précipité diffus. En bas à gauche : spectres XANES aux seuils $L_{2,3}$ du fer. Les spectres de composés de référence contenant 100 % de Fe(II) et 100 % de Fe(III) apparaissent respectivement en vert et en rouge et sont normalisés à la même quantité de fer. Un spectre pris pour exemple sur une cellule après un jour de culture est montré en bleu. On peut le modéliser par une combinaison linéaire des deux spectres de référence et obtenir ainsi la proportion de Fe(II) et de Fe(III). La cartographie en haut à gauche est obtenue par une telle modélisation faite sur chaque pixel de l'image.

À droite : évolution au cours du temps (3 h, 1 j, 3 j, 6 j) de la distribution sur les images des valeurs de l'état d'oxydation du fer. En abscisse sont reportées les valeurs de l'état d'oxydation du fer et en ordonnées le nombre de pixels pour une valeur d'oxydation donnée. À chaque temps, on observe deux pics : le premier correspond aux pixels des précipités de fer extracellulaires et le second aux pixels des précipités de fer sur les bactéries. Les droites en bleu et en rouge représentent les évolutions moyennes des états d'oxydation du fer au cours du temps pour le fer des précipités extracellulaires et le fer des précipités sur les cellules, respectivement.

avons montré que du Fe(III) apparaissait aussi à une vitesse plus lente en dehors des cellules malgré la très faible solubilité du Fe(III) à pH neutre [13]. Trois hypothèses ont été proposées : 1) les cellules exportent du Fe(III) de leur paroi vers l'extérieur grâce à des molécules complexant le Fe(III) ; 2) le Fe(III) du milieu extérieur provient de la lyse de cellules préalablement encroûtées ; enfin, 3) les cellules produisent un oxydant diffusible qui oxyde le Fe(II) loin des cellules. Les nitrites par exemple, produits par réduction partielle des nitrates, peuvent oxyder le Fe(II) très rapidement.

Nous avons enfin pu montrer en couplant microscopie X et microscopie électronique en transmission que les cellules encroûtées contiennent des protéines sous forme de globules encapsulés par les phases minérales riches en fer (figure 2). La cryomicroscopie électronique en transmission (observation des échantillons congelés dans la glace amorphe) ainsi mise en œuvre s'est révélée très complémentaire de la microscopie X en offrant des images avec une très forte résolution spatiale permettant de visualiser les protéines individuellement et une excellente préservation de ces structures. En retour, la microscopie X permet d'identifier la nature protéique de ces structures. Au final, cette observation suggère que les structures bactériennes ainsi protégées très finement à nanoéchelle par des minéraux pourraient résister à la dégradation pendant un long intervalle de temps et fournir un cas de fossilisation très précoce. De tels objets offrent ainsi une opportunité unique de mieux comprendre l'origine et la nature des fossiles de micro-organismes [14].

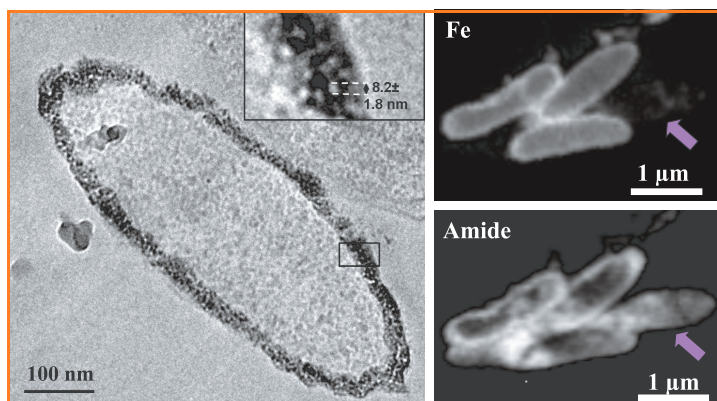


Figure 2 - À gauche : image en cryomicroscopie électronique en transmission d'une coupe de cellule encroûtée par les phases riches en fer. Celles-ci se forment initialement au niveau de la paroi et apparaissent denses aux électrons. L'agrandissement d'une portion de la paroi montre la présence de globules d'environ 8,2 nm de diamètre, qui sont peu denses aux électrons et qui par comparaison avec les données de microscopie X sont interprétés comme des globules de protéines.

À droite, en haut : cartographie STXM du fer, trois cellules sont visibles ; en bas : cartographie STXM du carbone présent dans les fonctions amides, c'est-à-dire au premier ordre les protéines. Une quatrième cellule apparaît, ce qui suggère qu'elle n'est pas encroûtée par le fer. On remarque que la distribution des protéines est relativement homogène dans la cellule non encroûtée alors que les protéines sont concentrées sur le pourtour des cellules encroûtées. En comparant les données STXM et MET, on déduit que les protéines sont concentrées dans la paroi encroûtée des cellules sous la forme de globules nanométriques.

Conclusions

L'analyse par microscopie X de la bio-oxydation du fer apporte des résultats sans précédents qui complètent et alimentent les études effectuées par des approches de génétique et de biochimie. Ces résultats montrent qu'il n'est pas facile de diagnostiquer l'intervention du vivant par de simples observations de microscopie « classique ». En effet, seule une partie du fer oxydé par les bactéries est au final liée spatialement aux structures cellulaires.

Le recours à la microscopie X synchrotron est indispensable pour déterminer que l'oxydation du Fe(II) intracellulaire et celle du Fe(II) extracellulaire se font à des vitesses différentes. Le rayonnement synchrotron par sa très grande brillance permet d'obtenir un faisceau fin, focalisable et monochromatique, apportant une contribution essentielle à ce sujet et à bien d'autres que nous n'avons pu discuter ici [15]. Bien sûr, une technique ne peut tout résoudre et nous avons évoqué la très intéressante complémentarité avec d'autres outils comme la microscopie électronique en transmission.

Plusieurs questions restent ouvertes : les cellules sont-elles tuées par cette précipitation ? Si oui, le recours à ces organismes pour dépolluer pourrait alors n'avoir qu'une efficacité réduite du fait de la durée de vie limitée du système. Nous avons constaté que d'autres micro-organismes capables de catalyser l'oxydation du Fe(II) dans les mêmes conditions ne s'encroûtent pas et forment uniquement des précipités extracellulaires [16]. L'aventure scientifique conduisant à comprendre les différences génétiques entre ces espèces reste donc complètement ouverte.

Références

- [1] Whitman W.B., Coleman D.C., Wiebe W.J., Prokaryotes: the unseen majority, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1998**, 95, p. 6578.
- [2] Williams J.P., Hallsworth J.E., Limits of life in hostile environments: no barriers to biosphere function?, *Environmental Microbiology*, **2009**, 11, p. 3292.
- [3] Schidlowski M., A 3,800-million-year isotopic record of life from carbon in sedimentary-rocks, *Nature*, **1988**, 333, p. 313.
- [4] Blank C.E., Sanchez-Baracaldo P., Timing of morphological and ecological innovations in the cyanobacteria: A key to understanding the rise in atmospheric oxygen, *Geobiology*, **2010**, 8, p. 1.
- [5] Ehrenreich A., Widdel F., Anaerobic oxidation of ferrous iron by purple bacteria, a new-type of phototrophic metabolism, *Applied and Environmental Microbiology*, **1994**, 60, p. 4517.
- [6] Straub K.L., Benz M., Schink B., Widdel F., Anaerobic, nitrate-dependent microbial oxidation of ferrous iron, *Applied and Environmental Microbiology*, **1996**, 62, p. 1458.
- [7] Benzerara K., Miot J., Morin G., Ona-Nguema G., Skouri-Panet F., Férard C., Significance, mechanisms and environmental implications of microbial iron mineralization, *C.R. Geoscience*, **2011**, 343, p. 160.
- [8] Morin G., Calas G., Arsenic in soils, mine tailings, and former industrial sites, *Elements*, **2006**, 2, p. 97.
- [9] Hohmann C., Winkler E., Morin G., Kappler A., Anaerobic Fe(II)-oxidizing bacteria show As resistance and immobilize As during Fe(III) mineral precipitation, *Environmental Science and Technology*, **2010**, 44, p. 94.
- [10] Hohmann C., Morin G., Ona-Nguema G., Guigner J.M., Brown Jr. G.E., Kappler A., Molecular-level modes of As binding to Fe(III) (oxyhydr)oxides precipitated by the anaerobic nitrate-reducing Fe(II)-oxidizing *Acidovorax* sp. strain BoFeN1, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **2011**, 75, p. 4699.
- [11] Benzerara K., Yoon T.H., Tylliszczak T., Constantz B., Spormann A.M., Brown Jr. G.E., Scanning transmission X-ray microscopy study of microbial calcification, *Geobiology*, **2004**, 2, p. 249.
- [12] Miot J., Benzerara K., Morin G., Kappler A., Bernard S., Obst M., Férard C., Skouri-Panet F., Guigner J.M., Posth N., Galvez M., Brown Jr. G.E., Guyot F., Iron biomineralization by neutrophilic iron-oxidizing bacteria, *Geochimica Cosmochimica Acta*, **2009**, 73, p. 696.
- [13] Miot J., Benzerara K., Morin G., Bernard S., Beyssac O., Larquet E., Ona-Nguema G., Kappler A., Guyot F., Transformation of vivianite by anaerobic nitrate-reducing iron-oxidizing bacteria, *Geobiology*, **2009**, 7, p. 373.
- [14] Benzerara K., Miot J., Biomineralisation mechanisms, *Origins and Evolution of Life: An Astrobiological Perspective*, M. Gargaud, P. López-Garci, H. Martin (eds), Cambridge University Press, **2010**.
- [15] Benzerara K., Tylliszczak T., Brown Jr. G.E., Study of interactions between microbes and minerals by scanning transmission X-ray microscopy (STXM), *Proceedings XAFS13, AIP Conf. Proc.*, **2007**, p. 726.
- [16] Miot J., Benzerara K., Obst M., Kappler A., Hegler F., Bouchez C., Guyot F., Morin G., Extracellular iron biomineralization by photoautotrophic iron-oxidizing bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, **2009**, 75, p. 5586.



K. Benzerara



G. Morin



J. Miot

Karim Benzerara (auteur correspondant) est chargé de recherche CNRS et **Guillaume Morin**, directeur de recherche CNRS, à l'Institut de Minéralogie et de Physique des Milieux Condensés (IMPMC)*.

Jennyfer Miot est post-doctorante au Laboratoire de réactivité et chimie des solides (LRCS) à Amiens**.

* Institut de Minéralogie et de Physique des Milieux Condensés, Tour 22-23, 4^e étage, 4 place Jussieu, F-75252 Paris Cedex 05.

Courriels : karim.benzerara@impmc.jussieu.fr ;

guillaume.morin@impmc.upmc.fr

** Courriel : jennyfermiot@yahoo.fr