

Thèse de Doctorat

Alice HAZOTTE

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : 3MPL

Discipline : Biologie de l'environnement, des populations, écologie

Unité de recherche : *Subatech (UMR 6457) ; LPG-Nantes (UMR 6112)*

Soutenue le 15 janvier 2016

Rôle de métabolites bactériens dans la mobilisation du césium d'une illite dopée : étude mécaniste et application à la phytoextraction

JURY

Rapporteurs :	Camille DUMAT , Professeur, Ecolab, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse Christian MUSTIN , Directeur de recherche, LIEC, Université de Lorraine
Examineurs :	Yves ANDRES , Professeur, GEPEA, Ecole des mines de Nantes Emile BENIZRI , Professeur, LSE, Université de Lorraine Mélanie DAVRANCHE , Professeur, Géosciences Rennes, Université de Rennes
Directeur de Thèse :	Abdesselam ABDELOUAS , Professeur, Subatech, Ecole des mines/Université de Nantes
Co-directeur de Thèse :	Thierry LEBEAU , Professeur, LPG-Nantes, Université de Nantes
Co-encadrant de Thèse :	Olivier PERON , Maître de conférences, Subatech, Ecole des mines/Université de Nantes

Thèse de doctorat

Présentée par

Alice Hazotte

en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Nantes

sous le label de l'Université Nantes Angers Le Mans

Rôle de métabolites bactériens dans la mobilisation du césium d'une illite dopée : étude mécaniste et application à la phytoextraction

Composition du jury de thèse :

Rapporteurs	Camille DUMAT , Professeur, Ecolab, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse Christian MUSTIN , Directeur de recherche, LIEC, Université de Lorraine
Examineurs	Yves ANDRES , Professeur, GEPEA, Ecole des mines de Nantes Emile BENIZRI , Professeur, LSE, Université de Lorraine Mélanie DAVRANCHE , Professeur, Géosciences Rennes, Université de Rennes
Directeur de Thèse	Abdessalam ABDELOUAS , Professeur, Subatech, Ecole des mines/Université de Nantes
Co-directeur de Thèse Co-encadrant de Thèse	Thierry LEBEAU , Professeur, LPG-Nantes, Université de Nantes Olivier PERON , Maître de conférences, Subatech, Ecole des mines/Université de Nantes

Remerciements

Ma thèse s'est déroulée pendant un peu plus de trois ans sous la direction de Abdesselam Abdelouas, Thierry Lebeau et Olivier Péron. Ce travail n'aurait pas été le même et ne serait pas allé aussi loin sans eux. Pour ça, je voudrais vous remercier : merci Abdel pour tes encouragements et merci d'avoir su te rendre disponible pour les réunions d'avancement presque mensuelles. Thierry, merci pour ta présence quasi quotidienne (la proximité de nos bureaux dans le même laboratoire aidant), merci pour ta disponibilité, ton soutien, ton optimisme (oui, tu es optimiste et heureusement que tu l'es !), merci de m'avoir fait confiance en me permettant de reprendre et donner tes cours de Bioremédiation des sols à l'IUT de La Roche-sur-Yon, merci pour tes conseils scientifiques rigoureux et tes encouragements. Je voudrais également te remercier, Olivier, pour ton encadrement. Tu n'étais, sur le papier, que co-encadrant mais je crois pouvoir dire que tu as plutôt fait un travail de co-directeur. Je tiens à te remercier pour le temps que tu as passé sur ma thèse, que ce soit pour le traitement des données, la relecture de l'article, du manuscrit, mais aussi pour tous les « problèmes » administratifs. Même si nous n'étions pas dans le même labo, tu as toujours voulu et su être présent et te tenir au courant des dernières nouvelles scientifiques en apportant continuellement des remarques pertinentes et constructives.

Je remercie Olivier Grasset, directeur du laboratoire de Planétologie et de Géodynamique de Nantes (LPG - Nantes) ainsi que Bernd Grambow, directeur du laboratoire de physique subatomique et des techniques associées (Subatech) pour m'avoir accueillie au sein de vos laboratoires.

Je remercie également sincèrement les membres de mon jury : Mme. Camille Dumat, Professeur à Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse et M. Christian Mustin, Directeur de recherche à l'Université de Lorraine, rapporteurs de ce travail de thèse ainsi que M. Yves Andres, Professeur à l'Ecole des Mines de Nantes, M. Emile Benizri, Professeur à l'Université de Lorraine et Mme. Mélanie Davranche, Professeur à l'Université de Rennes, examinateurs de ce travail.

Je voudrais remercier sincèrement Armelle Braud, pour tout ce que tu m'as appris en « manipe », en rédaction de protocole, en présentation, ... au début de ma thèse. Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité. Merci également à Pierre Gaudin, notre technicien micro-bio-géo-

chimiste +++ et aussi MacGyver du laboratoire ! Merci pour ton aide précieuse et toutes tes idées qui m'ont permis d'avoir un dispositif de culture de trèfle robuste, de pouvoir purifier la pyoverdine (oui, je sais que tu me hais encore pour ces nombreuses heures passées et à venir pour purifier cette molécule qui sent le viandox®...). J'ai découvert aussi grâce à toi les radios FIP, avec ses fipettes, et Nova mais aussi qu'il ne faut jamais rien jeter, ça peut resservir pour tout comme par exemple des baguettes à sushi pour planter des graines une par une ! Merci aussi pour ton dévouement au laboratoire (photos, déco, plantes, égayement du labo), surtout continue !

Je voudrais également remercier Virginie Blot, Maître de Conférences au CEISAM, pour votre disponibilité, votre intérêt pour mon travail, pour les réponses à mes questions de chimie (même de dernières minutes) et pour m'avoir fourni la molécule au nom imprononçable : tetraméthylammonium tétrafluoroborate.

Je voudrais aussi remercier Katy Perrigaud, ACOM et responsable de l'ICP-MS de Subatech, pour tout ce que tu m'as appris sur cet appareil sur lequel j'ai passé beaucoup de temps, merci pour ta gentillesse, ta disponibilité sans faille (tu dois détester ce téléphone que tu as toujours sur toi et qui sonne dès qu'on a un problème).

Un ENORME merci à tous les doctorants du LPG !! Quand je suis arrivée au laboratoire, certains d'entre vous étiez déjà là en master, vous m'avez fait découvrir la ville, ses bars et ses jolis coins. J'ai tout de suite été intégrée et super à l'aise. On était une grosse promo, on s'est toujours soutenus dans les moments un peu difficiles (certains en ont eu plus que d'autres et on était toujours tous là les uns pour les autres) et aussi dans les super bons moments (weekend, sport, pot, soirée, ...). J'espère sincèrement ne pas vous perdre de vue. On part tous vers des horizons et des villes ou pays différents, il faut qu'on maintienne le « weekend des doctorants annuel » qu'on a instauré depuis 2013 ! Je pense aussi, évidemment aux doctorants des années suivantes, aux post-doctorants et à tou(te)s les chéri(e)s de tout ce monde-là qui ont agrandi encore plus ce groupe uni ! Merci à vous tous ! Vous le savez, sans vous ma thèse n'aurait pas été la même !

Ceux sans qui mes trois années nantaises n'auraient pas été les mêmes sont tout les salseros ! J'ai commencé la salsa en arrivant à Nantes avec Damien (le meilleur prof de salsa de Nantes ! Je le dis, je le répète haut et fort !). J'y ai très vite pris goût et même plus ! J'en avais besoin

pour m'échapper des journées, semaines, mois difficiles de « manipes » qui ne donnaient pas ce que j'attendais ou tout simplement pour danser, rire, me recharger en joie de vivre par la musique et les danseurs ! Merci à tous les danseurs, danseuses et encore merci Damien pour ta bonne humeur et ton partage !

Pour finir, je remercie mon Chér(rrr)i qui, même à plus de 1500 km m'a conseillée, m'a fait relativiser, m'a encouragée, m'a permis de voir les choses autrement pour mieux avancer. Et enfin, un grand grand merci à ma famille : mon Papa, ma Maman et mes trois petites sœurs qui ont toujours été présents même à l'autre bout de la France, qui m'ont toujours soutenue et encouragée. Merci pour ces moments en famille qui me font tellement de bien.

Sommaire

Introduction générale.....	1
Chapitre 1 :	5
Etude bibliographique	5
1. Le césium dans l'environnement	7
1.1. CARACTERISTIQUE ET ORIGINE DU CESIUM DANS LES SOLS	7
1.1.1. <i>Caractéristiques chimiques et nucléaires du césium</i>	7
1.1.2. <i>Origine naturelle du césium</i>	7
1.1.3. <i>Origine anthropique du césium</i>	7
1.2. CAS DES SOLS DE FUKUSHIMA	8
2. Comportement du césium dans les sols	8
2.1. PHENOMENE D'ADSORPTION-DESORPTION.....	9
2.2. ROLE DES COMPOSANTS ABIOTIQUES DES SOLS DANS LA MOBILITE DU CESIUM.....	9
2.2.1. <i>Les argiles</i>	9
2.2.2. <i>La matière organique</i>	11
2.2.3. <i>Paramètres physico-chimiques influençant la mobilité du césium dans les sols</i>	12
2.3. ROLE DES COMPOSANTS BIOTIQUES DANS LA MOBILITE DU CESIUM	12
2.3.1. <i>Rôle direct ou indirect des bactéries sur la mobilité du césium</i>	13
2.3.2. <i>Rôle des plantes sur la mobilité du césium</i>	23
2.4. ESTIMATION DE LA SPECIATION DU CESIUM DANS LE SOL	27
3. Dépollution biologique des sols contaminés au césium	27
3.1. BIOREMEDIATION	27
3.1.1. <i>Atténuation naturelle</i>	28
3.1.2. <i>Biostimulation</i>	28
3.1.3. <i>Bioaugmentation</i>	28
3.1.4. <i>Bioremédiation appliquée au césium</i>	29
3.2. PHYTOREMEDIATION	30
3.2.1. <i>Phytoextraction</i>	32
3.2.2. <i>Phytoextraction appliquée au césium</i>	32
3.3. PHYTOEXTRACTION AMELIOREE.....	37
3.3.1. <i>Phytoextraction associée chimiquement</i>	37

3.3.2. Phytoextraction associée à la bioaugmentation	38
3.3.3. La phytoextraction associée à la bioaugmentation de sols contaminée au césium	40
Chapitre 2 :	1
Matériel et méthodes	42
1. Composition et préparation des substrats dopés en césium	44
1.1. PREPARATION ET DOPAGE DE L'ILLITE.....	44
1.1.1. Solution stock d'illite stérile (10 g.L ⁻¹)	44
1.1.2. Dopage de l'illite en césium	44
1.2. PREPARATION ET DOPAGE DU SOL	44
1.2.1. Détermination du poids sec et de l'humidité résiduelle	46
1.2.2. Détermination de la capacité au champ	46
1.2.3. Dopage et vieillissement du sol	46
1.2.4. Détermination du pH du sol	47
2. Cultures et analyses microbiologiques	47
2.1. PSEUDOMONAS FLUORESCENS	47
2.1.1. Origine et mode de conservation	47
2.1.2. Milieux et conditions de culture	48
2.2. METHODES DE DENOMBREMENT DE LA BIOMASSE MICROBIENNE	49
2.3. PRODUCTION ET ANALYSE DES METABOLITES BACTERIENS (DONT LA PYOVERDINE).....	49
2.3.1. Production des métabolites bactériens	49
2.3.2. Purification de la pyoverdine	50
2.3.3. Détection et quantification de la pyoverdine	50
3. Caractéristiques et conditions de culture de la plante étudiée : le trèfle violet	50
3.1. DESINFECTION ET GERMINATION DES GRAINES	50
3.2. CONDITIONS DE CULTURE	51
3.2.1. Culture hydroponique	51
3.2.2. Culture en pots de sol	51
4. Analyse du césium	51
4.1. CESIUM EN SOLUTION	51
4.2. CESIUM DANS LES PLANTES	51
4.3. CESIUM DANS LE SOL	52
4.3.1. Césium total.....	52
4.3.2. Césium phytodisponible.....	52

4.4. ANALYSE STATISTIQUE	52
5. Présentation des expérimentations	53
5.1. DESORPTION DU CESIUM DE L'ILLITE PAR DES ACIDES ORGANIQUES, SIDEROPHORES ET METABOLITES BACTERIENS	53
5.1.1. Préparation des différentes modalités	53
5.1.2. Modélisation	54
5.1.3. Observations microscopiques	54
5.2. DESORPTION DU CESIUM DE L'ILLITE PAR PSEUDOMONAS FLUORESCENS ATCC 17400.....	54
5.2.1. Conditions de culture bactérienne adaptées aux objectifs des expérimentations	54
5.2.2. Rôle du biofilm de <i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 17400 sur la désorption du césium de l'illite	59
5.3. DISPOSITIF COMPLET : ILLITE-CESIUM-BACTERIES-PLANTES	60
5.3.1. En culture hydroponique	60
5.3.2. En pots de sol	61
5.3.3. Calcul du facteur de translocation, du facteur de bioaccumulation et du pourcentage de dépollution	62
Chapitre 3 :	1
Résultats Discussion	64
1. Désorption du césium de l'illite par des acides organiques, des sidérophores et des métabolites bactériens	66
1.1. SORPTION DU CESIUM SUR L'ILLITE	66
1.2. MOBILISATION DU CESIUM DE L'ILLITE PAR DES ACIDES ORGANIQUES : ACIDE CITRIQUE ET ACIDE OXALIQUE..	67
1.3. MOBILISATION DU CESIUM DE L'ILLITE PAR DES SIDEROPHORES BACTERIENS	69
1.4. MECANISMES DE DESORPTION DU CESIUM DE L'ILLITE	75
1.4.1. Echange ionique	75
1.4.2. Altération physique	77
1.5. CONCLUSION	78
2. Désorption du césium de l'illite par <i>Pseudomonas fluorescens</i>	1
2.1. ROLE DU BIOFILM DE PSEUDOMONAS FLUORESCENS SUR LA DESORPTION DU CESIUM DE L'ILLITE DANS UNE SOLUTION NaCl (1 mmol.L ⁻¹)	80
2.2. OPTIMISATION DES CONDITIONS DE CULTURE BACTERIENNE	82
2.2.1. Test de croissance de <i>P. fluorescens</i> dans un milieu DF modifié	82
2.2.2. Billes d'alginat de calcium	84
2.2.3. Pastilles d'agar	90
2.2.4. Milieu minimum de croissance modifié : source de potassium insoluble	90

2.3. ROLE DU BIOFILM DE PSEUDOMONAS FLUORESCENS SUR LA DESORPTION DU CESIUM DE L'ILLITE DANS LE MILIEU DF K	93
2.4. CONCLUSION	94
3. Phytoextraction du césium	96
3.1. EN CULTURE HYDROPONIQUE	96
3.1.1. Evolution des plants de trèfle violet au cours du temps.....	96
3.1.2. Concentration en césium dans la solution au cours du temps	102
3.1.3. Phytoextraction du césium par le trèfle violet	104
3.2. EN POT DE SOL	113
3.2.1. Evolution de l'état des plants de trèfle violet au cours du temps	113
3.2.2. Phytoextraction du césium par le trèfle violet en pots de sol	116
3.3. CONCLUSION	123
Conclusion générale & perspectives	125
Annexes	131
Références bibliographiques	151

Introduction générale

La production d'énergie nucléaire dans des réacteurs à fission s'accompagne de la production de déchets radioactifs incluant les produits de fission, les actinides mineurs, le plutonium, et les produits d'activation. Parmi les produits de fission à rendement élevé on note le césium-137 qui, en cas d'accident, constitue la principale source de contaminations de l'environnement à long-terme. Ainsi, lors d'accidents nucléaires, les radionucléides sont dispersés dans l'air avant de retomber au sol sur des distances pouvant aller jusqu'à plusieurs centaines de kilomètres autour des centrales. Ces radionucléides peuvent contaminer les produits agricoles, et plus généralement les chaînes alimentaires dont l'Homme fait partie.

Le Cs est connu pour être très peu mobile dans le sol. Sa mobilité est régie par différents processus d'origine physico-chimique et biologique. Des paramètres comme la nature des substrats minéraux ou organique, la concentration en Cs, la présence d'ions compétiteurs, le pH, les conditions d'oxydo-réduction, ainsi que la température, peuvent influencer cette mobilité. Parmi les composants du sol, les micas et les minéraux argileux sont connus pour adsorber spécifiquement et plus fortement le Cs grâce à leurs caractéristiques chimiques et minéralogiques. Ils sont alors très fortement impliqués dans le comportement du Cs dans les sols. Par ailleurs, les minéraux du sol peuvent être altérés par les microorganismes et les plantes. En effet, les bactéries, les champignons et les racines des plantes jouent un rôle important dans le cycle biogéochimique des éléments minéraux, grâce à des processus métaboliques comme la respiration microbienne, ou en modifiant les conditions redox et le pH ambiant, en produisant des ligands ou des nouveaux biominéraux ou encore en modifiant la surface des minéraux. Ces interactions bactérie-minérale influencent largement la biogéochimie des sols et leur implication dans la mobilisation des polluants, notamment les métaux, est largement étudiée et peut être à la base de méthodes de bioremédiation des environnements contaminés.

La bioremédiation est une méthode de dépollution des sols utilisant les propriétés des microorganismes indigènes ou exogènes du sol contaminé. Cette méthode peu coûteuse, considérée comme « douce », car peu invasive vis-à-vis de l'environnement, peut être appliquée *in situ* permettant ainsi d'éviter l'excavation du sol – qui devient sinon un déchet - et de maintenir le plus possible ses fonctions écosystémiques. Certains microorganismes ajoutés au sol peuvent, grâce à leurs propriétés de complexation et d'acidification du milieu par des métabolites comme les sidérophores et les acides organiques, mobiliser les polluants en agissant sur leur spéciation. Concernant le Cs, dont les constantes de complexation avec des molécules de synthèse telle que l'EDTA ou d'origine bactérienne telle que le NTA, sont très faibles, la bioremédiation ne peut se baser que sur la mobilisation indirecte du Cs grâce aux interactions entre les microorganismes et les composants du sol le retenant. A ce jour, aucune étude n'a montré le rôle indirect des sidérophores sur la libération de Cs. L'objectif sous-tendu est qu'une fois libéré dans la solution du sol, le Cs peut être extrait par les plantes qui le prélèvent en utilisant, au niveau racinaire, les voies d'absorption du potassium. La phytoextraction, est la seule technique d'extraction *in situ* des polluants inorganiques. Comme la bioremédiation, elle est peu invasive et est plus particulièrement adaptée au traitement des pollutions diffuses. Malgré plusieurs études sur la phytoextraction du Cs, aucune plante hyperaccumulatrice n'a été identifiée.

Toutefois le trèfle violet (*Trifolium pratense*), une plante dont la biomasse et l'accumulation du Cs dans les parties aériennes sont en moyenne plus importantes que pour d'autres plantes a été sélectionnée. Bien que peu onéreuse, la phytoextraction présente un inconvénient majeur, la lenteur du processus, le temps de décontamination pouvant atteindre plusieurs dizaines d'années. Afin de réduire ces durées de dépollution, des molécules peuvent être ajoutées de façon à augmenter la fraction mobilisable des polluants inorganiques dans les sols et donc leur concentration dans la plante. Ces molécules peuvent être synthétiques, comme l'EDTA, capable de complexer différents métaux ; il s'agit alors de phytoextraction améliorée chimiquement. Ce complexant a fait l'objet de nombreux tests en dépollution des sols mais est toxique pour l'environnement. Une alternative consiste à ajouter au sol des micro-organismes d'intérêt favorisant l'absorption des métaux par la plante grâce à la production de sidérophores ou d'acides organiques. On parle dans ce cas de phytoextraction associée à la bioaugmentation.

La compréhension des mécanismes qui régissent les interactions césium-sol-bactéries ainsi que les facteurs explicatifs a fait l'objet de ce travail de thèse. Il a ensuite été appliqué à la phytoextraction du Cs par le trèfle dans la perspective d'améliorer les performances de phytoextraction.

Le premier chapitre propose un état de l'art sur l'origine et les teneurs en Cs mesurées dans les sols, sur les facteurs abiotiques et biotiques influençant sa mobilité ainsi que sur l'application de la bioremédiation à la problématique du Cs. Le deuxième chapitre décrit les méthodes utilisées tout au long de ce travail de thèse. Les résultats sont présentés et discutés dans le troisième chapitre composé de trois volets.

Le premier volet aborde la mobilité du césium retenu sur les feuillettes d'une illite purifiée, choisie comme modèle d'étude, en considérant l'action de métabolites, comme les acides organiques (acides citrique et oxalique), les complexants commerciaux (desferrioxamine mésylate (DFOM) et acide acétohydroxamique (AAH)) et un sidérophore (pyoverdine) produit par *Pseudomonas fluorescens*. Les interactions directes entre les métabolites bactériens et le césium par échange ionique, ou indirectes par altération de la matrice les contenant, ont fait l'objet d'une analyse approfondie. La comparaison du rôle de ces métabolites bactériens, en particulier les sidérophores, avec celui de complexants commerciaux complète ce premier volet.

Le deuxième volet porte sur le rôle du biofilm de *P. fluorescens* sur la mobilisation du Cs ainsi que sur la recherche d'un milieu de culture approprié pour la croissance bactérienne et la production de métabolites impliqués dans la mobilisation du Cs, tout en évitant que d'autres constituants du milieu de culture n'interagissent avec le Cs.

Le troisième volet porte sur le système complet de phytoextraction du Cs par le trèfle violet, cultivé en hydroponie (Cs en solution ou sorbé sur de l'illite) ou en sol, associé ou non à l'ajout de *P. fluorescens* et/ou de pyoverdine. Le système de phytoextraction associée à l'ajout de *P. fluorescens* et/ou de pyoverdine est testée sur du Cs de moins en moins biodisponible : entièrement biodisponible en solution (CsCl), bioaccessible sorbé sur l'illite et adsorbé sur un sol vieilli.

Chapitre 1 :

Etude bibliographique

1. Le césium dans l'environnement

1.1. Caractéristique et origine du césium dans les sols

1.1.1. Caractéristiques chimiques et nucléaires du césium

Le césium (Cs) appartient, comme le lithium (Li), le sodium (Na), le potassium (K) et le rubidium (Rb), à la classe des métaux alcalins. Chimiquement, le Cs présente un seul degré d'oxydation correspondant au cation Cs^+ . Il possède 31 isotopes dont la masse atomique varie de 114 à 145 g.mol^{-1} . Parmi eux, seul l'isotope 133 est stable. La période de décroissance radioactive est supérieure à l'année uniquement pour les isotopes 134 (2,2 ans), 135 ($2,9 \times 10^6$ ans) et 137 (30 ans). Le ^{137}Cs , émetteur β^- , donne naissance avec un rendement de 94,6 % au $^{137\text{m}}\text{Ba}$ de période 2,55 min et avec un rendement de 5,4 % au baryum 137 stable. Le $^{137\text{m}}\text{Ba}$ conduit au baryum 137 stable, avec une émission gamma (661,7 keV, rendement 85 %).

1.1.2. Origine naturelle du césium

Le Cs naturel (^{133}Cs) est présent dans l'écorce terrestre à raison de 1 - 5 mg.kg^{-1} (ATSDR, 2004; Wedepohl and Turekian, 1961). Il se présente sous forme oxydée (Cs_2O) dans un minéral, appelé pollucite ($(\text{Cs},\text{Na})[\text{AlSi}_2\text{O}_6] \cdot n\text{H}_2\text{O}$). Il existe également sous forme d'hydroxyde (CsOH), de carbonate, (Cs_2CO_3), de nitrate (CsNO_3) et de chlorure (CsCl). La plupart des composés formés à partir du Cs sont très solubles dans l'eau (ATSDR, 2004). Les autres isotopes du Cs n'existent pas à l'état naturel.

1.1.3. Origine anthropique du césium

ESSAIS D'ARMES NUCLEAIRES

Pendant la période 1945-1980, les essais nucléaires atmosphériques ont libéré dans l'environnement une quantité de ^{137}Cs estimée à 948 PBq, qui s'est peu à peu déposée à la surface de la planète. Les essais souterrains et sous-marins ont rejeté environ 200 PBq de ^{137}Cs (Agalesdes et al., 2000). Le dépôt cumulé qui en a résulté est évalué à 142 kBq.m^{-2} pour l'hémisphère nord et 35 kBq.m^{-2} pour l'hémisphère sud (UNSCEAR 2000).

REJETS DES INSTALLATIONS NUCLEAIRES EN FONCTIONNEMENT NORMAL

Le cœur d'un réacteur de 1300 mégawatts électrique (MWe) contient en fin de cycle environ 400 PBq de ^{137}Cs confinés à l'intérieur du combustible. En fonctionnement normal, une faible fraction de ce Cs se retrouve rejetée dans l'environnement. Lors du retraitement du combustible irradié, le ^{137}Cs est extrait avec les autres produits de fission. A titre d'exemple, dans sa "fiche radionucléide" de 2001 consacrée au ^{137}Cs , l'Institut de Protection et de

Sûreté Nucléaire (IPSN) (actuellement IRSN) donne une estimation de rejet annuel sous forme liquide de 1,3 GBq de ^{137}Cs pour un réacteur nucléaire de 1300 MWe et de 1,3 TBq pour l'usine de retraitement de la Hague en 1999. Les ^{134}Cs et ^{135}Cs sont également présents dans les rejets liquides et gazeux issus des différentes étapes de retraitement du combustible.

REJETS ACCIDENTELS

En 1957, les accidents de Kyshtym (Tcheliabinsk, Russie) et de Windscale (Royaume-Uni) ont entraîné des rejets en ^{137}Cs de respectivement 26,64 TBq (UNSCEAR 2000) et 22 TBq (Agalesdes et al., 2000). L'activité du ^{137}Cs émis dans l'environnement lors de l'accident de Tchernobyl est estimée à 85 PBq. Le dépôt a pu atteindre plusieurs MBq.m⁻² à proximité du site, alors qu'en Europe occidentale, notamment en France, le dépôt était de l'ordre de quelques kBq.m⁻² à quelques dizaines de kBq.m⁻². Plus récemment, lors de l'accident de Fukushima, jusqu'à 10 GBq.m⁻² de ^{137}Cs ont été rejetés dans l'environnement.

1.2. *Cas des sols de Fukushima*

L'accident nucléaire de la centrale de Fukushima Daiichi, survenu le 11 mars 2011 à la suite d'un tremblement de terre suivi d'un tsunami, a entraîné la formation d'un nuage radioactif porté par les vents qui s'est déposé ensuite par lessivage (pluies) sur les sols et le couvert végétal, majoritairement vers le nord-ouest du Japon (Endo et al., 2012; Fujiwara et al., 2012; Morino et al., 2011). Ce nuage était principalement composé de ^{137}Cs et de ^{131}I à hauteur de $1,5 \times 10^{17}$ et $1,3 \times 10^{16}$ Bq, respectivement (Chino et al., 2011).

Les quelques mois qui ont suivi l'accident, différentes équipes de recherches ont mesuré la concentration en Cs dans les sols sur un périmètre allant jusqu'à 100 km autour de la centrale (Endo et al., 2012; Kato et al., 2012; Yoshida and Takahashi, 2012; MEXT, 2011a, b, c). Les activités mesurées atteignaient jusqu'à $1,0 \times 10^7$ Bq.m⁻² pour le ^{137}Cs . Il a été montré que l'activité du ^{137}Cs décroît en fonction de la profondeur du sol. Les études montrent que 90 % de l'activité est mesurée sur les 5 premiers centimètres du sol et 70 % sur les 2 premiers centimètres du sol (Fujiwara et al., 2012; Kato et al., 2012; Matsunaga et al., 2013). Cette localisation superficielle est la même quelle que soit l'utilisation des sols - sols forestier, sols de prairies, sols agricoles - (Koarashi et al., 2012; Takahashi et al., 2015). Toutes ces études suggèrent un lien étroit entre la concentration en Cs dans l'horizon de surface du sol et la quantité d'argile et de matière organique des sols (Kato et al., 2012; Saito et al., 2014; Takahashi et al., 2015).

2. Comportement du césium dans les sols

Le Cs est connu pour être très peu mobile dans le sol (Cornell, 1993; Sawhney, 1972, 1970, 1969). Sa mobilité est régie par différents processus d'origine physico-chimique et biologique. Des paramètres comme la nature des substrats minéraux ou organique, la concentration en Cs, la présence d'ions compétiteurs, le pH, les conditions

d'oxydo-réduction, ainsi que la température, peuvent influencer directement ou indirectement cette mobilité (Cornell, 1993).

2.1. Phénomène d'adsorption-désorption

Le principal mécanisme qui permet d'expliquer la mobilisation du Cs dans les sols est le phénomène d'adsorption-désorption. L'adsorption est un phénomène de surface par lequel des molécules se fixent à l'interface sol/eau ou sol/air. La désorption est le phénomène inverse qui permet la libération des molécules adsorbées à la surface du solide. Selon les énergies de liaisons impliquées, l'adsorption peut être de deux types : l'adsorption physique ou l'adsorption chimique (Alloway, 1995; Kabata-Pendias and Pendias, 2001; McBride, 1989). Pour le Cs, seule l'adsorption chimique entre en jeu.

L'adsorption chimique, ou chimisorption, résulte d'une attraction spécifique de haute affinité. Cette adsorption met en jeu des liaisons chimiques fortes avec un échange d'électrons entre la surface du solide et les molécules adsorbées. Les propriétés du solide s'en trouvent modifiées. Les liaisons chimiques mises en jeu peuvent être de type ionique, covalente ou de coordination. Ce type de sorption peut être réversible et dépend du pH et des conditions physico-chimiques du milieu. Le Cs est concerné par des liaisons de type ionique en raison de son unique charge positive.

2.2. Rôle des composants abiotiques des sols dans la mobilité du césium

Parmi les composants du sol, en raison de leurs caractéristiques chimiques, les micas et les minéraux argileux, contrairement aux oxydes, à la calcite ou aux silicates, sont connus pour adsorber spécifiquement et plus fortement le Cs. Ils sont très fortement impliqués dans le comportement du Cs dans les sols (Cornell, 1993; Komarneni, 1979; Sawhney, 1970).

2.2.1. Les argiles

Globalement, de par leurs caractéristiques chimiques (notamment leur électronégativité et leur structure en feuillets (phyllosilicates), les argiles possèdent une surface spécifique élevée, la capacité d'absorber de l'eau et donc de gonfler, et une capacité d'échange cationique (CEC). Ces caractéristiques influencent la rétention du Cs sur ces minéraux. En effet, l'électronégativité des argiles et la CEC influencent les processus d'échange cationique et donc la structure de l'argile et la nature des sites d'adsorption affectant la sorption du Cs (Jacobs and Tamura, 1960; Sawhney, 1970). Pour des concentrations élevées en Cs, l'adsorption sur l'argile se fait sur des sites présents à la surface. Ces sites sont non spécifiques au Cs et l'adsorption est fortement influencée par la teneur en cations majeurs dans l'eau et par la valeur de la CEC de l'argile. Par exemple, une montmorillonite qui possède une plus forte CEC

qu'une illite, adsorbe plus de Cs lorsqu'il est présent à forte concentration ($>10^{-3}$ mol.L⁻¹) (Bradbury and Baeyens, 2000; Cornell, 1993; Nakao et al., 2008; Sawhney, 1972, 1970).

Cependant, la situation est différente pour des concentrations en traces de Cs ($< 10^{-8}$ mol.L⁻¹). Dans ce cas, par exemple, l'illite adsorbe plus de Cs à partir d'une solution à faible concentration qu'une montmorillonite (Cornell, 1993). Cette différence de comportement s'explique par la présence de sites d'adsorption spécifiques à chaque type d'argile. L'illite contient des sites interfoliaires qui ont une forte spécificité pour le Cs alors que les montmorillonites possèdent de nombreux sites non spécifiques au Cs (Cornell, 1993; Nakao et al., 2008).

CAS PARTICULIER DE L'ILLITE

Parmi toutes les argiles présentes dans un sol, l'illite est connue pour influencer la mobilité du Cs grâce à la présence de sites spécifiques au Cs. Cette argile non gonflante de type 2:1, dont les interfeuillet ont toujours la même épaisseur limitant ainsi les échanges ioniques et donc la désorption, est souvent utilisée pour étudier le processus d'adsorption et de désorption du Cs (Figure 1). Les expérimentations en laboratoire et les modélisations utilisant des illites saturées en Ba, Ca, Cs, K, Na ou Sr ont permis de définir des CECs de l'illite. Les valeurs obtenues varient entre 3,5 et 26 cmol.kg⁻¹ (Cornell, 1993; Poinssot et al., 1999; Sawhney, 1970). Compte tenu de ces variations, Bradbury et Baeyens, (2005) ont choisi une valeur de référence pour la CEC de 20 cmol.kg⁻¹ et recommandent que le Cs soit le cation utilisé pour l'indice de référence. Pour l'illite, la CEC se répartit sur plusieurs sites de fixation. Les sites principaux de fixation appelés « planar site » sont des sites d'échange non-spécifiques au Cs et correspondent à environ 80 % de la CEC totale de l'illite. L'illite est connue pour avoir en plus des sites d'échange non-spécifiques de surface, deux autres types de sites d'adsorption avec une sélectivité variable au Cs : i) des sites intermédiaires appelés site de type II correspondant à environ 20 % de la CEC totale et ii) des sites FES pour frayed edge sites correspondants à 0,25 % de la CEC (Fan et al., 2014; Jacobs and Tamura, 1960; Sawhney, 1970). Les sites FES ont une affinité particulièrement élevée pour le Cs (Sawhney, 1970; Staunton and Roubaud, 1997). Ces différences d'affinité impliquent que la proportion de Cs adsorbé sur les argiles diminue avec l'augmentation de concentration en Cs. En effet, une fois les sites FES (en faible proportion) saturés, l'affinité des autres sites étant plus faible, la quantité de Cs adsorbée n'augmente quasiment plus (Sawhney, 1972; Staunton and Roubaud, 1997). En outre, la nature des FES et des sites de type II est telle qu'ils sont principalement accessibles aux cations de faibles énergies d'hydratation – K⁺, Rb⁺, NH₄⁺. Ces cations concurrencent donc le Cs pour la sorption sur ces sites. Cette compétition chimique par échange ionique avec le Cs⁺ correspond à une mobilisation directe du Cs.

Des modèles sont utilisés pour calculer la rétention du Cs en concentration trace ($<10^{-8}$ mol.L⁻¹) dans des environnements variés (Cremers et al., 1988; Preter, 1990). Un autre modèle, le modèle GCS pour « generalized cesium sorption » a été développé pour calculer la sorption du Cs sur les roches riches en argile à de plus fortes concentrations (comme celles des déchets radioactifs) (Bradbury and Baeyens, 2000; Maes et al., 2008). Dans ce modèle, l'illite est l'unique phase de sorption et les seuls sites d'adsorption du Cs considérés sont les sites de type II et les sites de surface.

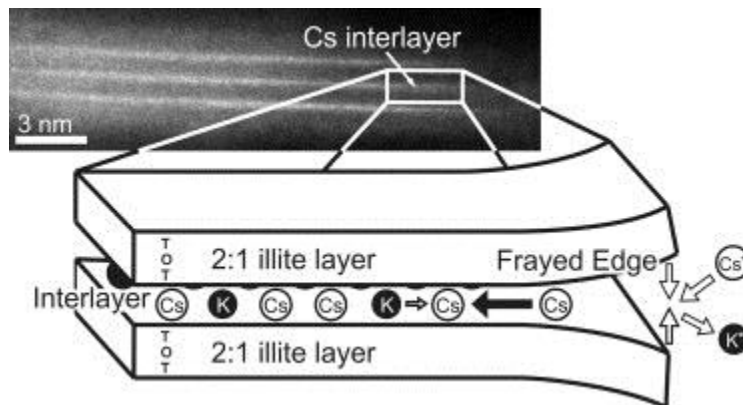


Figure 1 : Schéma d'une illite et de l'incorporation du Cs dans les espaces interfoliaires et les sites FES (Fuller et al., 2015)

2.2.2. La matière organique

Contrairement à l'adsorption sur les argiles, l'adsorption du Cs sur la matière organique, pourtant caractérisée elle aussi par une surface spécifique importante, est négligeable. La matière organique influe plutôt de manière indirecte sur la mobilité du Cs (Rigol et al., 2002). En effet, la présence de matière organique et plus spécifiquement d'acides humique et fulvique dans un sol diminue l'adsorption du Cs sur les argiles en masquant les sites de fixation du Cs (Dumat and Staunton, 1999; Dumat et al., 1997; Rigol et al., 2002). Ainsi l'augmentation du pourcentage de matière organique du sol réduit l'adsorption de Cs (Staunton, 2002). L'étude de Koarashi et al. (2012) réalisée à partir de sols forestiers riches en matière organique montre que le Cs est plus mobile que dans un sol en contenant moins. Ils suggèrent eux aussi que cela est dû au blocage des sites de fixation du Cs sur l'argile du sol par la matière organique. Fan et al. (2014), suggèrent que ce sont les molécules d'acide humique qui bloqueraient les sites FES et les sites de type II sur l'illite à l'adsorption du Cs.

2.2.3. Paramètres physico-chimiques influençant la mobilité du césium dans les sols

LE PH

Le Cs ne pouvant pas être hydrolysé ou former des complexes, il est présent sous la forme Cs^+ dans une large gamme de pH. Le pH du sol intervient, par conséquent, uniquement dans la mesure où il affecte les propriétés d'échange du substrat (Cornell, 1993). Différentes études ont montré qu'en fonction du minéral, la rétention du Cs était plus ou moins rapide. Dans le cas de l'argile utilisée, l'illite, la rétention du Cs est peu dépendante du pH, sur une gamme entre 4 et 10 (Wendling et al., 2004) qui correspond à celle de la plus grande majorité des sols.

LE POTENTIEL D'OXYDO-REDUCTION

Comme l'adsorption du Cs implique un échange d'ion, la rétention de cet élément devrait être affectée par une variation du potentiel d'oxydo-réduction. Mais comme pour le pH, il a été montré que le potentiel redox n'affectait pas l'adsorption du Cs (Lee et al., 2007) et donc sa mobilité. Il peut affecter la mobilité du Cs de la même façon que le pH, de manière indirecte en fonction du minéral retenant le Cs.

LA TEMPERATURE

Peu d'études portent sur l'effet de la température sur la mobilité du Cs. Et les résultats sont très variables. Pour le cas de l'illite, il a été montré qu'entre 20 et 80°C les propriétés de l'illite restent inchangées pour les sites de surface et de type II, mais que la sorption du Cs diminue d'un facteur 4 sur les FES à 80 °C (Chen et al., 2014a). Dans un sol où la température peut atteindre 50°C, les propriétés de l'illite resteront donc les mêmes qu'à 20°C.

LES AUTRES ELEMENTS CHIMIQUES

L'adsorption du Cs dépend surtout de la composition en autres cations puisque cette réaction d'adsorption est en réalité un échange d'ion. L'affinité relative du Cs dépend donc de la présence de cations compensateurs de charge. Ces cations sont, par ordre décroissant de compétition avec Cs^+ : $\text{K}^+ \gg \text{NH}_4^+ > \text{Rb}^+ > \text{Na}^+ > \text{Ca}^{2+}$. Cette affinité pour les sites d'adsorption très spécifiques (FES) de l'illite est largement déterminée par la petite sphère d'hydratation (sphère de molécule d'eau autour de l'atome), plus que par le rayon ionique de l'élément (Benedicto et al., 2014; Staunton and Roubaud, 1997).

2.3. Rôle des composants biotiques dans la mobilité du césium

Les différents paramètres physico-chimiques cités précédemment ainsi que les minéraux du sol peuvent être modifiés ou altérés par les microorganismes (et les plantes) présents dans (à la surface de) ces sols. En effet, les

bactéries, les champignons et les racines des plantes, jouent un rôle important dans le cycle biogéochimique des éléments minéraux (dont les radionucléides), grâce à des processus métaboliques directs comme la respiration microbienne, ou indirects en modifiant les conditions redox et le pH ambiant, en produisant des ligands ou des nouveaux biominéraux ou encore en modifiant la surface des minéraux. Ces interactions contrôlent leur mobilité et peuvent être à la base de méthodes de bioremédiation des environnements contaminés.

2.3.1. Rôle direct ou indirect des bactéries sur la mobilité du césium

De nombreuses bactéries sont capables de vivre en présence de radioactivité. En effet, lors de l'accident nucléaire de Tchernobyl, par exemple, une étude microbiologique des sols a montré que la diversité bactérienne n'était pas affectée (Chapon et al., 2012; Ragon et al., 2011). Dans le cas du césium, en plus de supporter la radioactivité, les bactéries peuvent également agir sur sa mobilité en l'immobilisant ou en le désorbant des minéraux du sol. Les propriétés chimiques du Cs impliquent que les réactions avec les microorganismes soient moins nombreuses qu'avec d'autres radionucléides (Avery, 1996). En effet, contrairement aux radionucléides comme le technétium (^{90}Tc), l'uranium (^{238}U), le neptunium (^{237}Np) et le plutonium (^{238}Pu , ^{239}Pu , ^{240}Pu et ^{241}Pu) dont la mobilité est influencée par leur spéciation en solution (réactions d'oxydo-réductions) elle-même influencée par les microorganismes, la mobilisation du Cs est limitée à des réactions d'échange cationique et de sorption/désorption (Brookshaw et al., 2012). La modification de la mobilité du Cs par les bactéries présentes dans l'environnement peut alors provenir d'une part de mécanismes directs par échange du Cs avec des ions compétiteurs qui entraînent la libération du Cs dans la solution du sol (Hinton et al., 2006), d'autre part des mécanismes indirectes par modification de la stabilité des minéraux sur lesquels le Cs est sorbé.

ROLE DIRECT DES BACTERIES SUR LA MOBILITE DU CESIUM

Ayant des propriétés similaires à celles du Cs, le K et NH_4^+ en sont des compétiteurs directs. Certains microorganismes du sol sont capables justement de produire des ions ammonium dans l'environnement à partir de l'urée notamment (Brookshaw et al., 2012). Ces ions ammonium libérés dans le sol pourront, par échange ionique, désorber le Cs des argiles du sol et le rendre ainsi mobile dans la solution du sol.

Des études ont toutefois montré que certaines bactéries sont capables d'immobiliser le Cs. En effet, Parekh et al. (2008) montrent que dans un sol contaminé autoclavé, 60 % de Cs en plus était mobilisé en solution par rapport à un sol non autoclavé. Les microorganismes du sol pourraient ainsi influencer l'immobilisation du Cs dans un sol sachant que l'autoclavage peut également modifier la matière organique et influencer la mobilité du Cs. L'immobilisation peut se faire par biosorption du Cs sur les parois des microorganismes ou sur les exopolysaccharides libérés dans le milieu par les microorganismes. La biosorption, dépendante du pH, est un mécanisme de fixation physico-chimique sur les parois de microorganismes vivants ou morts. Elle est passive car

seuls des processus d'interactions ioniques avec les groupements présents à la surface des parois bactériennes interviennent (Gabr et al., 2008; Volesky, 1990). Mao et al. (2011) montrent, par exemple, que l'exopolymère PFC02 produit par *P. fluorescens* C-2 permet de sorber du Cs de façon optimale à pH 8,0 par échange ionique présent en solution. Zhu et al. (2010) observent quant à eux que *P. alcaligenes* est capable de sorber également le Cs à partir d'une solution contaminée.

Une autre possibilité d'immobilisation est l'accumulation du Cs à l'intérieur des cellules bactériennes. La bioaccumulation est un mécanisme actif n'intervenant que chez des organismes vivants car il dépend du métabolisme de l'espèce considérée (Volesky, 1990). En effet, plusieurs microorganismes sont capables d'accumuler le Cs, i.e. *E. coli*, *A. variabilis*, *C. salina*, *Rhodococcus sp*, *K. palustris*, *Ochrobactrum spp.* and *M. luteus* (Avery and Tobin, 1993; Avery et al., 1992; Borst-Pauwels, 1993; Ivshina et al., 2013; Reed et al., 1981; Tišáková et al., 2013). Les voies de transfert influençant l'absorption du Cs par les bactéries sont les systèmes de transport de cations monovalents comme le potassium (Avery et al., 1992; Avery, 1996; Kuwahara et al., 2011). Le pH et la concentration en cation monovalent (autre que le Cs) influencent l'accumulation du Cs dans les cellules bactériennes (Avery et al., 1992). Parmi les nombreuses voies de transfert du potassium existantes au sein des membranes cellulaires microbiennes, le symport K^+/H^+ , nommé Kup, semble être le plus utilisé pour l'accumulation du Cs. En effet, une étude sur un mutant Kup-, et plus précisément de la protéine TrkD chez *E. coli*, a montré une nette diminution de l'accumulation du Cs dans la cellule (Bossemeyer et al., 1989). Cette protéine TrkD codant pour le fonctionnement du système Kup permet donc le passage du Cs à l'intérieur des cellules microbiennes.

A trop forte dose, le Cs devient toxique puisque, bien qu'il possède les mêmes propriétés physico-chimiques que le potassium, il n'a pas de rôle dans le métabolisme microbien (Avery, 1996). La toxicité provient alors du manque de potassium. Le sodium peut inhiber l'effet toxique du Cs sur la croissance microbienne (Avery et al., 1992).

Cette capacité d'immobilisation du Cs par biosorption et/ou bioaccumulation n'est pas systématique chez les bactéries. En effet, des bactéries telles que *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Thiobacillus intermedius* ne sorbent et n'accumulent pas le Cs, et à faible concentration (inférieure à 10 mmol.L⁻¹ de Cs) leur croissance n'est pas modifiée (Appanna et al., 1996; Tomioka et al., 1992).

ROLE INDIRECTE DES BACTERIES SUR LA MOBILITE DU CESIUM

Une autre possibilité de mobiliser le Cs est de modifier la stabilité de minéraux sur lesquels le Cs est sorbé, par altération minérale (Brookshaw et al., 2012; Cornell, 1993; Mapelli et al., 2012). L'altération minérale est le fait de phénomènes de dissolution ou d'altération sous l'action de métabolites bactériens : c'est la bioaltération (Hailiang Dong et al., 2009; Gadd, 2010; Uroz et al., 2009; Wendling et al., 2005a, 2005b). En effet, au cours de leur croissance, les bactéries peuvent utiliser les minéraux comme source d'énergie, e.g. accepteur d'électrons ou pour

leur besoin nutritionnel (Ehrlich, 1996). Elles libèrent alors dans l'environnement des métabolites tels que les sidérophores et les acides organiques qui peuvent avoir des effets sur les minéraux du sol. Ces différents métabolites sont capables d'altérer chimiquement par dissolution les minéraux contenant le polluant et ainsi déstructurer les minéraux et libérer le Cs. Les différents acides organiques et chélateurs libérés par les bactéries dans l'environnement ont ainsi une triple action sur l'altération des minéraux : i) ils adhèrent aux surfaces des minéraux et en extraient des nutriments par transfert d'électrons, ii) ils cassent les liaisons O-O, et iii) ils chélatent les ions dans la solution en accélérant indirectement la dissolution du minéral par déséquilibre électrique (Uroz et al., 2009). Ce mécanisme de bioaltération est influencé par le degré de cristallinité des minéraux et leur structure moléculaire mais également par les paramètres physico-chimiques (pH, température) favorisant le développement bactérien (Mapelli et al., 2012).

Concernant les argiles, leur bio-altération est essentiellement due à la réduction ou à la complexation du fer structural (Hailiang Dong et al., 2009). L'argile la plus étudiée en termes d'altération est la smectite seule ou en mélange avec l'illite ou la kaolinite. Il a été montré que parmi tous les minéraux étudiés, la smectite était la plus bio-altérable (plus rapidement et de façon plus étendue : 1 à 55 % avec une moyenne de 26 %), alors que l'illite est la moins altérable (de 1 à 25 %) (Hailiang Dong et al., 2009).

L'altération des argiles par des microorganismes peut produire un minéral secondaire, c'est la biominéralisation. Une smectite, par exemple, en présence de *Schewanella oneidensis* est altérée en illite et donne un mélange illite-smectite visible au microscope électronique à transmission (Kim et al., 2004). C'est également le cas pour des silicates qui peuvent être altérés en dolomite (Sanz-Montero and Rodríguez-Aranda, 2009).

Cette interaction bactérie-minéraux influence largement la biogéochimie des sols, et son implication dans la mobilisation des polluants, notamment les métaux est largement étudiée (Dong and Lu, 2012; Gadd, 2010; Uroz et al., 2009).

Les sidérophores

Les sidérophores sont des chélatants organiques ayant une très forte affinité pour le fer. La constante d'affinité du complexe Fe-sidérophores est de l'ordre de 10^{23} à 10^{52} M^{-1} selon la nature chimique des sidérophores (Clarke et al., 1987; Hernlem et al., 1999). Cette affinité est bien plus importante que celle déterminée pour l'EDTA (10^{20} M^{-1}) (Nowack et al., 2001) ou les acides organiques de faible poids moléculaire tel que l'acide oxalique ($10^{7.5} \text{ M}^{-1}$) (Perrin, 1979). Ils sont synthétisés par les bactéries, les champignons et les plantes en conditions aérobies pour séquestrer et transporter le Fe sous forme de complexe jusqu'à la cellule (Hider and Kong, 2010). Le fer une fois complexé dans le sol peut alors traverser les membranes cellulaires via des récepteurs membranaires. Le complexe est dissocié à l'intérieur de la cellule sans aucune modification chimique du sidérophore (Braud et al., 2009; Clarke et al., 1987; Yeterian et al., 2010). Leur production est régulée par la concentration en Fe du sol ($< 10 \mu\text{mol.L}^{-1}$)

mais également la nature et la concentration en C et N, le taux de phosphate, le pH, le taux d'aération, la présence d'éléments traces (Mn, Mo, Zn), la température (O'Sullivan and O'Gara, 1992) et la composition du sol, notamment la teneur en argiles (Neubauer et al., 2000). Actuellement, plus de 500 sidérophores de structures différentes, dont la taille varie entre 200 et 2000 Da, ont été décrits (Boukhalfa and Crumbliss, 2002). Ils sont classés en trois groupes selon les groupements fonctionnels utilisés pour complexer le fer : les hydroxamates, les catécholates et les carboxylates (Baakza et al., 2004; Miethke and Marahiel, 2007; Raymond et Dertz, 2004) (Figure 2). Les hydroxamates ont une constante d'affinité avec le fer (10^{30} M^{-1}) moins importante que celle des catécholates et hydroxamates (10^{40} M^{-1}) (Ahmed and Holmström, 2014). Ces groupes bidentés, comportant deux sites de fixation et peuvent être présents en double ou triple dans un même sidérophore ; c'est pourquoi un sidérophore peut être bi-, tétra- ou hexadentés.

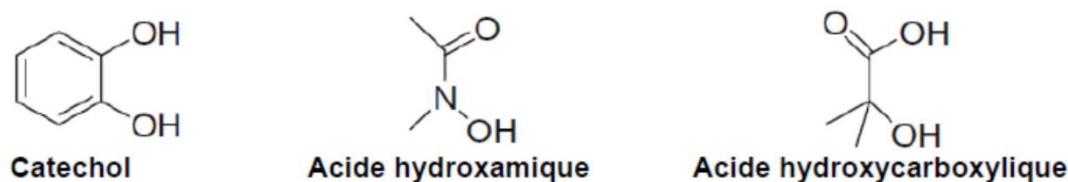


Figure 2 : Les différents groupements responsable de la fixation du fer (ou autres métaux) (Raymond et Dertz, 2004)

Leur concentration dans la rhizosphère peut atteindre 10^{-7} à 10^{-8} M (Powell et al., 1980) et il a été montré que *Pseudomonas sp* pouvait produire jusqu'à 875 mg de sidérophore par gramme de biomasse dans un milieu sans fer (Bossier et al., 1988).

Les sidérophores des *Pseudomonas fluorescents*

Les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* ont été isolées dans de nombreux habitats tels que les sols, les sédiments, les végétaux ainsi que les eaux douces et marines (O'Sullivan and O'Gara, 1992). Il apparaît comme l'un des taxons bactériens les plus importants du sol (Garbeva et al., 2004), où les populations indigènes de *Pseudomonas fluorescents* sont très fréquentes (Latour et al., 1999). Ce genre possède des rôles clés dans les sols en tant qu'agent de biocontrôle (O'Sullivan and O'Gara, 1992) mais aussi dans la stimulation de la croissance végétale ainsi qu'en bioremédiation (Garbeva et al., 2004). Comme leur nom l'indique, les *Pseudomonas fluorescent* grâce à la production de la pyoverdine, un sidérophore très étudié qui donne cette couleur jaune-vert (Meyer, 2000). En plus de la pyoverdine, ils produisent différents types de sidérophores : la pyochéline, la

Chemical structure of a complex molecule, likely a metal-organic complex, featuring a central orange sphere (likely a metal ion) coordinated by several ligands. The ligands include a green polycyclic aromatic system with a positive charge on one nitrogen, and various amide and hydroxyl groups. The structure is labeled with 'R' and '(CH₂)₃' groups.

R= CC(=O)CCC(=O)O Acide succinique

R= CC(=O)CCC(=O)N Succinamide

R= CC(=O)CCC(=O)O Alpha-cétoglutarique

17

Tableau 1. Bactéries capables d'altérer des minéraux

Genre bactérien	Mécanismes impliqués	Minéral solubilisé	Références
<i>Arthrobacter</i>	synthèse de sidérophores production d'acide	hornblende	(Kalinowski et al., 2000)
<i>Azospirillum</i>	gluconique	phosphate	(Rodriguez et al., 2004)
<i>Azotobacter</i>	production d'acide dihydroxybenzoïque et synthèse de sidérophores	pyrite, glauconite, olivine, limonite, hématite	(Hameeda et al., 2006)
<i>Geobacter</i>	réduction du fer ferrique	oxyde de fer	(Childers et al., 2002)
<i>Rhanella</i>	production d'acide gluconique	hydroxyapatite	(Kim et al., 1998)
<i>Streptomyces</i>	Synthèse de sidérophores	hornblende	(Liermann et al., 2000)
<i>Pseudomonas</i>	Production d'acide gluconique	phosphate	(Hameeda et al., 2006)
		olivine	(Torres et al., 2014)
	Synthèse de sidérophores	montmorillonite	(Kuhn et al., 2013)
		vermiculite	(Müller, 2009)
		smectite	(Claire Ferret et al., 2014)
		kaolinite	(Maurice et al., 2001)
<i>Shewanella</i>	Synthèse de sidérophores	olivine	(Torres et al., 2014)
		minéraux argileux	(Esnault et al., 2013)
<i>Enterobacter</i>	Production d'exsudats	smectite	(Perdrial et al., 2009)
<i>Ralstonia</i>	Production d'exsudats	illite	(Wendling et al., 2005b)
<i>Bacillus</i>	Production d'acide oxalique, d'acide tartrique	illite, biotite et feldspath	(Sheng and He, 2006)
	Production d'exsudats	illite	(Sheng et al., 2008) (Wendling et al., 2005b)

Le fer complexé par les sidérophores du sol provient de la solution du sol où il est présent sous forme libre à 10^{-17} M (Gram, 1996) ou alors des minéraux constitutifs des sols. Il a en effet été montré que les bactéries étaient capables de complexer, *via* des sidérophores, le fer provenant directement des minéraux comme de la hornblende, des feldspaths, des hydroxydes de fer, des silicates d'aluminium ou encore des oxydes de manganèse (Tableau 1) et ainsi d'altérer les minéraux (Kraemer, 2004). Des auteurs ont par ailleurs étudié directement l'effet des sidérophores purifiés comme la pyoverdine ou la pyocheline et des sidérophores commerciaux comme les trihydroxamates : *i.e.* DFOB (desferrioxamine-B), DFOD (desferrioxamine-D), DFOM (desferrioxamine mesylate) ou encore des monohydroxamates comme AAH (acide acéto-hydroxamique) sur l'altération des minéraux (Tableau 2). Ces sidérophores se comportent de la même façon que la pyoverdine en complexant le fer des minéraux mais avec des constantes d'affinité plus faibles que la pyoverdine (pyoverdine : 10^{32} M^{-1} ; DFOB : $10^{30,5} \text{ M}^{-1}$; AAH : $10^{28,3} \text{ M}^{-1}$; pyocheline : 10^5 M^{-1}) (Braud et al., 2009a; Cezard et al., 2015; Hider and Kong, 2010)

Les sidérophores appliqués à la bioremédiation

En plus du fer, les sidérophores sont capables de complexer d'autres métaux divalents comme Pb, Cu, Zn, Cd, Ni ou des divalents et trivalents comme Mn, Co et Al ainsi que des actinides comme Th, U et Pu avec une affinité toujours plus faible que celle pour le Fe (Braud et al., 2009b; Claire Ferret et al., 2014; Meyer et al., 2002; Peterson et al., 2004; Schalk et al., 2011). Cette capacité à complexer les métaux et donc à influencer leur mobilité est utilisée pour la bioremédiation des sols contaminés par les métaux par une action directe en complexant le métal à éliminer ou par une action indirecte en complexant des métaux constitutifs de minéraux conduisant à leur altération et à l'élimination indirecte du métal à éliminer. La pyoverdine et la pyocheline, des sidérophores de *Pseudomonas aeruginosa*, sont connus pour complexer une large gamme de métaux, *i.e.* Ag, Al, Cd, Co, Cr, Cu, Eu, Ga, Hg, Mn, Ni, Pb, Sn, Tb, Tl et Zn (Braud et al., 2009a, 2009b; C. Ferret et al., 2014a; Schalk et al., 2011). La pyoverdine a des constantes de stabilité plus élevées pour les métaux trivalents alors que la pyocheline complexe plus spécifiquement les ions divalents. Des sidérophores ont également joué un rôle important dans la mobilisation de métaux à partir de déchets de mine ou de sols contaminés. Plusieurs métaux (*i.e.* Fe, Ni et Co) ont été mobilisés à partir de déchets d'une ancienne mine d'uranium en présence de sidérophores produits par *P. fluorescens* (Edberg et al., 2010). La mobilisation du Fe est directe par complexation alors que celle de Ni et Co peut être entraînée par d'autres exsudats bactériens ou par altération du minerais. Il a été démontré que les sidérophores produits par *Agrobacterium radiobacter* permettaient de rendre plus biodisponible de manière indirecte environ 54 % de l'As à partir d'un sol contaminé par des métaux (Wang et al., 2011). Récemment, il a également été constaté que les pyoverdines pouvaient mobiliser indirectement U(VI) et d'autres métaux à partir de déchets de mines d'uranium (Behrends et al., 2012).

Tableau 2 : Sidérophores impliqués dans l'altération de minéraux

Sidérophores impliqué	Concentration en sidérophore	Minéral altéré	Métal dissous	Référence
DFOD	535 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	Smectite	Fe et Al	(Haack et al., 2008)
	150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	Goethite		(Kraemer et al., 1999)
AAH	10 mmol.L^{-1}	Goethite	Fe et Al	(Holmén and Casey, 1996)
	496 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	Smectite		(Haack et al., 2008)
	501 $\mu\text{mol.L}^{-1}$			
	50-240 $\mu\text{mol.L}^{-1}$			(Haack et al., 2008)
	1 $\mu\text{mol.m}^{-2}$			(Kuhn et al., 2013)
DFOB	150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	Smectite	Fe	(Simanova, 2011)
	40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	Montmorillonite		(Kraemer et al., 1999)
		Goethite		(Cervini-Silva and Sposito, 2002)
	80 $\mu\text{mol.L}^{-1}$			
	50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	Hornblende	Pb	(Carrasco et al., 2008)
	24 et 120 $\mu\text{mol.L}^{-1}$			(Reichard et al., 2007)
				(Liermann et al., 2000)
	240 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	Kaolinite		(Rosenberg and Maurice, 2003)
		Zéolite	Zn, Pb, Cd Fe, Al, Si, V, Ga, As, Sb, Mn	(Karimzadeh et al., 2013)
	150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	Roche volcanique		
	250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$			(Casentini and Pettine, 2010)
Ferrichrome	40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	Goethite	Fe	(Reichard et al., 2007)
Biscaberine	13 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	Ferrihydrite	Fe	(Yoshida et al., 2002)
Pseudobactine	240 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	Hematite		(Hersman et al., 1995)
Biscaberine	13 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	Goethite	Fe	(Yoshida et al., 2002)
DFOM	50 $\mu\text{mol.g}^{-1}$	Sol	Fe et Al	(Illmer, 2006)
Pyoverdine	250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	Smectite	Fe et Al	(Ferret et al., 2014)
Pyochelin	250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	Smectite	Fe	(Ferret et al., 2014)

Concernant le Cs, il est connu pour avoir une affinité quasi nulle avec les chélateurs : i.e. la constante d'affinité du Cs avec l'EDTA et le NTA est de $10^{1.3}$ and $10^{0.85}$ respectivement (Reinoso-Maset et al., 2013; Smith et al., 2003). Aucune étude n'a encore montré le rôle indirect des sidérophores spécifiquement sur la libération de Cs. Wendling et al. (2005b) ont montré que des exsudats de *Enterobacter*, *Ralstonia* et *Bacillus* ajoutés à une illite dopée en Cs permettaient une désorption du Cs, mais dans cette étude, la composition des exsudats bactériens est inconnue et le rôle spécifique des sidérophores n'est pas déterminé.

Les acides organiques

Les bactéries sont également capables de synthétiser des acides organiques tels que l'acide citrique, oxalique, lactique, gluconique, formique et succinique (Gadd, 2004; Vyas and Gulati, 2009). Ou encore des acides forts tels que l'acide hydrocyanique. C'est le cas par exemple de *Pseudomonas fluorescens* qui peut produire plusieurs acides organiques – à des concentrations allant jusqu'à 14 mg.mL^{-1} d'acides organiques total - dont l'acide citrique, gluconique ou encore l'acide formique (Vyas and Gulati, 2009) et de l'acide hydrocyanique (Gadd, 2000). Ces acides sont capables, comme les sidérophores d'altérer un minéral en acidifiant le milieu, en solubilisant le K, Al, Fe et Si contenus dans ces minéraux (Tableau 3). Ces acides ont aussi des propriétés complexantes mais bien plus faibles que celles des sidérophores. La constante d'affinité du fer avec l'acide oxalique et l'acide citrique est de 10^8 et 10^{12} respectivement (Perrin, 1979), et varie en fonction du minéral et des autres composés présents. Lorsque les sidérophores et les acides organiques sont présents dans le même milieu, alors l'altération est plus importante. Par exemple, l'acide oxalique seul n'a pas d'effet sur la dissolution de la goethite mais associé à un sidérophore (DFOB) le minéral peut être dissout de façon plus importante qu'en présence du DFOB seul (Simanova, 2011). Cette altération peut être utilisée en bioremédiation car elle déstructure le minéral et peut solubiliser les polluants initialement sorbés. Il a par exemple été montré que l'acide citrique et l'acide oxalique permettaient une solubilisation d'aluminium et une désorption indirecte du Cs (Wendling et al., 2005a, 2005b, 2004). Chiang et al. (2011) montrent également que le Cs peut être mobilisé indirectement à partir d'un sol contaminé par différents acides organiques par ordre décroissant d'efficacité : acide citrique > tartrique > oxalique > succinique > acétique. Ils suggèrent que les H^+ protonnent les groupes hydroxyles (OH et OH_2) et les atomes d'oxygène présents à la surface des minéraux du sol et que cette protonation permet aux acides organiques de former des complexes avec des cations tels que Al et Fe, ce qui libère le Cs et le Si du sol.

Tableau 3 : Acides organiques impliqués dans l'altération de minéraux

Acides organiques impliqués	Concentration en acide	Minéral altéré	Références
Acide citrique	20 mmol.L ⁻¹	Sol contaminé en Cs	(Chiang et al., 2011)
	500 µmol.L ⁻¹	Goethite	(Reichard et al., 2007)
	25, 50, 100, 250, 500 mmol.L ⁻¹	Kaolinite, illite, montmorillonite	(Kong et al., 2014)
Acide oxalique	50 et 100 µmol.L ⁻¹	Goethite	(Reichard et al., 2007)
	200 µmol.L ⁻¹		(Cervini-Silva and Sposito, 2002)
	20 mmol.L ⁻¹	Sol	(Chiang et al., 2011)
	3 mmol.L ⁻¹	Hématite	(Hersman et al., 1995)
	25, 50, 100, 250, 500 mmol.L ⁻¹	Kaolinite, illite, montmorillonite	(Kong et al., 2014)
Acide malique	750 µmol.L ⁻¹	Goethite	(Reichard et al., 2007)
Acide succinique	20 mmol.L ⁻¹	Sol	(Chiang et al., 2011)
Acide tartrique	20 mmol.L ⁻¹	Sol	(Chiang et al., 2011)
Acide acétique	20 mmol.L ⁻¹	Sol	(Chiang et al., 2011)
Acide ascorbique	2 mmol.L ⁻¹	Hématite	(Hersman et al., 1995)

Les biofilms bactériens

Classiquement les bactéries forment un biofilm à la surface des minéraux qui facilite l'altération du minéral (Brookshaw et al., 2012; Gorbushina, 2007), en améliorant le contact entre bactéries et minéraux. Ces biofilms sont des « matrices hétérogènes de micro-organismes maintenus ensemble et étroitement liés à des surfaces sous-jacentes par des exopolysaccharides (EPS) » (Rosenberg, 1989). Ces biofilms peuvent être constitués de bactéries uniquement mais également de racines et d'hyphes de champignons (Singh et al., 2006). C'est un microenvironnement dans lequel des gradients physico-chimiques se créent (pH, teneur en oxygène...) (Flemming and Wingender, 2010) par la production de métabolites, comme les acides organiques et les sidérophores et en raison des contraintes de diffusion qui concourent à la création de ces gradients. Ces modifications physico-chimiques entraînent l'altération des substrats comme les minéraux argileux, les silicates, les phosphates, les carbonates ou les oxy-hydroxydes de fer (Gorbushina, 2007; Grant et al., 2012; Seiffert et al., 2014). Il est cependant difficile de séparer les effets d'une biodégradation physique de ceux d'une biodégradation chimique au sein d'un biofilm.

S'ils sont capables d'altérer les minéraux, les biofilms sont également impliqués dans la bioremédiation des polluants. Les bactéries du biofilm peuvent dégrader les polluants organiques (Edwards and Kjellerup, 2013), et immobiliser les métaux et les radionucléides (Barkay and Schaefer, 2001). En effet, les EPS et les autres biopolymères produits dans les biofilms présentent d'excellentes propriétés de liaison avec les métaux, avec divers degrés de spécificité et d'affinité. Les cations sont liés au biopolymères bactériens par interaction électrostatique avec des groupes fonctionnels chargés négativement tels que les acides uroniques, les groupes phosphoryles associés aux composants de la membrane ou des groupes carboxyliques d'acides aminés. Certains polymères extracellulaires qui entourent les cellules sont également capables de chélater certains métaux et de les lier à la surface cellulaire. Le biofilm a donc un très fort pouvoir d'immobilisation par biosorption des métaux (Gadd, 2001; Pal and Paul, 2008).

2.3.2. Rôle des plantes sur la mobilité du césium

Comme les bactéries, les plantes sont capables de produire des exsudats par leurs racines en réponse à un stress ou une toxicité dans l'environnement proche des racines. Ces exsudats racinaires sont composés d'acides organiques (e.g. acide citrique, oxalique, malate, succinate...) et de phytosidérophores qui, par le même mécanisme que pour ceux des bactéries (voir paragraphe 2.3.1), pourront avoir un effet sur les composants du sol et sur certains métaux (Rajkumar et al., 2010, 2009). En effet, les phytosidérophores ont une forte affinité pour plusieurs métaux (e.g. Cd, Ni, Pb, Sn, AsO₄, AsO₂, Mn, Co, Cu, Fe) et en revanche se lient très faiblement à Al et Cr (Ruggiero et al., 1999). Les études réalisées avec des sols contaminés ou non ont montré que les phytosidérophores sont plus efficaces dans la mobilisation de Fe, Cu, Zn, Ni et Cd du sol que des chélateurs synthétiques ou des sidérophores microbiens

(Awad and Römheld, 2000; G. Singh et al., 2008). De la même façon que pour les sidérophores bactériens, aucun lien n'a encore été montré entre les phytosidérophores et le Cs. Le Cs peut tout de même être prélevé par la plante sous forme de cation présent uniquement dans la solution du sol bien qu'il n'ait aucun rôle nutritif connu pour celle-ci. A trop forte concentration en solution, le Cs peut même devenir toxique pour les plantes en bloquant la nutrition en potassium (Marschner, 2011; White and Broadley, 2000). Aucune différence d'absorption par les plantes n'a encore été montrée entre les différents isotopes du Cs (radioactifs ou non) (Avery, 1996).

ABSORPTION DU CESIUM PAR LES PLANTES

L'étude des mécanismes d'absorption du Cs par les plantes date des années 40 (Collander, 1941) où les voies de transfert du Cs du sol vers les racines des plantes étaient déjà proposées comme étant identiques à celles du potassium. Mais les deux éléments sont encore une fois en compétition. En effet, l'accumulation du Cs dans la plante diminue avec l'augmentation du potassium extracellulaire (Cline and Hungate, 1960; Nishita et al., 1962; Smolders et al., 1996). Des études caractérisant les interactions entre le K, NH_4^+ et le Cs, montrent que l'absorption du Cs par les plantes diminue de façon plus importante en présence de K que de NH_4^+ (Shaw et al., 1992). L'absorption du Cs est également inhibée par les cations divalents ($\text{Ba}^{2+} > \text{Mg}^{2+} \geq \text{Ca}^{2+}$) (Handley and Overstreet, 1961; Smolders et al., 1996).

Le Cs, s'il est présent en forte concentration dans la solution du sol, peut également être toxique pour la plante. La toxicité du Cs, qui peut se traduire par une nécrose des feuilles et des racines des plantes (Cline and Hungate, 1960; Kordan, 1987), est due à sa compétition avec les cations cités ci-dessus (K^+ , NH_4^+ , Ca^{2+}) qui sont des éléments essentiels au bon développement des plantes et plus particulièrement avec le potassium. En effet, plusieurs études ont montré qu'à trop forte concentration, le Cs inhibe l'activité d'enzymes activées par le potassium (Avery, 1996) ainsi que les chaînes principales de transport nutritif du potassium des membranes plasmiques des cellules végétales. Une concentration excessive en Cs dans la rhizosphère pourrait donc induire un manque de potassium dans les plantes. La croissance d'un certain nombre d'espèces végétales, comme le haricot, la tomate, *Arabidopsis* et le riz, sont inhibées pour des concentrations en Cs dans la rhizosphère supérieure à $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Cline and Hungate, 1960; Kordan, 1987; White and Broadley, 2000).

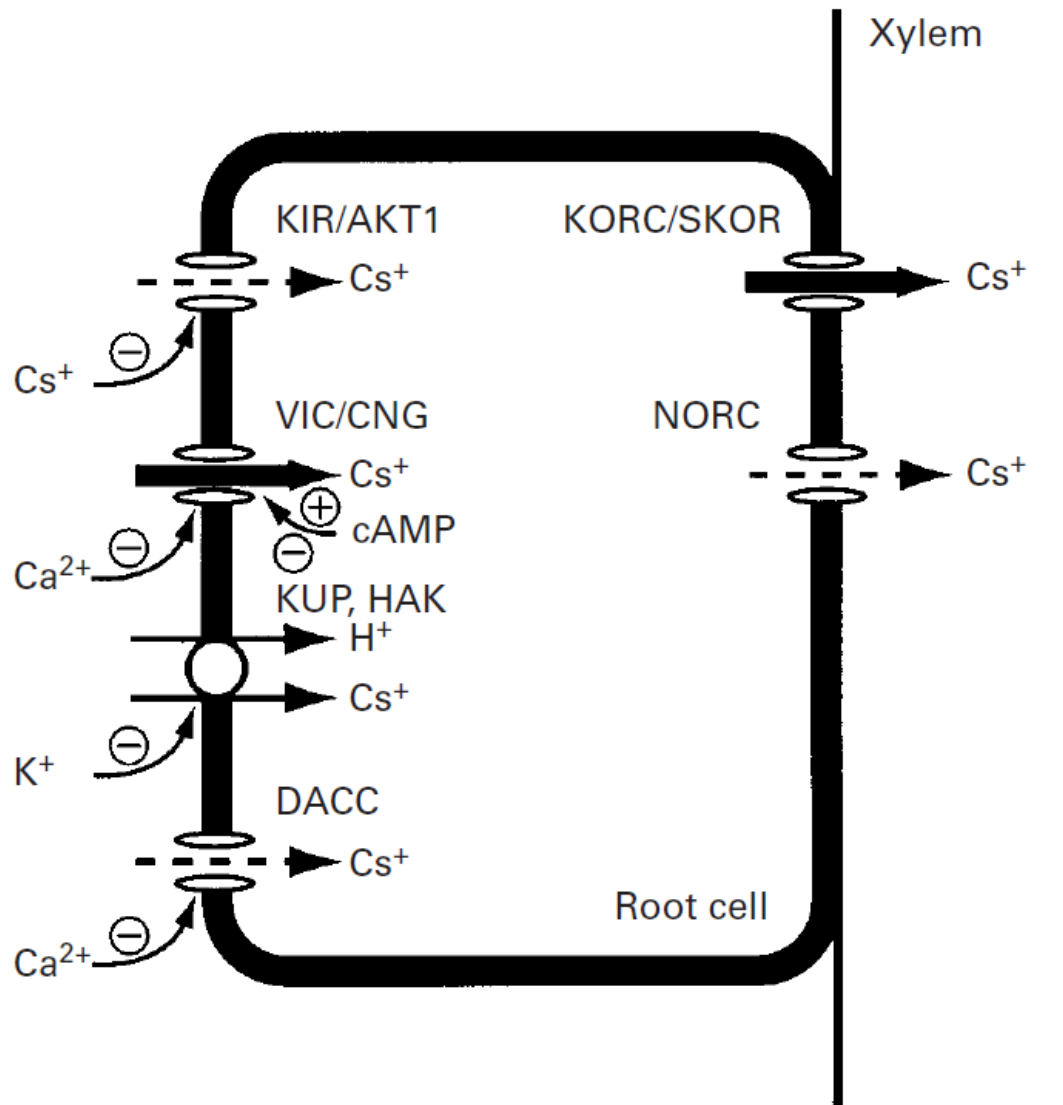


Figure 4 : Schéma des mécanismes de transport du Cs à travers la membrane plasmique des cellules racinaires. La contribution relative de chaque mécanisme réalisée à partir d'un modèle par White et Broadley est matérialisée par la largeur des flèches. L (White and Broadley, 2000)

MECANISMES MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS L'ABSORPTION DU CESIUM PAR LES RACINES

Parmi les nombreuses voies de transfert du potassium du sol vers les cellules racinaires, des études ont montré que le Cs était capable d'en emprunter plusieurs (Figure 4):

- Les canaux VIC (Voltage-insensitive cation) présents dans la membrane plasmique des cellules racinaires des céréales (White, 1999). Cette voie de transport est indépendante de la concentration en Cs en solution mais est inhibée par la présence de Ca^{2+} (White, 2000). La modélisation faite par White and Broadley (2000) et une expérience sur *Arabidopsis* par Broadley et al. (2001) montrent que les canaux VIC sont la principale entrée du Cs dans les cellules racinaires et qu'elle est inhibée par une forte concentration en potassium dans la solution du sol ;
- La famille des transporteurs HAK/KUP (high affinity K^+ transporter) est largement étudiée sur la plante de référence, *Arabidopsis* depuis plusieurs années. Ce symport K^+/H^+ permet au Cs de traverser la membrane racinaire (Alemán et al., 2014; White and Broadley, 2000). Ce transport est également inhibé par une augmentation de la concentration en potassium de la solution du sol (White and Broadley, 2000) ;
- Les canaux KIR (Inward-rectifying potassium) présents dans la membrane plasmique des cellules racinaires, peuvent être codés par plusieurs gènes (AKT1, KAT1, AtKC1 et SKT1) en fonction de la plante (*Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, Tomato) (Dreyer et al., 1997; Lagarde et al., 1996; Nakamura, 1995; Zimmermann et al., 1998). Cette voie de transport du Cs est inhibée lorsque la concentration en potassium est faible et que celle en Cs est forte dans la solution du sol. Par contre, lorsque la concentration en potassium est de l'ordre du milli-molaire dans la solution du sol, ce transport est favorisé (White and Broadley, 2000) ;
- Les canaux perméables au calcium (DACC pour depolarization-activated Ca^{2+} channels) sont également perméables au Cs (White, 1998; White, 2000, 1999, 1997). Ils sont également sensibles à la concentration en Ca^{2+} dans la solution du sol et excluent le Cs dès 1 mM de Ca^{2+} dans la solution du sol. Cette voie de transport n'est pas la voie d'absorption principale du Cs (White and Broadley, 2000).

TRANSLOCATION

Une fois dans la racine, le Cs peut être transloqué vers les parties aériennes en passant dans le xylème de la plante. De la même façon que pour l'absorption, le Cs emprunte les voies de transfert du potassium et principalement les canaux KORC (K^+ -selective outward-rectifying potassium channels) qui sont spécifiques au potassium contrairement au NORC (nonspecific outward-rectifying channels) (Maathuis and Sanders, 1996) (Figure 4).

2.4. Estimation de la spéciation du césium dans le sol

La distribution du Cs dans le sol et sa capacité à être mobilisé peuvent être estimées en laboratoire grâce à des méthodes d'extractions séquentielles. Pour le Cs, il n'y a pas de schémas d'extraction séquentielle unique contrairement aux métaux où les schémas d'extraction séquentielle les plus utilisés sont ceux de Tessier et al. (1979) et du BCR (Bureau Communautaire des Références) (Wang et al., 2003). La méthode BCR se révèle être très peu efficace pour le Cs (Todorov et al., 2008). Les autres schémas d'extraction séquentielle testés sont très proches de celui de Tessier et al. : ils utilisent les mêmes solutions extractantes mais pas nécessairement appliquée dans le même ordre ni dans les mêmes conditions (Forsberg and Strandmark, 2001; Guillén et al., 2015; Knox, 2005; Riise et al., 2005; Todorov et al., 2008). Malgré leurs différences, les procédures d'extractions séquentielles permettent d'estimer la distribution du Cs selon 5 fractions :

- Fraction F1 correspondant au Cs échangeable lié aux particules de sol par des liaisons faibles ;
- Fraction F2 où le Cs est présent sur les carbonates ;
- Fraction F3 correspondant au Cs lié aux oxydes. Les fractions F2 et F3 sont parfois additionnées (Guillén et al., 2015) ;
- Fraction F4 correspondant au Cs lié à la matière organique ;
- Fraction F5 correspondant à la fraction résiduelle.

Concernant la concentration en Cs libre dans la solution du sol que les plantes et les bactéries peuvent immédiatement absorber, appelée la fraction biodisponible, il n'y a pas de consensus quant à l'extractant unique à utiliser pour la quantifier. Les divergences entre auteurs se basent sur l'évolution dans le temps de la mobilité du Cs dans les différentes fractions du sol (Kennedy et al., 1997; Uchida and Tagami, 2007). Certains auteurs utilisent de l'eau (Evans and Dekker, 1969) et d'autres une solution d'acétate d'ammonium comme extractant unique (Forsberg and Strandmark, 2001; Riise et al., 2005; Vinichuk et al., 2005) et font correspondre la fraction biodisponible à la fraction F1 ci-dessus (Matsunaga et al., 2013; Todorov et al., 2008). D'autres suggèrent que la fraction biodisponible de Cs dans le sol correspond à la somme des fractions F1 et F2 ci-dessus (Baeza et al., 2006; Yoshikawa et al., 2014).

3. Dépollution biologique des sols contaminés au césium

3.1. Bioremédiation

La bioremédiation est une méthode de dépollution des sols utilisant les propriétés des microorganismes endogènes ou exogènes du sol contaminé. Cette méthode peu coûteuse (15 à 35 euros par m² (BRGM, 2010)) peut être appliquée *in situ* permettant ainsi de garder le sol en place, un sol excavé devenant juridiquement un déchet. Cette

méthode, considérée comme « douce », permet non seulement de préserver la vie biologique des sols, et par ailleurs de conserver les propriétés agronomiques des sols. La bioremédiation peut être appliquée de différentes manières et est donc divisée en différentes techniques.

3.1.1. Atténuation naturelle

L'atténuation naturelle ou bioatténuation consiste à laisser faire la nature. C'est la forme de bioremédiation la plus simple puisqu'un suivi de l'abattement de la pollution est l'unique intervention de l'Homme. Cette technique valorise les capacités de la microflore indigène du site pollué adaptée aux sols à dépolluer. Les microorganismes, dont les propriétés en dépollution ont été décrites dans le paragraphe 2.3.1. agissent de façon non contrôlée sur la mobilité ou la concentration de polluants dans le sol, les sédiments ou les eaux (EPA, 1997). Pour le Cs, la bioatténuation vise uniquement à diminuer sa mobilité par biosorption ou bioaccumulation. La désintégration radioactive est alors l'unique phénomène permettant une disparition totale de la pollution au Cs.

3.1.2. Biostimulation

La biostimulation consiste à favoriser la croissance et l'activité des microorganismes indigènes, par ajout de nutriments (carbonés et/ou minéraux) et/ou d'accepteurs finaux d'électrons (oxygène, fer ferrique, nitrate, sulfate) dans le site pollué. La biostimulation peut être utilisée aussi bien *in situ* qu'*ex situ* et concerne des bactéries aérobies et anaérobies selon la pollution à traiter (Bhandari et al., 2007). Cependant, cette technique ne permet pas de prédire à l'avance quelles seront les populations qui bénéficieront de l'ajout de nutriments.

3.1.3. Bioaugmentation

La bioaugmentation est utilisée depuis plus de deux siècles en agriculture par l'inoculation des légumineuses par *Rhizobium*, mais cela fait moins de 30 ans qu'elle est employée en remédiation (Portier et al., 1989; Singer et al., 2005). La bioaugmentation est caractérisée par l'ajout de microorganismes d'intérêt dans le sol afin de stimuler la dégradation des polluants organiques et d'agir sur la spéciation des polluants métalliques. Les microorganismes employés peuvent être sélectionnés à partir d'échantillons environnementaux (sols, sédiments, boues, etc.) et sont ensuite cultivés en masse et inoculés dans leur environnement d'origine ou dans un autre environnement (Jacques et al., 2008; Joshi et al., 2008; Kumar et al., 2008). Les principaux facteurs limitants sont la température (entre 5 et 30°C), le pH (entre 5 et 8), l'humidité, la quantité d'oxygène, la disponibilité de nutriments et notamment la quantité de matière organique et la compétition avec les microorganismes indigènes (Tableau 4) (Lebeau, 2011). Ainsi pour faciliter la survie et la colonisation des microorganismes inoculés, des nutriments peuvent être ajoutés au moment de l'inoculation, et la méthode d'inoculation des microorganismes doit être sélectionnée en fonction de la pollution et du type de sol. L'inoculum, composé d'une seule espèce bactérienne ou d'un consortium bactérien, peut être ajouté au sol directement, dans la rhizosphère ou encapsulé dans une matrice (Gentry et al., 2004). Des organismes

génétiquement modifiés peuvent également être utilisés mais leur inoculation fait l'objet de contrôles plus poussés (Gentry et al., 2004; Venkata Mohan et al., 2009).

Tableau 4 : Avantages et inconvénients de la bioaugmentation (Lebeau, 2011)

Avantage
• Application <i>in situ</i> • Possibilité d'inoculer une espèce unique ou un consortium bactérien • Applicable à des multipollutions • Ne modifie pas la structure du sol • Peut minéraliser les polluants organiques • Peut mobiliser les polluants inorganiques • Peu de déchets • Faible coût
Inconvénient
• Certaines conditions géochimiques inhibitrices (température, pH, humidité) • Peut modifier l'équilibre microbien du sol • Présence possible d'un co-contaminant inhibiteur • Taux de réussite variable

3.1.4. Bioremédiation appliquée au césium

Pour les sites contaminés au Cs, la bioremédiation est principalement basée sur les interactions microorganismes-Cs (voir paragraphes 2.3). Les principales réactions mises en jeu sont i) l'immobilisation par biosorption ou bioaccumulation afin de stabiliser le Cs et éviter sa propagation dans les produits agricoles ou dans les poissons, évitant ainsi de contaminer la chaîne alimentaire et ii) la mobilisation du Cs par désorption indirecte via les métabolites bactériens afin de favoriser sa récupération et notamment son absorption par la plante.

3.2. *Phytoremédiation*

La phytoremédiation est une technique peu coûteuse et écologique proposée en 1983 par Chaney pour dépolluer l'environnement. L'EPA (2001) définit la phytoremédiation comme étant « l'utilisation de plantes pour dépolluer des sols, des boues, des sédiments, des eaux souterraines, des eaux de surfaces ou des eaux usées contaminées par des polluants ». La croissance et la survie de la plante dans les milieux contaminés sont les principaux facteurs d'efficacité de la phytoremédiation. En effet, le choix de la plante utilisée pour la phytoremédiation s'opère sur la base de différents critères. Elle doit avoir une croissance rapide, une grande tolérance aux polluants étudiés, être résistante aux parasites et maladies, avoir des parties aériennes et des racinaires denses (Couselo et al., 2012). Dans le cas d'un site multi contaminé, c'est-à-dire en présence de plusieurs polluants, la plante choisie ne doit pas être spécifique d'un polluant mais du plus grand nombre possible à mobiliser simultanément (Miretzky et al., 2004).

La phytoremédiation regroupe différentes techniques qui conduisent à la dégradation, la suppression (par accumulation ou dissipation), ou à l'immobilisation des polluants (Tableau 5).

Tableau 5 : Caractéristiques des différentes techniques utilisées en phytoremédiation

	Rhizofiltration	Phytostabilisation	Phytoextraction	Phytovolatilisation	Phytodégradation
Mécanismes	Accumulation, adsorption, précipitation dans les racines	Complexation, adsorption, précipitation dans les racines	Accumulation et hyperaccumulation par translocation dans les parties aériennes	Volatilisation par évapotranspiration	Dégradation rhizosphérique
Type de polluant	Organique/Inorganique	Organique/Inorganique	Surtout inorganique	Organique/inorganique (As, Hg, Se)	Organique (solvants chlorés, herbicides) Eaux, sols, sédiments, boues
Substrats traités	Milieux aqueux	Sols, sédiments, boues	Eaux, sols, sédiments, boues	Sols, sédiments, boues	
Exemples de plantes utilisées	<i>H. annuus</i> , <i>B. juncea</i> , <i>N. tabacum</i> , <i>Zea mays</i>	Plantes exclusives (Agrostis tenuis ; Brachiaria decumbens)	Hyperaccumulatrices ou accumulatrices à forte biomasse	Pteris vittata pour l'As Plantes modifiées génétiquement	Tout type de plante hébergeant des rhizobactéries
Avantages	Utilisation <i>in situ</i> et ex situ	Limite le risque de lixiviation et d'érosion Solution rapide	Utilisation <i>in situ</i> Adaptée aux pollutions diffuses	Dilution de la pollution dans l'air Pas de traitement des déchets végétaux	Pas de traitement des déchets végétaux
Inconvénients	Dépend du système racinaire	Dépend du système racinaire N'élimine pas le polluant du sol	Dépend du système racinaire Retraitement des déchets produits	Risque d'exposition atmosphérique non quantifié Utilisation d'OGM	Limité à des polluants facilement dégradables Dépend des rhizobactéries associées
Références	Duschenkov <i>et al.</i> , 1995 ; Raskin et Ensley, 2000 ; Susarla <i>et al.</i> , 2002 ; Lee et Yang, 2010	Cunningham et Berti, 2000 ; Susarla <i>et al.</i> , 2002 ; Andreazza <i>et al.</i> , 2013	Salt <i>et al.</i> , 1995 ; Baker et Brooks, 1989	Bañuelos, 2000 ; Sharma <i>et al.</i> , 2015	Black, 1995

3.2.1. Phytoextraction

La phytoextraction représente la seule technique d'extraction *in situ* des polluants inorganiques et comporte de nombreux avantages, notamment pour le traitement des pollutions diffuses (Tableau 6). Le polluant est prélevé par les racines de la plante pour ensuite être plus ou moins transloqué – plus ou moins efficacement selon la plante – vers les parties aériennes. La concentration en polluants dans la plante rapportée à celle mesurée dans les sols définit le facteur de bioaccumulation ou de bioconcentration (FBC). La concentration en polluant dans les parties aériennes rapportée à celle des racines correspond au facteur de translocation (FT). Ces deux rapports permettent, respectivement, de déterminer la capacité d'une plante à absorber les métaux et sa capacité à les transloquer vers les parties aériennes (Dahmani-Muller et al., 2000). Certaines plantes ont la capacité naturelle et exceptionnelle d'accumuler de grandes quantités de polluants et de les transloquer vers les parties aériennes. Ce sont les plantes dites hyperaccumulatrices. Une de leurs caractéristiques est de posséder un FT supérieur à 1 et une teneur minimum en polluant dans les parties aériennes. Cependant cette valeur minimum n'est définie que pour certains polluants comme l'arsenic ($1000 \mu\text{g.g}^{-1}$), cadmium ($100 \mu\text{g.g}^{-1}$), chrome ($1000 \mu\text{g.g}^{-1}$), cobalt ($1000 \mu\text{g.g}^{-1}$), cuivre ($1000 \mu\text{g.g}^{-1}$), mercure ($10 \mu\text{g.g}^{-1}$), nickel ($1000 \mu\text{g.g}^{-1}$), plomb ($1000 \mu\text{g.g}^{-1}$), manganèse ($10000 \mu\text{g.g}^{-1}$), sélénium ($1000 \mu\text{g.g}^{-1}$) et zinc ($10000 \mu\text{g.g}^{-1}$). Elles résistent aux polluants et certaines plantes hyperaccumulatrices ont également une croissance rapide, un système racinaire développé et une aptitude à produire beaucoup de biomasse. Ce type de plantes a été testé sur des sols très pollués et ne sont pas forcément les plus intéressantes pour des pollutions diffuses. Si toutefois, il n'existe pas de plantes hyperaccumulatrices pour un polluant donné, d'autres approches ont été développées comme l'utilisation de plante à forte biomasse où l'efficacité du prélèvement des polluants peut être augmentée par ajout de chélateur ou de bactéries (voir paragraphe 3.3.) ou encore l'utilisation d'arbre à croissance rapide comme le peuplier.

3.2.2. Phytoextraction appliquée au césium

Plusieurs équipes ont travaillé sur la phytoextraction du Cs sur plus de 200 espèces différentes et Zhu and Shaw (2000) en concluent que les plantes de la famille des *Chenopodiaceae* sont les plus accumulatrices. Après une synthèse bibliographique sur la phytoremédiation du Cs (Tableau 7), aucune plante hyperaccumulatrice de Cs n'a été mise en évidence, mais une plante dont la biomasse et l'accumulation du Cs dans les parties aériennes sont plus importantes que pour d'autres plantes est le trèfle violet, *Trifolium pratense* (Takeda et al., 2013; Veresoglou et al., 1995; Wu et al., 2009). Il s'avère par ailleurs que c'est une plante cultivée à grande échelle pour l'alimentation du bétail, dont l'itinéraire technique cultural est bien connu, et dont les semences sont disponibles en grande quantité, élément important en phytoextraction. En effet, alors que de nombreuses plantes sont testées avec succès en phytoextraction, aucune semence n'est à ce jour disponible sur le marché, les expérimentations se limitant à l'échelle du laboratoire ou d'essai réalisés à micro-échelle.

Tableau 6 : Avantages et inconvénients de la phytoremédiation (Cunningham et al., 1995; Henry, 2000)

Avantages
• Utilisé pour une grande diversité de polluants organiques (la plante absorbe les polluants préalablement dégradés par les rhizobactéries) /inorganiques (la plante absorbe les polluants) • Application <i>in situ/ex situ</i> • Technique « douce » ne perturbant pas le sol contrairement aux techniques physico-chimiques conventionnelles • Diminution de la dispersion des polluants dans l'eau (lixiviation) et l'air • Méthode peu coûteuse en moyens humain et matériel (25 à 35 euros par m²)(BRGM, 2010) • Méthode facile à mettre en œuvre • Méthode écologiquement adaptée et esthétique (dépollution associée à des aménagements paysagers) • Limite l'érosion, maintien ou améliore la structure des sols • Impact positif sur la fertilité et la biodiversité des sols • Méthode adaptée aux pollutions diffuses
Inconvénients
• Méthode restreinte à des sites pollués peu profonds (profondeur limitée à 1 m pour les plantes herbacées ; quelques mètres pour les arbres) • Durée de remédiation longue (parfois plusieurs dizaines d'années) • Méthode restreinte aux sites faiblement contaminés • Traitement des déchets potentiellement dangereux lorsqu'il s'agit de radioactivité • Efficacité variable selon les conditions climatiques • Méthode risquant d'affecter la biodiversité en introduisant des espèces invasives et/ou exotiques • Risque de consommation de plantes contaminées par les animaux d'élevage et/ou sauvages

Tableau 7 : Synthèse bibliographique des études de phytoremédiation du césium

Plantes	Conditions de culture	Temps de culture	Isotope du Cs	Concentration initiale en Cs	[Cs] aérienne	[Cs] racines	FB	Références
Quinoa Chenopodium quinoa	Pot de sol	6h	CsCl + ¹³⁴ Cs	500 µmol/L CsCl 370 kBq/L	4 nmol/g		0,3	(Broadley and Willey, 1997)
	Pot de sol	11 semaines	¹³⁷ Cs	41,5 à 0,5 kBq/kg	800 Bq/pot		0,1 à 0,7	(Vinichuk et al., 2005)
Blé Triticum aestivum	Pot de sol	16 jours	¹³⁷ Cs	1000 kBq	/	/	0,1	(Smolders and Shaw, 1995)
Maïs Zea mays L	Pot de sol	3 semaines	CsCl (¹³⁷ Cs)	300 µmol/L (40 kBq)	/	/	/	(Bystrzejewska-piotrowska, 2004; Carver et al., 2007)
	Pot sédiment + différent % argile		¹³⁷ Cs	/		700 kBq/kg	5 ; 6	
Herbe à éléphant Pennisetum purpureum,	Hydroponique	7 semaines	CsCl	50, 150, 300, 1000, 3000 µmol/L	/	14400 mg/kg	1 ; 1,4	(Kang et al., 2012)
Orge Hordeum vulgare	Hydroponique	12 à 14 jours	¹³⁷ Cs	10 µC/L	/	/	/	(Middleton et al., 1960)
Tournesol Helianthus annuus	Pot de sol acide	8 semaines puis 120 jours	¹³⁴ Cs	650 kBq	70000 Bq/kg		/	(Massas et al., 2010)
			¹³⁷ Cs	4100 kBq/L			0,4	
Haricot Phaseolus vulgaris	Contamination des feuilles dans solution contaminée		¹³⁷ Cs				/	(Nishita et al., 1962)
	Pot de sol		¹³⁷ Cs	/			0,041	(Henner et al., 2005)
Soja Glycine	Pot de sol	3 mois	¹³⁷ Cs		62 kBq	/	15	(Carver et al., 2007)
	Pot de sol	8 semaines	¹³⁴ Cs	1983 Bq/kg 650 kBq	30000 Bq/kg		2	(Goncharova, 2009)
			¹³⁷ Cs				3	

Pot de sédiment + argile				/	/				(Massas et al., 2010)
Avoine <i>Avena sativa</i>	Pot de sol	4-8-16 semaines	137Cs	1983 Bq/kg	46 kBq	/	23		(Goncharova, 2009)
Pois <i>Pisum sativum</i>	Pot de sol		137Cs	1983 Bq/kg	34kBq	/	4.5		(Goncharova, 2009)
Radis <i>Raphanus sativus</i>	Pot de sol	60 jours 8 semaines	CsCl	0 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 ; 40 mg/kg	Jsq 43 μG/g	Jsq 108 μg/g	0,6		(Wang et al., 2012)
	Pot de sol acide	puis 90 jours	134Cs	0,65 MBq	10000 Bq/kg	/	0,5		(Massas et al., 2010)
Vétiver (Graminée)	In vitro	7 jours	137Cs	5×103 kBq/L	200 kBq/g	350 kBq/g	/		(S. Singh et al., 2008)
Herbe du Laos <i>Chromolaena odorata</i>	Hydroponique	15 jours	137Cs	7,5×104 Bq/L 1×103 kBq/L ; 5×103 kBq/L ; 10×103 kBq/L	Jsq 962 kBq/g	Jsq 615 kBq/g	0,51 et 0,89		(Singh et al., 2009)
Oignons <i>Allium cepa</i>	Hydroponique	48heures	CsCl (137Cs)	300 μmol/L (6 kBq/mL)	30 Bq/plant	55 Bq/plant	/		(Bystrzejewska-Piotrowska and Urban, 2004)
Famille des Apocinaceae <i>Catharanthus roseus</i>	In vitro	15 jours	137Cs	3,7×104 kBq/L	1000 kBq/g	750 kBq/g	0,05		(Fulekar et al., 2010)
<i>Panicum maximum</i> (graminée)	Pot de sol	3 semaines	CsCl (137Cs)	300 μmol/L (40 kBq)	Jsq 200 kBq/g	Jsq 200 kBq/g	1.3 fois plus dans les feuilles que les racines		(Bystrzejewska-piotrowska, 2004)
<i>Sorghum vulgare</i> (herbacée)	Pot de sol	47 jours	CsCl	0 ; 300 ; 1500 ; 3000 mg/kg	Jsq 15000 mg/kg	Jsq 8000 mg/kg DW	6,9		(Wu et al., 2009)
Trèfle violet <i>Trifolium pratense</i>	Pot de sol	47 jours	CsCl	0 ; 300 ; 1500 mg/kg	9000 mg/kg	11000 mg/kg	8,7		(Wu et al., 2009)
	Pot de sol	7 mois	CsCl	250 μg/g et 535 μg/g	6012 et 1932 μg/g	/	11,2 et 7,7		(Veresoglou et al., 1995)
	Pot de sol	28 jours	CsCl	2,2 mg/kg	/	/	0,23		(Takeda et al., 2013)

Bruyère Calluna Vulgaris Tomate Lycopersicon Esculentum PS 1296 Calotropis gigantea Arabidopsis thaliana	Pot de sol	36 jours	CsCl	30 µM (10 kBq) et 300 µM (17,5 kBq)	0,0256 mg/g	0,0064 mg/g	0,6	(Bystrzejewska- Piotrowska et al., 2005)
	Pot de sol	2 mois	134Cs	101,2 kBq/plant	/	/	Fruit/sol : 1,2 et 2,8 Bq/kg	(Brambilla et al., 2002)
	Hydroponique	7 jours	137Cs	5×103 kBq/L	150 kBq/g	250 kBq/g		(Eapen et al., 2006)
	Hydroponique	10 jours	CsCl	0,01; 0,1; 0,3; 0,7; and 1,0 mmol/L	/	/	Entre 11,8 et 22,2	(Kanter et al., 2010)
Amaranthus chlorostachys	Hydroponique	15 jours	CsCl	0,47 ; 1,58 ; 3,95 mg/L	250 ; 1150 ; 2200 mg/kg	300 ; 400 ; 450 mg/kg	/	(Moogouei et al., 2011)
Chenopodium album	Hydroponique	15 jours	CsCl	0,47 ; 1,58 ; 3,95 mg/L	200 ; 300 ; 1000 mg/kg	300 ; 250 ; 200 mg/kg	/	(Moogouei et al., 2011)
Calendula alata	Hydroponique	15 jours	CsCl	0,47 ; 1,58 ; 3,95 mg/L	100 ; 400 ; 11000 mg/kg	50 ; 350 mg/kg	/	(Moogouei et al., 2011)
	Hydroponique		CsCl	0,6; 2 et 5 mg/L	mg/kg /	/	/	(Borghei et al., 2011)
Hyacinth Eichhornia crassipes	Hydroponique	100h	137Cs	127 MBq/ml	1152 Bq/g	19751 Bq/g	69 (L/kg)	(Saleh, 2012)

3.3. *Phytoextraction améliorée*

L'inconvénient majeur de la phytoextraction est la lenteur du processus, en raison d'une quantité de polluant mobilisable par la plante à un instant donné inférieure à ce que pourrait prélever la plante. Afin de réduire ces durées de dépollution en augmentant le « pool » de polluants absorbables, des molécules peuvent être ajoutées de façon à augmenter la mobilité des polluants dans les sols et donc leur concentration dans la plante. Ces molécules peuvent être synthétiques, c'est la phytoextraction améliorée chimiquement - mais sont souvent toxiques (exemple : EDTA) ou dégradées rapidement par la microflore du sol (exemple : EDDS, DTPA) - ou naturelles (produites notamment par les microorganismes). Dans ce second cas, c'est ce que l'on appelle la phytoextraction associée à la bioaugmentation – les microorganismes sont inoculés dans le sol.

3.3.1. *Phytoextraction associée chimiquement*

Les molécules synthétiques utilisées en phytoremédiation permettent d'augmenter la mobilité des polluants et leur absorption par la plante en diminuant le pH du sol et/ou en complexant les polluants dans la rhizosphère (Sharma et al., 2014). Les molécules organiques utilisées sont par exemple l'EDTA (acide d'éthylène-diamine-tétra-acétique) et ses dérivés (*e.g.* l'HEDTA (acide N-(2-hydroxyéthyle)-éthylène-diamine-tri-acétique), l'EDDHA (acide d'éthylène-diamine-N,N'-bis(2-hydroxyphenyl)-acétique)) ou un chélateur synthétique biodégradable, le DTPA (acide diéthylène-triamine-penta-acétique). Ces complexants sont généralement utilisés pour dépolluer des sols contaminés par des métaux. Ils augmentent leur solubilité dans les sols, facilitent leur diffusion dans la rhizosphère (Blaylock et al., 1997), augmentent le facteur de bioaccumulation (FB) et augmentent la translocation vers les feuilles (FT) (Barren, 2012).

La phytoextraction améliorée chimiquement par ajout d'EDTA, d'acide citrique ou d'acide ascorbique sur un sol contaminé au Cs a été étudiée par Fuhrmann and Lanzirrotti, (2005). Contrairement au fer dont une partie a été solubilisée, ces auteurs ont montré que pour le Cs, ces 3 complexants n'ont aucun effet sur l'accumulation du Cs par le tabac. La constante de complexation de l'EDTA avec le Cs est très faible ($10^{1,05}$) (Reinoso-Maset et al., 2013), contrairement à celle de nombreux métaux, ce qui explique ce résultat. Ces complexant peuvent cependant exercer un rôle sur les minéraux contenant le Cs (*e.g.* par complexation du fer des minéraux du sol) et rendre le Cs disponible indirectement de la même façon que les métabolites bactériens et les exsudats racinaires (voir paragraphe 2.3).

L'utilisation des chélateurs chimiques peut cependant avoir des effets négatifs. En effet, l'accumulation excessive de métal favorisée par l'ajout de ces agents chélateurs peut causer une toxicité pour la plante et modifier les voies d'absorption (Briat and Lebrun, 1999; Grčman et al., 2001; Williams et al., 2000). Ces molécules peuvent également dans certains cas diminuer la translocation et diminuer la croissance de la plante (Chen and Cutright, 2001;

Nascimento and Xing, 2006). L'étude de Grčman et al. (2001) montre notamment que l'ajout d'EDTA sur des plants de trřfles entraine la nćcrose des feuilles et diminue donc la biomasse des parties aćriennes du trřfle violet.

Des effets nćgatifs ont ęgalement ętę mis en ęvidence sur l'abondance et l'activitę des microorganismes et des nęmatodes du sol (Bouwman et al., 2005; Lee and Sung, 2014; Rřmkens et al., 2002). D'autres ętudes ont montrę un impact nęgatif de l'EDTA sur les activitęs enzymatiques du sol et sur le nombre total de bactęries (Grčman et al., 2001), en particulier les *Pseudomonas* sp. et des bactęries dęnitrifiantes (Galimska-Stypa *et al.* 2000).

Enfin, la dęgradabilitę de l'EDTA est trřs lente. Elle peut prendre plusieurs mois aprřs l'ajout du complexant dans le sol (Lombi et al., 2001). Afin d'ęviter ces effets nęgatifs sur la physiologie de la plante et la qualitę du sol, l'utilisation d'acides organiques apparaęt plus judicieuse en raison de leur moindre toxicitę et parce qu'ils sont plus facilement assimilables par la plante (Doumett et al., 2008). Ils ne sont malheureusement pas d'aussi bons extractants que l'EDTA ou le NTA (Lee and Sung, 2014; Meers et al., 2004) et peuvent ęgalement ętre toxiques pour la plante ę forte dose.

3.3.2. *Phytoextraction associęe ę la bioaugmentation*

Une alternative ę la phytoextraction associęe chimiquement qui peut ętre toxique pour l'environnement consiste ę optimiser la synergie qui existe entre les bactęries et les plantes (Glick, 2003) par couplage de la phytoextraction ę la bioaugmentation de sol (Kuiper et al., 2004). La bioaugmentation est l'ajout contrřlę de microorganismes pręalablement sęlectionnęs (issus ou non du sol ę bioaugmenter) dans cet ęcosystęme et vise ę optimiser la croissance vęgętale et/ou la mobilisation des polluants du sol par la plante ce qui permet d'augmenter les performances de phytoextraction (en termes de quantitę et/ou concentration en mętaux dans les parties ręcoltables). On donne aussi le nom de rhizoremędiation ę cette technique de dępollution puisqu'elle implique les microorganismes de la rhizosphęre (dęfinition ci-dessous).

FONCTIONNEMENT DE LA RHIZOSPHERE

La rhizosphęre a ętę dęfinie pour la premięre fois en 1904 par Hiltner comme ętant la zone du sol sous influence biologique et biochimique des racines et ętant habitęe par une population de microorganismes influencęe par les substances chimiques libęręes par les racines des plantes. Elle correspond ę une zone de quelques micromętres autour de chaque racine, dans laquelle existent des gradients chimiques, physiques et biologiques qui varient horizontalement et verticalement autour de la racine (McNear, 2013). Le volume de sol occupę par la rhizosphęre varie en fonction de la nature du sol et des paramętres physico-chimiques associęs, des propriętęs du systęme racinaire et des conditions climatiques (Lombi et al., 2001).

INTERACTION BACTERIES/PLANTES

Les exsudats racinaires des plantes affectent significativement la croissance de la microflore rhizosphérique et inversement, la microflore peut influencer la croissance des plantes. Au sein de la rhizosphère, certains microorganismes comme les AMF (arbuscular mycorrhizal fungi) et les bactéries rhizosphériques - ou rhizobactéries - peuvent effectivement interagir avec la plante de façon symbiotique ou par mutualisme. Ces interrelations sont basées sur des échanges : la plante fournit notamment des substances carbonées et une protection physique aux microorganismes et les microorganismes fournissent un apport en eau et en sels minéraux aux plantes.

Les bactéries associées aux racines peuvent agir fortement sur la nutrition de la plante grâce à de nombreux mécanismes impliqués dans les relations mutualistes ; tel est le cas des PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). De nombreux genres dont *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes* (*Ralstonia*), *Bacillus*, *Bulkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* et *Serratia* sont recensés (Höflich et al., 1994; O'Sullivan and O'Gara, 1992). Elles colonisent les racines grâce à la production de composés tels que les protéines membranaires, les parois polysaccharidiques, les lipopolysaccharides (LPS), l'agglutinine et les exopolysaccharides (EPS) (Amellal et al., 1999). Les rhizobactéries peuvent stimuler la croissance de la plante grâce à la production de différents types de molécules. En effet, ces bactéries produisent des enzymes comme la l-amino-cyclopropane-1-carboxylate désaminase (ACC) qui dégrade l'ACC, précurseur de l'éthylène connu comme molécule de stress pour la plante. Cette dégradation permet donc de ne pas réduire voire d'augmenter la biomasse de la plante (Glick et al., 1998; Glick, 2003). Des phytohormones comme l'acide indolacétique (AIA), de la famille des auxines, sont également synthétisées par les rhizobactéries et permettent la croissance et l'allongement des racines ainsi que la division cellulaire (Salisbury, 1994; Barazani and Friedman, 1999). En petite quantité, l'AIA régule les processus intracellulaires et modifie la physiologie des plantes (Pazurkiewicz-Kocot et al., 2003). La sécrétion d'autres phytohormones comme les gibberellines permet la croissance des tissus aériens, principalement au niveau de la tige (Gutierrez-Manero et al., 2001). Les sidérophores produits par les bactéries (voir paragraphe 2.3.1) influencent également dans certains cas la croissance de la plante par apport de fer (Glick, 2010) et sa capacité à extraire des métaux du sol (Braud et al., 2009b; Glick, 2010; Rajkumar et al., 2012).

Les plantes quant à elle jouent un rôle capital dans la croissance des bactéries rhizosphériques et sur la biodisponibilité des métaux et des nutriments. Les exsudats racinaires tels que les acides organiques et les phytosidérophores ont un effet sur les microorganismes environnants. En effet, la diversité microbienne de la rhizosphère est gouvernée par la quantité et la qualité des exsudats racinaires sécrétés par les racines (Steenwerth et al., 2008; Upchurch et al., 2008) et dont la composition varie selon l'espèce, l'état physiologique (Marschner et al., 2001) et le génotype de la plante (Oliveira et al., 2009). Les exsudats racinaires augmentent également la mobilité des métaux (Haydon and Cobbett, 2007; Jones, 1998; Zeng et al., 2008). L'exsudation racinaire peut être

influencée par différents facteurs externes que sont la lumière, la température, l'aération, la teneur en eau, la nutrition minérale et la nature du substrat (Badri and Vivanco, 2009; Huang et al., 2014; Lespinat and Berlier, 1975).

PERFORMANCES DE LA PHYTOEXTRACTION ASSOCIEE A LA BIOAUGMENTATION

Cette association bactéries/plantes est alors utilisée pour augmenter les performances de phytoextraction. L'absorption des polluants et notamment des métaux par les plantes peut alors être améliorée par deux moyens complémentaires: i) l'augmentation de la mobilité des métaux dans des matrices poreuses (sol et sédiments), aboutissant à des concentrations de métaux plus élevées dans les plantes, grâce à la bioaugmentation par des microorganismes produisant des tensioactifs (Hersman et al., 1995; Mulligan et al., 2001, 1999), des sidérophores (Diels et al., 1999; Dubbin and Ander, 2003), et des acides organiques (voir paragraphe 2.3.1), et/ou ii) l'augmentation de la biomasse végétale en associant les plantes avec des PGPR (Zhuang et al., 2007) et/ou champignons mycorhiziens arbusculaires (AMF) (paragraphe 3.3.2) (Khan, 2006). La phytoextraction associée à la bioaugmentation a fait l'objet de quelques synthèses (Glick, 2010; Lebeau et al., 2008; Sessitsch et al., 2013) pour des sols contaminés par des métaux et métalloïdes comme As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, U and Zn. Ces études ont permis de confirmer, dans un certain nombre de cas, les performances de cette technique par l'augmentation de la biomasse de la plante et/ou de la quantité et la concentration de métal extrait par la plante. On notera cependant des contre-exemples pour lesquels les explications ne sont pas évidentes en raison de la complexité des systèmes étudiés (interrelations sol-métaux-microorganismes indigènes et ajoutés-plante) (Sessitsch et al., 2013).

A la place des bactéries, des chélateurs d'origine microbienne moins toxiques que les chélateurs chimiques et plus biodégradables comme le NTA (acide nitrilo-tri-acétique) ou encore des acides organiques (acide citrique) ou la pyoverdine purifiée à partir de culture de *Pseudomonas* peuvent également être ajoutés au sol afin d'améliorer les performances de phytoextraction de métaux ou métalloïdes (Cornu et al., 2014; C. Ferret et al., 2014a; Jagetiya and Sharma, 2013; Xie et al., 2015).

3.3.3. La phytoextraction associée à la bioaugmentation de sols contaminée au césium

D'un point de vue biogéochimique, le devenir du Cs dans la rhizosphère est influencé essentiellement par les changements de la composition minéralogique du sol. Les plantes et les microorganismes de la rhizosphère sont les principaux acteurs de ce changement (Figure 5). L'excrétion de composés organiques et de sidérophores plus importante dans la rhizosphère (Lombi et al., 2001; Sokolova, 2011) et d'ions H^+ provoquent en effet l'altération des minéraux du sol (Jones and Kochian, 1996). Cette altération entraîne alors la libération du Cs dans la solution du sol et le rend phytodisponible (Wendling et al., 2005b). L'efficacité du transfert sol-plantes du Cs varie donc en fonction de la composition du sol et notamment du pourcentage d'argile et de matière organique, de la plante utilisée et des exsudats racinaires produits ainsi que des rhizobactéries.

Chapitre 2 :

Matériel et méthodes

1. Composition et préparation des substrats dopés en césium

1.1. Préparation et dopage de l'illite

L'argile utilisée pour cette étude est l'illite du Puy : $[(\text{Si}_{3.52}\text{Al}_{0.48})\text{O}_{10}(\text{OH})_2]\text{Z}(\text{Al}_{1.17}\text{Fe}_{0.49}\text{Mg}_{0.33})(\text{Ca}_{0.04}\text{Na}_{0.12}\text{K}_{0.64})$ purifiée par le BRGM. Elle a été caractérisée dans les travaux de Poinssot et al. (1999) et analysée par ICP-MS-HR Element XR Thermo scientifique avant d'être utilisée.

Dans un premier temps, une suspension stock est préparée selon le protocole REC.BEN1.P.02 Subatech.

1.1.1. Solution stock d'illite stérile (10 g.L⁻¹)

Une suspension d'illite purifiée à 10 g.L⁻¹ dans 1 mM de NaCl est mise à agiter 24h (200 rpm) puis les deux phases sont séparées par centrifugation (7690 g pendant 15 minutes). La phase liquide est éliminée et la suspension reconstituée par ajout de NaCl (1 mM) stérile afin de conserver la concentration de 10 g d'illite.L⁻¹.

Cette suspension est ensuite stérilisée par tyndallisation afin de préserver la structure cristalline de l'illite. La tyndallisation consiste en 3 cycles de chauffage à 70°C pendant 1 heure séparés par 24 heures de refroidissement à température ambiante.

Un étalement de 100 µL de la suspension sur un milieu TSB (tryptic soy broth) solide à 15 g.L⁻¹ est réalisé à la fin des trois stérilisations afin de vérifier la stérilité de la suspension.

1.1.2. Dopage de l'illite en césium

La suspension stock d'illite stérile est divisée en deux suspension dopées ensuite à partir d'une solution de CsCl (100 mM) stérile afin d'obtenir 10 et 100 mmol de Cs par kg d'illite. Les suspensions dopées sont agitées énergiquement (vortex) puis à 200 rpm pendant 48h. Ensuite les suspensions sont centrifugées 15 minutes à 7690 g. Le surnageant est stocké afin d'être analysé par ICP-MS XSERIES 2 Thermofisher pour mesurer la quantité de Cs non sorbé. La suspension d'illite (10 g.L⁻¹) est ensuite reconstituée par ajout de NaCl (1 mM).

1.2. Préparation et dopage du sol

Le sol utilisé pour cette étude a été prélevé sur le site des Closeaux de l'INRA de Versailles. C'est un Néo-Luvisol développé sur des dépôts de Loess (voir sa composition sur les Tableau 8 et Tableau 9). Le sol est tamisé à 2 mm et conservé à l'obscurité.

Tableau 8 : Récapitulatif des caractéristiques des 25 premiers centimètres du sol des Closeaux de l'INRA de Versailles. Les données granulométriques ainsi que la concentration en matière organique, carbone organique, rapport C/N et CEC proviennent de Hubert et al., (2009) et Moni et al., (2010). Les autres analyses chimiques sont décrites dans les paragraphes 1.2.1., 1.2.2., 1.2.4. et 4.3.1.

Sol des Closeaux	
Type de sol	Limon argilo-sableux
Granulométrie	
% argile	18
% limons fins	22
% limons grossiers	35
% sable	26
Analyse chimiques	
Matière organique (g.kg ⁻¹ de sol)	
Carbone organique (g.kg ⁻¹ de sol)	16,1
pH eau (±0.02)	5.7
CEC (cmol.kg ⁻¹ de sol)	11,2
HR (%)	14,3
CR (%)	53,8
Cs natif (μmol.kg ⁻¹)	13
Cations échangeables	
Potassium (cmol.kg ⁻¹)	0,57
Magnésium (cmol.kg ⁻¹)	0,90
Calcium (cmol.kg ⁻¹)	9,73
Sodium (cmol.kg ⁻¹)	0,03

Tableau 9 : Proportion des différents types d'argiles dans la fraction granulométrique <2μm des 25 premiers centimètres du sol des Closeaux de l'INRA de Versailles (Hubert et al., 2009)

	Illite	Kaolinite	Smectite	Illite-smectite	Chlorite-smectite
0-25 cm	20	21	18	33	8

1.2.1. Détermination du poids sec et de l'humidité résiduelle

Le poids sec du sol et l'humidité résiduelle sont déterminés selon la norme NF ISO 11465 (1993) en triplica. Une coupelle en aluminium est séchée à 105°C pendant au moins 45 min et placée ensuite dans un dessiccateur jusqu'à refroidissement puis pesée (m_1). Une prise d'essai de 10 à 15 g de sol est placée dans la coupelle pesée (m_2). Après séchage à 105 °C pendant au moins 24h (jusqu'à obtention d'une masse constante), la coupelle est déposée dans un dessiccateur jusqu'à refroidissement puis est à nouveau pesée (m_3). Le pourcentage d'humidité résiduelle (% HR) est déterminé selon la formule suivante en triplica :

$$\% HR = \frac{[m_2 - m_3]}{(m_2 - m_1)} \times 100 \quad (1)$$

(m_1 , m_2 , m_3 en g)

1.2.2. Détermination de la capacité au champ

Le fond de 3 tubes Nalgene® en polypropylène de 125 mL est percé d'un trou de 0,5 cm de diamètre et est ensuite recouvert d'une grille et d'un disque épais en aluminium. L'ensemble est pesé (m_1), puis le pot est ensuite rempli du sol tamisé à 2 mm, qui aura au préalable été séché au moins 48h à température ambiante. L'ensemble est légèrement tassé et pesé (m_2). Le tout est placé dans un récipient contenant de l'eau distillée. L'eau est ajustée à 1 cm au-dessus de la base du tube. Au bout de 24h, le pot est sorti du récipient et pesé (m_3) après une période de repos de 10 min. Le calcul de la capacité au champ ou de rétention (CR) est le suivant (réalisé en triplica):

$$CR = \frac{(m_3 - m_2) + [(m_2 - m_1) * \frac{HR}{100}]}{(m_2 - m_1) * (100 - HR)/100} \times 100 \quad (2)$$

(m_1 , m_2 , m_3 en g ; HR en %)

1.2.3. Dopage et vieillissement du sol

Le sol est aliquoté en deux lots afin de n'en doper qu'un seul et de garder l'autre non dopé comme témoin. Les deux lots sont préalablement pesés vides. 7 kg de sol est ajouté dans un premier bac (lot 1 : dopé en Cs) et 3 kg sont ajoutés dans l'autre (lot 2 : non dopé en Cs - témoin). Le sol est ensuite dopé selon la méthode décrite par Wu et al., (2009).

2,795 L d'une solution de CsCl ($25,3 \text{ mmol.L}^{-1}$) sont ajoutés en surface des 7 kg de sol du lot 1 permettant d'atteindre à la fois une concentration en Cs de 11,2 mmol de Cs par kg de sol sec et la capacité maximale de rétention d'eau du sol (c'est-à-dire la saturation). 1,26 L d'eau ultra pure (EUP) est ajouté au sol du lot 2 afin d'atteindre également la capacité maximale de rétention d'eau.

Le sol est ensuite laissé à l'obscurité et à température ambiante pendant 6 semaines sous une légère agitation.

Pendant ces 6 semaines, un suivi de l'humidité des deux sols est réalisé par pesée régulière. Le sol est homogénéisé périodiquement (environ une fois par semaine). Une fois l'eau entièrement évaporée ($\sim 14 \%$ d'humidité), chaque pot est à nouveau arrosé jusqu'à atteindre 50 % de la capacité de rétention d'eau et laissé 2-3 jours à l'obscurité à température ambiante pour s'équilibrer.

1.2.4. Détermination du pH du sol

Après 6 semaines de vieillissement et 2-3 jours d'équilibrage, une mesure du pH de chaque lot de sol (1 et 2) est réalisée sur 3 répliques (Annexe 3).

La méthode utilisée s'inspire de la norme NF ISO 10390 (AFNOR 1994b). La prise d'essai est de $5 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ de sol préalablement séché à 40°C . Puis est ajouté 5 fois le volume du sol en eau distillée soit environ 25 mL (densité apparente du sol fixée arbitrairement à 1). Après agitation à 200 rpm pendant 15 min à température ambiante, les tubes sont mis à reposer 2h minimum. Avant la mesure avec un pH-mètre calibré, les tubes sont secoués énergiquement pour les remettre en suspension.

2. Cultures et analyses microbiologiques

2.1. Pseudomonas fluorescens

2.1.1. Origine et mode de conservation

Afin de choisir une souche bactérienne ayant la meilleure croissance sur un milieu dopé en Cs, la croissance de 5 souches bactériennes dans un milieu dopé en CsCl à différentes concentrations a été comparée.

Les souches testées ont été isolées à partir de différents sols et sont les souches disponibles au laboratoire :

- *Bacillus subtilis*
- *Pseudomonas fluorescens*
- *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400
- *Pseudomonas putida*
- *Cupriavidus metallidurans*

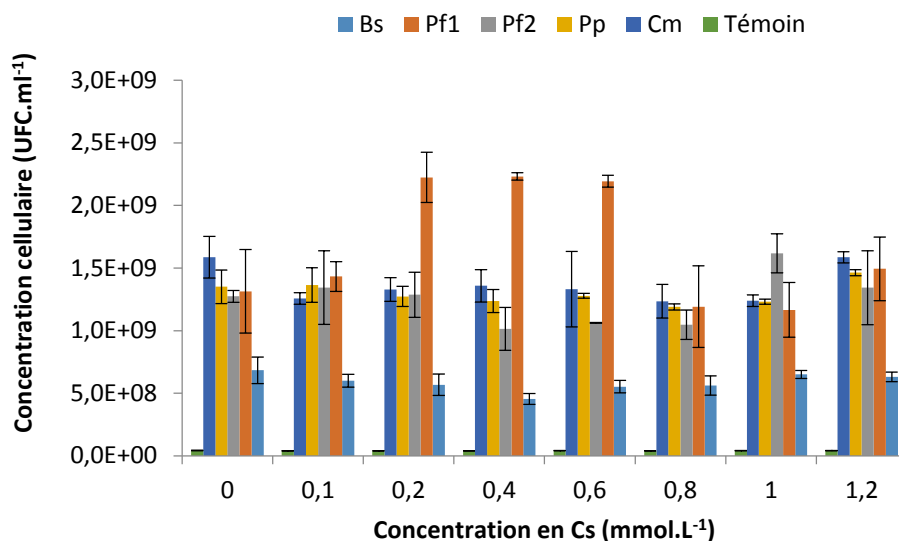


Figure 6 : Concentration cellulaire de Bs : *Basilus subtilus* ; Pf1 : *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400 ; Pf2 : *Pseudomonas fluorescens* ; Pp : *Pseudomonas putidas* ; Cm : *Cupriavidus metallidurans* après 24 heures de culture en milieu complet (TSB) additionné de concentration croissante en CsCl (0 à 1,2 mmol.L⁻¹)

La souche finalement choisie pour sa croissance optimale en 24h dans un milieu dopé en Cs est *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400 (Figure 6). Elle est conservée à -80°C en cryotube dans du glycérol 20 % (v/v).

2.1.2. Milieux et conditions de culture

A chaque nouvelle expérience, les bactéries sont pré-cultivées dans un milieu TSB (Tryptic Soy Broth) dilué au demi à 28°C et 200 rpm pendant 24h à partir de cryotubes. La biomasse bactérienne est récoltée par centrifugation à 7690 g pendant 10 min et le culot est lavé 2 fois avec une solution de NaCl 9 %. Il est ensuite repris dans 2 mL de la même solution et la densité optique (DO) est mesurée à 600 nm avec un spectromètre UV-visible VARIAN Cary 50 Scan.

Afin de favoriser la croissance bactérienne en présence de l'illite dopée en Cs sans qu'il y ait de compétition ionique avec le potassium et l'ammonium des différents milieux de culture, différents milieux de croissance bactérienne sont testés (voir leur composition en annexe 1).

- DF : milieu minimum à pH 7,2 ;
- DF sans fer : milieu minimum à pH 7,2 sans fer pour favoriser la production de sidérophore et/ou sans potassium compétiteur du Cs ;

- DF K : milieu minimum à pH 7,2 sans fer et sans potassium en solution remplacé par une poudre d'orthose riche en potassium (voir paragraphe 5.2.1.) ;
- CAA : milieu minimum à pH 7 favorisant la production de pyoverdine ;

Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage pendant 20 min à 121°C et sont ensemencés avec un inoculum d'une pré-culture bactérienne à une DO_{600nm} de 0,1. Au bout de 24, 48 ou 72h de culture à 28°C en fonction des milieux, les métabolites bactériens sont détectés.

2.2. Méthodes de dénombrement de la biomasse microbienne

Le nombre d'unités formant colonies (UFC) est déterminé grâce à une courbe de calibration reliant le nombre d'UFC à la DO_{600nm} . Pour cela, des dilutions en cascades de la suspension bactériennes sont réalisées jusqu'à 10^{-8} et pour chacune d'elle, 10 μ L sont déposés en gouttelettes (3 gouttes pour chaque dilution) sur une boîte de Pétri contenant du milieu TSB solide (voir composition en annexe 1) préalablement divisée en 8. Les colonies isolées sont dénombrées après 48h à 28°C.

Les coefficients de conversion entre la biomasse ($g.L^{-1}$), l'absorbance (DO_{600nm}) et la concentration cellulaire ($UFC.mL^{-1}$) correspondant aux différentes méthodes de dénombrement de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400, sont reportés dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Coefficients de conversion entre la concentration cellulaire ($UFC.mL^{-1}$), la biomasse ($g.L^{-1}$) et la densité optique (600 nm) pour *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400

<i>P. fluorescens</i> ATCC 17400	
Concentration cellulaire ($UFC.mL^{-1}$) / DO (600 nm)	$1,01 \times 10^9$
Biomasse ($g.L^{-1}$) / DO (600 nm)	0,495
Biomasse ($g.L^{-1}$) / concentration cellulaire ($UFC.mL^{-1}$)	$4,9 \times 10^{-10}$

2.3. Production et analyse des métabolites bactériens (dont la pyoverdine)

2.3.1. Production des métabolites bactériens

Les métabolites bactériens étudiés regroupent l'ensemble des exsudats produits par *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400 après 48h de croissance dans le milieu CAA. Cette culture est réalisée à partir d'une pré-culture de 24h à

28°C et 200 rpm. Le milieu CAA stérile est alors inoculé et la biomasse produite pendant 48h à 28°C et 200 rpm (voir paragraphe 2.1.2.). Le surnageant est ensuite récupéré par centrifugation 10 min à 7690 g. Il constitue le stock de métabolites bactériens utilisés pour les expériences.

2.3.2. Purification de la pyoverdine

La pyoverdine est purifiée à partir d'un stock de surnageants bactériens (voir paragraphe 2.3.1.) d'après le protocole décrit par Bertrand, (2009). Au surnageant sont ajoutés 2% d'acide trichloroacétique afin de précipiter les protéines. Après 2h à l'obscurité et à température ambiante sans agitation, l'ensemble est filtré sur filtre de verre à 0,7 µm à l'aide d'une pompe à vide. Le pH du filtrat est ensuite ajusté à 8. Puis 100 g.L⁻¹ de résine Amberlite XAD-4 (Aldrich) sont ajoutés au filtrat et la suspension est mise sous agitation pendant 17h à 4°C. La résine est ensuite récupérée par filtration sur verre fritté, puis lavée 4 fois avec 500 mL d'EUP. Enfin, les sidérophores sont récupérés par 4 lavages avec 200 mL de méthanol. L'extrait ainsi obtenu est ensuite soumis à une évaporation sous vide à 50°C, congelé pour être lyophilisé et conservé à -20°C.

2.3.3. Détection et quantification de la pyoverdine

La concentration en pyoverdine est déterminée par mesure de la DO à 405 nm avec un spectromètre UV-visible VARIAN Cary 50 Scan, d'un échantillon dilué et ajusté à pH 7. La concentration en pyoverdine en µmol.L⁻¹ est ensuite calculée grâce au coefficient d'extinction molaire et de la formule suivante :

$$[\text{pyoverdine}] = \frac{DO_{405 \text{ nm}}}{19000} \times 10^6 \quad (3)$$

Le coefficient d'extinction de la pyoverdine ayant été déterminé par Wilderman et al. (2001)

3. Caractéristiques et conditions de culture de la plante étudiée : le trèfle violet

3.1. Désinfection et germination des graines

La plante utilisée pour cette étude est le trèfle (*Trifolium pratense*). Pour chaque expérience, les graines sont stérilisées à température ambiante par ajout de 1 % de NaClO₄ et d'une goutte de Tween 20 pendant 10 min. Elles sont ensuite rincées 10 fois avec de l'EUP stérilisée par autoclavage. La stérilité des graines est vérifiée en incubant une dizaine de graines sur un milieu TSA gélosé incubé 48h à 28°C.

Les graines sont ensuite mises à germer en conditions stériles dans une boîte de Pétri en verre contenant du papier filtre imbibé d'EUP stérile à l'obscurité à 25°C pendant 72h.

3.2. Conditions de culture

3.2.1. Culture hydroponique

Après 72h de germination en conditions stériles, les graines sont transférées dans des bacs Araponix® (un plant par puits) contenant chacun 1,7 L de milieu Hoagland stérile (voir sa composition en annexe 1) à pH 6 oxygéné par bullage à l'aide d'une pompe à air.

Les bacs sont placés dans une chambre de culture en conditions contrôlées (16h de jour à 21°C et 8h de nuit à 17°C avec une humidité relative de 70 %) pendant 45 jours. La solution Hoagland est remplacée une fois par semaine.

3.2.2. Culture en pots de sol

Après 40 jours de croissance en hydroponie (voir paragraphe 3.2.1), 4 à 5 plants sont repiqués par pot afin d'obtenir un nombre de tige homogène dans chaque pot soit environ 14 tiges par pot. Les plants sont ensuite laissés dans la chambre de culture dans les mêmes conditions de culture contrôlée pendant 12 jours.

4. Analyse du césium

4.1. Césium en solution

Le Cs de tous les prélèvements et filtrats obtenus au cours de l'étude est analysé par ICP-MS. Les gammes étalon sont préparées dans la même matrice que les dilutions des échantillons : HNO₃ 2 %. La limite de quantification obtenue pour l'analyse du Cs est en moyenne de 1,5 nmol.L⁻¹ (avec une erreur inférieure à 5 %).

4.2. Césium dans les plantes

Tous les échantillons végétaux récoltés ont été minéralisés dans un minéralisateur MARS 6 selon le programme suivant :

- Phase de chauffage : 0°C à 175°C pendant 15 minutes ;
- Phase de maintien à 175°C pendant 10 minutes ;
- Phase de refroidissement jusqu'à 60°C pendant 15 minutes.

Les échantillons sont pesés précisément (masse maximum : 0,5 g) avant d'être mis en contact de 8 mL d'acide nitrique (HNO₃) 65 % ultra pur et 2 mL d'eau oxygénée (H₂O₂) 30 % dans un réacteur en téflon. Une fois

l'échantillon minéralisé, le volume est ajusté à 25 mL avec de l'EUP et le liquide est filtré sur du papier Whatman n°40, puis récupéré dans des tubes résistant à l'acide. Les tubes sont stockés à 4°C avant l'analyse par ICP-MS.

4.3. *Césium dans le sol*

4.3.1. *Césium total*

De même que pour les végétaux, les échantillons de sol sec sont minéralisés dans un minéralisateur MARS 6 selon le même programme.

Les échantillons sont pesés précisément (masse maximum : 0,5 g). La minéralisation acide du sol est obtenue en ajoutant 3 ml d'HCl 37 % et 9 ml d'HNO₃ 65 % ultra pur selon le protocole N°3051 de l'Environmental Protection Agency (EPA). Une fois l'échantillon minéralisé, le volume est ajustée à 2 ml avec de l'EUP et le liquide est filtré sur papier filtre Whatman n°40, puis récupéré dans des tubes résistant à l'acide. Les tubes sont stockés à 4 °C avant analyse par ICP-MS.

Le césium naturellement présent dans le sol avant dopage est analysé de la même façon mais l'analyse du filtrat est réalisée à l'ICP-MS-HR Element XR Thermo scientific où la limite de quantification est plus basse (7,5 pmol.L⁻¹).

4.3.2. *Césium phytodisponible*

L'extractant utilisé pour évaluer la fraction phytodisponible du césium dans les sols est l'acétate d'ammonium (CH₃COONH₄, 1 M). Dans cette expérience, la prise d'essai est de 1 g ($\pm$ 0,01 g) de sol sec broyé dans un tube de polypropylène auquel sont ajoutés 10 mL d'extractant (4 répliques). Les tubes sont ensuite agités pendant 2h. Après agitation, les tubes sont centrifugés pendant 8 min à 7690 g puis leur contenu est filtré sur membrane de 0,22 μ m et acidifié avec 2 % HNO₃ ultra pur. Un blanc sans sol est également réalisé dans les mêmes conditions. Le filtrat est ensuite analysé à l'ICP-MS.

4.4. *Analyse statistique*

Les données sont traitées avec le logiciel STATBOX version 5.0 (GRIMMER Logiciels, 2001) par l'analyse de variance (ANOVA) à partir d'un dispositif multifactoriel en randomisation qui permet une comparaison de moyennes selon le test de Newman-keuls au seuil de 5 %. Les groupes homogènes sont représentés sur les figures par les lettres a,b,c,...

5. Présentation des expérimentations

5.1. Désorption du césium de l'illite par des acides organiques, sidérophores et métabolites bactériens

5.1.1. Préparation des différentes modalités

Différents métabolites sont ajoutés à 0,1 g.L⁻¹ d'illite dopée à deux concentrations différentes en Cs (10 et 100 mmol.kg⁻¹) prélevés à partir des solutions stock à 10 g.L⁻¹ (voir paragraphe 1.1.2.) dans une solution de NaCl à 1 mM :

- 2 acides organiques, l'acide citrique et l'acide oxalique sont ajoutés à 40 µmol.L⁻¹ ;
- 3 complexants sont ajoutés à 50 et 250 µmol.L⁻¹ ;
 - l'acide acétohydroxamique (AAH), un complexant du fer ;
 - le desferroxiamine mesylate (DFOM), un sidérophore commercial ;
 - la pyoverdine purifiée selon le protocole décrit au paragraphe 2.3.2. ;
- les métabolites bactériens (voir préparation au paragraphe 2.3.1.). Les métabolites bactériens sont ajoutés de façon à avoir dans la suspension 50 µmol.L⁻¹ de pyoverdine ;
- Le tétraméthylammonium tétrafluoroborate (Me₄NBF₄), une molécule choisie comme compétiteur du Cs est ajouté à 50 et 250 µmol.L⁻¹.

Chaque modalité est répétée 3 fois. Des prélèvements de 1 mL de suspension sont réalisés au bout de 0, 1, 2, 7, 15 et 28 jours d'incubation à 28°C sous agitation à 200 rpm. Ces prélèvements sont filtrés sur filtre seringue à 0,22 µm et 30 µL d'HNO₃ 65 % ultra pur sont ajoutés au filtrat conservé à 4°C avant analyse du Cs, du Fe et de l'Al par ICP-MS.

Tous les résultats sont présentés en pourcentage de désorption selon l'équation suivante :

$$\% \text{ désorption } X = \frac{(\text{quantité de } X \text{ dans le filtrat en présence de chélatant})_t - (\text{quantité de } X \text{ dans le filtrat du témoin})_t}{\text{quantité initiale de } X \text{ sorbé sur l'illite}} \times 100 \quad (4)$$

Où X est l'élément analysé en solution (Cs, Fe ou Al) et t est le temps d'incubation. Le témoin correspond à la modalité sans ajout de chélateur mais en présence d'illite dopée.

5.1.2. Modélisation

Tous les calculs sont effectués avec le logiciel géochimique PHREEQC v2.17 (Parkhurst and Appelo, 1999) et le processus d'échange d'ions est décrit suivant la convention Gaines-Thomas (Gaines and Thomas, 1953) en utilisant le modèle généralisé proposé par Bradbury and Baeyens (2000). Il correspond à un modèle à trois sites permettant de décrire l'adsorption du Cs sur l'illite étudiée. La compétition du Cs avec K^+ , NH_4^+ , EDTA et l'acide citrique est étudiée.

5.1.3. Observations microscopiques

MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE

Des images en microscopie électronique à balayage (MEB) ont été réalisées à la fin des expériences en présence de pyoverdine purifiée (voir paragraphe 5.1.1.). L'illite en suspension est prélevée à la fin des expériences en présence ou non de $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de sidérophores, lavée avec de l'EUP suivi de deux lavage avec 70 % d'éthanol. Les grains d'illite sont ensuite ajoutés sur un plot puis laissés sécher à l'air libre avant d'être métallisés avec un mélange Palladium-Or (Pd-Au) pendant 2 min. Un MEB à effet de champ JEOL, modèle JSM 7600F est utilisé pour l'imagerie.

MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION

L'altération potentielle de l'illite est étudiée par microscopie électronique à transmission (MET) à la fin des expériences en présence de pyoverdine purifiée (voir paragraphe 5.1.1.). Au bout de 28 jours en présence de $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de pyoverdine ou sans sidérophores, l'illite en suspension est prélevée par centrifugation (10 min à 7690 g), lavée avec 70 % d'éthanol et soumise à une sonication pendant environ 5 min. Une goutte de la suspension a été introduite à la pipette et transférée sur des grilles de cuivre avec un maillage de 300 mesh et un revêtement de carbone. Un MET Hitachi H9000NAR LaB6 avec une tension d'accélération de 300 keV et 0,18 nm est utilisé pour l'imagerie.

5.2. Désorption du césium de l'illite par *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400

5.2.1. Conditions de culture bactérienne adaptées aux objectifs des expérimentations

Afin de pallier une compétition ionique entre le césium et les constituants du milieu DF (voir composition en annexe 1), plusieurs adaptations des conditions et du milieu de culture ont été réalisées.

MILIEU DF MODIFIE

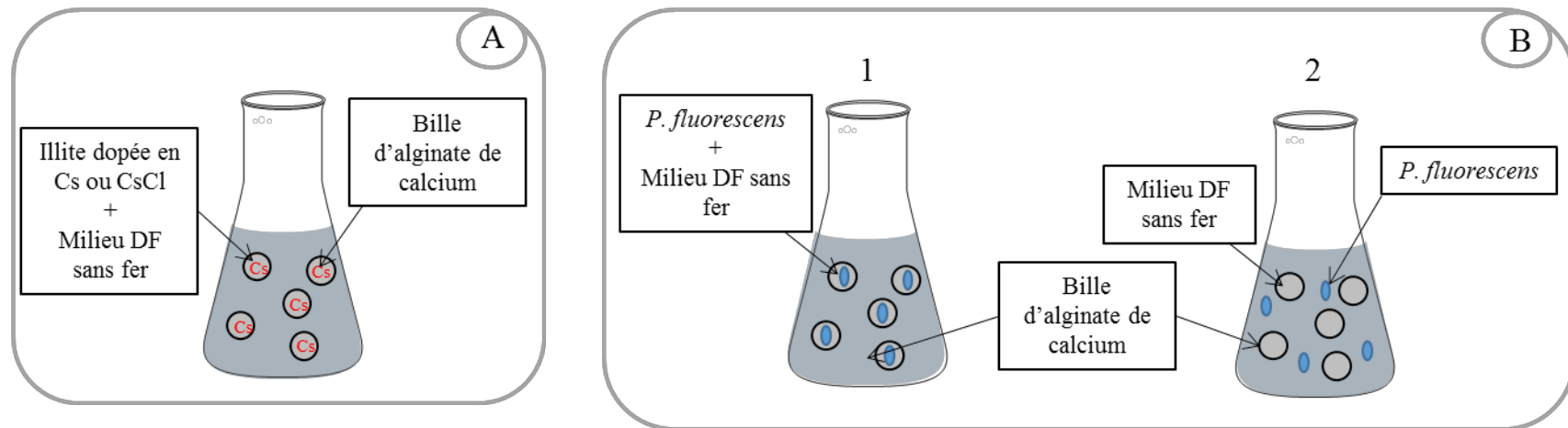
Le milieu DF est modifié en supprimant le fer et le potassium afin d'augmenter (DF sans fer), en l'absence de fer, la production de pyoverdine et d'éviter une compétition entre le potassium et le Cs. Après inoculation de ce milieu par une suspension de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400 (voir paragraphe 2.1.2.) à une DO_{600nm} de 0,1, sa croissance est suivie au cours du temps par prélèvements réguliers de 1 mL de la suspension et lecture de la DO_{600nm} .

BILLES D'ALGINATE DE CALCIUM

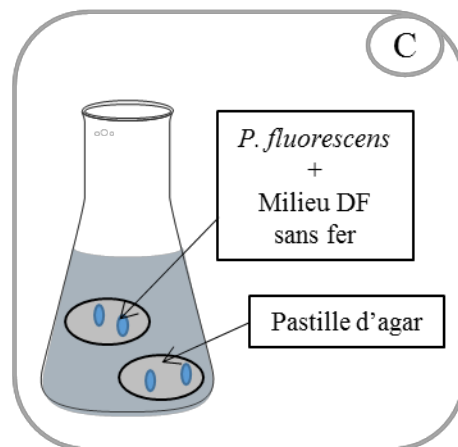
Les billes d'alginate de calcium sont utilisées afin de confiner les milieux de culture ou les bactéries et d'éviter le contact avec l'illite dopée en Cs. Elles sont préparées selon le protocole de (Bréant et al., 2002) pour différents tests schématisés dans la Figure 7A et B.

Pour fabriquer les billes d'alginate contenant le milieu DF sans fer, il est ajouté à une solution d'alginate de sodium à 30 g.L^{-1} . Le mélange est stérilisé par autoclavage (121°C pendant 20 min). Du glucose est ajouté au mélange après stérilisation à partir d'une solution stérile concentrée (500 g.L^{-1}) afin d'atteindre une concentration de 10 g.L^{-1} de glucose. Ce mélange stérile est ensuite introduit goutte à goutte dans une solution de CaCl_2 stérile à 30 g.L^{-1} avec une agitation douce pour former des billes rondes. Les billes, une fois formées, restent dans la solution de CaCl_2 30 min minimum à 200 rpm. Le CaCl_2 est ensuite éliminé et les billes sont lavées à l'eau distillée stérile plusieurs fois.

Billes d'alginate de calcium



Pastilles d'agar



Milieu de croissance DF K

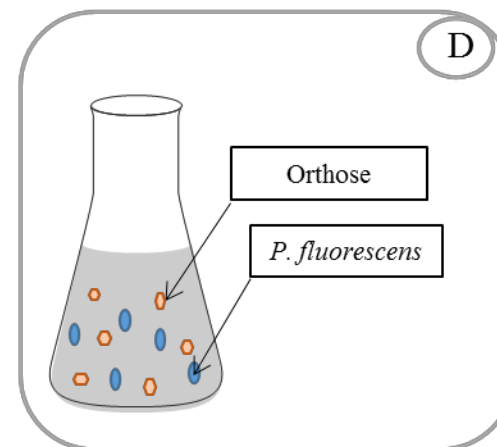


Figure 7 : Schéma décrivant les différentes étapes de tests réalisés pour l'optimisation des conditions de culture de *Pseudomonas fluorescens* en vue de l'utiliser en présence d'illite dopée en Cs avec les billes d'alginate de calcium (A et B), les pastilles d'agar (C) et le nouveau milieu DF K (D)

A partir de ces billes d'alginate, différents tests sont réalisés pour lesquels de l'illite dopée en Cs, du Cs sous forme de CsCl ou des bactéries sont ajoutés dans le mélange avant la formation des billes d'alginate par goutte à goutte dans la solution de CaCl_2 :

1. Etude de la mobilité du Cs de l'illite ou du Cs en solution en présence du milieu DF sans fer (Figure 7 A).

Le Cs est ajouté sous deux formes à l'intérieur des billes d'alginate de calcium en plus du milieu DF sans fer :

- sorbé sur l'illite à deux concentrations (10 et 100 mmol.kg^{-1}) : la concentration finale en illite est de 0,1 g.L^{-1} du volume total utilisé de l'ermeneyer (50 mL de NaCl) ;
- en solution sous forme de CsCl pour atteindre 1 mmol.L^{-1} de Cs total.

Des billes contenant du milieu DF sans fer et sans ajout de Cs sont également réalisées comme témoin.

2g de billes d'alginate de calcium fabriquées avec le milieu DF sans fer, et avec ou sans Cs, sont ajoutés à 50 mL de NaCl à 1 mM. Chaque modalité est répétée 3 fois. Des prélèvements de 3 mL du milieu liquide environnant sont réalisés au bout de 1, 4, 24 et 48h et filtrés sur filtre seringue à 0,22 μm en changeant de filtre à chaque prélèvement. Le filtrat est acidifié à 2 % d' HNO_3 65 % ultra pur et conservé à 4°C. Le Cs est analysé par ICP-MS

2. Etude de la diffusion du potassium du milieu DF sans fer à travers les billes

A partir des prélèvements réalisés pour le test précédent, le potassium est analysé par ICP-AES iCAP6300 Radial.

3. Etude de la croissance de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400 et de la production de pyoverdine dans les billes ou en présence de billes (Figure 7 B)

La croissance bactérienne est suivie au cours du temps suivant différentes modalités :

- *Pseudomonas fluorescens* est ajoutée en plus du milieu DF sans fer à l'intérieur des billes d'alginate de calcium (Figure 7 B 1);
- *Pseudomonas fluorescens* est ajouté dans le milieu environnant en présence de billes contenant le milieu DF sans fer (Figure 7 B 2).

2g de billes d'alginate de calcium fabriquées avec le milieu DF sans fer sont ajoutées à 50mL de NaCl. *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400 est ajoutée dans les billes ou dans le milieu environnant de façon à obtenir une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,1. Chaque modalité est répétée 3 fois et agitée à 28°C et 200 rpm. La croissance bactérienne dans les billes est suivie par mesure de la DO à 600 nm après dissolution de 3 billes dans 2 mL de citrate de sodium à 50 mM sous forte agitation pendant 20 minutes. La production de pyoverdine est également suivie après filtration de la solution

après dissolution sur filtre seringue à 0,22 μm et la DO est mesurée à 405 nm. Les prélèvements sont réalisés au bout de 0, 4, 8, 13, 24, 48 et 72 h. Des prélèvements de 1 mL du milieu environnant sont également réalisés aux mêmes temps et les DO à 600 nm et à 405 nm sont également mesurées.

PASTILLES D'AGAR (FIGURE 7 C)

Les mêmes expériences de croissance de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400 en culture libre en présence de pastilles d'agar contenant le milieu DF sans fer sont réalisées.

Les pastilles d'agar sont formées en mélangeant le milieu DF stérile sans fer à une solution d'agar stérile à 15 g.L⁻¹ et du glucose est ajouté à 10 g.L⁻¹. Le mélange est coulé encore chaud sur des supports stérilisés d'un diamètre de 3,7 cm et 0,3 cm de hauteur (Junter and Labbe, 1987). La pastille se forme par refroidissement du mélange dans le support. Une fois refroidie, la pastille est démoulée puis lavée plusieurs fois dans de l'eau distillée stérile.

2 pastilles d'agar contenant le milieu DF sans fer sont ajoutées à 50 mL de NaCl (1 mM). Un inoculum de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400 est ajouté dans le milieu environnant de façon à obtenir une DO_{600nm} de 0,1. L'expérience est réalisée en triplica. La croissance bactérienne et la production de pyoverdine sont suivies par mesure de la DO à 600 et 405 nm d'un prélèvement de 1 mL du milieu environnant au bout de 0, 4, 8, 13, 24, 48 et 72 h.

MILIEU MINIMUM DE CROISSANCE MODIFIE : SOURCE DE POTASSIUM INSOLUBLE (FIGURE 7 D)

Un milieu de croissance nommé « DF K » utilisant d'autres sources de potassium et d'azote est testé (voir sa composition en annexe 1). Le potassium et le fer sont préalablement analysés dans la poudre d'orthose (KAlSi₃O₈) par ICP-AES. Le milieu DF K stérile est inoculé avec une suspension de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400 (paragraphe 2.1.2.) à une DO_{600nm} de 0,1 et est mis à incuber à 28°C sous agitation à 200 rpm.

La croissance bactérienne est mesurée au cours du temps par prélèvements de 2 mL (homogénéisation par reflux) et par la méthode de dénombrement en gouttelettes sur boîtes de Pétri contenant un milieu TSB gélosé (voir paragraphe 2.2). Le reste du surnageant est ensuite centrifugé à 7690 g pendant 10 min et 800 μL sont prélevés afin de faire une lecture de la DO_{405nm} qui permet d'obtenir la concentration en pyoverdine. Le reste sur surnageant est filtré sur filtre seringue à 0,22 μm et 30 μL d'HNO₃ 65 % ultra pur sont ajoutés au filtrat conservé à 4°C avant analyse du K par ICP-AES.

5.2.2. Rôle du biofilm de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400 sur la désorption du césium de l'illite

Un inoculum de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400 à une DO_{600nm} de 0,1 est ajouté à 0,1 g.L⁻¹ d'illite dopée avec deux concentrations différentes en Cs (10 et 100 mmol.kg⁻¹) contenu ou non dans une membrane de dialyse. L'expérience est réalisée dans une solution de NaCl à 1 mM et dans le milieu de croissance DF K permettant une croissance bactérienne sans ions compétiteurs du césium (voir paragraphe 5.2.1.).

Deux modalités sont testées pour chaque milieu :

- *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400 sous forme de biofilm : les bactéries sont en contact avec l'illite dopée ;
- *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400 en suspension nommée par la suite « bactéries libres » : sans contact entre l'illite et les bactéries.

Pour la modalité « bactéries libres », l'illite est confinée dans une membrane de dialyse dont le seuil de coupure est de 12000 à 14000 Da évitant ainsi le contact entre les bactéries et l'argile et laissant traverser uniquement les métabolites bactériens. Les membranes de dialyse sont préalablement coupées (8,5 cm) ainsi que les ficelles permettant de fermer un des bouts des membranes et sont lavées dans l'EUP sous agitation faible pendant 48h. Les membranes sont ensuite fermées à une extrémité par la ficelle et sont stérilisées 20 minutes à 121°C. Une fois stérilisées, l'illite dopée est insérée dans les membranes afin d'atteindre une concentration de 0,1 g.L⁻¹ (le volume total de milieu est considéré) et l'autre extrémité est fermée par un sert-clip stérile.

Pour l'expérience en milieu DF K, l'illite est ajoutée en solution ou dans la membrane de dialyse, de façon à atteindre 0,1 g.L⁻¹, après 3 jours de pré-culture bactérienne dans ce milieu à 28°C sous agitation à 200 rpm. Chaque modalité (en triplica) est mise à incuber à 28°C sous agitation à 200 rpm. Des prélèvements de 1 mL du milieu sont réalisés au bout de 0, 1, 2, 4, 8, 24, 48 et 72h pour l'expérience en milieu NaCl et au bout de 0, 4, 12, 24, 48 et 72h et 5 jours après l'ajout d'illite pour l'expérience en milieu DF K. Ces prélèvements sont filtrés sur filtre seringue à 0,22 µm et 30 µL d'HNO₃ 65 % ultra pur sont ajoutés au filtrat conservé à 4°C avant analyse du Cs par ICP-MS.

La croissance bactérienne est évaluée au début et à la fin de l'expérience par dénombrement sur milieu TSB solide (voir sa composition en annexe 1) après réalisation d'une gamme de dilutions de la suspension bactérienne et étalement en gouttelettes de 3 fois 10 µL de chaque dilution sur la même boîte de Pétri. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées au moins 48h à 28°C.

5.3. Dispositif complet : Illite-césium-bactéries-plantes

5.3.1. En culture hydroponique

Après 45 jours de croissance en conditions contrôlées (voir paragraphe 3.2.1.), pour chaque plant, le nombre de feuilles (formées, mortes et pousses) est calculé.

Plusieurs modalités ont été testées :

- La disponibilité du Cs :
 - Cs en solution par ajout de CsCl à 0,1 mmol.L⁻¹ ;
 - Cs sorbé sur l'illite à 10 mmol.kg⁻¹
- La présence ou non de *Pseudomonas fluorescens* à une DO_{600 nm} initiale de 0,1 :
 - En suspension dans le milieu, « bactéries libres », évitant ainsi la formation d'un biofilm dans la modalité avec l'illite dopée en la confinant dans une membrane de dialyse (voir paragraphe 5.2.2.) ;
 - Sous forme de biofilm sur l'illite
- La présence de pyoverdine purifiée à 25, 50 ou 250 µmol.L⁻¹

Chaque modalité est répétée 4 fois. Pour chaque réplica, 3 plants sont utilisés afin d'obtenir assez de biomasse sèche pour la minéralisation finale. L'ensemble de l'expérience est réalisé dans une solution de NaCl à 1 mmol.L⁻¹.

Des prélèvements de 1 mL du milieu sont réalisés au bout de 0, 1, 2, 5, 8 et 12 jours. Ces prélèvements sont filtrés sur filtre seringue à 0,22 µm et 30 µL d'HNO₃ 65 % ultra pur sont ajoutés au filtrat conservé à 4°C avant analyse du Cs. Le suivi de la production de pyoverdine est réalisé par lecture de la DO à 405nm aux mêmes temps de prélèvement.

La croissance des plantes est également suivie par mesure du nombre de feuilles (formées, mortes et pousses).

A la fin de l'expérience, les parties aériennes et les parties racinaires sont récoltées séparément dans des récipients préalablement tarés. Les racines sont rincées à l'EUP. Pour chaque plante, la masse fraîche des parties aériennes et racinaires est pesée avant de faire sécher les échantillons dans une étuve à 40°C pendant 72h. A l'issue de la dessiccation, la masse sèche des parties aériennes et des racines est à nouveau pesée et les végétaux sont minéralisés.

5.3.2. En pots de sol

PREPARATION DES POTS

Différentes modalités sont testées :

- sol non dopé en Cs et végétalisé ;
- sol dopé en Cs et végétalisé ;
- ajout de pyoverdine sur un sol dopé et végétalisé.

Chaque modalité est répliquée 4 fois. Au fond de chaque pot, un morceau de feutre est placé pour éviter l'écoulement de la terre et une coupelle est placée sous chaque pot afin d'éviter le risque de contamination croisée. Le dispositif « pot + coupelle + feutre » est pesé à vide, puis 500 g de sol 1 ou 2 à 50 % de la capacité au champ y sont ajoutés (voir paragraphe 1.2.3). Pour cela, chaque pot est pesé et un volume d'EUP est ajouté afin de rester à 50 % de la capacité au champ. L'EUP est ajoutée à la surface du sol et dans la coupelle afin de répartir l'eau de façon la plus homogène possible.

SUIVI DE CULTURE

La masse des pots est contrôlée tous les jours de façon à maintenir le sol à 50 % de la capacité au champ. Pour ce faire, les pots sont pesés et l'ajustement en eau est fait pour chaque pot. Après chaque pesée, les pots sont replacés aléatoirement dans la chambre de culture afin de prendre en compte tout risque d'hétérogénéité (température, éclairage, humidité) au sein de la chambre de culture.

AJOUT DE LA PYOVERDINE

La pyoverdine est ajoutée une semaine avant la récolte des plants. A ce moment, les stades de développement des plants sont notés. La pyoverdine reprise dans de l'EUP est introduite dans les pots pour les modalités correspondantes. La concentration finale dans chaque pot est de $50 \mu\text{mol.kg}^{-1}$. Une fois le complexant ajouté, le sol est mélangé sur quelques cm et les pots sont remis dans la chambre de culture pour la dernière semaine de culture.

RECOLTE DES ECHANTILLONS

Après 12 jours de culture en sol dopés ou non, les plantes sont récoltées. Pour chaque plant, le nombre de feuilles (formées, mortes et pousses) est calculé.

Les parties aériennes et les parties racinaires sont récoltées séparément dans des récipients préalablement tarés. Les racines sont rincées à l'eau du robinet puis à l'eau distillée et enfin à l'EUP afin de retirer toutes les particules de

sol éventuellement collées au réseau racinaire. Pour chaque plante, la masse fraîche des parties aériennes et racinaires est pesée avant de faire sécher les échantillons dans une étuve à 40°C. Enfin, environ 40 g de sol sont prélevés par pot, pesés précisément puis mis à sécher à 40°C également afin d'analyser le Cs total (voir paragraphe 4.3.1), la mobilité du Cs dans le sol en présence de la plante (voir paragraphe 4.3.2.) et le pH (voir paragraphe 1.2.4. et résultats en annexe 3). A l'issue de la dessiccation, la masse sèche des parties aériennes et des racines est à nouveau pesée et les végétaux sont minéralisés.

5.3.3. Calcul du facteur de translocation, du facteur de bioaccumulation et du pourcentage de dépollution

Une fois l'analyse faite, le facteur de translocation est calculé en utilisant la formule suivante :

$$FT = \frac{[Cs]_{parties\ aériennes}}{[Cs]_{parties\ racinaires}} \quad (5)$$

Et le facteur de bioaccumulation est calculé grâce à la formule suivante :

$$FB = \frac{[Cs]_{parties\ aériennes} + [Cs]_{parties\ racinaires}}{[Cs]_{initiale}} \quad (6)$$

Enfin, le pourcentage de dépollution de la solution ou du sol par les parties aériennes du trèfle violet est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de dépollution} = \frac{\text{Quantité de Cs dans les parties aériennes}}{\text{Quantité de Cs initiale}} \times 100 \quad (7)$$

La concentration ou la quantité initiale de Cs correspond à celle présente initialement dans le sol ou, pour les expériences en hydroponie, ajoutée dans la solution de NaCl ou sorbé sur l'illite.

Chapitre 3 :

Résultats Discussion

1. Désorption du césium de l'illite par des acides organiques, des sidérophores et des métabolites bactériens

L'effet de chélateurs chimiques ou naturels sur la mobilité du Cs est étudié dans cette partie et fait l'objet d'une publication soumise dans Chemical Geology (Annexe 2). Les données expérimentales et issues de la modélisation par le logiciel géochimique PhreeqC sont comparées tout au long de cette étude. Il est important de distinguer le taux maximum de désorption du Cs de celui à l'équilibre. La désorption à l'équilibre est utilisée pour comparer les données de modélisation alors que le taux maximum de désorption est un paramètre important à prendre en compte en remédiation des sols. Dans notre cas, l'objectif est d'augmenter la fraction de Cs en solution pour augmenter la quantité de Cs absorbée par les plantes utilisées en phytoremédiation.

1.1. Sorption du césium sur l'illite

La sorption du Cs sur l'illite est évaluée de façon expérimentale et par modélisation. Le modèle utilisé permet de décrire le taux de sorption et d'occupation du Cs sur les différents sites de l'illite. Les résultats comparant la sorption expérimentale et par modélisation sont présentés dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Sorption du Cs sur l'illite. Comparaison des valeurs modélisées et expérimentales (entre parenthèse)

	Cs ajoute (mmol.kg ⁻¹)	Sorption (%)	Occupation des sites de sorption de l'illite par le Cs (%)		
			FES	Type II	Surface
Phase de sorption	10	99,92 (89)	5,0	90,3	4,6
	100	97,22 (67)	0,5	39,3	57,4

Les calculs donnés par la modélisation (PhreeqC) montrent que plus de 97 % du Cs est théoriquement adsorbé sur l'illite et cela indépendamment de la concentration massique initiale en Cs (10 et 100 mmol.kg⁻¹). Les données expérimentales calculées en faisant la différence entre la quantité de matière initiale de Cs mise en contact avec la suspension d'illite et la quantité de matière analysée en solution après mise à l'équilibre (48h), fait apparaître des différences avec les valeurs modélisées et également une différence importante selon la concentration massique utilisée.

Pour la modalité à 10 mmol de Cs.kg⁻¹, 11 % de la quantité de Cs ajouté reste en solution, 89 % sont donc adsorbés sur l'illite. C'est assez proche de la valeur théorique. Par contre pour la modalité à 100 mmol.kg⁻¹

¹, 33 % de Cs reste en solution après mise à l'équilibre (48h). Le Cs n'est donc sorbé qu'à 67 % sur l'illite dans ces conditions expérimentales.

La différence entre le modèle et l'expérimentation pourrait provenir de la force ionique. En effet, les paramètres du modèle de Bradbury and Baeyens (2000) utilisé ici, proviennent de données de sorption obtenues à des forces ioniques relativement élevées (sodium moyen à 100 mmol.L⁻¹), alors que les données de sorption obtenues dans cette étude sont mesurées pour 1 mmol.L⁻¹ de NaCl. Et il a été montré que la force ionique pouvait avoir un impact important sur les valeurs de constantes d'échange (Tournassat et al., 2009).

Bien que les résultats du modèle ne soient pas parfaits, la modélisation permet d'évaluer le taux d'occupation du Cs sur les différents sites de sorption de l'illite. Le Cs est principalement adsorbé sur les sites de type II (90,3 %) pour 10 mmol de Cs.kg⁻¹ et est réparti entre les sites de type II (39,3 %) et les sites de surface (57,4 %) pour 100 mmol de Cs.kg⁻¹. Pour les deux concentrations en Cs utilisées dans cette étude, la contribution des sites FES à la sorption du Cs sur l'illite est négligeable.

1.2. Mobilisation du césium de l'illite par des acides organiques : acide citrique et acide oxalique

Une fois le Cs sorbé sur l'illite, des études de désorption sont réalisées en utilisant différentes molécules. Dans un premier temps, de l'acide citrique et de l'acide oxalique à 40 µmol.L⁻¹ sont ajoutés à une suspension d'illite dopée en Cs (10 et 100 mmol.kg⁻¹). Ces acides peuvent être produits par les racines des plantes et par les microorganismes du sol (Gadd, 2004; Vyas and Gulati, 2009). La concentration utilisée correspond à celle pouvant être mesurée dans les sols (Vyas and Gulati, 2009). Dans cette expérience effectuée à pH = 6, seules les propriétés de complexation de ces acides organiques sont étudiées puisque le pH n'a pas d'effet sur la mobilité du Cs lorsqu'il est compris entre 4 et 10 (Cornell, 1993; Wendling et al., 2004), gamme de pH à laquelle appartient la plus grande majorité des sols. L'analyse de la concentration en Cs est effectuée à partir de prélèvements réalisés au cours du temps dans la solution (Figure 8). Les pourcentages de désorption sont calculés une fois le témoin déduit.

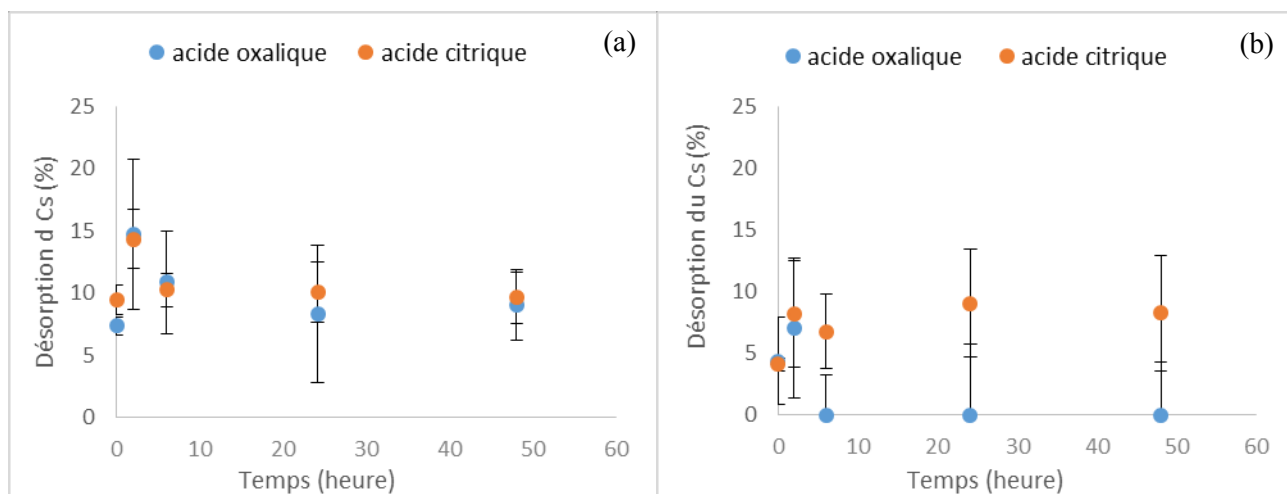


Figure 8 : Mobilisation du Cs de l'illite après ajout de 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'acide citrique ou oxalique à une illite dopée en Cs à : (a) 10 mmol.kg^{-1} et (b) 100 mmol.kg^{-1} de Cs. Les valeurs sont calculées par rapport à la concentration initiale en Cs sur l'illite et une fois les valeurs du témoin sans acide déduites.

Deux heures après l'ajout de l'acide citrique ou de l'acide oxalique à une suspension d'illite dopée en Cs à 10 mmol.kg^{-1} , environ 14 % du Cs est libéré en solution (Figure 8a). C'est la désorption maximale observée suivie ensuite d'une diminution du Cs en solution ; l'équilibre en solution est atteint. En présence de l'illite dopée avec 100 mmol.kg^{-1} de Cs, les deux acides organiques ont moins d'effets, i.e., 7 % de désorption maximale du Cs (Figure 8b). A partir de 2h, l'équilibre chimique s'établit pour atteindre après 48h 7 % de désorption du Cs de l'illite en présence d'acide citrique. Un taux de désorption similaire est atteint pour l'acide oxalique en présence de l'illite faiblement dopée (10 mmol.kg^{-1}) alors qu'aucune désorption n'est observée lorsque la concentration en Cs est plus forte (100 mmol.kg^{-1}).

L'effet des acides organiques est faible. Ce résultat n'est pas surprenant puisque le Cs^+ est un cation monovalent soumis à des interactions faibles avec les chélateurs. La constante de complexation quasi nulle entre le Cs^+ et l'acide citrique ($10^{0,98}$) est rapportée dans la base de données Thermochimie de PhreeQC pour quantifier la désorption du Cs de l'illite. Cette modélisation ne montre aucune désorption. Une désorption négligeable de Cs en présence d'acide citrique ou oxalique a également été observée par Wendling et al. (2005). En effet, selon ces résultats, recalculés pour tenir compte de la désorption du Cs par le témoin (sans ajout d'acide), 1 % de Cs d'une illite dopée avec 120 mmol.kg^{-1} de Cs est désorbé après ajout de 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'acide oxalique et 3 % avec de l'acide citrique à la même concentration. Les mêmes auteurs montrent également que moins de 1 % de Cs est désorbé d'une illite dopée avec une plus faible concentration en Cs (16 mmol.kg^{-1}) en présence des deux acides organiques. D'après ces résultats, les acides organiques de faible poids moléculaire produits en grandes quantités par les racines des plantes et les

microorganismes de la rhizosphère du sol ne jouent donc pas un rôle majeur dans la libération du Cs dans les conditions expérimentales de cette étude.

1.3. Mobilisation du césium de l'illite par des sidérophores bactériens

L'effet de sidérophores bactériens sur la mobilisation du Cs de l'illite dopée aux mêmes concentrations en Cs est ensuite étudié. Les complexants utilisés sont commerciaux comme l'acide acétohydramique (AAH), un monohydroxamate et le desferrioxamine mesylate (DFOM), un trihydroxamate. Ces complexants sont largement utilisés dans la littérature comme complexants du fer et d'autres métaux dans un but de rémédiation (Casentini and Pettine, 2010; Karimzadeh et al., 2013). Des sidérophores naturels comme la pyoverdine purifiée (PVD) et l'ensemble des métabolites bactériens produit par *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400 sont également étudiés. Ces sidérophores sont ajoutés à deux concentrations différentes : 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ correspondant à la concentration retrouvée dans les sols et 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ correspondant à une concentration pouvant être atteinte à certains endroit du sol (Hersman et al., 1995). La libération du Cs de l'illite est suivie au cours du temps par des prélèvements de la solution (Figure 9 : 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; Figure 10 : 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

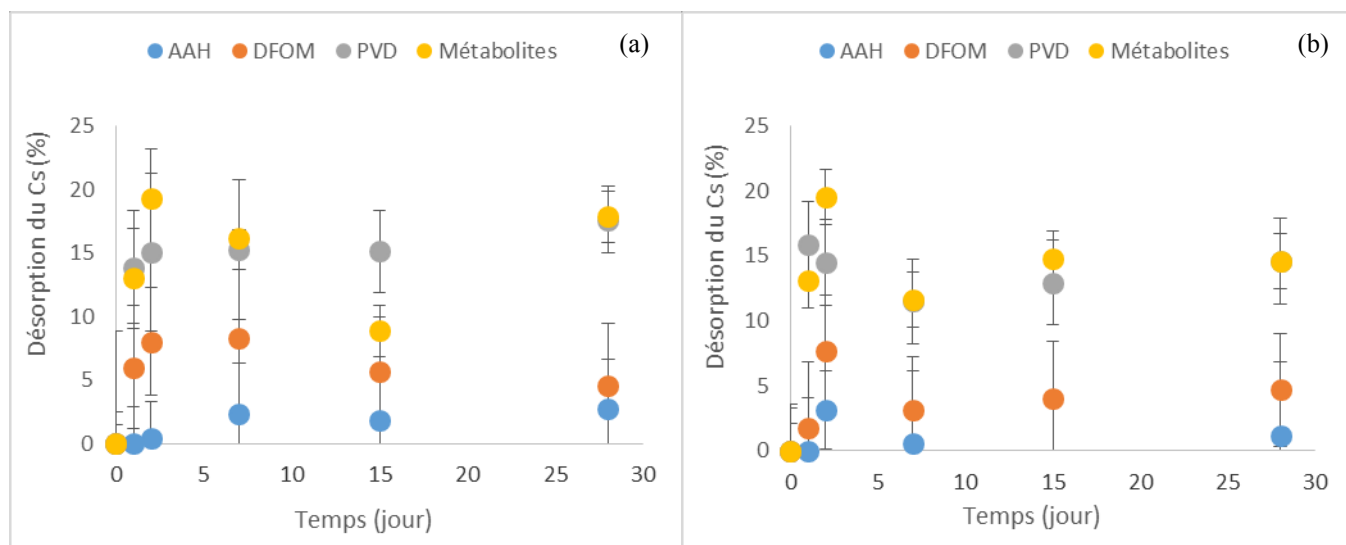


Figure 9 : Mobilisation du Cs de l'illite après ajout de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'acide acétohydramique (AAH), de desferrioxamine mesylate (DFOM), de pyoverdine purifiée (PVD) ou de métabolites bactériens (Métabolites) en présence d'une illite dopée en Cs à (a) 10 mmol.kg^{-1} et (b) 100 mmol.kg^{-1} (concentrations mesurées en solution). Les valeurs sont calculées par rapport à la concentration initiale en Cs sur l'illite et une fois les valeurs du témoin sans complexant déduites.

En présence de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de complexants et pour l'illite dopée à 10 mmol.kg^{-1} , 3 %, 8 %, 18 % et 19 % de Cs sont désorbés au maximum en présence respectivement d'AAH, DFOM, PVD purifiée et des

métabolites bactériens (Figure 9a). La vitesse de désorption maximale est atteinte dans les deux premiers jours (à l'exception de l'AAH, 7 jours) et le temps nécessaire à une désorption maximale du Cs dépend de l'agent complexant : 2 jours pour les métabolites bactériens et DFOM et 28 jours pour l'AAH et la PVD purifiée.

Pour illite dopée avec 100 mmol.kg⁻¹ de Cs, des pourcentages similaires de désorption ont été mesurés, à savoir, 3 %, 8 %, 16 % et 19 % de Cs désorbé au maximum en présence respectivement d'AAH, DFOM, PVD purifiée et des métabolites bactériens (Figure 9b). La vitesse de désorption maximale est atteinte dans les deux premiers jours pour tous les complexants. Les pourcentages maximums de désorption du Cs sont atteints après un jour en présence de PVD et de deux jours en présence d'AAH, DFOM et des métabolites bactériens. La cinétique de désorption est donc plus rapide qu'avec l'illite dopée à 10 mmol.kg⁻¹ probablement parce que le Cs est présent principalement sur les sites de surface de l'illite lorsqu'elle est dopée avec 100 mmol de Cs.kg⁻¹ et donc moins fortement sorbé (Tableau 11).

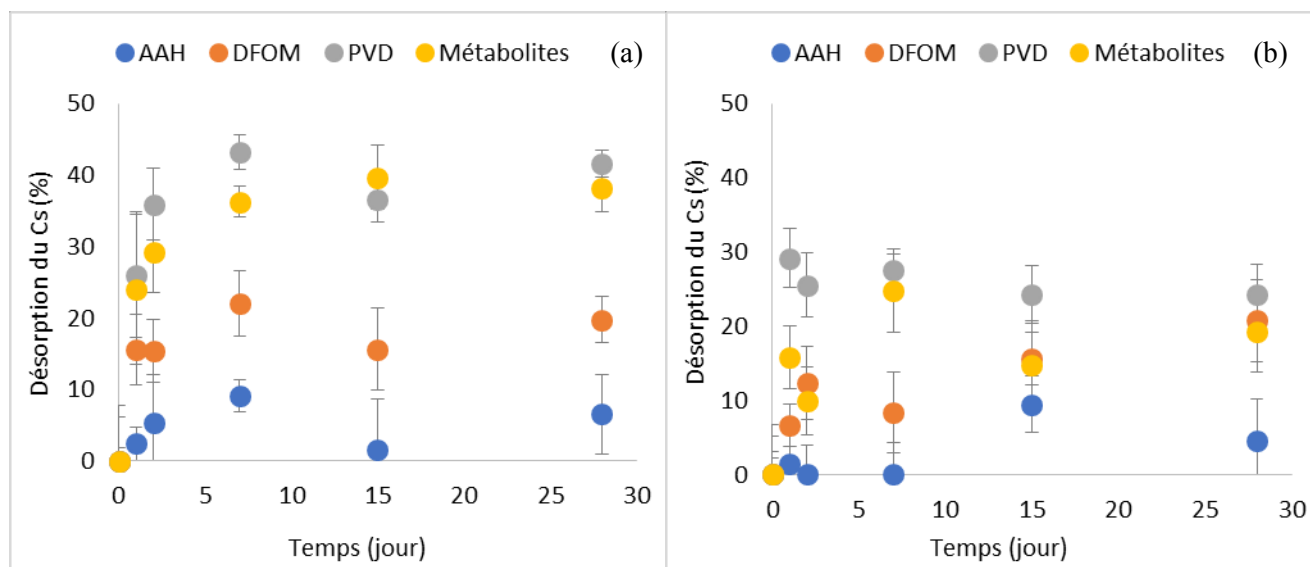


Figure 10 : Mobilisation du Cs de l'illite après ajout de 250 µmol.L⁻¹ d'acide acétohydroxamique (AAH), de desferrioxamine mesylate (DFOM), de pyoverdine purifiée (PVD) ou de métabolites bactériens (Métabolites) en présence d'une illite dopée en Cs à (a) 10 mmol.kg⁻¹ et (b) 100 mmol.kg⁻¹ (concentrations mesurées en solution). Les valeurs sont calculées par rapport à la concentration initiale en Cs sur l'illite et une fois les valeurs du témoin sans complexant déduites.

En présence de 250 µmol.L⁻¹ de complexants, les pourcentages de désorption du Cs de l'illite sont plus élevés à 10 mmol de Cs.kg⁻¹ qu'à 100 mmol.kg⁻¹ (Figure 10a et b) et sont plus élevés que ceux mesurés à 50 µmol.L⁻¹ (Figure 9). L'ajout d'AAH, DFOM, PVD ou des métabolites à de l'illite dopée avec 10 mmol.kg⁻¹ Cs entraîne au maximum la désorption de 9 %, 22 %, 43 % et 40 % de Cs, respectivement (Figure 9a). La

vitesse de désorption maximale est atteinte dans les deux premiers jours (à l'exception de DFOM : 1 jour) et la désorption maximale est observée après 7 jours pour AAH, DFOM et PVD et après 15 jours pour les métabolites bactériens. Avec l'illite dopée à 100 mmol de Cs.kg⁻¹, 9 %, 19 %, 30 % et 25 % sont libérés en 1 jour pour la PVD, 7 jours en présence de métabolites, 15 jours pour l'AAH et 28 jours pour DFOM (Figure 10b).

L'ensemble des résultats de désorption maximale présentée est reporté dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Pourcentage de désorption maximale du Cs de l'illite après ajout de différents complexants à 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ou 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et en fonction de la concentration initiale de Cs (10 ou 100 mmol.kg⁻¹). Les valeurs sont données en moyenne $\pm$ l'écart-type.

	Concentration en complexant		
		10 mmol.kg⁻¹ Cs	100 mmol.kg⁻¹ Cs
AAH	50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	3 ($\pm$ 3)	3 ($\pm$ 2)
	250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	9 ($\pm$ 2)	9 ($\pm$ 3)
DFOM	50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	8 ($\pm$ 5)	8 ($\pm$ 4)
	250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	22 ($\pm$ 4)	19 ($\pm$ 5)
PVD	50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	18 ($\pm$ 2)	16 ($\pm$ 3)
	250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	43 ($\pm$ 2)	30 ($\pm$ 3)
Metabolites	50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	19 ($\pm$ 3)	19 ($\pm$ 2)
	250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	40 ($\pm$ 4)	25 ($\pm$ 5)

Indépendamment de la concentration en Cs, les pourcentages de désorption du Cs les plus élevés sont observés en présence de PVD et des métabolites bactériens et sont assez similaires. Ces résultats indiquent que, parmi les métabolites purifiés à partir du surnageant de la culture de *P. fluorescens*, la PVD est probablement la plus impliquée dans la mobilisation du Cs.

Le pourcentage de désorption du Cs est inférieur lorsque l'illite est dopée à 100 mmol.kg⁻¹ (30 et 25 %) par rapport à 10 mmol.kg⁻¹ (43 et 40 %) en présence de PVD purifiée et des métabolites bactériens à 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Cette différence est probablement due à la différence de distribution du Cs sur les sites de sorption de l'illite après l'équilibre comme expliqué précédemment (voir paragraphe 3.1).

Les chélateurs bactériens comme la PVD sont connus pour complexer fortement les métaux sous leur forme ionique (Al³⁺, Cd²⁺, Cr²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺, et Zn²⁺) dès 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Braud et al., 2009a, 2009b; Cornu et al., 2014). Mais une complexation directe du Cs ne peut être envisagée en raison de la très faible constante de stabilité des chélateurs avec le Cs. Par exemple, la constante de stabilité de l'EDTA (10^{1,3}) est très faible (Reinoso-Maset et al., 2013; Smith et al., 2003) et la modélisation faite en utilisant cette constante Cs/EDTA ne montre aucune désorption alors que ce complexant se révèle très puissant pour les cations trivalents tel que Fe³⁺ (10^{25,1}) et même pour des divalents tels que Cu²⁺ (10^{18,8}) La constante de stabilité pour

le complexe PVD-Cs est inconnue mais la technique décrite par Braud et al. (2009b) peut être utilisée pour savoir si un complexe PVD-Cs se forme. En effet, lorsque la PVD forme un complexe avec un métal, sa fluorescence est modulée. Elle pourra s'éteindre (phénomène de « quenching ») lors de la chélation du fer (Albrecht-Gary et al., 1994; Schalk et al., 1999) ou à l'inverse, être stimulée par l'Al (Braud et al., 2009b; del Olmo et al., 2003) (Figure 11).

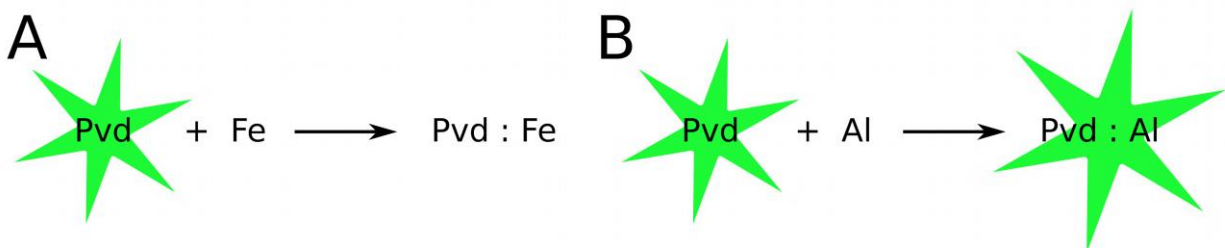


Figure 11 : Propriétés de fluorescence de la pyoverdine lors de la chélation des métaux. A. Chélation du fer par la pyoverdine entraînant l'extinction de la fluorescence. B. Chélation de l'aluminium par la pyoverdine avec augmentation de l'intensité de fluorescence du complexe formé

Cette propriété est utilisée ici afin de déterminer la cinétique de complexation du Cs par la PVD en ajoutant des concentrations croissantes en CsCl à un surnageant de culture de *P. fluorescens* ATCC 17400 pré-cultivée dans un milieu favorisant la production de PVD. La concentration de PVD dans le surnageant est de $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figure 12).

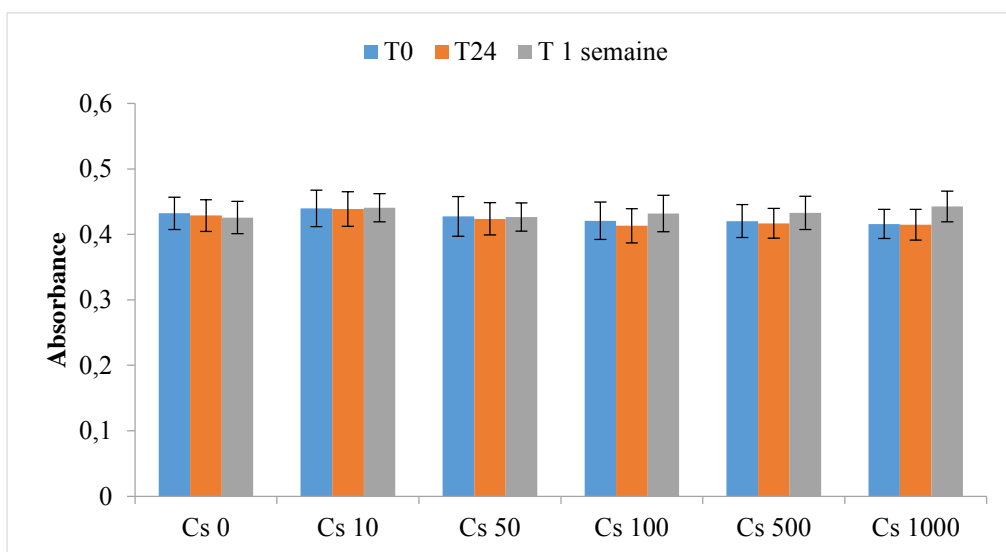


Figure 12 : Mesure de l'absorbance à 405nm au cours du temps d'une suspension de *Pseudomonas fluorescens* contenant $25 \mu\text{mol PVD.L}^{-1}$ en présence de concentrations croissantes en CsCl (de 0 à 1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$)

Quelle que soit la concentration en Cs ajoutée dans la solution à $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en PVD et le temps après l'ajout, l'absorbance de celle-ci n'est pas modifiée. La PVD n'est donc pas capable de former un complexe avec le Cs. La désorption du Cs n'est, par conséquent, pas liée au phénomène directe de complexation de la PVD.

La libération de Cs peut donc être attribuée à l'altération de l'illite par un effet indirecte de la complexation de la PVD des métaux constituant le réseau cristallin des argiles tels que le fer et l'aluminium (Claire Ferret et al., 2014; Haack et al., 2008). De nombreuses études ont, en effet, montré que les agents complexant sont capables de modifier les minéraux argileux ou des oxyhydroxydes de fer. Par exemple, les sidérophores sont capables de mobiliser le fer et l'aluminium constitutif des minéraux argileux (Esnault et al., 2013; Claire Ferret et al., 2014; Haack et al., 2008). L'illite utilisée dans cette étude contient $0,85 \text{ mol de Fe kg}^{-1}$ et $4,02 \text{ mol de Al kg}^{-1}$ et le fait d'en retrouver en solution peut être considéré comme un indicateur de l'altération de l'illite. La dissolution de ces deux éléments de l'illite par l'AAH, DFOM, PVD purifiée et l'ensemble des métabolites de *P. fluorescens* est représentée dans les Figure 13 et Figure 14.

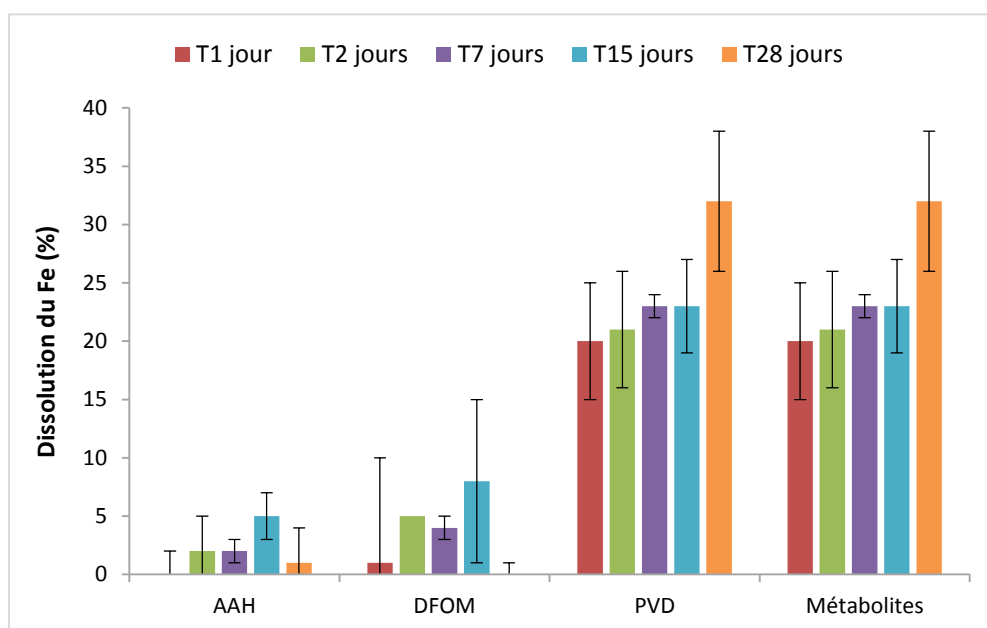


Figure 13 : Mobilisation du fer de l'illite au cours du temps après l'ajout de $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ d'acide acétohydroxamique (AAH), de desferrioxamine mesylate (DFOM), de pyoverdine purifiée (PVD) ou de l'ensemble des métabolites bactériens (Métabolites) en présence d'une illite dopée avec 100 mmol.kg^{-1} de Cs (résultats similaires à 10 mmol.L^{-1}). Les valeurs sont calculées par rapport à la concentration initiale en fer dans l'illite et une fois les valeurs du témoin sans complexant déduites.

Le pourcentage de fer dans la solution est plus élevé en présence de PVD purifiée et des métabolites bactériens qu'en présence d'AAH et de DFOM (Figure 13). 30% de dissolution du fer représentent, en

concentration $1,8 \times 10^{-2} \text{ mmol.L}^{-1}$ de fer dissout en solution en présence de PVD contre $0,3 \times 10^{-2} \text{ mmol.L}^{-1}$ dans le témoin correspondant à l'illite en solution sans ajout de complexant. Cela indique que l'illite est modifiée en présence de PVD et des métabolites bactériens. Le fer est complexé dès le premier jour. La complexation est donc instantanée et augmente au cours du temps. Ces résultats avec la PVD purifiée et les métabolites bactériens ne sont pas étonnants puisque la PVD purifiée présente une forte affinité pour le fer (10^{32} pour la PVD de *Pseudomonas aeruginosa*) (Albrecht-Gary et al., 1994).

La concentration en aluminium dans la solution a également été suivie au cours du temps dans les mêmes conditions (Figure 14).

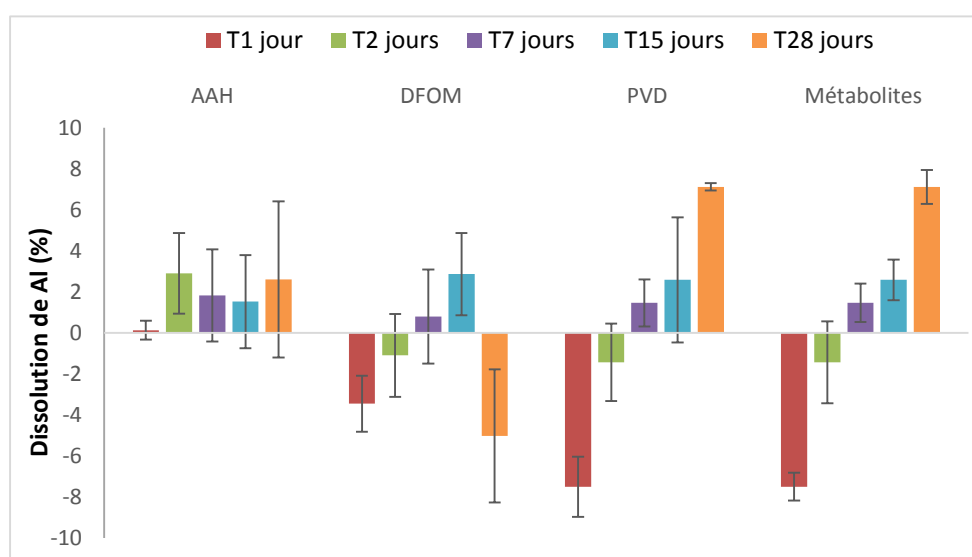


Figure 14 : Mobilisation de l'aluminium de l'illite au cours du temps après l'ajout de $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ d'acide acétohydroxamique (AAH), de desferrioxamine mesylate (DFOM), de pyoverdine purifiée (PVD) ou de l'ensemble des métabolites bactériens (Métabolites) en présence d'une illite dopée avec 100 mmol.kg^{-1} de Cs (résultats similaires à 10 mmol.L^{-1}). Les valeurs négatives représentent la resorption de Al sur l'illite. Les valeurs sont calculées par rapport à la concentration initiale en fer dans l'illite et une fois les valeurs du témoin sans complexant déduites.

Après 1 jour, les valeurs négatives signifient qu'en présence de DFOM, PVD et des métabolites bactériens, moins d'aluminium est retrouvé en solution par rapport au témoin (illite dopée en solution sans ajout de complexants). L'ajout de ces complexants modifierait alors l'équilibre chimique de l'illite dans la solution NaCl (1 mmol.L^{-1}). Après 7 jours, la tendance s'inverse et la concentration en Al en solution est plus importante en présence de DFOM, PVD et des métabolites entraînant jusqu'à 3 % de dissolution de l'Al de l'illite après 15 jours en présence de DFOM, et 7 % après 28 jours en présence de PVD et des métabolites bactériens par rapport au témoin. Comme pour le fer mais dans une moindre mesure, la PVD et les métabolites sont alors capables de solubiliser l'aluminium de l'illite. La dissolution de l'illite par la PVD et

les métabolites se faisant par la complexation des constituants de l'illite, celle de l'Al doit être moins importante que celle du Fe. La constante de complexation de l'Al par la PVD n'est pas connue mais sa capacité à le faire l'est (Hernlem et al., 1999). Pour comparaison, la constante de complexation de l'EDTA pour l'Al ($10^{16,4}$) est plus faible que celle pour le Fe ($10^{25,1}$) (Smith et al., 2003). Cette différence de constante d'affinité peut influencer l'altération de l'illite en complexant le fer prioritairement et l'aluminium ensuite.

Ce phénomène de libération du fer et de l'aluminium par des chélateurs commerciaux ou naturels a déjà été observé comme, par exemple, à partir d'une goethite par un monohydroxamate (Holmén and Casey, 1996) ou par un sidérophore hydroxamate : desferrioxamine B et D à partir d'une smectite (Haack et al., 2008) ou encore par la PVD de *Pseudomonas fluorescens* également à partir d'une smectite (Claire Ferret et al., 2014). Ces complexations successives et combinées du fer et de l'aluminium et de leur mise en solution peuvent alors conduire à l'altération de l'illite et ainsi à la libération indirecte du Cs. La différence de libération de ces éléments de l'illite entre les différents agents chélatant peut être expliquée par le nombre de sites de complexation et par l'encombrement stérique des monohydroxamates, des hydroxamates et de la PVD, cette dernière étant une molécule plus complexe, plus encombrante, avec des sites de complexation ayant une affinité très forte pour le fer. En plus du site de complexation, la PVD dispose d'un atome de carbone chargé positivement sur son chromophore. Ce carbocation est facilement échangeable avec le Cs en raison de sa plus grande affinité avec les -OH présents au niveau des espaces interfoliaires et des bordures de l'illite. Cet échange d'ions pourrait aussi entraîner la désorption directe du Cs de l'illite en présence du carbocation de la PVD.

1.4. Mécanismes de désorption du césium de l'illite

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle le Cs est libéré de l'illite par échange ionique, l'effet d'une molécule sans site de complexation du fer et avec un atome réactif vis-à-vis du Cs (un atome d'azote chargé positivement) est étudié. Des images au Microscope Electronique à Transmission (MET) et au Microscope Electronique à Balayage (MEB) ont également été réalisées afin d'observer une modification physique de l'illite par séparation ou altération des feuillets d'illite en présence ou non de sidérophores.

1.4.1. Echange ionique

Le tétraméthylammonium tétrafluoroborate (Me_4NBF_4) est utilisé dans les mêmes conditions expérimentales que les sidérophores. C'est une molécule qui peut interagir avec le Cs uniquement par échange ionique grâce à son atome d'azote chargé positivement. En effet, aucune autre réaction chimique – liaisons hydrogène ou réaction acido-basique – n'existe (contrairement à NH_4^+ qui est connu pour être

compétiteur du Cs et dont les atomes d'hydrogène peuvent former des liaisons avec les oxygènes des groupements –OH présents sur l'illite).

Les résultats présentés sur la Figure 15 montrent qu'avec Me_4NBF_4 , le Cs est désorbé de l'illite plus fortement à $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ qu'à $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Environ 12 % au maximum du Cs est désorbé de l'illite au bout de 7 jours, en présence de $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Me_4NBF_4 contre 7 % avec $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$, lorsque la concentration en Cs est de 10 mmol.kg^{-1} (Figure 15a). Avec une illite dopée avec 100 mmol de Cs.kg^{-1} , le Me_4NBF_4 a un effet similaire (sauf que la désorption maximale est atteinte au bout de 2 jours pour les deux concentrations) (Figure 15b).

Dans cette étude, le Cs est principalement adsorbé sur les sites de type II et les sites de surface (Tableau 11). Afin de comparer ces résultats expérimentaux à ceux théoriques, une modélisation aurait pu être réalisée mais la constante de complexation du Cs avec cette molécule est inconnue et celle pour le NH_4^+ n'est connue que pour les FES de l'illite. La comparaison n'a pas pu être réalisée.

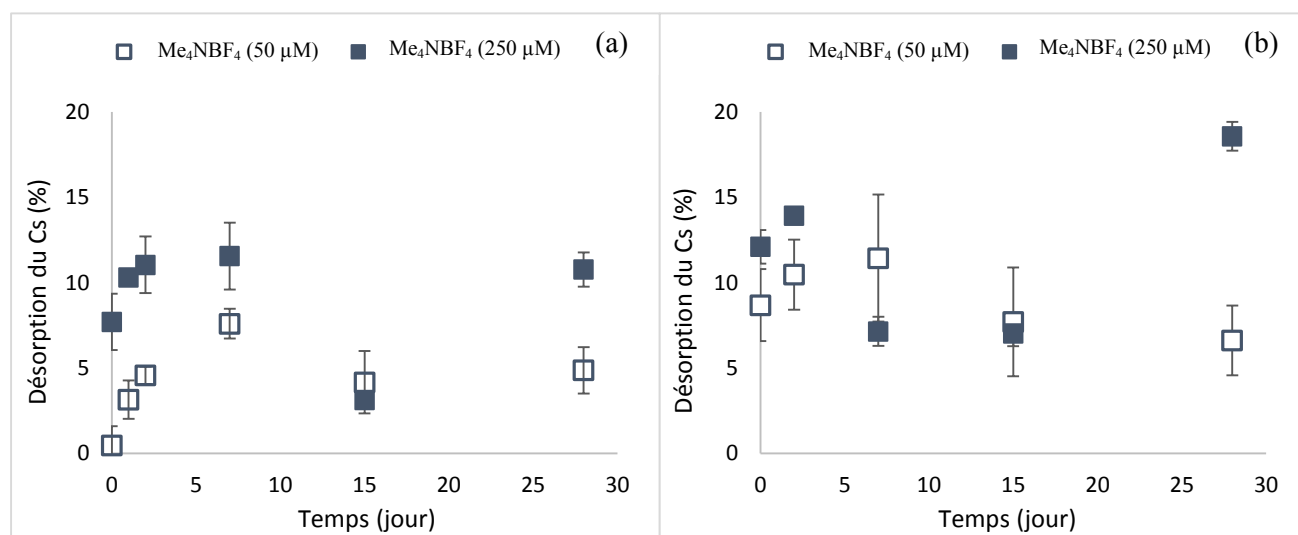


Figure 15 : Mobilisation du Cs de l'illite après ajout de 50 et $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de tétraméthylammonium tétrafluoroborate (Me_4NBF_4) en présence d'une illite dopée avec (a) 10 mmol de Cs.kg^{-1} et (b) 100 mmol de Cs.kg^{-1}

Les pourcentages de Cs libéré dans la solution sont plus faibles que celles qui ont été mesurées en présence de PVD purifiée et des métabolites (Figure 9 et Figure 10). En effet, avec l'illite dopée à 10 mmol de Cs.kg^{-1} , 7 % et 12 % maximum de Cs sont désorbés à $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Me_4NBF_4 , respectivement, alors qu'en présence de PVD purifiée jusqu'à 18 % et 43 % de Cs désorbé est observé (Figure 9a et Figure 10a et Tableau 12). Avec l'illite dopée à 100 mmol de Cs.kg^{-1} , 11 % et 14 % (le point à 18 % étant considéré

comme un artéfact) de Cs sont libérés au maximum après ajout de Me_4NBF_4 à 50 et 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivement, alors qu'on atteint 16 % et 30 % de désorption maximale en présence de PVD purifiée. La désorption maximale est atteinte au bout 7 jours lorsque l'illite est faiblement dopée en Cs (10 mmol.kg^{-1}). En présence de l'illite plus fortement dopée en Cs (100 mmol.kg^{-1}), la désorption maximale est atteinte au bout de 7 jours en présence de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Me_4NBF_4 et au bout de 2 jours avec 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Ces résultats suggèrent que la désorption du Cs de l'illite, en présence de la PVD purifiée est due à deux mécanismes, c'est-à-dire à la fois à un échange ionique entre le carbocation du chromophore de la PVD et le Cs et à l'altération de l'illite qui contribue indirectement à la désorption Cs. Mais l'expérience n'a pas permis de quantifier la proportion des deux mécanismes dans la désorption Cs de l'illite.

1.4.2. Altération physique

La possible modification physique de l'illite par l'action de la PVD purifiée à 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ est analysée et comparée à l'illite témoin sans ajout d'agents complexant par observation au MEB et au MET de grain d'illite à la fin de l'expérience (Figure 16 et Figure 17).

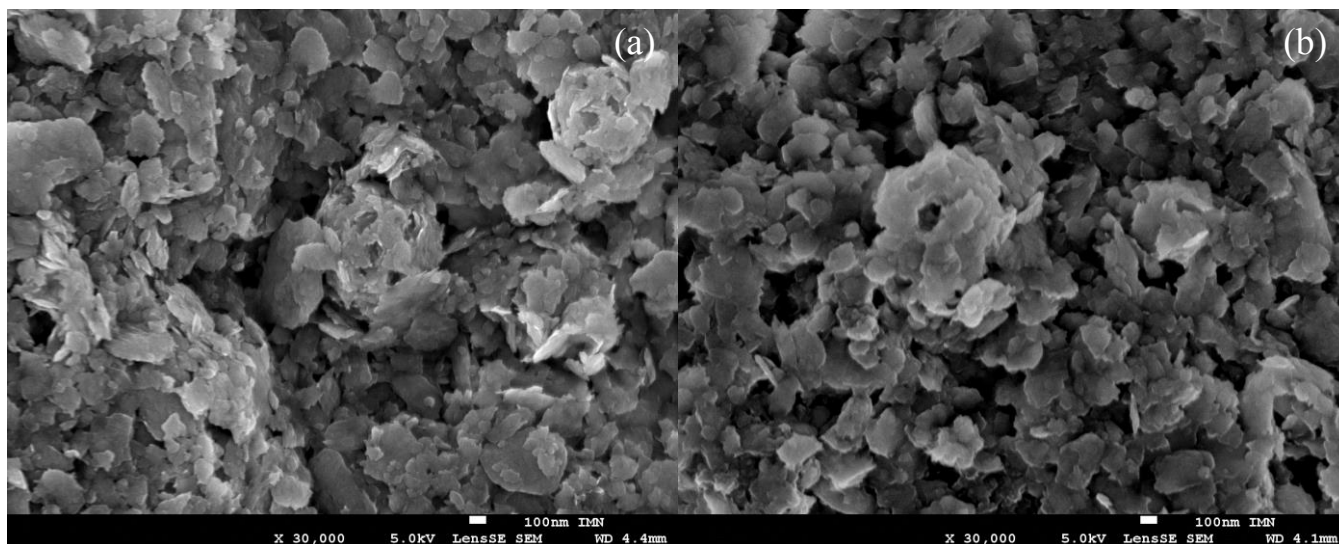


Figure 16 : Image MEB de feuillets d'illite après 28 jours (a) sans sidérophores et (b) avec 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de PVD purifiée

Les images MEB ne montrent aucune modification de la surface des feuillets d'illite et les images MET ne montrent pas d'écartement des espaces interfoliaires. En effet, les espaces interfoliaires de l'illite ont la même taille avec ou sans l'action de la PVD purifiée. La taille de l'espace interfoliaire a été mesurée et correspond à la valeur de référence pour l'illite : 1 nm. Ces instruments pourraient ne pas être assez sensibles

pour montrer la première étape de l'altération, d'autant plus que la quantité de fer dissout est très faible ($1,8 \times 10^{-2} \text{ mmol.L}^{-1}$).

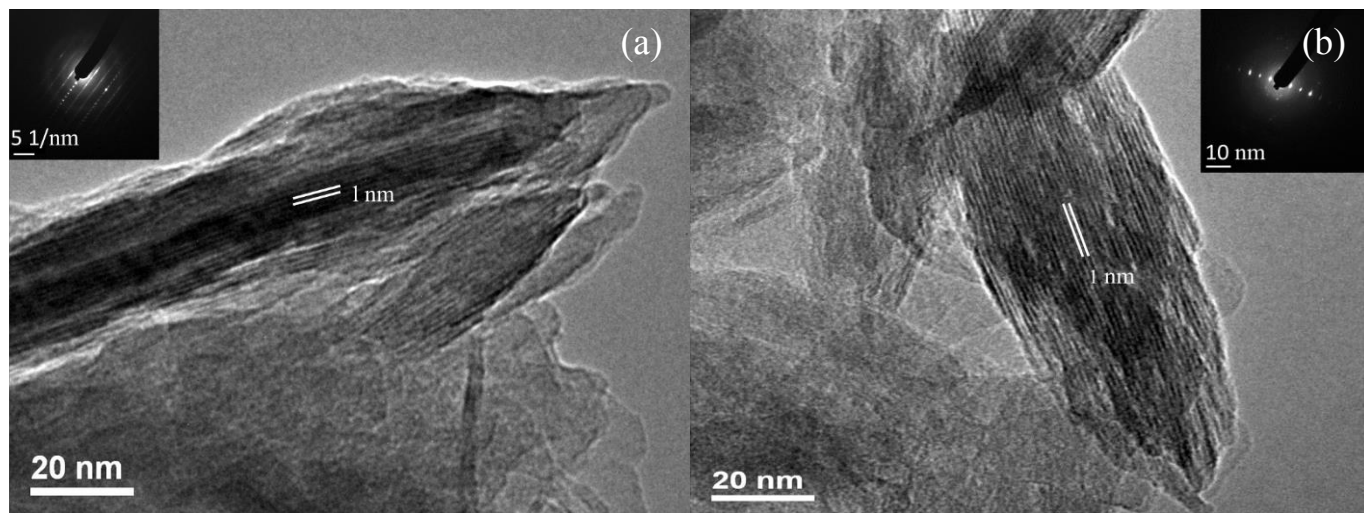


Figure 17 : Image MET de feuillets d'illite après 28 jours (a) sans sidérophore et (b) avec $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de PVD purifiée

1.5. Conclusion

La pyoverdine purifiée (PVD) et les métabolites produits par *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400 ont un effet important dans la désorption du Cs de l'illite (jusqu'à 43 % pour la PVD) contrairement à l'acide citrique et l'acide oxalique qui ont eu un effet négligeable sur la mobilisation de Cs. Ces résultats suggèrent que parmi l'ensemble des métabolites produits par *P. fluorescens*, la PVD est la plus impliquée dans la désorption du Cs de l'illite. Cette libération dans la solution du Cs de l'illite est accompagnée d'une dissolution de 30 % du fer de l'illite par ce même sidérophore. Ces résultats suggèrent une mobilisation indirecte du Cs par complexation du Fe par la PVD entraînant l'altération de l'illite. Cependant cette altération n'a pas pu être observée au MET ni au MEB. En plus de cette libération indirecte du Cs de l'illite, une désorption directe par échange ionique entre le Cs^+ et le carbocation du chromophore de la PVD est possible. Le Cs peut donc être libéré en solution par l'action de la PVD via deux actions concomitantes : la complexation correspondant à un mécanisme indirect et l'échange ionique correspondant à un mécanisme direct.

2. Désorption du césium de l'illite par *Pseudomonas fluorescens*

L'objectif de cette partie est, comme pour la première, de mobiliser le Cs de l'illite mais cette fois-ci, non pas en présence de molécules dont certaines peuvent être produites par des microorganismes (DFOM, PVD, acides citrique et oxalique), mais en présence des microorganismes eux-mêmes. L'objectif est ainsi de se rapprocher d'un système le plus réel possible afin de tester la phytoextraction associée à la bioaugmentation. Dans cette étude, la croissance de plusieurs bactéries du sol disponibles au laboratoire a préalablement été testée dans un milieu DF sans fer (Tableau 13) en présence de CsCl de façon à sélectionner la souche bactérienne présentant la croissance et la production de PVD la plus importante. Ce milieu de culture a été adapté à partir du milieu DF (Dworkin and Foster, 1958), un milieu minimum connu pour permettre la croissance de nombreuses bactéries et notamment des *Pseudomonas*. Le fer en solution étant un élément réprimant la production de PVD (Albrecht-Gary et al., 1994; Braud et al., 2009a), il a été retiré de la composition du milieu. La souche *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400 a été choisie comme étant la plus tolérante à des concentrations atteignant 1,2 mmol.L⁻¹ de Cs, sans modifier sa production de PVD (jusqu'à 115 µmol.L⁻¹) (Figure 24). Dans un premier temps, le rôle du biofilm de *P. fluorescens* sur la désorption du Cs de l'illite dopée aux mêmes concentrations que précédemment (10 et 100 mmol.L⁻¹) est étudié en employant le même milieu (NaCl, 1 mmol.L⁻¹). Des milieux de culture plus complexes sont ensuite testés. L'objectif est à la fois d'assurer la croissance bactérienne, la production de métabolites impliqués dans la mobilisation du Cs, tout en évitant que d'autres constituants du milieu de culture n'interagissent avec le Cs.

Tableau 13 : Composition chimique du milieu DF sans fer utilisé pour la croissance de *P. fluorescens* et favoriser la production de PVD

DF sans fer	
KH₂PO₄	4,0 g.L ⁻¹
Na₂HPO₄	6,0 g.L ⁻¹
(NH₄)₂SO₄	2,0 g.L ⁻¹
MgSO₄.7H₂O	0,2 g.L ⁻¹
Solution éléments traces (voir composition en annexe 1)	0,1 mL
Glucose	10,0 g.L ⁻¹
pH	7,2

2.1. Rôle du biofilm de *Pseudomonas fluorescens* sur la désorption du césium de l'illite dans une solution NaCl (1 mmol.L⁻¹)

Le rôle des bactéries avec et sans contact avec l'illite sur la désorption du césium de l'illite est étudié en utilisant la technique de la membrane de dialyse. Les pores de 12000 à 14000 Da de la membrane de dialyse laissent passer les

métabolites bactériens tout en retenant l'illite. Ainsi, en présence de la membrane de dialyse, les bactéries en croissance restent en suspension (bactéries dites « libres ») dans le milieu environnant (NaCl , 1 mmol.L^{-1}) alors qu'en son absence, elles forment naturellement un biofilm qui recouvre les particules d'illite ; les bactéries sont donc en contact direct avec l'illite. L'objectif de l'étude est de comparer l'action « directe » des bactéries sous forme de biofilm sur la mobilisation du Cs à l'action « indirecte » des métabolites bactériens produit par des bactéries en suspension et qui diffusent à l'intérieur de la membrane de dialyse. Dans un premier temps, cette expérience est réalisée avec le milieu NaCl (1 mmol.L^{-1}) utilisé dans la partie précédente sur la désorption du Cs de l'illite par des métabolites bactériens. Ce milieu ne permet pas la croissance des bactéries mais celles-ci sont pré-cultivées dans un milieu complet TSB, leur permettant d'accumuler des réserves pour produire des métabolites ensuite. Elles sont ensuite concentrées, lavées et ajoutées à une DO_{600} de 0,1 dans le milieu NaCl en présence d'illite dopée avec 10 ou 100 mmol.L^{-1} de Cs confinée ou non dans la membrane de dialyse (Figure 18).

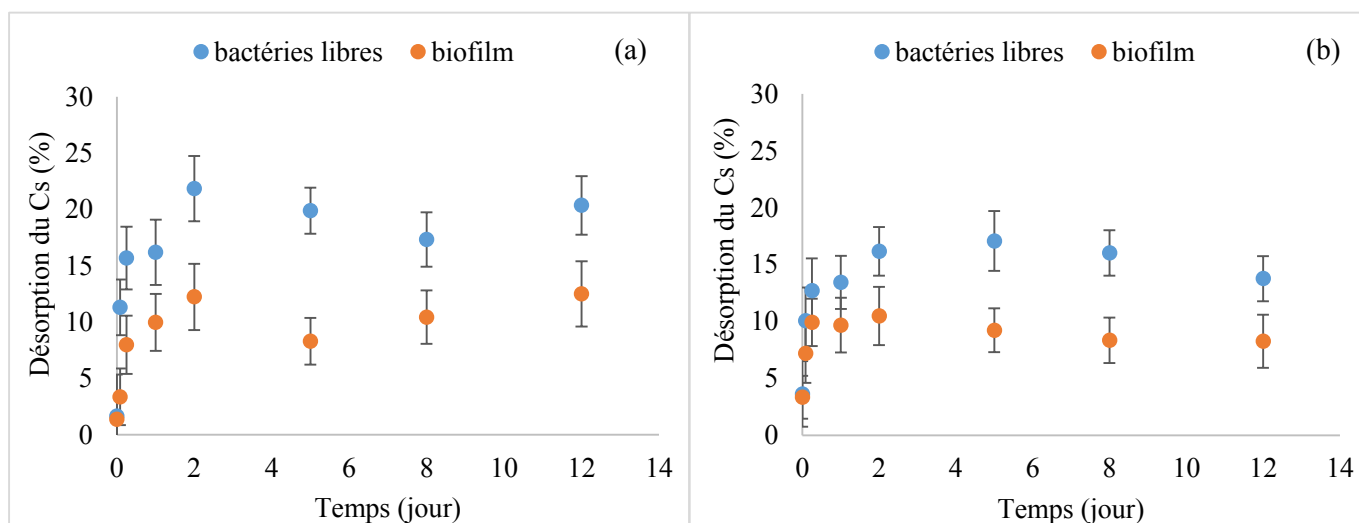


Figure 18 : Désorption du Cs de l'illite dopée avec (a) 10 mmol.L^{-1} ou (b) 100 mmol.L^{-1} de Cs et en présence de *P. fluorescens* cultivées dans du NaCl (1 mmol.L^{-1}) et présentes sous forme de biofilm (sans membrane de dialyse) ou de cellules libres en suspension (illite enfermée dans une membrane de dialyse)

Les résultats montrent jusqu'à 21 % de désorption du césium de l'illite lorsque les bactéries sont libres dans la solution, donc sans nécessité d'un contact direct avec l'illite dopée avec 10 mmol.kg^{-1} . En présence de l'illite dopée avec 100 mmol.kg^{-1} de Cs, la désorption observée est similaire (17 %). Jusqu'à 12 % de désorption du Cs sont également observés lorsque les bactéries ont la possibilité de former un biofilm directement autour de l'illite et ce, quelle que soit la concentration en Cs. La légère différence de désorption du Cs selon que les bactéries sont en contact ou non avec l'illite peut être due à : i) une plus faible production de métabolites bactériens en présence de biofilm. En effet, dans le cas de la PVD, sa production par les microorganismes est stimulée lorsque les bactéries

sont en manque de fer. Or, les bactéries formant un biofilm sont d'une part en contact direct avec l'illite et donc avec du fer structural, ce qui tendrait à réprimer la production de PVD. D'autre part, elles n'ont probablement pas besoin de produire autant de PVD pour mobiliser le fer, en raison des contraintes de diffusion imposées par le biofilm qui limitent la diffusion de la PVD dans le milieu de culture (et par conséquent sa dilution), ce qui aurait pour effet d'entretenir la production de PVD (Julou et al. 2013). A contrario, cette moindre production de PVD se traduirait par une altération moins efficace de l'illite avec une libération plus faible de Cs et, ii) la resorption du Cs dans le biofilm, qui constitue l'autre hypothèse. En effet, le biofilm est constitué d'exopolysaccharides (EPS) connus pour retenir les métaux et les radionucléides (Anderson et al., 2011; Teitzel and Parsek, 2003). Cette hypothèse aurait pu être vérifiée en analysant le Cs en fin d'expérience au sein du biofilm mais la quantité de biofilm produit était insuffisante pour permettre une analyse. Cette sorption a cependant été mise en évidence dans le paragraphe 2.2.2. Il est donc possible que *P. fluorescens* sous forme de biofilm désorbe plus de Cs que lorsqu'elle n'est pas en contact avec l'illite mais dans ce cas, le Cs n'est pas libéré dans la solution.

En conclusion de cette expérience, *P. fluorescens* est capable de désorber le Cs de l'illite de manière directe sous forme de biofilm ou indirecte via les métabolites bactériens et ce, dans un milieu ne permettant pas sa croissance. Nous avons par la suite étudié cette désorption du Cs de l'illite en présence de *P. fluorescens* cultivée dans des milieux de culture favorisant la croissance. La contrainte liée à l'utilisation de milieux de culture complexes est la compétition entre le Cs et les éléments des milieux de culture ; plus particulièrement le potassium et l'ammonium.

2.2. Optimisation des conditions de culture bactérienne

Dans un premier temps, la croissance de *P. fluorescens* est suivie dans différents milieux minimums permettant d'éviter la compétition ionique entre le césium et les constituants de ces milieux. En effet, le Cs^+ sorbé sur l'illite peut entrer en compétition avec le K^+ et le NH_4^+ principalement, et également, de façon moins importante, avec le Ca^{2+} (Benedicto et al., 2014; Staunton and Roubaud, 1997). Or, les microorganismes requièrent plusieurs éléments essentiels pour leurs croissances, notamment du C, H, K, N, O et P qui composent les milieux de culture habituels. Ces derniers ne peuvent donc pas être utilisés ici puisque des échanges ioniques entre le potassium et l'ammonium du milieu et le césium de l'illite créeraient un biais expérimental et ne permettraient plus de distinguer l'effet spécifique des métabolites bactériens sur la désorption du césium de l'illite de ceux des éléments du milieu de culture. Plusieurs adaptations du milieu de culture DF sont alors étudiées pour choisir le milieu de culture adapté à la croissance bactérienne et à la production de PVD, tout en évitant ces compétitions potentielles.

2.2.1. Test de croissance de *P. fluorescens* dans un milieu DF modifié

La première adaptation testée est la modification du milieu DF (Dworkin and Foster, 1958) (Tableau 14). Ce milieu contient une source de potassium sous forme de KH_2PO_4 et une source d'azote sous forme de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Ces éléments étant les principaux compétiteurs du Cs, la croissance de *P. fluorescens* est suivie au cours du temps dans

un milieu DF modifié, sans source de potassium ou d'ammonium (Figure 19). La composition des deux milieux testés ainsi que le milieu DF initial est présentée dans le tableau suivant (Tableau 14).

Tableau 14 : Composition chimique des différents milieux testés pour la croissance de *P. fluorescens*

	DF (Dworkin and Foster, 1958)	DF sans potassium	DF sans ammonium
KH₂PO₄	4,0 g.L ⁻¹	-	4,0 g.L ⁻¹
Na₂HPO₄	6,0 g.L ⁻¹	6,0 g.L ⁻¹	6,0 g.L ⁻¹
(NH₄)₂SO₄	2,0 g.L ⁻¹	2,0 g.L ⁻¹	-
MgSO₄.7H₂O	0,2 g.L ⁻¹	0,2 g.L ⁻¹	0,2 g.L ⁻¹
Solution éléments traces (voir composition en annexe 1)	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
Solution sulfate de Fe (voir composition en annexe 1)	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
Glucose	10,0 g.L ⁻¹	10,0 g.L ⁻¹	10,0 g.L ⁻¹
pH	7,2	7,2	7,2

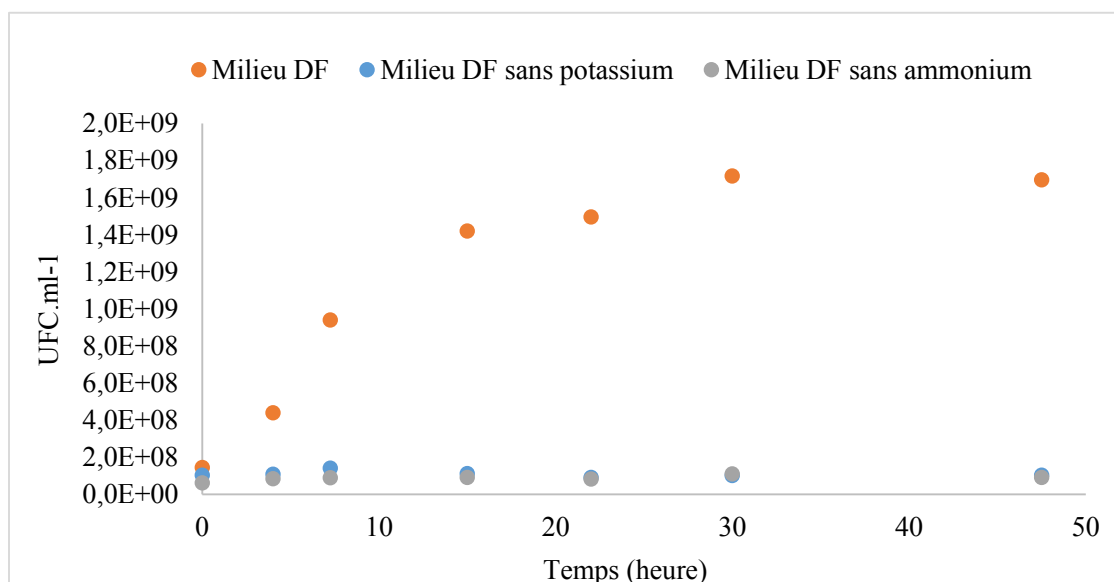


Figure 19 : Croissance de *P. fluorescens* dans le milieu minimum de culture DF avec ou sans source de potassium ou d'ammonium

Les résultats présentés dans la Figure 19 ne montrent aucune croissance cellulaire en l'absence de potassium ou d'ammonium, ce qui était prévisible puisque ces éléments sont essentiels à la croissance bactérienne. Ce milieu DF modifié ne permet donc pas de répondre à l'objectif fixé.

2.2.2. Billes d'alginate de calcium

Une deuxième adaptation est alors testée : des billes d'alginate de calcium préparées à partir d'une solution d'alginate contenant le milieu de culture DF sans fer et/ou les bactéries ou de l'illite dopée sont polymérisées dans une solution de CaCl_2 (Figure 20 et Figure 23 A, B). Ce système permettrait d'éviter tout contact et échange ionique entre l'illite dopée en Cs et le milieu de culture, tout en maintenant une croissance bactérienne et la production de PVD. Les billes d'alginate de calcium sont des supports utilisés généralement pour mimer l'immobilisation microbienne sous forme de biofilm. Ces techniques d'immobilisation permettent en effet de limiter les variations des conditions physico-chimiques et biologiques dans l'environnement immédiat des microorganismes et de favoriser l'adaptation de ces derniers à des stress environnementaux et ainsi d'améliorer la survie microbienne lorsque la technique de bioaugmentation est employée (van Elsas and Heijnen, 1990). L'alginate est un polysaccharide composé d'acide D-mannuronique et d'acide L-gluconique, obtenu à partir de différents types d'algues et produits également par certaines *Pseudomonas* lors de la formation de biofilms, ce qui en fait un support tout à fait adapté à ces bactéries (Cancela et al., 2003).

ETUDE DE LA MOBILITE DU CS DE L'ILLITE OU DU CS EN SOLUTION DANS LES BILLES D'ALGINATE DE CALCIUM (FIGURE 20 ET FIGURE 23 A)

Une première solution consiste à isoler du milieu de culture l'illite dopée en Cs dans les billes d'alginate de calcium, en formulant l'hypothèse que les bactéries pourraient croître en suspension dans le milieu DF sans fer (Tableau 13) et que la PVD et les autres métabolites bactériens pourraient diffuser suffisamment au sein des billes d'alginate de calcium pour mobiliser le Cs de l'illite. L'illite dopée aux deux concentrations (10 et 100 mmol.kg^{-1}) est ajoutée à la solution d'alginate de sodium (30 g.L^{-1}) puis la suspension apportée est polymérisée au contact de la solution de CaCl_2 (30 g.L^{-1}). Des billes témoin, sans illite, et ne contenant que du Cs (CsCl) ajouté à la solution d'alginate de sodium avant polymérisation, sont également réalisées et ajoutées à une solution de NaCl afin d'étudier la diffusion du Cs à travers ses billes.

Quel que soit la forme sous laquelle se trouve le Cs (Cs mélangé à l'alginate de sodium ou Cs sorbé à l'illite), il ne diffuse pas au travers des billes d'alginate de calcium. Le Cs étant chargé positivement, il s'est très probablement sorbé sur les billes mimant le biofilm. Cette observation répond à l'hypothèse soulevée dans le paragraphe 2.1 quant à la sorption du Cs à l'intérieur du biofilm de l'illite. En effet, les groupements carboxyliques des polysaccharides de l'alginate sont chargés négativement dans un milieu neutre ou alcalin, ce qui est le cas dans notre étude ($\text{pH } 7 \pm 0.3$). Ces groupements ont en effet une grande affinité pour les cations qui peuvent être fixés par échange d'ions

avec les protons des groupements carboxyliques (Arica et al., 2004; Ibáñez and Umetsu, 2004). Malheureusement, une fois le Cs éventuellement désorbé par les métabolites bactériens, il se resorbe sur les billes d'alginate de calcium ce qui empêche son dosage en solution.

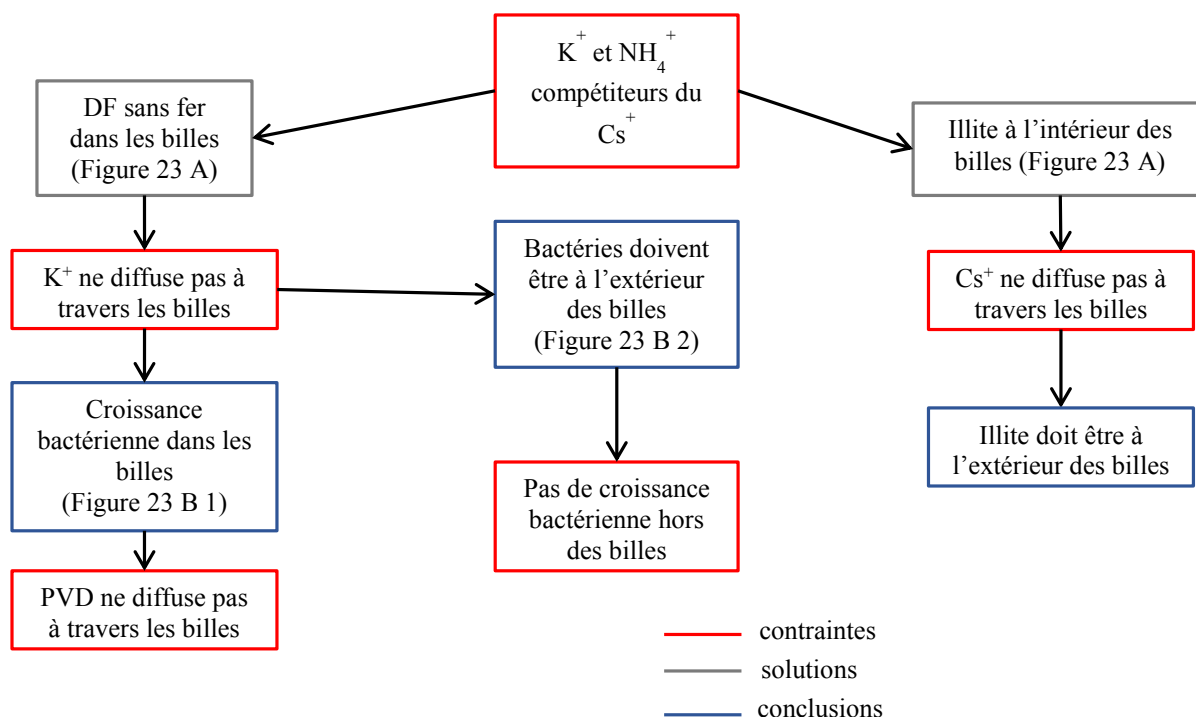


Figure 20 : Schéma récapitulatif des questions posées, solutions apportées et conclusions obtenues pour l'optimisation des conditions de culture de *Pseudomonas fluorescens* en vue de l'utiliser en présence d'illite dopée en Cs

MILIEU DE CROISSANCE DANS LES BILLES : ÉTUDE DE LA DIFFUSION DES CONSTITUANTS DU MILIEU DF SANS FER A TRAVERS LES BILLES D'ALGINATE DE CALCIUM (FIGURE 20 ET FIGURE 23 A)

Le contraire a alors été testé : l'illite a été mise en suspension dans la solution de NaCl à 1 mmol.L⁻¹ alors que le milieu DF sans fer a été immobilisé dans les billes d'alginate de calcium.

Cette alternative consiste à isoler le milieu de croissance bactérien, et notamment le potassium et l'ammonium, dans des billes d'alginate de calcium afin de les séparer de l'illite dopée en Cs en suspension dans le milieu de culture liquide. Les billes d'alginate de calcium contenant les composés du milieu DF sans fer (le milieu DF sans fer additionné d'alginate de sodium à 30 g.L⁻¹, le tout polymérisé au contact d'une solution de CaCl₂ à 30 g.L⁻¹) sont tout d'abord ajoutées à une solution de NaCl (1 mmol.L⁻¹) sans illite, et le potassium (issu de sa désorption

éventuelle des billes) est dosé en solution après 48h d'agitation. Les analyses montrent une diffusion maximum de 8 % du potassium des billes d'alginate de calcium vers la solution. Cette quantité de potassium en solution est faible et sa rapide consommation par les bactéries pourrait suffire à éviter toute compétition avec le Cs de l'illite. La croissance des bactéries à l'intérieur et à l'extérieur des billes peut alors être testée.

ETUDE DE LA CROISSANCE DE *P. FLUORESCENS* IMMOBILISEES DANS LES BILLES D'ALGINATE DE CALCIUM OU CULTIVEES EN SUSPENSION EN PRESENCE DE BILLES D'ALGINATE DE CALCIUM ET DE SA PRODUCTION DE PYOVERDINE (FIGURE 23 B)

L'illite dopée en Cs devant être dans le milieu environnant et isolé du milieu de croissance bactérien, les bactéries peuvent être à l'intérieur ou à l'extérieur des billes d'alginate de calcium. La croissance bactérienne et la production de PVD sont alors suivies au cours du temps suivant différentes modalités :

- 1) *P. fluorescens* est immobilisée en plus du milieu DF sans fer dans des billes d'alginate de calcium (correspondant à un volume d'environ 3ml). La concentration bactérienne est plus élevée que celle des cultures libres, de manière à obtenir dans le volume total de la culture, la même concentration bactérienne (Figure 23 B 1) ;
- 2) *P. fluorescens* est ajouté dans le milieu environnant en présence de billes contenant le milieu DF sans fer dans le but de faire croître les bactéries à l'extérieur en admettant qu'elles forment un biofilm autour des billes et qu'elles mobilisent les nutriments contenu dans celles-ci (Figure 23 B 2) ;

1) Lorsque les bactéries sont immobilisées dans les billes d'alginate contenant le milieu DF sans fer, aucune croissance bactérienne n'est observée (Figure 20 et Figure 23 B 1). L'hypothèse avancée est que les concentrations en éléments chimiques du milieu de croissance n'étaient pas assez élevées pour la quantité de bactéries ajoutée. Le test a donc été renouvelé en augmentant les concentrations des composés du milieu DF sans fer (jusqu'à la limite de solubilisation de certains éléments dans l'eau et la limite de toxicité du glucose pour les bactéries). Avec un milieu DF sans fer concentré 5 fois, la croissance bactérienne est plus élevée que dans le milieu DF sans fer lorsque les bactéries sont en suspension (Figure 21). Cette plus forte croissance peut être due à la concentration en bactéries environ 10 fois plus élevée au départ ou encore à l'immobilisation. Plusieurs auteurs ont, en effet, montré l'effet positif de l'immobilisation bactérienne sur la croissance microbienne (Hall, 1998; van Elsas et al., 1992).

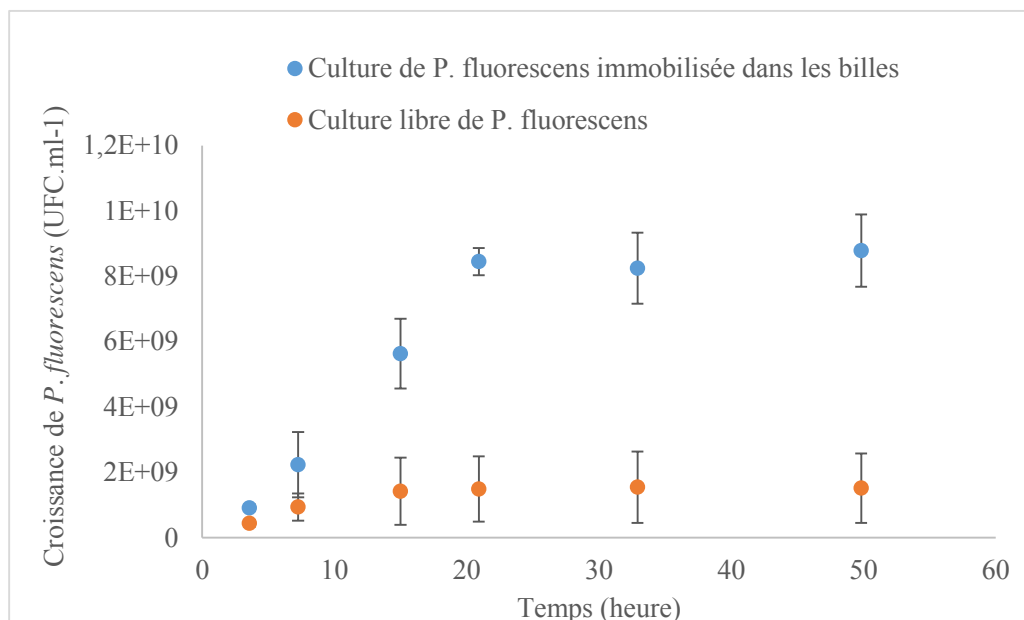


Figure 21 : Croissance de *P. fluorescens* immobilisée dans des billes d'alginate contenant du milieu DF sans fer concentré 5 fois comparée à une culture libre dans du milieu DF sans fer

La production de PVD est quant à elle analysée dans la solution et dans les billes d'alginate de calcium après les avoir dissoutes. L'analyse montre une concentration très faible de PVD dans la solution comparée à celle mesurée dans les billes d'alginate de calcium et ce, indépendamment de la concentration du milieu de culture (Figure 22). La PVD ne diffuse donc pas à travers les billes d'alginate de calcium, contrairement aux métabolites neutres de faible poids moléculaire (Kierstan and Bucke, 1977; Zezza et al., 1993). Par exemple, *P. fluorescens* piégée dans des billes d'alginate de calcium à 30 g.L⁻¹ libre dans le milieu des substances antibiotiques tels que des phloroglucinols (Russo et al., 1996). En revanche la PVD, qui fait partie des métabolites secondaires produits par *P. fluorescens*, est une molécule complexe et chargée positivement (Figure 3) ; elle peut donc être retenue dans le réseau de l'alginate comme le Cs⁺ ce qui corrobore les résultats obtenus par Julou et al.(2013) un biofilm de *P. aeruginosa*.

L'illite dopée devant être à l'extérieur des billes et la PVD diffusant très peu à travers de celles-ci, cette adaptation ne permettrait donc pas d'observer l'effet des métabolites bactériens sur la mobilisation du Cs de l'illite.

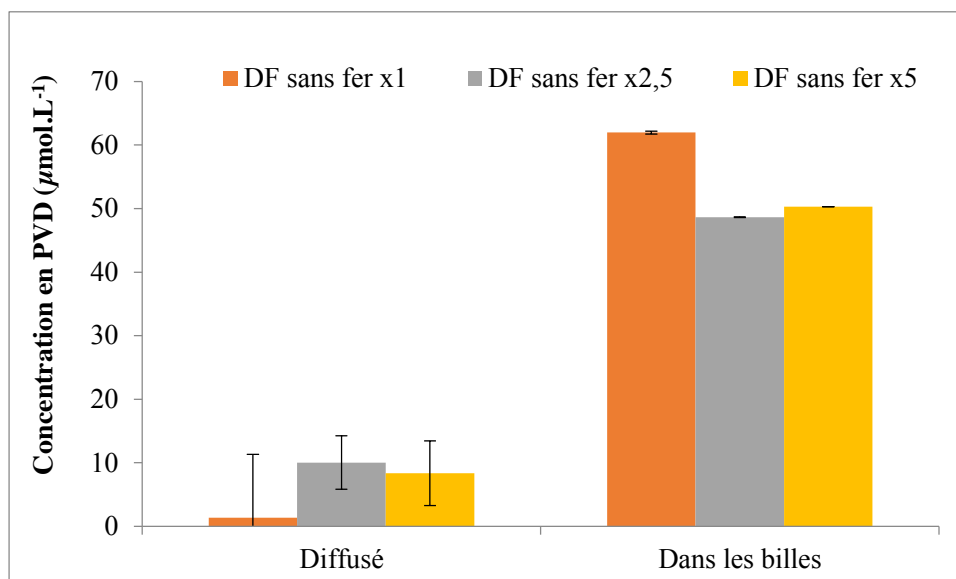
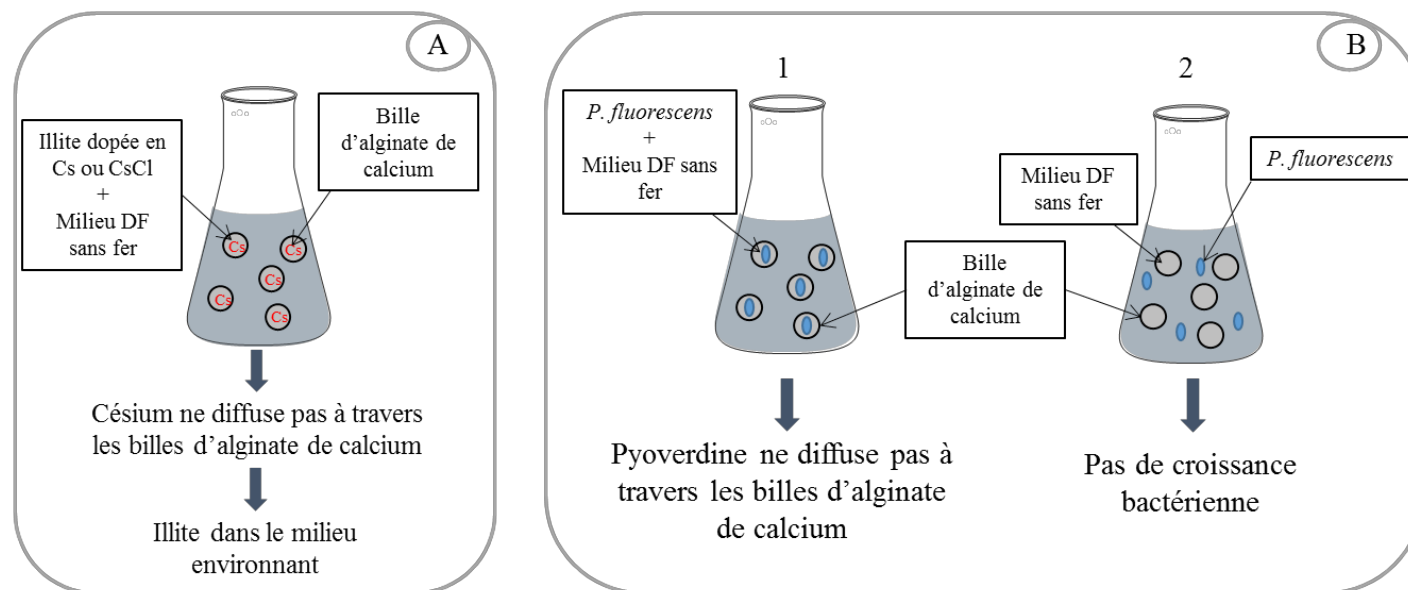


Figure 22 : Concentration en PVD produite par *P. fluorescens* immobilisée dans des billes d'alginate de calcium contenant du milieu DF sans fer concentré 1, 2,5 ou 5 fois

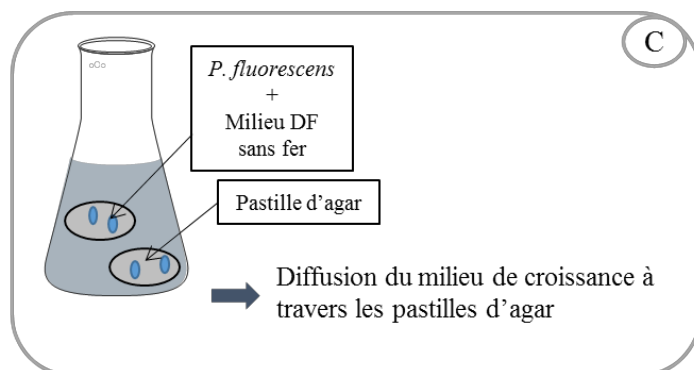
2) La deuxième alternative consiste à placer les bactéries à l'extérieur des billes d'alginate de calcium contenant le milieu DF sans fer ajouté à la solution d'alginate de sodium avant qu'il soit polymérisé au contact du CaCl_2 (Figure 20 et Figure 23 B 2). L'hypothèse avancée est que les bactéries forment un biofilm autour des billes d'alginate de calcium et qu'elles mobilisent les nutriments nécessaires à leur croissance contenus dans celles-ci (comme à la surface d'une gélose nutritive sur boîtes de Pétri) puisque les nutriments comme le potassium diffusent peu à travers les billes. Cependant, aucune croissance bactérienne n'a été observée. Le test a donc été renouvelé en augmentant les concentrations des éléments du milieu de croissance comme précédemment mais à nouveau aucune croissance n'est observée. Les bactéries ne sont pas capables de prélever les nutriments nécessaires. Des billes d'alginate de calcium avec des pourcentages plus faibles d'alginate de sodium et de chlorure de calcium ont été réalisées afin de faciliter la mobilisation des éléments nutritifs mais aucun des tests n'a été probant.

Aucune des combinaisons utilisant des billes d'alginate de calcium n'est finalement adaptée. Les billes d'alginate de calcium ne peuvent donc pas être utilisées pour éviter le contact du Cs de l'illite et les composés du milieu de culture bactérien.

Billes d'alginate de calcium



Pastilles d'agar



Milieu de croissance DF K

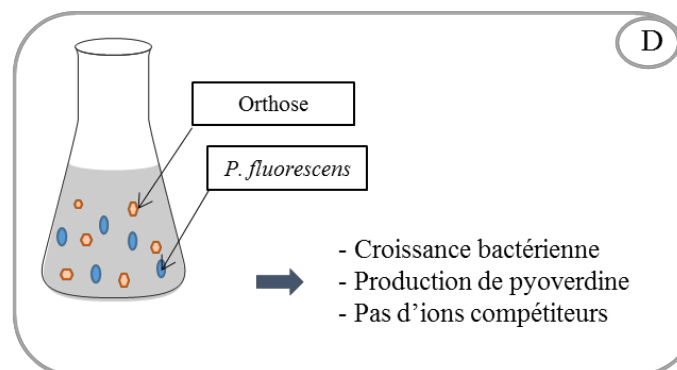


Figure 23 : Schéma décrivant les différentes étapes de tests réalisés pour l'optimisation des conditions de culture de *Pseudomonas fluorescens* en vue de l'utiliser en présence d'illite dopée en Cs avec les billes d'alginate de calcium (A et B), les pastilles d'agar (C) et le nouveau milieu DF K (D)

2.2.3. Pastilles d'agar

L'agar est un polymère différent de l'alginate, dont la polymérisation est réalisée thermiquement et non chimiquement, ce qui évite les interactions entre les ions. L'agar est classiquement utilisé pour la croissance de microorganismes en milieu solide. Les mêmes expériences de croissance bactérienne en culture libre en présence de pastilles d'agar contenant le milieu DF sans fer ont été réalisées (Figure 23 C). Dans ce cas, les bactéries se développent de la même façon qu'en culture libre mais après analyse de la solution contenant les pastilles d'agar en fin d'expérience (48h), près de 50 % du potassium du milieu DF sans fer est présent en solution. Le milieu de croissance diffuse donc trop vite à travers les pastilles d'agar qui ne permettent donc pas de l'isoler et les bactéries ne consomment pas assez rapidement le potassium pour obtenir une concentration de potassium en solution suffisamment faible et éviter ainsi une compétition avec le Cs. Ce système ne peut pas être utilisé pour la suite de l'étude.

2.2.4. Milieu minimum de croissance modifié : source de potassium insoluble

La dernière adaptation consiste à modifier le milieu de croissance en utilisant d'autres sources de potassium et d'azote (Figure 23 D). *P. fluorescens* est capable d'assimiler les nitrates et les nitrites. La source d'azote $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ du milieu DF est remplacée par du nitrite de sodium (NaNO_2). Pour la source de potassium, de la poudre de feldspath potassique à 1 g.L^{-1} est ajoutée au milieu liquide. Différentes études ont montré que les bactéries étaient capables de croître dans un milieu exempt de potassium et d'altérer des minéraux sous forme de poudre contenant du potassium afin de subvenir à leur besoin nutritif (Parmar and Sindhu, 2013; Sheng et al., 2008).

Le feldspath potassique utilisé ici est l'orthose qui est préalablement réduit en poudre et analysé afin de vérifier la concentration en potassium et en fer. Pour une concentration en fer supérieure à $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, la production de sidérophores est inhibée (Braud et al., 2009b; Díaz de Villegas et al., 2002). Or, un des objectifs de cette étude est de produire des sidérophores afin de reproduire les conditions de la première partie de ce chapitre. Le minéral potassique choisi doit donc contenir du potassium à une concentration suffisante pour la croissance bactérienne mais beaucoup moins de fer afin d'éviter une concentration en Fe aqueux supérieur à $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$. C'est le cas de l'orthose qui, après analyse, est composée de $2,78 \text{ mmol.g}^{-1}$ de K et de $9,68 \text{ mmol de Fe.g}^{-1}$ d'orthose. En supposant que cette faible concentration en fer ne soit pas entièrement accessible, la quantité de fer en solution devrait être assez faible pour pouvoir permettre la production de PVD. La composition de ce nouveau milieu de croissance est présentée dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Composition chimique du milieu de culture nommé DF K testé pour la croissance de *P. fluorescens* et la production de PVD

DF K	
Na₂HPO₄	6,0 g.L ⁻¹
NaNO₂	0,6 g.L ⁻¹
MgSO₄.7H₂O	0,2 g.L ⁻¹
Orthose	1,0 g.L ⁻¹
Solution éléments traces (voir composition en annexe 1)	0,1 mL
Glucose	10,0 g.L ⁻¹
pH	7,2

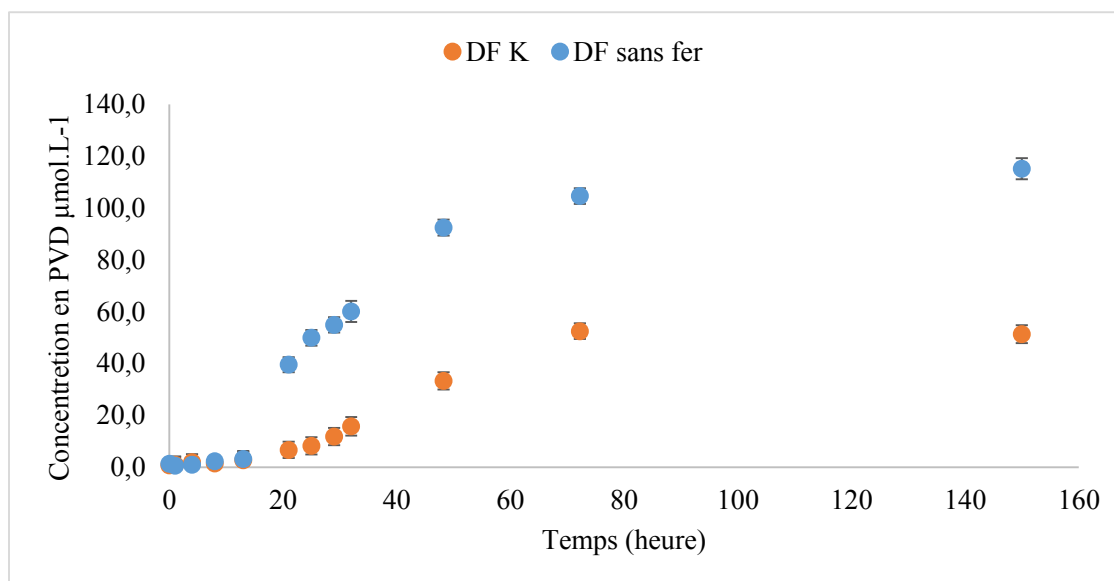


Figure 24 : Production de PVD par *P. fluorescens* cultivée dans les milieux DF sans fer et DF K (orthose)

Au cours de leur croissance dans ce nouveau milieu nommé DF K, les bactéries forment un biofilm autour de l'orthose (la mesure de la DO_{600nm} n'a donc pas montré de croissance mais un biofilm était visible à l'œil nu) et produisent des sidérophores en solution (Figure 24). La cinétique de production de PVD est plus lente que dans le milieu DF sans fer. En effet, la concentration maximale de PVD atteint 50 µmol.L⁻¹ au bout de 72 heures pour le

milieu DF K contre 24h pour le DF sans fer. Le potassium en solution est également analysé au cours du temps afin de vérifier que les bactéries n'en solubilisent pas plus qu'elles n'en consomment (Figure 25).

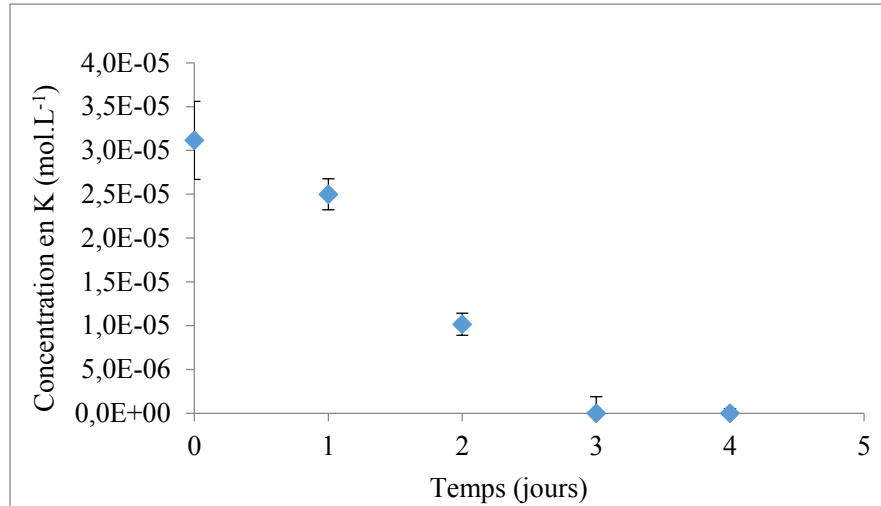


Figure 25 : Concentration en potassium dans le milieu de croissance modifié DF K cultivé avec *P. fluorescens*

La concentration de potassium en solution est au départ de $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ et provient de l'équilibre entre le milieu et la poudre d'orthose. Au bout de 3 jours, sa concentration en solution diminue jusqu'à sa disparition. Cette diminution du potassium en solution peut venir de sa consommation par les bactéries qui se trouve en solution, ou de sa sorption à l'intérieur du biofilm qui se forme autour de l'orthose. Dans les deux cas, le potassium n'est pas en solution et ne peut donc pas entrer en compétition ionique avec le Cs de l'illite.

Cette adaptation utilisant ce nouveau milieu minimum de croissance DF K avec une source de potassium solide permet donc une croissance de *Pseudomonas fluorescens* ainsi qu'une production de PVD sans contamination du milieu de culture par du potassium.

Le rôle direct des bactéries sur la désorption du césium de l'illite peut alors être testé dans ce milieu modifié DF K.

2.3. Rôle du biofilm de *Pseudomonas fluorescens* sur la désorption du césium de l'illite dans le milieu DF K

Le rôle des bactéries avec et sans contact avec l'illite sur la désorption du césium de l'illite peut alors être étudié avec ce nouveau milieu de croissance DF K de la même façon que dans le paragraphe 2.1 à l'aide de membranes de dialyse retenant l'illite dopée en Cs (10 et 100 mmol.kg⁻¹).

Lors de cette expérience, une croissance bactérienne est observée (cinétique conforme à celle observée dans le paragraphe 2.2.4) mais lors de l'analyse du Cs en solution au cours du temps, aucune différence n'est observée par rapport au témoin correspondant à l'illite dopée en suspension sans ajout de *P. fluorescens*. Pourtant, jusqu'à 25 µmol.L⁻¹ de PVD est produit dans le milieu en présence d'une membrane de dialyse c'est-à-dire lorsque les bactéries ne forment pas de biofilm. La PVD pourrait ne pas avoir d'effet à cette concentration sur la désorption du Cs de l'illite. Une expérience de désorption abiotique du Cs de l'illite, utilisant de la PVD purifiée, est alors réalisée en la concentrant à 25 µmol.L⁻¹ afin de vérifier cette hypothèse (Figure 26).

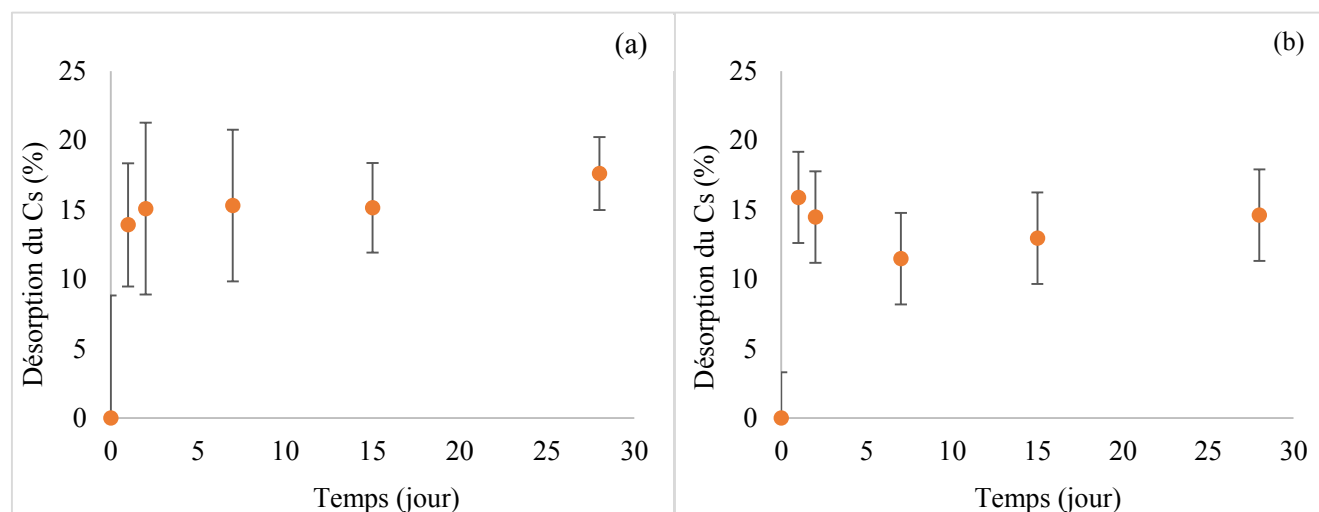


Figure 26 : Désorption du Cs de l'illite dopée avec (a) 10 mmol.L⁻¹ ou (b) 100 mmol.L⁻¹ de Cs et en présence de 25 µmol.L⁻¹ de PVD purifiée à partir d'une culture de *P. fluorescens*

Les résultats montrent qu'il y a environ 15 % de Cs désorbé au maximum par la PVD purifiée à 25 µmol.L⁻¹ en un ou deux jours quelle que soit la concentration en Cs de l'illite au départ. Cela équivaut au pourcentage de désorption observé en présence de 50 µmol.L⁻¹ de PVD purifiée (Figure 9). La faible concentration en PVD produite par les bactéries en présence de la membrane de dialyse n'explique alors pas l'absence de désorption du Cs de l'illite. Une autre hypothèse pourrait être l'état physiologique des bactéries. Le milieu DF K est un milieu dans lequel les

bactéries se développent mais lorsque l'illite est mise en contact direct ou indirect, les bactéries ont déjà 3 jours de croissance correspondant au temps de consommation du potassium dans le milieu, afin d'éviter toute compétition avec le Cs. A ce moment, la culture bactérienne est déjà en phase stationnaire voire en phase de déclin. Le Cs désorbé par la PVD pourrait alors se re-sorber à la surface des bactéries vivantes et/ou mortes. Alors que l'étude de Tomioka et al. (1992) montre que la souche de *P. fluorescens* n'accumule pas le Cs, il est probable qu'elle le sorbe, la sorption étant un phénomène passif contrairement à l'accumulation bactérienne. En revanche, de grandes disparités existent entre les souches d'une même espèce bactérienne. Mais l'expérience dans le milieu NaCl du paragraphe 2.1 répond déjà partiellement à cette hypothèse. En effet, dans cette expérience, les 21 % de Cs désorbé de l'illite ne sont pas re-sorbés sur les parois des bactéries puisqu'ils sont dosés en solution. Néanmoins, cette observation ne permet pas de réfuter entièrement l'hypothèse d'une sorption du Cs sur les bactéries. Elle est en effet possible mais dans ce cas la désorption du Cs de l'illite est plus importante que la re-sorption du Cs sur les parois bactériennes. Une dernière hypothèse pourrait être que le Cs désorbé par la PVD se re-sorbe sur l'orthose altérée par les bactéries.

2.4. Conclusion

Qu'elle soit sous forme de biofilm ou sous forme « libre », *P. fluorescens* est capable de désorber le Cs de l'illite respectivement jusqu'à 21 % et 17 %. Cette désorption étant possible dans un milieu ne permettant pas la croissance bactérienne, elle devrait être d'autant plus importante dans un milieu adapté à la culture de *P. fluorescens* et à la production de métabolites bactériens. Néanmoins, la compétition ionique entre le Cs et le potassium et/ou l'ammonium empêche cette observation. Plusieurs alternatives ont été testées et permettent de définir des incompatibilités à savoir que les billes d'alginate de calcium ainsi que les pastilles d'agar ne sont pas adaptées pour répondre à ces contraintes (Figure 20 et Figure 23). Un nouveau milieu de croissance contenant une source d'azote sous forme de nitrite et une source de potassium solide est validée pour la croissance bactérienne et la production de PVD. Malheureusement, aucune désorption du Cs de l'illite n'est observée dans ces conditions. Le rôle de *Pseudomonas fluorescens* sur la désorption du Cs de l'illite, dans des conditions de culture favorables à la croissance bactérienne, n'a donc pas pu être précisé. Des questions restent encore sans réponse et le dispositif doit encore être amélioré.

3. Phytoextraction du césium

Le trèfle violet est sélectionné comme plante accumulatrice de Cs ayant une croissance rapide et dont les graines sont facilement disponibles. Cette plante est testée en culture hydroponique et en pot de sols en présence de Cs plus ou moins biodisponible : entièrement biodisponible en solution (CsCl) à $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ et plus ou moins bioaccessible lorsqu'il est adsorbé à l'illite dopée avec 10 mmol.kg^{-1} de Cs ou en pot de sol. L'absorption du Cs par la plante avec ou sans ajout de *P. fluorescens* et/ou de PVD est étudiée dans cette partie et fait l'objet d'une publication en cours de rédaction.

3.1. En culture hydroponique

Après une pré-culture du trèfle violet en hydroponie dans du milieu Hoagland, les plants sont transférés dans une solution NaCl (1 mmol.L^{-1}) en présence de Cs soluble, CsCl ou adsorbé à l'illite. Le rôle du biofilm de *P. fluorescens* est étudié en utilisant, ou non, une membrane de dialyse pour confiner l'illite dopée et ainsi éviter aux bactéries inoculées de former un biofilm qui ralentirait la libération du Cs en solution et par conséquent son accumulation par la plante. Le Cs est analysé au cours du temps dans la solution (Figure 29 et Figure 30) et dans les parties aériennes et les parties racinaires des plants de trèfle après 12 jours de culture (Figure 31, Figure 33, Figure 32, Figure 34, Figure 35 et Figure 36). Au cours des 12 jours de culture en hydroponie, les flacons sont régulièrement pris en photo (Planche 1 et Planche 2) et le nombre de tiges vivantes et mortes est noté en début et en fin d'expérience afin de calculer le nombre de nouvelles tiges et le pourcentage de mortalité pour chaque modalité (Figure 27, Figure 28).

3.1.1. Evolution des plants de trèfle violet au cours du temps

Dans un premier temps, avant l'analyse du Cs dans la solution ou dans les plantes, le calcul du nombre de tiges en début et en fin d'expérience montre que le trèfle violet se développe de la même façon quelles que soient les modalités (Figure 27) malgré l'aspect visuel des plantes au cours du temps qui diffère selon ces mêmes modalités (Planche 1 et Planche 2). Cette différence est clairement reliée au pourcentage de mortalité calculé après 12 jours de culture (Figure 28).

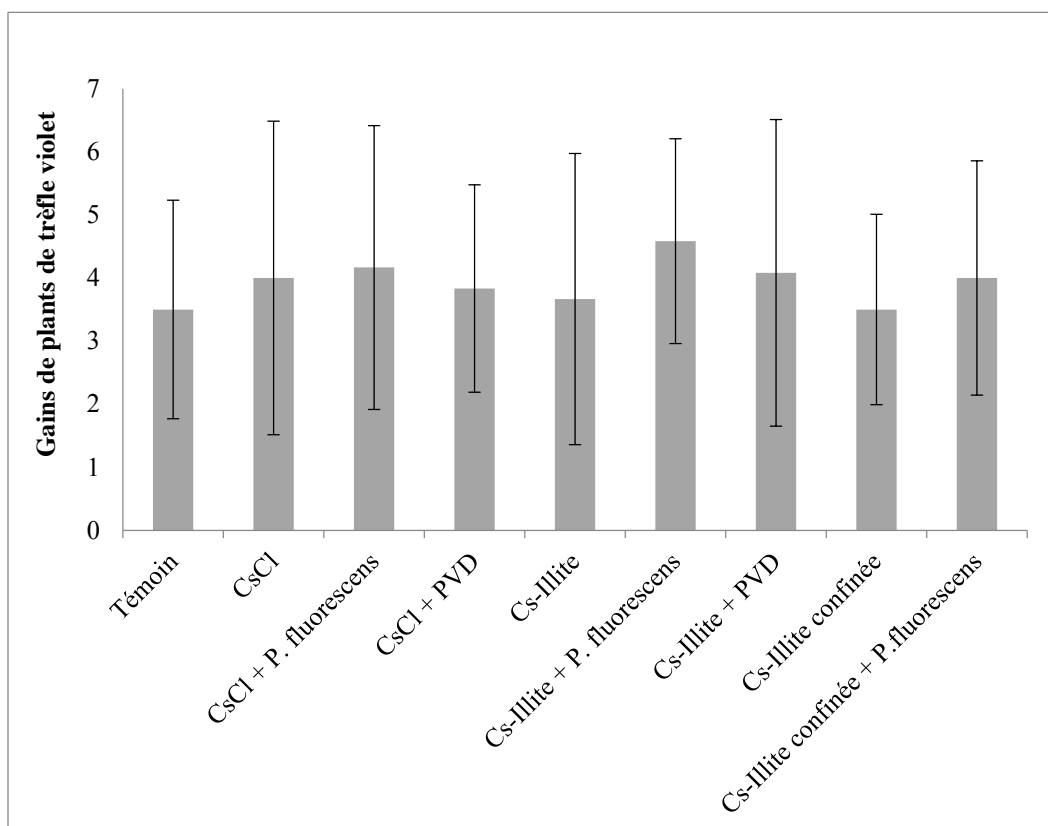


Figure 27 : Nombre de nouveaux plants de trèfle violet (feuille + tige) après 12 jours de culture en hydroponie dans une solution de NaCl 1 mmol.L⁻¹ et du Cs sous forme soluble (CsCl) ou sous forme adsorbée sur l'illite confinée ou non dans une membrane de dialyse avec ou sans ajout de *Pseudomonas fluorescens* ou de PVD purifiée à 50 μmol.L⁻¹

En effet, en présence de PVD (en présence ou non d'illite) jusqu'à 51 % des plantes meurent en 12 jours alors que le témoin et la modalité avec *P. fluorescens* ne diffèrent pas, avec une mortalité qui n'excède pas 11 % (Figure 28). La PVD est donc toxique pour le trèfle dans ces conditions de culture. Cette toxicité n'a jamais été observée auparavant sur les plantes à ces concentrations. Au contraire, dans plusieurs études, la PVD ajoutée ne modifie pas et même favorise parfois la croissance de la plante (Cornu et al., 2014; C. Ferret et al., 2014b). Pour cette étude, la purification de la PVD est réalisée grâce à une résine très faiblement polaire (Amberlite® XAD4) qui a été décrite comme permettant d'extraire le moins d'impureté possible en plus des sidérophores de type hydroxamate et des phénol/catéchol (Bertrand, 2009). Pourtant, il est possible qu'en plus de la PVD, la résine concentre également des éléments du milieu de culture CAA ainsi que d'autres métabolites primaire et secondaires produits par *P. fluorescens* qui, à trop forte dose, seraient toxiques pour le trèfle violet. En effet, la résine retient les molécules polaires comme la PVD mais également d'autres catégories de molécules comme les phospholipides ou des acides organiques produits par les

bactéries. Certains de ces acides organiques comme l'acide citrique sont connus pour être toxique pour certaines plantes à trop forte concentration (Turgut et al., 2004).

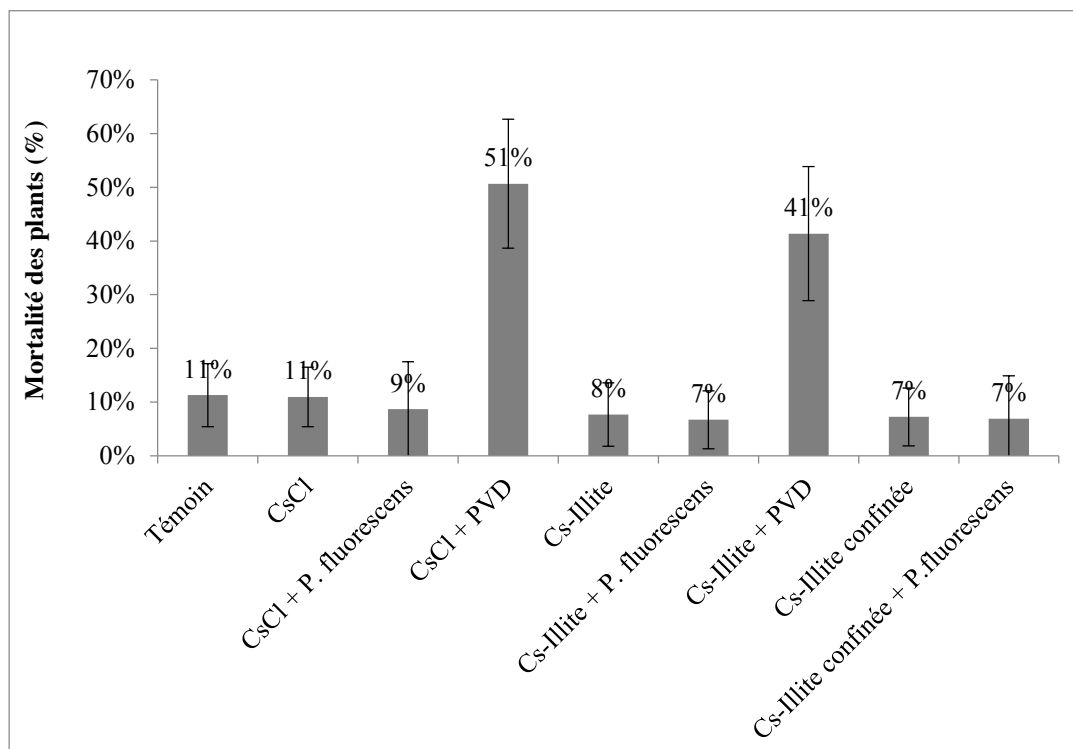


Figure 28 : Proportion de plants de trèfle violet morts (feuille + tige) après 12 jours de culture en hydroponie dans une solution de NaCl 1 mmol.L⁻¹ et du Cs sous forme soluble (CsCl) ou sous forme adsorbée sur l'illite confinée ou non dans une membrane de dialyse avec ou sans ajout de *Pseudomonas fluorescens* ou de PVD purifiée à 50 μmol.L⁻¹

La mortalité pourrait également s'expliquer par une toxicité spécifique de la PVD sur le trèfle violet. En effet, Cornu et al. (2014) qui utilisent la même méthode de purification de la PVD par la résine Amberlite® XAD4 n'observent aucune toxicité sur la tomate et l'orge alors que la molécule purifiée est ajoutée à plus forte concentration (250 μmol.kg⁻¹). Grčman et al., (2001) montrent par exemple que l'EDTA et EDDS, des complexant du fer utilisés pour améliorer la phytoextraction de métaux dans les plantes, sont également très toxiques pour le trèfle violet. Cette toxicité s'observe également par nécrose des feuilles puis des tiges mais n'est pas observée pour d'autres plantes utilisées dans la même étude comme le chou chinois (*Brassica rapa*).

La toxicité de la PVD est également visible au cours du temps (Planche 1 et Planche 2) où les plantes fanent dès le 5^{ème} jour (les feuilles puis les tiges). Un jaunissement des feuilles apparaît par ailleurs au 12^{ème} jour en présence de *P. fluorescens* et un début de jaunissement dans le cas du témoin CsCl. Les bactéries semblent

donc induire un léger stress sur la croissance du trèfle, conséquence possible des métabolites bactériens produits par *P. fluorescens*. Bien que le milieu NaCl ne favorise pas la croissance bactérienne, les bactéries ayant été pré-cultivées dans le milieu DF sans fer favorisant notamment la production de PVD, des métabolites et en particulier la PVD a probablement été produite. Mais cette production est beaucoup moins importante que celle de la modalité où elle a été ajoutée purifiée. La présence d'un biofilm de *P. fluorescens* autour des racines de trèfle pourrait aussi expliquer ce stress entraînant ce jaunissement. Ce biofilm pourrait en effet limiter les échanges d'ions et de métabolites entre les racines et la solution. Cependant, dans la modalité en présence d'illite confinée dans la membrane de dialyse (Planche 2), les bactéries ajoutées forment également un biofilm autour des racines, mais cela n'entraîne pas de jaunissement des feuilles.

Planche 1 : Photos des flacons de culture en hydroponie des trèfles violet au cours du temps en fonction des différentes modalités testées avec ou sans Cs ($\text{CsCl } 0.1 \text{ mmol.L}^{-1}$)

	NaCl	CsCl	CsCl + <i>P. fluorescens</i>	CsCl + PVD
T1 jour				
T 5 jours				
T 12 jours				

Planche 2 : Photos des flacons de culture en hydroponie des trèfles violet au cours du temps en fonction des différentes modalités testées en présence de Cs sous forme adsorbé sur l'illite

	Illite	Illite + <i>P. fluorescens</i>	Illite + PVD	Illite confinée	Illite confinée + <i>P. fluorescens</i>
T 1 jour					
T 5 jours					
T 12 jours					

3.1.2. Concentration en césium dans la solution au cours du temps

Dans un deuxième temps, le Cs en solution est mesuré (Figure 29 et Figure 30). Indépendamment de sa biodisponibilité (totalement biodisponible en solution ou bioaccessible adsorbé sur l'illite), sa concentration en solution diminue au cours du temps. Dans le cas où le Cs est apporté sous forme soluble à $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ (Figure 28), la diminution de sa concentration en solution ne peut provenir que de l'absorption par la plante. Ainsi, 88,7 %, 84,1 % et 58,8 % du Cs est consommé par la plante en 12 jours dans le témoin « CsCl », en présence de *P. fluorescens* ou de PVD respectivement. La présence de bactéries ne modifie pas sa cinétique en solution ($6,1 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{jour}^{-1}$), comparé au témoin « CsCl » ($6,4 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{jour}^{-1}$), contrairement à la PVD ($3,6 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{jour}^{-1}$). En effet, à partir de 8 jours la concentration en Cs en solution dans la modalité avec PVD est significativement plus élevée ($0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$) que dans le témoin « CsCl » ($0,02 \text{ mmol.L}^{-1}$) et la modalité « CsCl + *P. fluorescens* » ($0,03 \text{ mmol.L}^{-1}$).

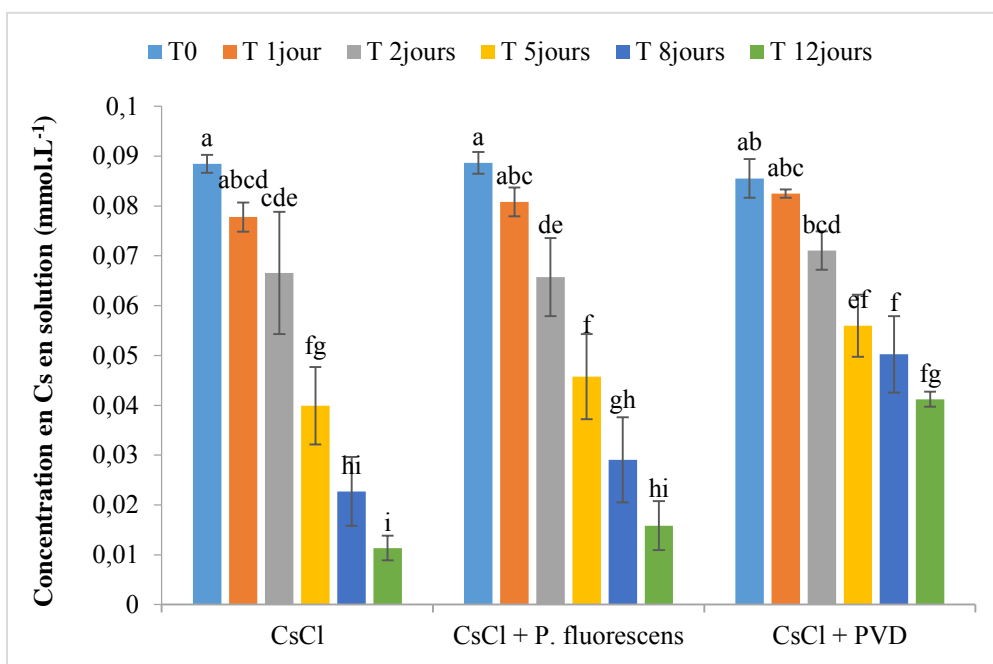


Figure 29 : Concentration en Cs au cours du temps dans la solution de NaCl en présence de Cs sous forme soluble à $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ (CsCl) et avec ajout ou non de bactéries ou de PVD

Lorsque le Cs est apporté sous forme adsorbée à l'illite (Figure 30), sa concentration en solution augmente significativement après 1 jour, ce qui correspond au temps d'équilibre de l'illite ajoutée à la solution de NaCl, puis elle diminue plus ou moins rapidement selon les modalités. Lorsque le Cs est apporté sous forme adsorbé sur l'illite, la diminution de sa concentration en solution est la résultante de deux mécanismes : i) la désorption du Cs de l'illite et ii) son absorption par la plante. Lorsque la concentration en Cs en solution augmente cela signifie que la vitesse de désorption du Cs est supérieure à la vitesse de prélèvement par la plante et lorsque la concentration en Cs en

solution diminue, ce phénomène s'inverse. Les observations faites à partir de ces seuls résultats doivent alors être comparées et complétées avec les résultats de la quantité de Cs retrouvée dans le trèfle violet (voir paragraphe 3.1.3). De manière générale, on remarque que la concentration de Cs en solution n'excède pas $0,7 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Dans le cas de l'ajout de bactéries, aucune différence significative n'est observée au cours du temps par rapport au témoin. Par contre en présence de PVD, la baisse de la concentration de Cs en solution au cours du temps est moins importante dans les derniers jours, T8 et T12 jours, comme ce qui a été observé lorsque le Cs est sous forme soluble (Figure 29). Après 12 jours d'expérience, il reste 3 fois plus de Cs dans la solution en présence de PVD par rapport au témoin « Cs-Illite ». Cette concentration plus élevée en Cs en présence de PVD peut facilement être reliée à la mortalité des plants de trèfles correspondants (Figure 28).

Toujours pour les modalités avec illite, on notera que la concentration en Cs à T0 est plus importante en présence de PVD ($0,6 \mu\text{mol.L}^{-1}$) que dans le témoin ($0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Ce prélèvement correspond au premier de l'expérience mais 40 minutes environ se sont déjà écoulées entre la préparation des flacons et le premier prélèvement. Ce délai suffirait à la PVD pour désorber cette quantité supplémentaire de Cs comparé au témoin « illite ». Lors des expériences en conditions abiotiques de désorption du Cs de l'illite, en présence de sidérophores à différentes concentrations (partie 1 de ce chapitre), le premier prélèvement était réalisé plus rapidement puisque la préparation des expériences nécessitait moins de manipulation, d'où l'absence de différence à T0 entre le témoin et la modalité avec de l'illite. On peut donc supposer que dès 40 minutes de contact, la PVD est capable de désorber le Cs.

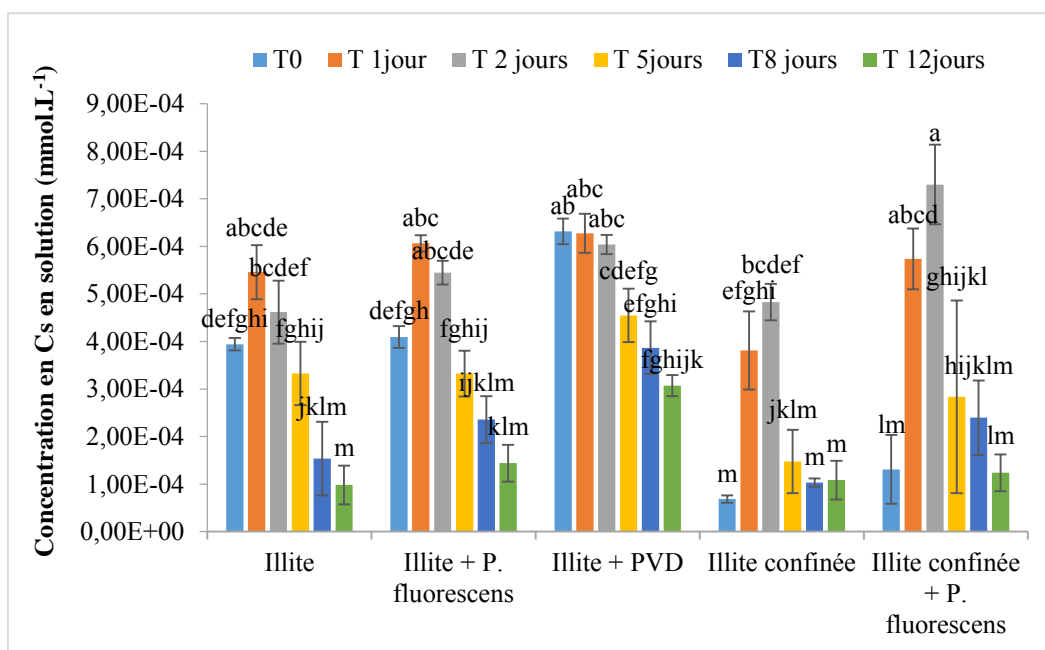


Figure 30 : Concentration du Cs au cours du temps dans la solution de NaCl en présence de Cs sous forme adsorbée à l'illite à 10 mmol.kg^{-1} et avec ajout ou non de bactéries ou de PVD

La modalité en présence de boudin de dialyse appelé « illite confinée » correspond à la modalité où l'illite dopée est confinée dans le même type de membrane de dialyse que dans la partie précédente (voir partie 2 de ce chapitre. Cette modalité permet d'étudier l'effet des métabolites seuls, qui peuvent traverser la membrane, indépendamment de l'action directe des bactéries qui colonisent l'illite sous forme de biofilm. La présence de biofilm pourrait par ailleurs limiter le transport du Cs, mobilisé à partir de l'illite, vers la solution et donc limiter son prélèvement par la plante. Comme précédemment, la concentration de Cs en solution est la résultante de la mobilisation du Cs à partir de l'illite et de sa consommation par la plante. L'analyse des résultats suivants doit, comme précédemment, être mise en regard de l'analyse de la concentration de Cs dans la plante (voir paragraphe 3.1.3). Lorsque l'illite dopée est confinée, la libération de Cs dans la solution pendant les deux premiers jours de prélèvement est plus lente que lorsque l'illite est « libre » dans la solution. En effet, il faut 2 jours pour atteindre des concentrations similaires en Cs dans la solution (environ $0,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Cette différence peut être due au temps de diffusion du Cs à travers la membrane de dialyse ou à la sorption du Cs sur le matériel utilisé pour fermer la membrane de dialyse. En effet, la membrane est fermée à un bout avec une ficelle et à l'autre bout avec un sert-clip en polypropylène. Le Cs chargée positivement peut s'être sorbé sur la ficelle avant d'être consommé par la plante. Le Cs peut également s'être sorbé sur des biofilms différents selon les modalités. En effet, l'environnement de la plante en contact direct ou non avec l'illite étant différent, les biofilms qui se sont développés sont différents, ainsi que la structure de la communauté microbienne. Les bactéries formant ces biofilms peuvent provenir des racines bien que les graines aient été stérilisées, de l'air ambiant ou du dispositif de pré-culture Araponix® qui ne peut pas être stérilisé. Cette modalité « illite confinée » peut être également comparée à celle avec ajout de bactéries en dehors de la membrane de dialyse où les exsudats bactériens peuvent agir sur l'illite en plus des exsudats racinaires. Dans ce cas, une différence significative de libération du Cs en solution est observée dans les deux premiers jours ($0,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ sans bactéries contre $0,7 \mu\text{mol.L}^{-1}$ avec). Les exsudats bactériens ont, comme observé dans la partie 2 de ce chapitre, un rôle dans la libération du Cs de l'illite. Mais cela ne se traduit pas par un prélèvement accru de Cs par la plante.

3.1.3. Phytoextraction du césium par le trèfle violet

Après 12 jours de culture, les concentrations et les quantités de Cs dans les racines et les parties aériennes sont mesurées après les avoir séparées, lavées, séchées et pesées puis minéralisées. Les Figure 31 et Figure 32 correspondent aux expériences où le Cs est apporté en solution en concentration et en quantité respectivement et les Figure 33 et Figure 34 lorsqu'il est adsorbé à l'illite. Pour chaque modalité, le facteur de translocation (FT) correspondant à la concentration en Cs dans les parties aériennes rapportée à celle des racines est calculé, de même que le facteur de bioaccumulation (FB) correspondant à la concentration en Cs dans la plante rapportée à celles de la solution ou du sol (Tableau 16).

Lorsque le Cs est totalement disponible dans la solution sous la forme CsCl, le trèfle violet est capable de l'accumuler dans ses parties racinaires et également de le transloquer vers les parties aériennes (Figure 31).

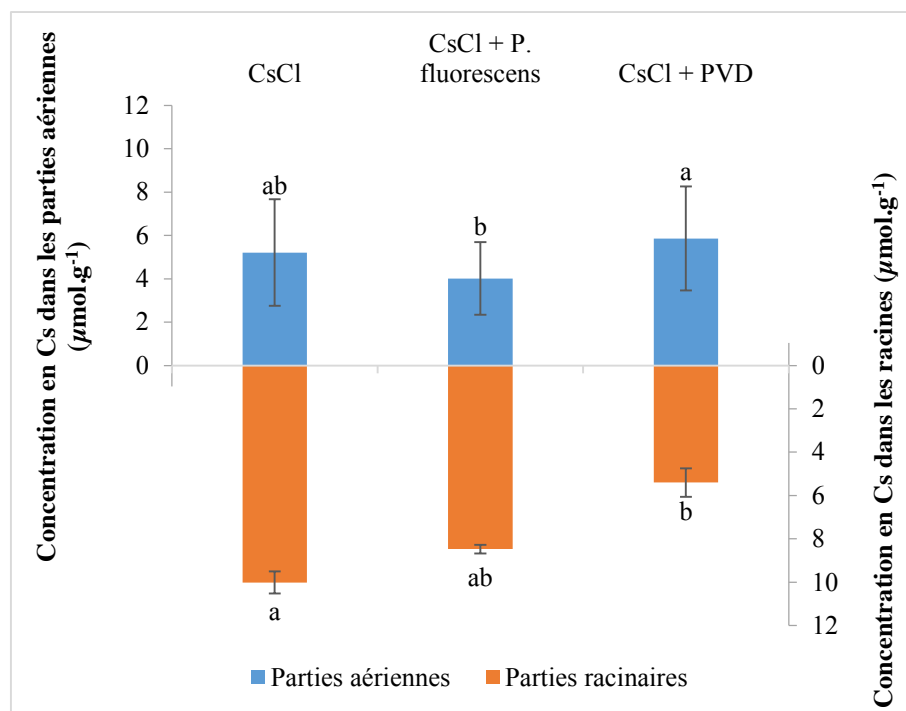


Figure 31 : Concentration en Cs dans les parties aériennes et les parties racinaires des plants de trèfle violet en présence de Cs sous forme soluble : CsCl à 0,1 mmol.L⁻¹ dans la solution de NaCl

En effet après 12 jours, dans le témoin CsCl, 10 μmol de Cs g⁻¹ de matière sèche (MS) sont accumulés dans les parties racinaires et jusqu'à 5,2 μmol.g⁻¹ dans les parties aériennes. Le facteur de translocation est assez faible (0,5), le trèfle n'étant pas réputé pour être une plante hyperaccumulatrice (Tableau 16). Le facteur de bioaccumulation est en revanche très élevé (152) en raison de la biodisponibilité totale du Cs en solution.

En présence de *P. fluorescens*, la concentration est significativement plus faible dans les parties aériennes (4,0 μmol.g⁻¹) et plus faible dans les parties racinaires (8,5 μmol.g⁻¹) que dans le témoin. Le FB est alors inférieur (124) au témoin. Le FT est en revanche du même ordre de grandeur (0,47).

P. fluorescens ne favorise donc pas l'accumulation du Cs dans le trèfle violet et n'augmente pas la translocation racines-parties aériennes ; de même que cette bactérie ne favorise pas la croissance du trèfle (Figure 27). Pourtant, *P. fluorescens* est connu pour favoriser la bioaccumulation des métaux par les plantes et leur croissance (Hoflich

and Metz, 1997). En effet, les *Pseudomonas* sont des PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) qui agissent sur la croissance et le développement des végétaux et permettent d'augmenter le prélèvement des métaux par la plante en augmentant à la fois la croissance végétale et en agissant sur la mobilité des métaux dans le sol par le biais des sidérophores et des acides organiques (Glick, 2003). L'hypothèse du biofilm qui réduirait les transferts de Cs de la solution vers les racines pourrait être la cause de cette faible bioaccumulation. Le Cs peut en effet être sorbé sur le biofilm formé autour des racines, comme cela a été démontré dans la partie 2 de ce chapitre.

Tableau 16 : Pourcentage de dépollution, facteur de translocation (FT) et facteur de bioaccumulation (FB) du trèfle violet après 12 jours de culture dans une solution NaCl (1 mmol.L^{-1}) dopée en Cs en solution ($0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$) ou sorbé à l'illite (10 mmol.kg^{-1}), en présence ou non de *P. fluorescens* ou de PVD purifiée ajoutée à $50 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$

	FT	FB	% de dépollution par les parties aériennes
CsCl	0,52	152,27	53,22
CsCl + <i>P. fluorescens</i>	0,47	124,86	33,17
CsCl + PVD $50 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$	1,08	112,61	33,23
Illite	0,25	2,53	0,45
Illite + <i>P. fluorescens</i>	0,464	1,59	0,45
Illite + PVD $50 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$	0,62	1,19	0,32
Illite confinée	0,18	3,10	0,38
Illite confinée + <i>P. fluorescens</i>	0,34	2,79	0,60

En présence de PVD, le FB (112) est proche de celui du témoin (152). Le TF est en revanche plus important (1,08) en raison d'une concentration racinaire beaucoup plus faible ($5,4 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$ contre $10,0 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$ dans le témoin). La PVD qui entraîne la mortalité des plants, ne permet pas de bioaccumuler plus de Cs mais favorise par contre la translocation du Cs vers les parties aérienne du trèfle violet. Cette capacité d'augmentation de la translocation des métaux dans les parties aériennes de plantes par la PVD n'a jamais été montrée. Par contre, d'autres complexants comme l'EDTA, par exemple, sont connus pour augmenter le FT de métaux dans les plantes (Shahid et al., 2013).

Quelle que soit la modalité, les FB sont très importants comparés à ceux de la littérature pour cette plante (Takeda et al., 2013; Veresoglou et al., 1995; Wu et al., 2009). Cette différence s'explique par la moindre biodisponibilité du Cs dans ces études réalisées dans un sol où le Cs est plus difficilement mobilisable par la plante car adsorbé sur les argiles ou la matière organique.

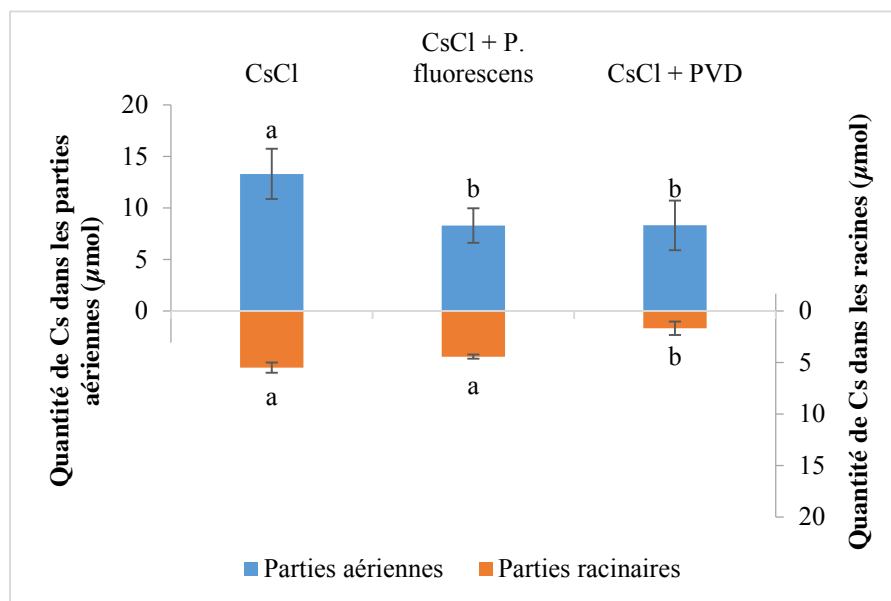


Figure 32 : Quantité de Cs dans les parties aériennes et dans les parties racinaire des plants de trèfle violet en présence de Cs sous forme soluble : CsCl à $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ dans la solution de NaCl avec ou sans ajout de bactéries et de pyoverdine (PVD)

Les quantités de Cs des parties aériennes du trèfle violet de la modalité témoin « CsCl » ($13,3 \text{ } \mu\text{mol}$) sont supérieures à celles de la modalité avec ajout de bactéries ou de PVD ($8,3 \text{ } \mu\text{mol}$ toutes deux) (Figure 32). Ces plus faibles quantités s'expliquent par la biomasse plus faible pour ces modalités due à la mortalité des plants (Figure 28). A partir des données en quantité de Cs dans les parties aériennes du trèfle violet et de la quantité de Cs ajouté initialement, le pourcentage de dépollution de la solution est calculé (Tableau 16). Le trèfle violet est alors capable d'extraire jusqu'à 53,2 % du Cs dans ces parties aériennes dans le témoin contre 33,2 % lorsque le dispositif est bioaugmenté par *P. fluorescens* ou la PVD. Pour les parties racinaires, l'ajout de PVD diminue significativement la quantité de Cs accumulé ($1,7 \text{ } \mu\text{mol}$ contre $5,5 \text{ } \mu\text{mol}$ de Cs accumulé dans les parties racinaires du témoin), comme pour les concentrations.

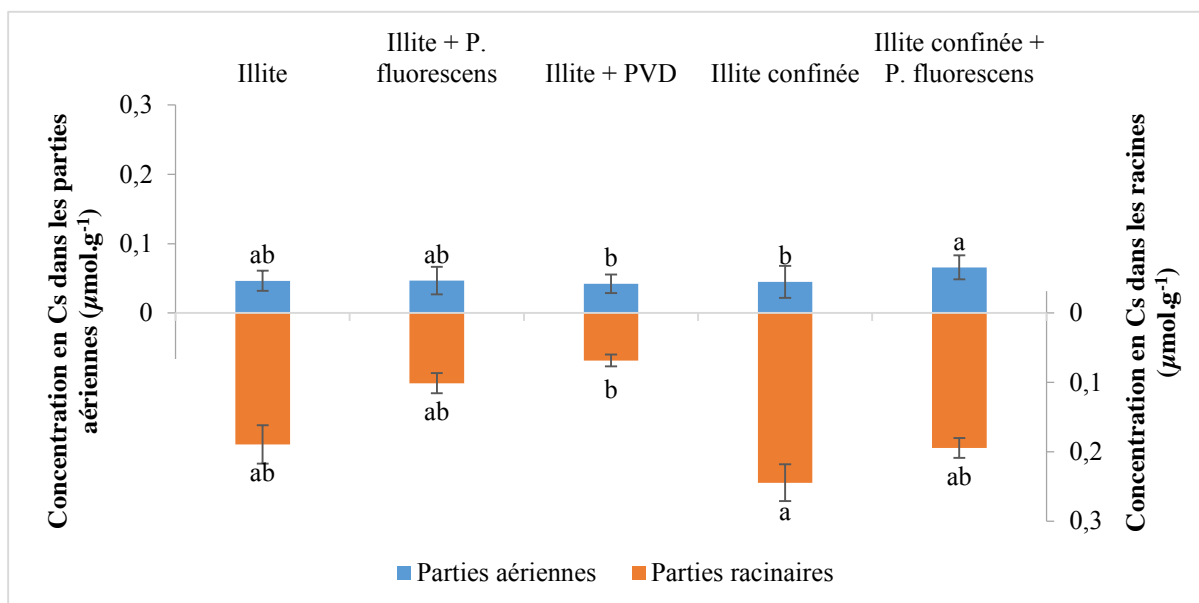


Figure 33 : Concentration en Cs dans les parties aériennes et les parties racinaires des plants de trèfle violet lorsque le Cs est apporté adsorbé à l'illite à 10 mmol.kg^{-1} de suspension dans la solution NaCl

Lorsque le Cs est présent dans la solution sous forme adsorbé à l'illite, la plante est également capable de l'absorber dans ses parties racinaires et aériennes (Figure 33) mais à des niveaux beaucoup plus bas. Comme dans l'expérience avec le Cs en solution, une accumulation du Cs s'observe préférentiellement dans les racines, quelle que soit la modalité. Par ailleurs les faibles niveaux d'accumulation de Cs (plus d'un ordre de grandeur de différence), aussi bien dans les racines que dans les parties aériennes, s'expliquent probablement par la durée de l'expérience qui n'excède pas 12 jours. En effet, puisque le Cs est mobilisé comme le potassium (Collander, 1941; White and Broadley, 2000), élément essentiel à la croissance des plantes on peut escompter des concentrations maximales en Cs beaucoup plus élevées.

La modalité nommée « Illite confinée » empêchant la formation d'un biofilm à la surface de l'illite est celle qui possède le FB le plus important (3,1) (Tableau 16). L'absence de biofilm augmente la biodisponibilité du Cs adsorbé pour partie sur le biofilm, et permet alors une accumulation plus importante du Cs par la plante.

Pour la modalité « Illite + *P. fluorescens* », les concentrations en Cs des racines et des parties aériennes sont les mêmes que celles du témoin (Figure 33). Il se confirme que *P. fluorescens* ne permet pas l'accumulation supplémentaire de Cs par la plante. Par contre, lorsque seuls les exsudats bactériens interagissent avec l'illite – modalité nommée « Illite confinée + *P. fluorescens* », alors le trèfle violet accumule plus de Cs, le FB est plus élevé (Tableau 16). C'est aussi dans ce cas qu'il y avait plus de désorption du Cs de l'illite (Figure 30) et que le

pourcentage de dépollution est le plus élevée (0,60 %) (Tableau 16). Lorsque l'illite n'est pas confinée dans la membrane de dialyse, le biofilm formée autour de l'illite par les bactéries, pourrait empêcher la libération du Cs dans la solution et donc sa consommation par la plante.

En présence de PVD, la concentration en Cs (et donc le FB de 1,2) est la plus faible. En revanche, le FT (0,61) est le plus important comparé à celui pour le témoin (0,24) des autres modalités (Tableau 16). Malgré sa rapide toxicité entraînant la mortalité des plants de trèfle violet, la PVD permet une translocation plus importante du Cs vers les parties aériennes.

En termes de quantité de Cs accumulé par les parties aériennes du trèfle (Figure 34), aucune différence n'apparaît en comparaison des résultats en concentration. Le calcul du pourcentage de phytoextraction du Cs par les parties aériennes du trèfle violet permet d'observer une nette différence en termes de biodisponibilité du Cs. En effet, lorsque le Cs est sorbé sur l'illite seulement 0,45 % du Cs est accumulé par les parties aériennes du trèfle (Tableau 16). Et l'ajout de la PVD diminue le pourcentage de phytoextraction (0,32 %). La phytoextraction est légèrement plus efficace lors de l'ajout de *P. fluorescens* à l'illite confinée (0,60 %) mais reste tout de même faible. Pour les parties racinaires c'est également le cas sauf pour la modalité où l'illite est confinée dans une membrane de dialyse et que *P. fluorescens* est ajoutée au surnageant (modalité « Illite confinée + *P. fluorescens* »). Dans ce cas-là, en termes de quantité, il n'y a pas de différence significative avec ou sans ajout de bactérie. Dans ce cas, *P. fluorescens* n'a probablement pas les nutriments nécessaires pour sa croissance puisque l'illite devant lui servir de source de nutriment n'est pas accessible. Les bactéries n'ont alors aucun effet sur le trèfle violet.

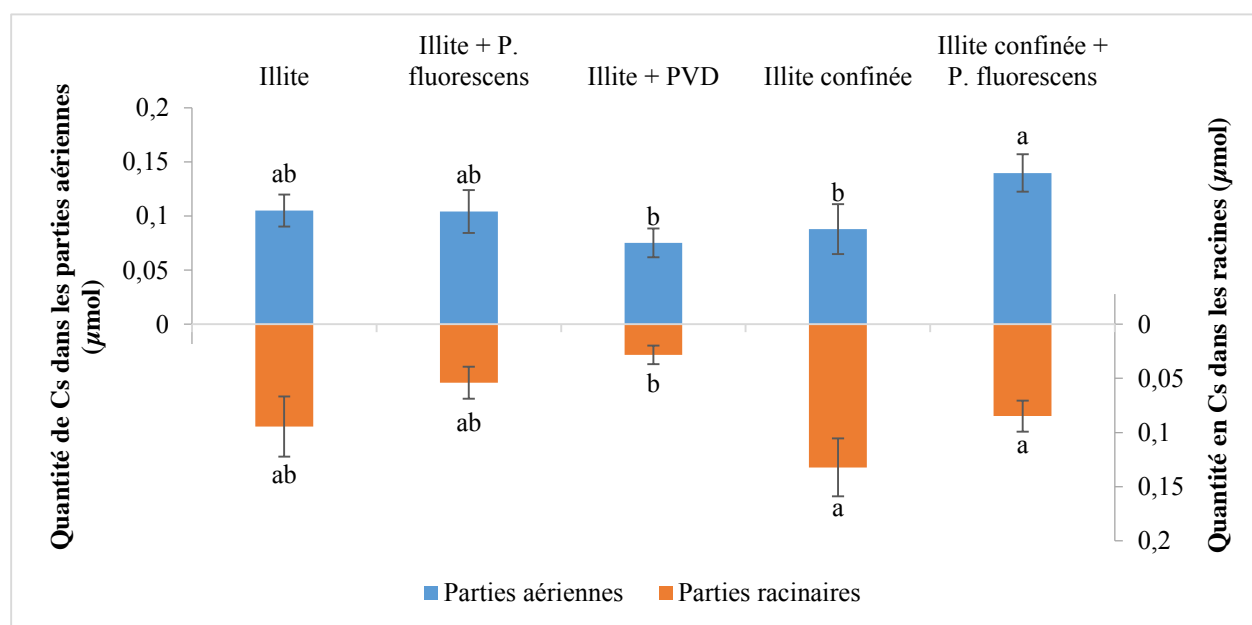


Figure 34 : Quantité de Cs dans les parties aériennes et dans les parties racinaire des plants de trèfle violet en présence de Cs adsorbé sur l'illite à 10 mmol.kg^{-1} en suspension dans la solution de NaCl avec ou sans ajout de bactéries et de pyoverdine (PVD)

Ces premières expériences montrent que la PVD ajoutée à $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans la solution de NaCl permet d'augmenter le FT d'un facteur 2. Des expériences complémentaires ont alors été réalisées dans les mêmes conditions que précédemment en augmentant la concentration de PVD ajoutée en solution à $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ afin de savoir si la translocation du Cs était plus importante. Les résultats sont présentés en concentration (Figure 35) et en quantité (Figure 36) de Cs dans les parties aériennes et racinaires lorsque les trèfles sont mis en présence d'une illite dopée en Cs à 10 mmol.kg^{-1} et avec ou sans ajout de PVD à 50 et $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

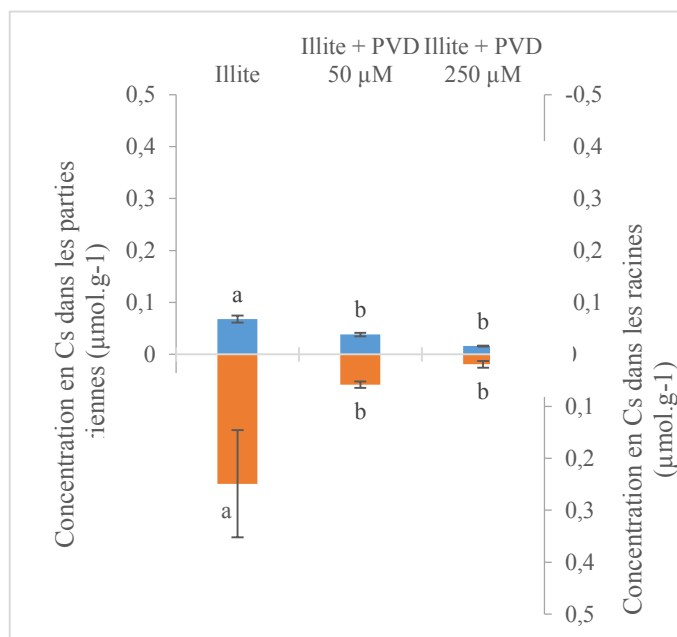


Figure 35 : Concentration en Cs dans les parties aériennes et les parties racinaires des plants de trèfle violet en présence de Cs apporté sous forme adsorbée à l'illite à 10 mmol.kg^{-1} en suspension dans la solution NaCl avec ou sans ajout de PVD à 50 et $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$

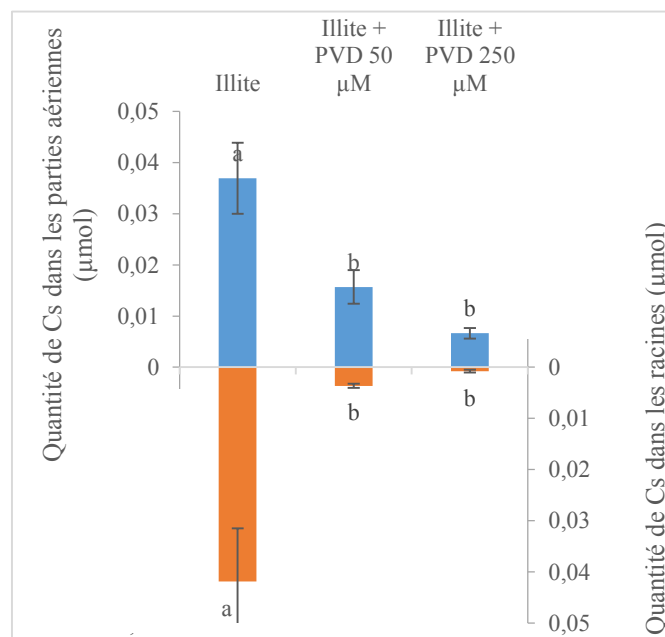


Figure 36 : Quantité de Cs dans les parties aériennes et dans les parties racinaire des plants de trèfle violet en présence de Cs apporté sous forme adsorbée à l'illite à 10 mmol.kg^{-1} en suspension dans la solution de NaCl avec ou sans ajout de PVD à 50 et $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$

Les résultats montrent que l'effet toxique de la PVD sur le trèfle augmente avec sa concentration. En effet, tous les plants meurent en présence de la plus forte concentration de PVD et aucune croissance n'est observée (Figure 38 et Figure 37). Cette augmentation de la toxicité réduit la concentration en Cs dans la plante (Figure 35). Par contre, les résultats présentés dans la Figure 36 montrent qu'en termes de quantité, avec l'ajout de PVD à $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$, la proportion du Cs entre les parties aériennes du trèfle violet et les racines est différente par rapport aux concentrations en Cs du témoin sans PVD. La quantité de Cs est plus élevée dans les parties aériennes que dans les racines lorsque la PVD est ajoutée à plus forte concentration mais reste tout de même plus faible que dans le témoin. Les FT montrent cette différence (Tableau 17). Le FT du Cs dans les parties aériennes du trèfle en présence de PVD à 50

$\mu\text{mol.L}^{-1}$ est de 0,66 comparé à 0,84 en présence de $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de PVD. Néanmoins, cette différence n'est pas significative et entraine un pourcentage de dépollution par les parties aériennes du trèfle négligeable (0,09 et 0,04 %).

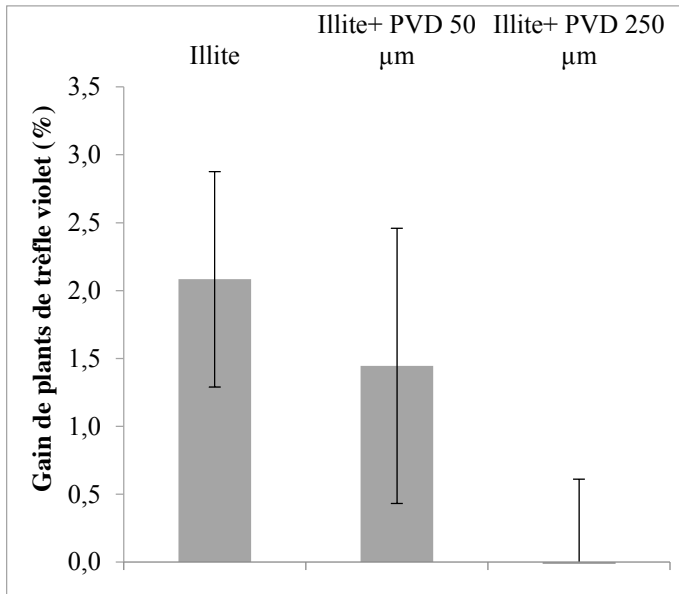


Figure 37 : Proportion de nouveaux plants de trèfle violet (feuille + tige) après 12 jours de culture en hydroponie dans une solution de NaCl 1 mmol.L^{-1} contenant du Cs sous forme adsorbée sur l'illite à 10 mmol.kg^{-1} avec ou sans ajout de de PVD purifiée à 50 et $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$

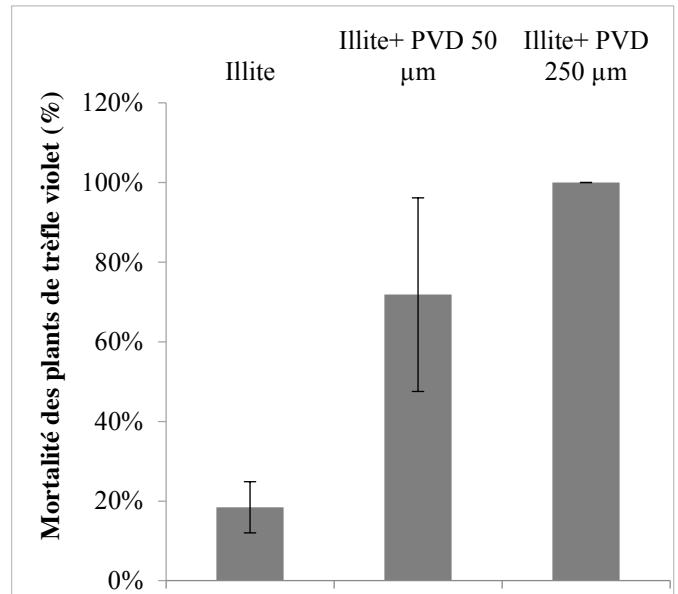


Figure 38 : Proportion de plants de trèfle violet morts (feuille + tige) après 12 jours de culture en hydroponie dans une solution de NaCl 1 mmol.L^{-1} contenant du Cs sous forme adsorbée sur l'illite à 10 mmol.kg^{-1} avec ou sans ajout de PVD purifiée à 50 et $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$

Tableau 17 : Pourcentage de dépollution, facteur de translocation (FT) et facteur de bioaccumulation (FB) du trèfle violet après 12 jours de culture dans une solution NaCl (1 mmol.L^{-1}) dopée en Cs sorbé à l'illite (10 mmol.kg^{-1}), en présence ou non de PVD purifiée ajoutée à 50 ou $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

	FT	FB	% de dépollution par les parties aériennes
Illite	0,27	3,40	0,22
Illite + PVD 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	0,66	1,03	0,09
Illite + PVD 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	0,84	0,37	0,04

CONCLUSION INTERMEDIAIRE

Le trèfle violet est capable d'accumuler le Cs dans ses racines de façon plus importante que dans ses parties aériennes, que le Cs soit entièrement biodisponible en solution ou adsorbé sur l'illite et, sans ou avec ajout de bactéries ou de métabolites bactériens. La différence de biodisponibilité du Cs entraîne une diminution importante du pourcentage de dépollution de la solution par phytoextraction (uniquement dans les parties aérienne de la plante). Lorsque le Cs est entièrement biodisponible, les parties aériennes du trèfle violet peuvent extraire jusqu'à 53.2 % du Cs en 12 jours contre 0,45 % lorsque le Cs est sorbé sur l'illite (Tableau 16). Cette plante peut alors être un bon candidat pour la phytostabilisation ou la rhizofiltration du Cs des eaux contaminée en Cs. En effet, ces techniques consistent en l'accumulation ou la séquestration de polluants dans les racines d'une plante et est utilisée notamment pour filtrer les eaux polluées. Dans un but de phytoextraction, où le Cs doit être transloqué vers les parties aériennes de la plante, le trèfle violet est potentiellement un bon candidat lorsque la PVD est ajouté au milieu puisqu'elle permet d'augmenter celle translocation en termes de concentration en Cs. Toutefois, la PVD ayant montré une toxicité sur le trèfle violet, il est intéressant de voir si dans un sol où elle peut être moins bioaccessible et moins en contact avec les racines de la plante, sa toxicité peut être réduite permettant ainsi son utilisation en phytoextraction.

3.2. *En pot de sol*

Après une pré-culture de 40 jours du trèfle violet en hydroponie dans le milieu Hoagland sans Cs, 4 à 5 plants sont repiqués dans des pots de sols dopés ou non en Cs à 10 mmol.kg^{-1} et ayant subi un vieillissement de 6 semaines. Après 7 jours de culture, un ajout de PVD à $50 \text{ } \mu\text{mol.kg}^{-1}$ est réalisé pour l'une des modalités, puis les plants sont récoltés 5 jours plus tard (12 jours de culture au total). $50 \text{ } \mu\text{mol}$ de PVD.kg⁻¹ de sol correspond à la concentration totale retrouvée dans les sols (en solution et sorbé sur les différents phases du sol) (Hersman et al., 1995; Powell et al., 1980). La concentration de la PVD en solution est plus faible que celle sorbée sur les particules de sols, en raison des liaisons –OH de la PVD. L'hypothèse est que la toxicité de la PVD devrait s'en trouver fortement réduite comparée à l'expérience en hydroponie où la totalité de la PVD (expérience sans illite) est totalement biodisponible pour le trèfle violet (voir paragraphe 3.1).

Au cours des 12 jours de culture, les pots sont régulièrement pris en photo (Planche 3) et le nombre de tiges vivantes et mortes est noté en début et en fin d'expérience afin de calculer un pourcentage de mortalité et un gain de tige pour chaque modalité (Figure 39 et Figure 40).

3.2.1. *Evolution de l'état des plants de trèfle violet au cours du temps*

L'aspect visuel des plants au cours du temps diffère selon les modalités (Planche 3). En présence de PVD, les plants fanent très rapidement comme observé en culture hydroponique : dès le 6^{ème} jour, les feuilles commencent à faner puis les tiges. A 12 jours, l'intégralité des parties aériennes en présence de PVD sont complètement fanées. Cela se vérifie sur la Figure 40 montrant 100 % de mortalité des plants de trèfle. La PVD, même partiellement sorbée aux particules de sol, demeure toxique pour le trèfle à cette concentration. La sorption de la PVD sur le sol n'a pas pu être vérifiée et pourrait être réduite par la présence d'autres ions compétiteurs présents dans la solution de PVD purifiée ou des ions du sol. En effet, comme expliqué précédemment (voir paragraphe 3.1.1), lors de la purification de la PVD, des éléments du milieu de culture CAA et des métabolites produits par *P. fluorescens* ont pu être retenus par la résine et être ensuite concentrés dans les étapes suivantes de purification. La PVD a pu également avoir un effet toxique pour le trèfle violet entre le moment où elle est apporté en solution et celui où elle s'adsorbe sur le sol.

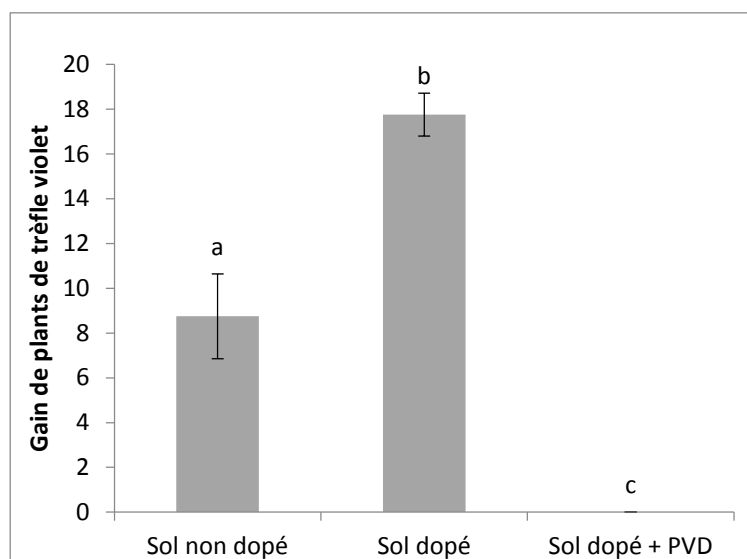


Figure 39 : Nombre de nouveaux plants de trèfle violet (feuille + tige) après 12 jours de culture en pot de sol dopé ou non en Cs à 10 mmol.kg^{-1} avec ou sans ajout de PVD à $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$

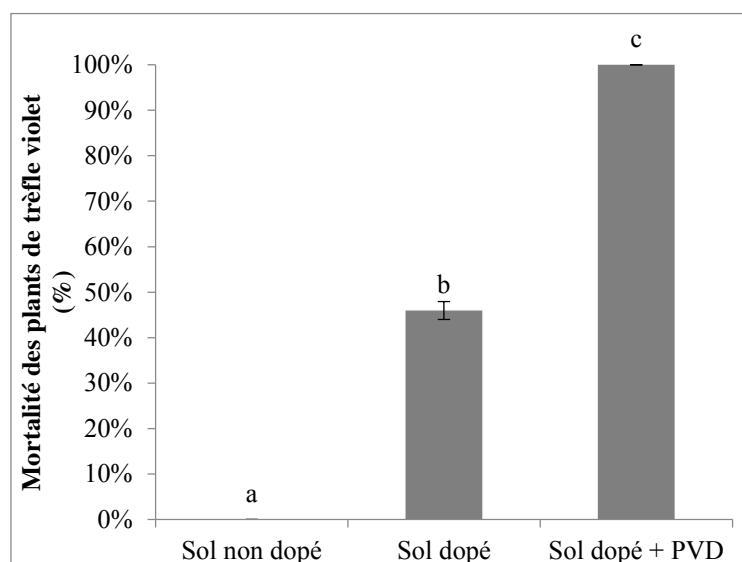


Figure 40 : Proportion de plants de trèfle violet (feuille + tiges) morts après 12 jours de culture en pot de sol dopé ou non en Cs à 10 mmol.kg^{-1} avec ou sans ajout de PVD à $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$

Planche 3 : Photos des pots de culture en sol des trèfles violet au cours du temps en fonction des différentes modalités testées en présence de sol dopé ou non en Cs à 10 mmol.kg⁻¹ et avec ou sans ajout de PVD à 50 µmol.L⁻¹

	Sol non dopé	Sol dopé en Cs	Sol dopé en Cs + PVD
T 3 jour			
T 6 jours			
T 12 jours			

3.2.2. Phytoextraction du césium par le trèfle violet en pots de sol

Après 12 jours de culture, les parties aériennes sont séparées des parties racinaires, lavées, séchées puis pesées avant d'être minéralisées pour analyser le Cs. Les résultats sont présentés en concentration (Figure 41) et en quantité (Figure 42) de Cs afin de tenir compte de la biomasse végétale après 12 jours d'expériences qui diffère suivant les modalités. Les différences de biomasse s'observent qualitativement par la proportion de gain de plants de trèfles (Figure 39) et la mortalité des plants après 12 jours (Figure 40). Les facteurs de translocation (FT) et les facteurs de bioaccumulation (FB) sont également calculés pour chaque modalité ainsi que le pourcentage de dépollution du sol par les parties aériennes du trèfle violet (Tableau 19).

Malgré la sorption du Cs sur les particules de sol, le trèfle violet est capable de l'accumuler dans ses parties racinaires et également de le transloquer vers les parties aériennes (Figure 41).

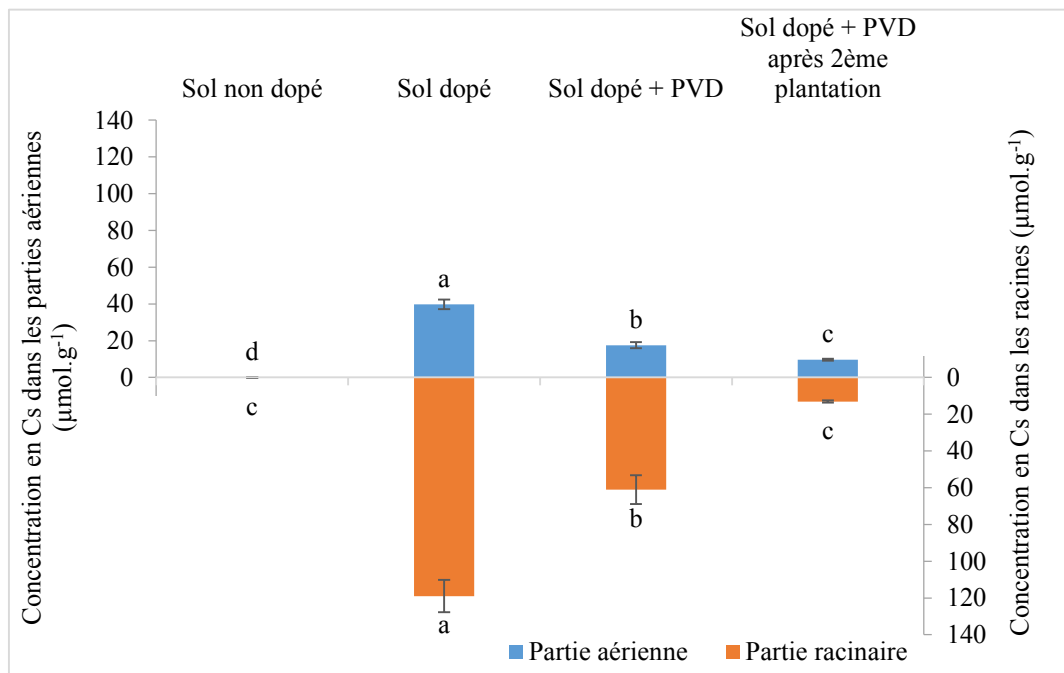


Figure 41 : Concentration en Cs dans les parties aériennes et les parties racinaires des plants de trèfle violet pour un sol à 10 mmol de Cs.kg⁻¹ avec ou sans ajout de PVD à 50 µmol.L⁻¹

En effet, dans le témoin « Sol dopé », 119 et 40 µmol de Cs.g⁻¹ de MS de trèfle sont retrouvés dans les parties racinaires et aériennes du trèfle violet, respectivement après 12 jours. La concentration en Cs est plus élevée dans les parties racinaires que dans les parties aériennes. Le trèfle violet a un pouvoir de translocation faible (0,33) entraînant un très faible pourcentage de dépollution du sol par ses parties aériennes (0,02 %) mais un fort pouvoir de bioaccumulation (12,95) (Tableau 19). Le Tableau 18 rassemble les résultats des trois études existantes sur ce

sujet. L'étude se rapprochant le plus de notre expérience est celle de Wu et al. (2009) qui trouvent des FB plus faibles que celui de notre étude. En effet, le FB de son témoin sans ajout de Cs (sachant que le sol utilisé contenait une concentration négligeable – $5,8 \times 10^{-5} \text{ mmol.kg}^{-1}$ – de Cs, initialement) est de 3,4 et le FB de la modalité à 11,2 mmol de Cs.kg⁻¹ de sol, la plus proche de la concentration utilisée dans notre étude, est beaucoup plus faible (4,6). Cette différence peut être due à l'ajout de potassium, compétiteur du Cs, dans l'étude de Wu et al. (2009). En effet, l'augmentation de la concentration en potassium dans la solution du sol diminue l'accumulation du Cs par les cellules racinaires (Cline and Hungate, 1960; Nishita et al., 1962; Smolders et al., 1996). Dans notre étude aucune source de potassium n'est ajoutée.

En présence de PVD à 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, la concentration est significativement plus faible dans les parties aériennes (17 $\mu\text{mol.g}^{-1}$) et dans les parties racinaires (61 $\mu\text{mol.g}^{-1}$) comparées à celles du témoin (118 et 40 $\mu\text{mol.g}^{-1}$) (Figure 41). Le FB est par conséquent plus faible (6,41) que pour le témoin (12,95) (Tableau 19). Et le FT est également plus faible (0,29 comparé à 0,33 dans le témoin) conduisant à un pourcentage de dépollution encore plus faible de 0,01 %. La PVD n'augmente donc pas les niveaux de concentration de Cs dans le trèfle violet, et est aussi toxique. Par ailleurs, contrairement à ce qui a été observé en culture hydroponique, la PVD ne favorise pas la translocation du Cs vers les parties aériennes.

Tableau 18 : Facteurs de bioaccumulation (FB) du Cs par le trèfle (*Trifolium pratense* et *Trifolium repens*) tirés de la littérature

Concentration en Cs dans les sols (mmol.kg ⁻¹)	Temps de contact entre le Cs et la plante	FB	Remarques	Références
1,2		0	7,7	
(dans un sol sans matière organique)	7 mois après 0, 1 ou 2 mois de culture des plantes dans le sol	1	7,2	
		2	6,5	
4		0	9,3	(Veresoglou et al., 1995)
(dans un sol avec matière organique)		1	9,5	
		2	11,2	
1.6 × 10 ⁻²	28 jours après 29 jours de vieillissement du sol avec Cs	0,23	Ne prend en compte que les parties aériennes de la plante	(Takeda et al., 2013)
0	47 jours après 2 mois de vieillissement du sol avec le Cs	3,4		
2,2		8,7	Ajout de 200 mg.kg ⁻¹ de potassium	(Wu et al., 2009)
11,3		4,6		

Tableau 19 : Pourcentage de dépollution, facteur de translocation (FT) et facteur de bioaccumulation (FB) du trèfle violet après 12 jours en présence de sol dopé en Cs à 10 mmol.L⁻¹ et avec ou sans PVD purifiée ajoutée à 50 µmol.kg⁻¹

	FT	FB	% de dépollution par les parties aériennes
Sol dopé	0,33	12.95	0,02
Sol dopé + PVD (50 µmol.L ⁻¹)	0,29	6,41	0,01
Sol dopé + PVD (50 µmol.L ⁻¹) après 2ème plantation	0,73	1,85	0,01

L'hypothèse de la diminution de la toxicité de la PVD en raison de sa sorption sur le sol n'est donc pas vérifiée. Ce résultat peut être dû à la technique d'ajout de la PVD. En effet, elle est ajoutée, sous forme d'une solution, directement sur le sol dopé au contact des plants de trèfles violet âgés de 47 jours. Avant d'être sorbée sur les phases du sol, sa biodisponibilité est probablement élevée. Une expérience complémentaire (mêmes conditions que précédemment) est alors réalisée en repiquant dans les mêmes pots de sol dopé en PVD 15 jours auparavant, des plants au stade 4 tiges, âgés de 55 jours de croissance en hydroponie dans un milieu complet Hoagland. Les résultats sont présentés en concentration (Figure 41) et en quantité (Figure 42) de Cs dans les parties aériennes et racinaires en comparaison avec les expériences précédentes. Cette expérience complémentaire montre que les plants de trèfle commencent à faner dès le premier jour de contact avec le sol et la PVD à $50 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ (Planche 4) et que la concentration en Cs dans la plante est encore plus faible que lors du premier repiquage (Figure 41). Le calcul du FB (1,85) confirme cette faible accumulation, néanmoins, le calcul du FT (0,73) montre une meilleure translocation du Cs vers les parties aériennes par rapport au témoin « sol dopé » (0,33) et à la première plantation « sol dopé + PVD » (0,29). Cette augmentation ne permet cependant pas d'augmenter le pourcentage de dépollution du sol après la deuxième plantation (0,01 %).

Planche 4 : Photos des cultures en pots de sol des trèfles violet au cours du temps en présence d'un sol dopé en Cs à 10 mmol.kg^{-1} et équilibré pendant 15 jours après ajout de PVD à $50 \mu\text{mol.kg}^{-1}$

	Sol dopé + PVD après 2 ^{ème} plantation
T0	
T 2 jours	
T 9 jours	

En termes de quantité (Figure 42), il n'y a aucune différence significative d'accumulation du Cs dans les parties aériennes et les parties racinaires du trèfle violet par rapport aux résultats en concentration. Mis à part les résultats de la deuxième plantation de trèfle, l'accumulation du Cs est plus importante dans les racines que dans les parties aériennes et ce, quelle que soit la modalité. Ce résultat peut être encore une fois lié au temps de l'expérience qui n'est que de 12 jours ou simplement à la nature du trèfle qui n'est pas une plante hyperaccumulatrice.

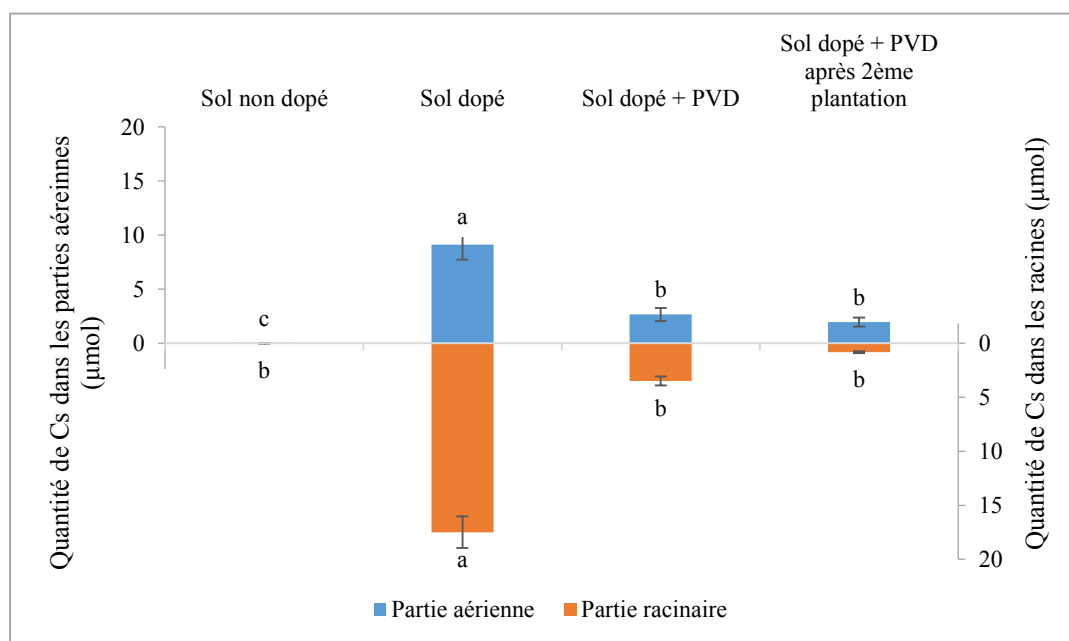


Figure 42 : Quantité de Cs dans les parties aériennes et dans les parties racinaires des plants de trèfle violet pour un sol à $10 \text{ mmol de Cs.kg}^{-1}$ avec ou sans ajout de bactéries et de PVD à $50 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$

A la fin des expériences, une fois les plants récoltés (y compris les racines), des échantillons de sols sont séchés, broyés, pesés puis minéralisés afin i) d'analyser la concentration de Cs restant dans les sols, comparée à celle ajoutée initialement (Figure 43) et ii) d'extraire à l'acétate d'ammonium ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$ à 1 mol.L^{-1}) la fraction bioaccessible de Cs (Figure 44).

Les résultats montrent qu'en fin d'expérience le sol contient statistiquement la même concentration en Cs (environ $12 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$) (Figure 43) bien qu'en moyenne, on constate une diminution de 2,4 à 8,4 % de la concentration initiale de Cs. La quantité de Cs extrait par la plante est trop faible pour mettre en évidence une réduction significative de la concentration de Cs du sol, bien que la concentration de Cs bioaccessible demeure importante ($7,6 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$ environ) (Figure 44). La durée de 12 jours d'extraction n'est certainement pas suffisante pour extraire une quantité significative de Cs bien que Takeda et al. (2013) aient montré que l'accumulation du Cs par le trèfle était de plus en plus faible avec le temps pour atteindre une accumulation stable après 6 mois avec un FB de 0,034.

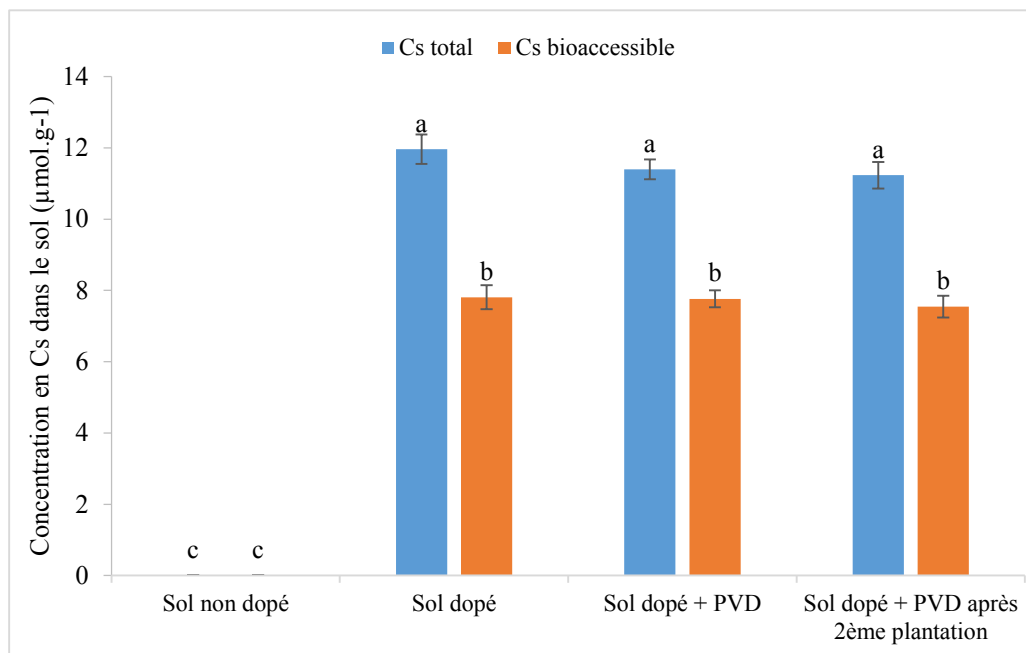


Figure 43 : Concentration en Cs total (minéralisation HNO_3 65 % + HCl 35 %) ou bioaccessible (extraction à $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 1 M) dans le sol après 12 jours d'expérience.

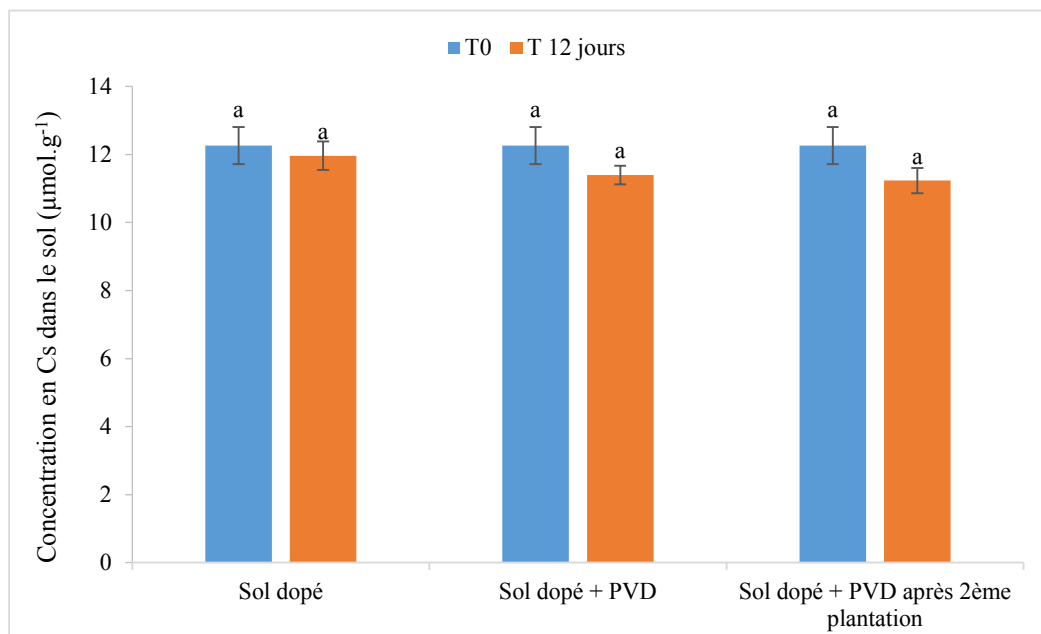


Figure 44 : Concentration en Cs total (minéralisation HNO_3 65 % + HCl 35 %) dans le sol dopée à 10 mmol de Cs.kg⁻¹ avant et après les 12 jours de phytoextraction par le trèfle violet

3.3. Conclusion

Le système complet de phytoextraction du Cs par le trèfle violet choisi comme plante accumulatrice, et cultivé en hydroponie et en pots de sols dopés est étudié en présence ou non de *P. fluorescens* et/ou de PVD ajoutée dans la solution ou dans le sol. En hydroponie, la biodisponibilité du Cs est également étudiée avec une modalité où le Cs est totalement biodisponible en solution et une autre où il est bioaccessible adsorbé sur l'illite à $10 \mu\text{mol.kg}^{-1}$. Les résultats montrent que le trèfle violet, sans ajout de *P. fluorescens* ou PVD est capable d'accumuler plus de Cs dans ses racines (jusqu'à $10,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$) que dans ses parties aériennes (jusqu'à $5,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Le trèfle violet est alors une plante intéressante pour de la phytostabilisation plutôt que pour de la phytoextraction bien qu'elle soit capable d'extraire jusqu'à 53,2 % du Cs uniquement dans ces parties aériennes lorsque le Cs est entièrement biodisponible. Lorsque la PVD est ajoutée à $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dans les expériences en hydroponie, le facteur de translocation augmente d'un facteur 2 (0,5 sans et 1,1 avec). L'ajout de cette molécule bactérienne purifiée permet donc d'augmenter la capacité de phytoextraction du trèfle violet en termes de concentrations de Cs mais diminue par le pourcentage de phytoextraction en termes de quantités. Lorsque cette même expérience est réalisée sur un sol dopé avec $10 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ de Cs puis vieilli, le trèfle violet l'accumule également de façon plus importante dans ses parties racinaires ($119 \mu\text{mol.g}^{-1}$) que dans ses parties aériennes ($40 \mu\text{mol.g}^{-1}$). L'ajout de PVD sur le sol à la même concentration que dans les expériences en hydroponie réduit le facteur de translocation (0,33 sans et 0,23 avec). Ces résultats mettent également en évidence une toxicité de la PVD pour le trèfle violet, qu'il soit cultivé en hydroponie ou en pots de sol. Cette toxicité pouvant provenir du contact direct de la molécule concentrée avec les racines du trèfle violet, une étude complémentaire est alors réalisée en repiquant des plants de trèfle violet dans un sol dopé dans lequel la PVD a été ajoutée et équilibrée 15 jours auparavant limitant ainsi théoriquement sa biodisponibilité. La toxicité de la PVD sur le trèfle n'en est cependant pas réduite, toutefois la translocation du Cs est augmentée avec un facteur de translocation de 0,73 contre 0,23 pour la première plantation.

L'utilisation de métabolites bactériens et notamment de la PVD est une alternative ayant montré des résultats très encourageants pour mobiliser le Cs. L'étape suivante de phytoextraction associée à la PVD doit toutefois encore être améliorée dans un but d'application.

Conclusion générale & perspectives

L'objectif de ce travail de thèse a consisté à étudier les possibilités de mobilisation du Cs retenu dans les sols, et d'en comprendre les mécanismes, afin d'augmenter sa biodisponibilité pour la plante et ainsi, dans une optique de dépollution, d'améliorer la technique de phytoextraction.

Dans un sol, le Cs est principalement retenu dans les feuillets des argiles et plus spécifiquement l'illite qui possède des sites spécifiques au Cs, les FES. Une des méthodes envisageables pour désorber le Cs est l'altération des minéraux le retenant. Le processus d'altération des minéraux étudié ici est gouverné par les microorganismes qui mobilisent le Cs dans le sol de façon indirecte. En effet, certaines bactéries du sol, comme les *Pseudomonas*, utilisées en phytoremédiation bioaugmentée, entre autres pour leurs propriétés PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), sont également capables d'altérer les composants du sol par différents processus direct ou indirect. Cette altération modifie les caractéristiques biogéochimiques du sol avec une répercussion sur la spéciation du Cs. Cette aptitude a été étudiée pour le Cs et les travaux se sont principalement focalisée sur la compréhension des mécanismes impliqués dans les interactions entre le Cs, l'illite, *Pseudomonas fluorescens*, une bactérie PGPR productrice de sidérophores capable de se développer en présence de Cs, ses métabolites bactériens et la plante (trèfle violet).

Dans une première partie, ce travail s'est focalisé sur la mobilisation du Cs retenu entre les feuillets d'une illite purifiée, choisie comme modèle d'étude, en considérant l'action de métabolites, comme les acides organiques (acides citrique et oxalique), des complexants commerciaux (DFOM et AAH) et la PVD, produite par *P. fluorescens* et libéré dans son environnement. Les interactions directes entre les métabolites bactériens et le césium par échange ionique, ou indirectes par altération de la matrice les contenant, ont fait l'objet d'une étude approfondie. La comparaison du rôle de ces métabolites bactériens, en particulier les sidérophores, avec celui de complexants commerciaux a complété ce premier volet. Les résultats ont montré que parmi tous les chélateurs testés, la PVD produite par *Pseudomonas fluorescens* permettait de désorber jusqu'à 45 % de Cs initialement présent dans l'illite, en 28 jours, alors que les acides organiques et les sidérophores commerciaux l'ont désorbé dans une moindre mesure (jusqu'à 8 % et 22 % respectivement). Des tests complémentaires utilisant l'atome d'azote du tétraméthylammonium tétrafluoroborate (Me_4NBF_4) chargé positivement comme compétiteur du Cs ont permis de montrer que sa désorption par la PVD est régie à la fois par des mécanismes directs par échange ionique entre le carbocation du chromophore de la PVD et le Cs et indirects par complexation du fer de l'illite, sans que la part de chacun soit quantifiée.

Dans un deuxième temps, l'objectif a consisté à mobiliser le Cs de l'illite, non pas en présence de molécules dont certaines peuvent être produites par des microorganismes (DFOM, PVD, acides citrique et oxalique), mais des microorganismes eux-mêmes, afin de se rapprocher de conditions plus réelles où le rôle de la bioaugmentation sur les performances de phytoextraction est étudié. Que *P. fluorescens* soit sous forme de biofilm ou en suspension dans le milieu de culture, cette bactérie est capable de désorber le Cs de l'illite

jusqu'à 12 % et 21 % respectivement en 2 jours. Dans cette première expérience, un milieu de culture simplifié (NaCl) a été utilisé afin d'éviter toute compétition ionique entre le césium et le potassium et l'ammonium, principaux constituants des milieux de culture habituels. Aucune croissance bactérienne n'a alors été observée. Par la suite, différents milieux de culture ont été testés afin d'assurer à la fois, la croissance bactérienne, la production de métabolites impliqués dans la mobilisation du Cs, tout en évitant que certains constituants du milieu de culture n'interagissent avec le Cs, en particulier le potassium et l'ammonium. Des milieux de culture où le Cs n'est pas en contact avec ces éléments ont été élaborés : par exemple l'ajout d'orthose dont la source de potassium n'est pas soluble mais accessible aux microorganismes, billes d'alginate contenant le Cs non soluble, etc. La source d'azote ammoniacale a également été remplacée par des nitrites. Un nouveau milieu de croissance contenant une source d'azote nitrique et une source de potassium sous forme d'orthose a permis la croissance bactérienne et la production de PVD mais aucune désorption du Cs de l'illite n'a été observée dans ces conditions en raison d'une possible re-sorption du Cs sur les parois bactériennes. Le rôle de *P. fluorescens* sur la désorption du Cs de l'illite, dans des conditions de culture favorables à la croissance bactérienne, n'a alors pas pu être précisé.

Dans un troisième volet, le système complet de phytoextraction du Cs par le trèfle violet, choisi comme plante accumulatrice, et cultivé en hydroponie et en pots de sols dopé en Cs (pendant 12 jours) a été étudié. L'absorption du Cs par la plante a été suivie en présence ou non de *P. fluorescens* et/ou de PVD ajoutée dans la solution ou dans le sol. En hydroponie, la phytoextraction a été étudiée en présence de Cs plus ou moins biodisponible : totalement biodisponible en solution et bioaccessible adsorbé à l'illite dopée. Les résultats ont montré que le trèfle accumulait le Cs dans ses racines (jusqu'à $10,0 \mu\text{mol.g}^{-1}$) et dans ses parties aériennes (jusqu'à $5,8 \mu\text{mol.g}^{-1}$) et que le facteur de translocation augmentait en présence de PVD (0,5 sans et 1,1 avec) lorsque la phytoextraction était réalisée en hydroponie. La phytoextraction permet de prélever jusqu'à 53,2 % du Cs présent initialement en solution lorsqu'il est entièrement disponible alors que seulement 0,45 % n'est extrait lorsque le Cs est sorbé sur l'illite. Lorsqu'un sol dopé en Cs a été utilisé, le trèfle violet l'a également accumulé dans ses parties racinaires ($119 \mu\text{mol.g}^{-1}$) et aériennes ($40 \mu\text{mol.g}^{-1}$). Par contre, le facteur de translocation en présence de PVD a diminué (0,33 sans et 0,23 avec) et le système ne permet pas d'extraire une quantité significative de Cs (0,02 %). Les résultats ont également permis de mettre en évidence une toxicité de la PVD pour le trèfle violet, qu'il soit cultivé en hydroponie ou en pots de sol. Cette toxicité pouvant provenir du contact direct de la molécule concentrée avec les racines du trèfle violet, une étude complémentaire a été réalisée en repiquant des plants de trèfle violet dans un sol dopé et équilibré contenant de la PVD depuis 15 jours (hypothèse d'une moindre biodisponibilité de la PVD dans le sol). La toxicité de la PVD sur le trèfle était toujours la même, néanmoins la translocation du Cs absorbé était meilleure avec un facteur de translocation de 0,73 contre 0,23 pour la première plantation.

Ce travail en système simplifié avec une illite dopée en Cs est une étude préliminaire à la phytoextraction du Cs d'un sol contaminé. De nombreuses perspectives d'études quant à la mobilisation du Cs d'une part et l'utilisation de la PVD pour l'amélioration de la phytoextraction du Cs d'autre part sont alors envisageables. D'un point de vue mécanistique, il serait intéressant d'étudier la mobilisation du Cs dans un système complexe avec du sol et notamment de s'intéresser aux différentes interactions qui peuvent intervenir entre le Cs et les différentes composantes du sol : les différents type d'argiles, la matière organique ou la composition chimique du sol. Dans ce travail de thèse, le rôle de la PVD sur la mobilisation du Cs de l'illite a bien été montré mais cette appréciation n'a pas été observée lorsque la PVD est ajouté à un sol dopé en Cs. Les interactions entre la PVD et les mêmes composantes d'un sol pourraient alors également être étudiées.

La mobilisation du Cs de l'illite par la PVD est montrée comme étant régie par un mécanisme direct par échange ionique et un mécanisme indirect par complexation du fer structurale de l'illite. Alors que 30 % du fer dissout de l'illite est analysé en solution, aucune figure d'altération sur les grains d'illite en fin d'expérience n'est observée au MEB et au MET. Des méthodes de microscopie plus poussées, des analyses spectroscopiques ou encore des mesures de surface spécifique pourraient alors être envisagées afin d'observer et de quantifier ce mécanisme d'altération de l'illite par dissolution du fer.

D'un point de vue applicatif, la phytoextraction associée à la bioaugmentation est une technique complexe qui doit être adaptée à chaque polluant. Dans le cas d'un sol contaminé au Cs, la phytoextraction associée à la bioaugmentation est d'autant plus compliquée du fait des propriétés physico-chimiques du Cs – adsorption spécifique et compétition ionique avec des éléments majeurs du milieu de culture – qui rendent la mobilisation du Cs délicate. L'étape de phytoextraction associée à la PVD montre des résultats encourageant quant à l'augmentation de la translocation du Cs dans le trèfle. L'unique inconvénient à l'utilisation de cette technique est la toxicité de la PVD sur le trèfle violet. En effet, la PVD semble finalement aussi toxique que d'autres complexants « puissants » tel que l'EDTA, ce point devant être vérifié et notamment qu'aucune autre molécule non éliminée lors de la purification de la PVD n'explique cette toxicité. Plusieurs expériences complémentaires pourraient être testées afin de comprendre ce phénomène et d'améliorer la technique en conservant l'effet de la PVD sur la translocation du Cs tout en diminuant ou en éliminant sa toxicité. Une première expérience serait d'améliorer le système utilisé en hydroponie : une membrane de dialyse avec des pores plus petits que la PVD, et où l'illite dopée en Cs et la PVD seraient ajoutées à l'intérieur de la membrane, pourrait en effet être utilisée. Cela permettrait de mobiliser le Cs de l'illite par la PVD en empêchant la sorption de la PVD sur les racines du trèfle violet. Le Cs mobilisé par la PVD pourrait traverser la membrane de dialyse et être accumulé par le trèfle violet. Une deuxième expérience serait d'appliquer cette technique de phytoextraction associée à l'ajout de PVD en utilisant une

plante moins sensible à la toxicité de la PVD, en sachant qu'aucune plante hyperaccumulatrice n'a encore été découverte pour la phytoextraction du Cs. L'unique étude de la littérature sur la phytoextraction associée à l'ajout de PVD utilise la tomate (*Lycopersicon esculentum*) et l'orge (*Hordeum vulgare*) pour extraire le Cd et le Cu d'un sol artificiellement contaminé (Cornu et al., 2014). L'ajout de PVD est réalisé à forte concentration ($250 \mu\text{mol.kg}^{-1}$) et pourtant aucune toxicité n'est observée sur les plants de tomate et d'orge. Plusieurs études de phytoextraction du Cs par la tomate ayant montré qu'elle était capable de l'accumuler, une étude de phytoextraction associée à l'ajout de PVD pourrait être intéressante. Par contre l'orge n'ayant pas été testée pour la phytoextraction du Cs, une étude complémentaire utilisant cette autre plante pourrait être testée avant de l'associer à l'ajout de PVD. D'un point de vue opérationnel, et également pour réduire l'effet toxique de la PVD, une deuxième expérience sur l'effet d'un apport fractionné de la PVD pourrait être envisagé. En effet, un ajout fractionné de la PVD permettrait de diminuer la concentration en contact avec les racines et se rapprocherait des conditions réelles de production de la PVD par les bactéries dans un sol qui la produisent probablement en continu, à petites doses. Ces ajouts fractionnés sont parfois réalisés lors de l'ajout d'EDTA et ont montré une diminution de sa toxicité (Gabos et al., 2009; Grcman et al., 2003). Une dernière expérience peut également être réalisée sur l'effet de la date d'apport de la PVD, c'est-à-dire juste avant la récolte – la plante étant capable d'absorber le Cs en un temps très court – de façon à se départir de la toxicité de la PVD.

Une dernière perspective serait de réaliser les expériences de phytoextraction du Cs améliorée en se plaçant dans des conditions radioactives avec du ^{137}Cs . L'utilisation de la radioactivité pourrait permettre d'utiliser des concentrations plus faibles en Cs, correspondant à celles retrouvées dans les sols de Fukushima par exemple, en s'affranchissant des contraintes de limite de quantification du ^{133}Cs par les analyses chimiques.

Annexes

Annexe 1 : Composition des différents milieux de culture utilisés

Milieu Casamino acid (CAA)

Casamino acids (Difco)	5,0 g
K ₂ HPO ₄	1,18 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g
Eau distillée	1 L
pH	7,0

Milieu TSB (tryptic soy broth)

Tryptone	17,0 g
Peptone de soja	3,0 g
Glucose	2,5 g
NaCl	5,0 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
Eau distillée	1 L

Milieu DF (Dworkin and Foster, 1958)

KH ₂ PO ₄	4,0 g
Na ₂ HPO ₄	6,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
Solution éléments traces	0,1 mL
Solution sulfate de Fe	0,1 mL
Glucose	10,0 g
Eau distillée	1 L
pH	7,2

Solution éléments traces

MnSO ₄ .H ₂ O	10 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	11,2 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	78,2 mg
H ₃ BO ₃	10 mg
MoO ₃	10 mg

Eau distillée	100 mL
---------------	--------

Solution de sulfate de fer

FeSO ₄ .7H ₂ O	100 mg
Eau distillée	10 mL

Milieu DF K solide

Na ₂ HPO ₄	6,0 g
NaNO ₂	0,6 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
Orthose	1,0 g
Solution éléments traces (milieu DF)	0,1 mL
Glucose	10,0 g
Eau distillée	1 L
pH	7,2

Milieu Hoagland (Hoagland et Arnon, 1938)

KNO ₃	0,606 g
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0,656 g
KH ₂ PO ₄	0,136 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,241 g
Solution de Fe-citrate	20 mL
Solution éléments traces	10 mL
Eau distillée	1 L
pH	6,0 (ajusté avec Na ₂ CO ₃ 10 g.L ⁻¹)

Solution éléments traces

MnCl ₂ .4H ₂ O	181 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	22 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	8 mg
H ₃ BO ₃	286 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25 mg
Eau distillée	1 L

Solution de Fe-citrate

Fe-citrate	0,548 g
Eau distillée	250 mL

Annexe 2 : Article

MICROBIAL MOBILIZATION OF CESIUM FROM ILLITE: ROLE OF ORGANIC ACIDS AND SIDEROPHORES

HAZOTTE A.A. (1-2), PERON O. (1), ABDELOUAS A. (1), MONTAVON G. (1), LEBEAU T. (2*)

(1) SUBATECH, UMR 6457, IN2P3/CNRS/EMN/Université de Nantes, 4, rue Alfred Kastler, BP 20722, 44307 Nantes cedex 3, France

(2) LPG-NANTES, UMR 6112 CNRS, 44322 Nantes, France, thierry.lebeau@univ-nantes.fr

* Corresponding author

Abstract

This paper aims at providing a mechanistic understanding of the mobilization of cesium (Cs) by bacteria from soil with the view of soil cleaning up. Whole metabolites and purified siderophores (pyoverdine, PVD), from the supernatant of a culture of *P. fluorescens* (ATCC 17400) were supplied to illite spiked with 10 and 100 mmol.kg⁻¹ of Cs. The effect was compared to low molecular weight organic acids (LMWOAs), citric and oxalic acids at 40 µM, or synthetic chelant, *i.e.*, acetohydroxamic acid (AHA) and desferrioxamine mesylate (DFOM) at 50 µM and 250 µM. To be able to distinguish direct (by ionic exchange) *vs.* indirect effects (by alteration of the illite crystal lattice) of purified PVD on the release of Cs, tetraethylammonium tetrafluoroborate (Me₄NBF₄) was used to evaluate the first mechanism, the release of Fe from illite the second. Eventually a modelling was realized to quantitatively describe the sorption phases on illite. A slight release of Cs from illite was observed with LMWOAs (7 %) and with AHA and DFOM (9 % and 22 % respectively, at 250 µM). The highest release was shown with the purified PVD and the bacterial supernatant (43 % and 40 % in 7 days, respectively). Such a release of Cs from illite was a result of both: i) a likely direct mobilization of Cs from illite by ion exchange due to the positively charged carbon atom on the chromophore and ii) an indirect mechanism due to the weathering of illite revealed by the chelating of iron from the illite crystal lattice by purified PVD. These results demonstrate that Cs can be significantly released from illite by *P. fluorescens* producing chelating agents and offer promising prospects to phytoextraction improved with bioremediation.

1. Introduction

Following nuclear accidents such as those of Chernobyl and more recently at Fukushima, radionuclides were dispersed in the air before being deposited on the soil within a hundred kilometers radius around the nuclear plants (Fujiwara et al., 2012). These radionuclides have contaminated many agricultural products, which raises the question of the future of soils. Indeed, due to the extent of the impacted surfaces, only the *in situ* and inexpensive cleaning-up techniques are relevant. It is the case of the phytoextraction method provided that the soil/plant transfer process is facilitated by increasing the phytoavailability of radionuclides. The major limit of phytoremediation indeed stems from the slowness of the treatment as a consequence of the low availability of metals at a given time (Baker et al., 2000). Overall microorganisms such as bacteria play an important role in the biogeochemical cycling and the (phyto)availability of metals and radionuclides (Brookshaw et al., 2012; Gadd, 2010; Uroz et al., 2009), thanks to various processes (microbial respiration, changes in redox conditions and soil pH, production of ligands, etc) leading to mineral weathering, radionuclides chelation and dissolution or even the formation of new mineral phases (Dong and Lu, 2012; H. Dong et al., 2009; Gadd, 2010).

The recent accident of Fukushima has led mainly to a contamination in radioactive cesium and iodine (Endo et al., 2012; Fujiwara et al., 2012; Kato et al., 2012). To date, only ^{137}Cs , with a half-life of 30 years against 8 days for ^{131}I , remains a concern. Cs is known for its low mobility in the majority of soils (Cornell, 1993; Sawhney, 1972). In the Fukushima area, studies regarding vertical migration of Cs have shown that 90% and 70% of the Cs were retained in the first 5 and 2 centimeters of the soil, respectively (Fujiwara et al., 2012; Kato et al., 2012). The main abiotic mechanism of Cs retention is adsorption. Cs was shown to be sorbed to micas and clays more strongly than to metal oxides, calcite or (alumino) silicate minerals such as quartz (Cornell, 1993). Owing to their chemical characteristics (including their electronegativity) and layered structure (phyllosilicates), clays have a high specific surface area, the ability to absorb water and for some of them to expand with a high cation exchange capacity (CEC). Indeed, the importance of clay minerals in Cs behavior in soils or geological formation is well known (Cornell, 1993; Komarneni, 1979; Sawhney, 1970). It is quantitatively explained by a cation-exchange process (Jacobs and Tamura, 1960; Sawhney, 1970). For high Cs concentrations, the interaction is governed by the planar sites present at the basal surface. These sites being non-specific, Cs interaction is strongly influenced by the content of major cations in the water and the CEC value of the clay, *e.g.* stronger for montmorillonite than for illite (Bradbury and Baeyens, 2000; Cornell, 1993; Nakao et al., 2008; Sawhney, 1972, 1970). The situation is different for trace concentrations of Cs. It is well known that Cs interaction with soil particles, especially illite is due to specific sites. In addition to non-specific basal surface sites, illite is known to have two other adsorption sites: i) intermediate sites (type II sites) and ii) "frayed edge sites" ("FES") forming inner sphere complexes

(Jacobs and Tamura, 1960; Sawhney, 1970). Illite FES have a particularly high affinity for Cs^+ ions as compared to planar sites of K^+ -saturated vermiculite or montmorillonite (Sawhney, 1970; Staunton and Roubaud, 1997). In addition, FES and type II sites are predominantly accessible to cations with low hydration energies – K^+ , Rb^+ , NH_4^+ – which can efficiently compete with Cs^+ . This is one reason why mineral-Cs interactions are strongly affected by the impact of microbes resulting in the release of ammonium ions useful for their metabolism (Brookshaw et al., 2012) or by the addition of fertilizers to soils. This corresponds to a direct mobilization by competition through ionic exchange. Another possibility to mobilize Cs could result in a modification of the mineral stability – on which Cs is sorbed – by mineral alteration (Brookshaw et al., 2012; Cornell, 1993), *i.e.*, the weathering of clays by means of bacterial dissolution under the action of bacterial metabolites (H. Dong et al., 2009; Uroz et al., 2009; Wendling et al., 2005a, 2005b). This Cs mobilization by alteration corresponds to an indirect release.

These bacteria-minerals interactions have therefore potential applications via direct and/or indirect ways in bioremediation by coupling bioaugmentation and phytoextraction in order to shorten the cleaning-up time frame of the soils (Lebeau et al., 2008; Sessitsch et al., 2013). Indeed, microbial metabolic activity gives rise to organic and inorganic compounds such as humic substances, organic acids, and several ions (nitrite, ammonium, carbonate and phosphate). These compounds may impact on radionuclide behavior in the soil. For example, sorption of humic substances onto mineral surfaces leads to a new reactive interface which has different affinities for radionuclides compared to the mineral surface itself (Bellenger and Staunton, 2008). These authors showed that the sorption capacity of Cs by clays can then decrease. In a field-scale study, the ion-exchange between microbial-released ammonium ions and Cs sorbed by lake sediments resulted in the seasonal release of Cs in the water column (Hinton et al., 2006). To date, although many studies investigated the interaction of Cs with minerals and microorganisms, most of them focused on global effects (Brookshaw et al., 2012; Newsome et al., 2014). Few of them describe the role of some bacterial metabolites, *e.g.*, organic acids and chelating agents such as citric and oxalic acids, EDTA, NTA and picolinate (Dumat and Staunton, 1999; Reinoso-Maset et al., 2013; Staunton and Roubaud, 1997; Wendling et al., 2005a, 2005b, 2004). Therefore, the question of direct and indirect mobilization was not yet clearly defined and, for the specific case of chelating agents, not molecules from bacterial origins (*e.g.*, siderophores) were used. This fundamental question is at the center of the present paper. Well controlled experiments were performed to study Cs desorption from illite for two Cs loadings starting from 10 and 100 mmol of stable Cs per kg of illite. The effect of purified pyoverdine (PVD) obtained from a culture of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17400) was compared to that of commercial complexing agents (acetohydroxamic acid (AHA), desferrioxamine mesylate (DFOM)) and to citric (CA) and oxalic (OA) acids as organic acids with chelating properties as well produced by *Pseudomonas* bacteria. To be able to distinguish direct vs. indirect effects of purified PVD, the tetraethylammonium tetrafluoroborate (Me_4NBF_4)

was selected as a competitor of Cs. A geochemical modelling was realized in parallel to the experimental study in order to help understanding the observed effects.

2. Materials and methods

2.1. *Cs-spiked illite*

Purified illite was used (Illite du Puy characterized by Poinssot et al. (1999)). This illite was analyzed by LA-ICP-MS-HR (Laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry high resolution) for its background in Cs and Fe before spiking: 0.5 mmol.kg⁻¹ of Cs and 0.8 mol.kg⁻¹ of Fe. Illite was spiked with 10 and 100 mmol.kg⁻¹ of Cs. This order of magnitude of concentration is similar to those used by many authors such as Wendling et al. (2005b).

A 10 g.L⁻¹ illite suspension was washed several times with a 1 mM NaCl solution and sterilized by tyndallization (3 cycles of 60 minutes at 70 °C, with 24 hours cooling to ambient temperature between each cycle) to eliminate microbial spores – sterility was checked by plating on solid Tryptic Soy Broth (TSB) medium 100 µL of illite suspension – and to avoid illite alteration (Chen et al., 2014b). The stock suspension was then spiked with 10 and 100 mmol.kg⁻¹ of Cs and equilibrated during 48 hours. Illite suspensions spiked with Cs were then centrifuged (7690 g, 15 min). Illite spiked was washed twice with NaCl solution (1mM) and resuspended in the same solution at 10 g.L⁻¹. The supernatant was analyzed by ICP-MS to measure the non-sorbed Cs. The following batch experiments were made with 0.1 g.L⁻¹ of spiked illite from aliquots of the solution at 10 g.L⁻¹.

2.2. *Pyoverdine production and purification*

Pseudomonas fluorescens (ATCC 17400) was used to produce PVD. Bacteria were first grown overnight at 28°C in TSB medium with 200 rpm shaking. Bacterial cells were then centrifuged, washed twice with 9‰ NaCl solution and inoculated in Casamino Acids (CAA) medium. CAA cultures were grown at 28°C for 48 h. After that, the culture medium was centrifuged for 10 min at 7690 g and a trichloroacetic acid solution (3%) was added in the supernatant to precipitate proteins during 2h under slow shaking. After 2h, the supernatant containing PVD was filtered through a 0.7 µm Whatman filter paper and pH of the filtrate was adjusted at 8. Then, PVD was purified by ion exchange chromatography using an Amberlite XAD-4 resin (Sigma), according to the method reported by Georgias et al. (2009). PVD was eluted with methanol (100%) and then with diluted methanol with H₂O (50:50 (v:v)), lyophilized and stored at -20 °C.

2.3. Bacterial mobilization of Cs from illite in batch experiments

2.3.1. Cs mobilization by LMWOAs and by siderophore and siderophore-like molecules of synthetic or bacterial origin

Different molecules were added to 0.1 g.L⁻¹ of spiked illite in NaCl solution (1 mM) for 28 days at 28 °C. Two siderophores were added at 50 µM and 250 µM: acetohydroxamic acid (AHA), a complexing agent, desferrioxamine mesylate (DFOM), a marketed siderophore, and a PVD-enriched siderophore purified from a *P. fluorescens* culture (see section 2.2). Additional experiments were conducted with citric acid or oxalic acid (40 µM) for the purpose of comparison. A 1 mL aliquot of each mixture was sampled after 1, 2, 7, 15 and 28 days and analyzed by ICP-MS.

All results are presented as a percentage of desorption according to the following equation.

$$\%X \text{ desorption} = \frac{(\text{quantity of } X \text{ in solution in the presence of the molecule supplied})_t - (\text{quantity of } X \text{ in solution in the control})_t}{\text{initiale quantity of } X \text{ sorbed onto illite}} \times 100$$

Where X is the analyzed element (Cs, Fe) and t is the contact time between spiked illite and the molecule (*control* stands for X in the solution without adding of chelant, *i.e.*, the natural equilibrium over time).

2.3.2. Ionic exchange of Cs

The tetramethylammonium tetrafluoroborate (Me₄NBF₄) was selected for its nitrogen cation known as a competitor of Cs and for the lack of N-H bonds. Then, neither hydrogen bonding nor acido-basic reaction was possible with Me₄NBF₄ (unlike NH₄⁺). This molecule was added at 50 and 250 µM to 0.1 g.L⁻¹ of spiked illite in NaCl solution (1 mM) for 28 days at 28 °C for comparison with LMWOAs and siderophores (see section 2.3.1.). A 1 mL aliquot of each mixture was sampled at 1, 2, 7, 15 and 28 days and analyzed by ICP-MS.

2.4. Modelling

All calculations were performed with PHREEQC v2.17 (Parkhurst and Appelo, 1999) and the ion-exchange process was described following the Gaines–Thomas convention (Gaines and Thomas, 1953) using the generalized model proposed by Bradbury and Baeyens (2000). It corresponds to a three-site model allowing to describe Cs sorption for a variety of illite, including the one studied in the present study, as was as for illite-rich sediments (Chen et al., 2014a). The site in high amount but of weak affinity (0.16 eq.kg⁻¹, called

the “the weak site”) is located at the basal surface. It is a non-specific site subjected to adsorption with all the cations present in solution.

For Cs-trace concentrations, the model considered the specific sites for Cs, *i.e.*, the FES and type II sites, with the parameters given in Bradbury and Baeyens (2000). The competition of Cs with NH_4^+ and, citrate and EDTA was considered in the modeling. The results were compared to the experimental data, *i.e.*, Me_4NBF_4 and PVD, respectively.

2.5. Microscopies observations

The potential weathering of illite at the end of the experiments with PVD, was studied by transmission electron microscopy (TEM). After 28 days in the presence or not of $250\mu\text{M}$ of PVD, illite suspensions was collected by centrifugation (10 min at 7690 g), washed with 70 % ethanol and sonicated for *ca.* 5 min. A drop of the suspension was pipetted and transferred onto 300 mesh copper grids with a nitrocellulose membrane and carbon coating. A HITACHI H9000NAR LaB6 TEM with a 300 keV accelerating voltage and 0.18 nm was used for TEM imaging.

3. Results and discussion

3.1. Cs sorption on illite

A modelling was realized to quantitatively describe the sorption phases on illite. Results are presented in Table 1 where calculated and experimental values are compared.

Tab. 1 : Sorption of Cs on illite. Comparison between theoretical and experimental (in brackets) values.

	Cs (mmol.kg ⁻¹)	Sorption (%)	Site occupation by Cs on illite (%)		
			FES	Type II	Planar
Sorption phase	10	99.92 (89)	5.0	90.3	4.6
	100	97.22 (67)	0.5	39.3	57.4

The PHREEQC calculations show that more than 97% of Cs is theoretically adsorbed regardless Cs concentration. The calculation agrees with the experimental value for 10 mmol.kg⁻¹ of Cs (89%) whereas it overestimates the sorption (97.2% instead of 67%) for the highest studied Cs concentration. The parameters from the Bradbury and Baeyens (2000) model derived from sorption data obtained at relatively high ionic

strengths (sodic medium at 0.1 M) whereas our sorption data were measured for 1 mM NaCl. It was indeed shown that the ionic strength may have an important impact on the exchange constants values (Tournassat et al., 2009).

Although the prediction is not perfect, the modelling allowed assessing Cs surface speciation. Cs is mainly sorbed on the type II sites (90.3 %), and is distributed between type II (39.3%) and planar sites (57.4%) at 10 and 100 mmol.kg⁻¹ of Cs, respectively. For both Cs concentrations, the contribution of FES sites in Cs distribution is negligible.

3.2. Cs mobilisation from illite by citric and oxalic acids

Citric acid and oxalic acid (40 µM) were added to illite suspension spiked with Cs (10 and 100 mmol.kg⁻¹) for 48 h (Fig. 1). In this experiment performed at pH 6, only the complexing properties of these molecules were studied since pH has not effect on the Cs desorption between 4 and 10 (Cornell, 1993). It is important to differentiate the maximum Cs desorption rate. The latter was taken into account in a purpose of phytoremediation to Cs desorption rate at equilibrium which was used to compare to data modelling.

2 hours after the supply of citric acid or oxalic acid with Cs at 10 mmol.kg⁻¹, about 14% of Cs was released from illite (Fig. 1a). At 100 mmol.kg⁻¹ of Cs, organic acids had a little effect, *ca.* 7% for both acids (Fig 1b). Beyond 2 hours, the chemical equilibrium was reached. 7% of Cs were desorbed from illite for citric acid regardless the concentration of Cs. Similar desorption rate was observed for oxalic acid à 10 mmol.kg⁻¹ of Cs while no desorption was shown at 100 mmol.kg⁻¹ of Cs. The effect of organic acids, although observable is, as expected negligible since Cs⁺ is a monovalent cation subjected to a weak interaction with chelating agents. Different complexation constants between Cs⁺ and chelating agents containing carboxylic groups are reported in the Thermochemistry database of PHREEQC. The value for citrate is almost null (10^{0.98}) and the values for other chelants such as EDTA and NTA are similar (10^{1.3} and 10^{0.85} respectively). A quantitative estimation of Cs desorption was done by modelling with Cs/citrate constant and it was found that no desorption is expected. A negligible Cs desorption was observed by Wendling et al. (2005b) as well, *i.e.*, according to data, 1% of Cs from illite spiked with 120 mmol.kg⁻¹ of Cs after the addition of 40 µM of oxalic acid and 3% with citric acid at the same concentration. These values take into account the control (natural equilibrium of Cs in solution over time). Less than 1 % of Cs was desorbed by one of these two acids from illite spiked with 16 mmol.kg⁻¹ of Cs. Note that the effect appears even more pronounced, *i.e.* about 1-3% in comparison to 7%. From these results, we considered that these low molecular weight organic

acids produced in large amounts by the roots of plants and microorganisms in the rhizosphere of the soil do not play any major role in Cs-release in our experimental conditions.

3.3. *Cs-illite mobilisation affected by synthetic or bacterial origin chelant*

Regardless the chelating agent and the Cs concentration, the highest desorption rate was achieved within the first 2 days (Fig 2: 50 μM of chelant; Fig. 3: 250 μM of chelant).

For illite spiked with 10 mmol.kg^{-1} of Cs, *ca.* max. 3%, 8%, 18% and 19% Cs were desorbed in the presence of AHA, DFOM, purified PVD and bacterial metabolites, respectively (Fig. 2a). The maximal desorption rate was reached within the first two days (except for AHA, 7 days) and the time required for a maximum Cs desorption depended on the chelating agent: 2 days for bacterial metabolites, 7 for DFOM and 28 days for AHA and purified PVD. For illite spiked with 100 mmol.kg^{-1} Cs, similar desorption percentages were measured, *i.e.*, *ca.* 3%, 8%, 16% and 19% Cs for AHA, DFOM, PVD and bacterial metabolites, respectively (Fig. 2b). The maximal desorption rate was reached within the first one to two days. The maximal percentages of Cs desorption were reached after one day for PVD and two days in the presence of AHA, DFOM and bacterial metabolites. The desorption kinetics was faster probably because Cs was present mainly on the surface basal sites with 100 mmol.kg^{-1} .

While bacterial chelating agents (*e.g.* PVD) at 50 μM levels – concentration found in soils (Hersman et al., 1995) – are known to strongly complex metals such as Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} and Zn^{2+} (Cornu et al., 2014), our study shows that only a small amount of Cs was desorbed in the presence of chelants although significant. We cannot suspect a direct complexation of Cs because of the very low stability constant of chelants with Cs. Even the stability constant of EDTA ($10^{1.3}$) is very low (Reinoso-Maset et al., 2013; Smith et al., 2003) and the modelling done with Cs/EDTA constant found no desorption. The stability constant is unknown for the PVD-Cs complex but the measurement of the fluorescence of PVD in the solution, as described by Braud et al. (2009), concluded that PVD did not complex Cs (data not shown) which was not surprising. Then the release of Cs could be attributed to illite weathering as the result of the complexation by PVD of metals constituting the crystal lattice of clays such as iron and aluminum (Haack et al., 2008; Ferret et al., 2014). In that case, the release of Cs is indirect.

At 250 μM of chelants, the percentages of Cs released from illite were higher at 10 mmol of Cs.kg^{-1} than at 100 mmol. kg^{-1} (Fig 3a and b) and were higher than what was measured at 50 μM (Table 2: maximal percentages of Cs desorbed from illite). The supply of AHA, DFOM, PVD or metabolites to illite spiked with 10 mmol. kg^{-1} Cs resulted in *ca.* 9%, 22%, 43% and 40% Cs desorption, respectively. The maximum desorption was observed after 7 days for AHA, DFOM and PVD up to 15 days for bacterial metabolites. With illite spiked with 100 mmol of Cs.kg^{-1} , 9%, 19%, 30% and 25% (Fig 3b) were released in 1 day for PVD, 7 days in the presence of metabolites, 15 days for the AHA and 28 days for DFOM.

Table 2 : Percentage of maximal Cs desorption from illite after supplying various chelants at 50 μM or 250 μM and depending on the initial concentration of Cs (10 or 100 mmol. kg^{-1}). Values are given as average $\pm$ standard deviation.

	Concentration of chelant	10 mmol.kg^{-1} Cs	100 mmol.kg^{-1} Cs
AHA	50 μM	3 ($\pm$ 3)	3 ($\pm$ 2)
	250 μM	9 ($\pm$ 2)	9 ($\pm$ 3)
DFOM	50 μM	8 ($\pm$ 5)	8 ($\pm$ 4)
	250 μM	22 ($\pm$ 4)	19 ($\pm$ 5)
PVD	50 μM	18 ($\pm$ 2)	16 ($\pm$ 3)
	250 μM	43 ($\pm$ 2)	30 ($\pm$ 3)
Metabolites	50 μM	19 ($\pm$ 3)	19 ($\pm$ 2)
	250 μM	40 ($\pm$ 4)	25 ($\pm$ 5)

Regardless Cs concentration, the highest and quite similar percentages of Cs desorbed from illite were shown with PVD and bacterial metabolites (Table 2). From these results, we concluded that among metabolites recovered from the supernatant of the culture of *P. fluorescens*, almost PVD was likely involved in the mobilization of Cs.

The Cs desorption percentage was lower at 100 versus 10 mmol of Cs.kg^{-1} of illite for the most efficient chelating agent, *i.e.*, PVD and bacterial metabolites at 250 μM . It most probably results, once Cs recovered from the illite crystal lattice, of the difference in Cs distribution on the sorption sites of illite after equilibrium as above explained (see section 3.1.).

As already discussed above, many studies showed that chelants may alter the clay minerals or iron oxyhydroxides. For example, siderophores are able to mobilize Fe from clay minerals (Esnault et al., 2013; Claire Ferret et al., 2014; Haack et al., 2008). Since illite contains iron, its release in the solution can be considered as a proof of illite alteration. Figure 4 shows iron in the solution for Cs-spiked illite at 100 mmol. kg^{-1} . At 10 mmol. kg^{-1} , the results were similar (data not shown).

Fig. 4 shows that the percentage of iron in the solution compared to the initial iron concentration of illite and to natural equilibrium was higher with PVD and bacterial metabolites than with AHA, DFOM. This indicates that illite was altered in the presence of PVD and bacterial metabolites and led to the indirect release of Cs from illite. Indeed, PVD has a high affinity for iron (10^{32}) for the PVD of *Pseudomonas aeruginosa* (Albrecht-Gary et al., 1994). Fe release from smectite has been described with the hydroxamate siderophores desferrioxamine B and D (Haack et al., 2008) and with PVD (Claire Ferret et al., 2014) but no data exists for the monohydroxamate ligand acetohydroxamic acid (AHA). The difference in iron release from illite between the different chelants can be explained by the number of complexation sites among monohydroxamates, hydroxamates and PVD, the latter being a more complex molecule. In addition to the iron complexation site, PVD has a positively charged carbon atom on the chromophore. This atom of carbon is easily exchangeable with Cs because of its higher affinity with the OH bonds of interlayer spaces-of illite than Cs. This ion exchange in the interlayer space of the illite could result in the direct Cs release with PVD.

3.4. Mechanism of Cs desorption from the interfoliar space illite

To test the hypothesis according to which Cs released from illite by ion exchange, the effect of a molecule without iron complexation site and with a more reactive atom (nitrogen cation) than the carbocation was studied. TEM images were also taken in order to observe a possible separation or alteration of the illite layers in the presence of siderophores (physical modification of illite).

3.4.1. Ionic exchange

Tetramethylammonium tetrafluoroborate (Me_4NBF_4) was used in the same experimental conditions as siderophores as a molecule with neither hydrogen bonding nor acido-basic reaction (unlike NH_4^+). If the Cs desorption is only due to ionic exchange in the presence of PVD, the expected effect should be more important with Me_4NBF_4 .

Fig. 5 shows that with Me_4NBF_4 , Cs was released from illite at a higher rate at 250 μM than at 50 μM . About 12% of Cs was released at the maximum from illite in the presence of 250 μM of Me_4NBF_4 when the concentration of Cs is 10 mmol.kg^{-1} (Fig. 5a). At 100 mmol.kg^{-1} of Cs, Me_4NBF_4 had a similar effect (Fig 5b).

In this study, the Cs is predominantly sorbed on type II and base surface sites. But the only known constant Cs-NH_4^+ is for FES illite. A parallel with modelling could therefore not be done.

The values of Cs released in the solution were lower than what was recorded with PVD and metabolites (Fig 3). Indeed, with illite spiked with 10 mmol of Cs.kg^{-1} of illite, *ca.* max. 7% and 12% of Cs was desorbed

at 50 μM and 250 μM of Me_4NBF_4 , respectively and reached 18% and 43% with PVD (Fig 2a and 3a and Table 2). With illite spiked with 100 mmol of Cs.kg^{-1} , 11% and 18% of Cs were released after Me_4NBF_4 addition at 50 and 250 μM respectively and it reached 16% and 30% with PVD. These results then suggest that Cs desorption from illite in the presence of PVD resulted of both i) an ionic exchange between the carbocation of the PVD chromophore and Cs and ii) the weathering of illite which indirectly contributed to the Cs desorption. But the experiment has not allowed to quantify the proportion of both mechanisms in the Cs desorption from illite.

3.4.2. Physical alteration of illite

The possible physical alteration of illite by different chelating agents was analyzed owing to TEM observation of illite at the end of the experiment.

TEM images showed neither deterioration nor separation of the illite layers (Fig. 6). Indeed, illite interlayer has the same size corresponding to the reference value for illite. We concluded that TEM was not enough sensitive to show the first step of the weathering, in spite of the iron release in the solution (marker for illite weathering).

4. Conclusion

Citric acid and oxalic acid had a negligible effect on the mobilization of Cs. On the contrary purified pyoverdine (PVD) and metabolites produced by *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17400) showed a significant release of Cs-spiked illite (up to 43% for PVD). Iron release was observed with PVD suggesting an indirect mobilization of Cs *via* the complexation of iron by PVD leading to the weathering of illite. This complexation and an ionic exchange between Cs^+ and the carbocation of the PVD chromophore suggest an indirect and direct Cs desorption respectively. These two mechanisms were most probably concomitant.

Acknowledgments

The authors are grateful to Christophe Tournassat (BRGM, France) for the supplying of the illite powder, Virginie Blot and Mireia Rodriguez (CEISAM, University of Nantes, France) for their helpful advice on ionic exchange and for providing Me_4NBF_4 powder and Nicolas Gautier (IMN, University of Nantes, France) for transmission electron microscopy images. This work was granted by Pays de la Loire Region of France (RS2E-OSUNA project).

References

- Albrecht-Gary, A.-M., Blanc, S., Rochel, N., Ocaktan, A.Z., Abdallah, M.A., 1994. Bacterial Iron Transport: Coordination Properties of Pyoverdine PaA, a Peptidic Siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorg. Chem.* 33, 6391–6402. doi:10.1021/ic00104a059
- Baker, A., McGrath, S., Reeves, R., Smith, J., 2000. Metal hyperaccumulator plants: A review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. *PHYTOREMEDIATION Contam. SOIL WATER* 85–107.
- Bellenger, J.P., Staunton, S., 2008. Adsorption and desorption of ⁸⁵Sr and ¹³⁷Cs on reference minerals, with and without inorganic and organic surface coatings. *J. Environ. Radioact.* 99, 831–840. doi:10.1016/j.jenvrad.2007.10.010
- Bradbury, M.H., Baeyens, B., 2005. Experimental and Modelling Investigations on Na-Illite: Acid-Base Behaviour and the Sorption of Strontium, Nickel, Europium and Uranyl. NAGRA Tech. Rep. 04-02.
- Bradbury, M.H., Baeyens, B., 2000. A generalised sorption model for the concentration dependent uptake of caesium by argillaceous rocks. *J. Contam. Hydrol.* 42, 141–163. doi:10.1016/S0169-7722(99)00094-7
- Braud, A., Hoegy, F., Jezequel, K., Lebeau, T., Schalk, I.J., 2009. New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. *Environ. Microbiol.* 11, 1079–1091. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01838.x
- Brookshaw, D.R., Patrick, R. a. D., Lloyd, J.R., Vaughan, D.J., 2012. Microbial effects on mineral–radionuclide interactions and radionuclide solid-phase capture processes. *Mineral. Mag.* 76, 777–806. doi:10.1180/minmag.2012.076.3.25
- Chen, Z., Montavon, G., Ribet, S., Guo, Z., Robinet, J.C., David, K., Tournassat, C., Grambow, B., Landesman, C., 2014a. Key factors to understand in-situ behavior of Cs in Callovo–Oxfordian clay-rock (France). *Chem. Geol.* 387, 47–58. doi:10.1016/j.chemgeo.2014.08.008
- Chen, Z., Montavon, G., Ribet, S., Guo, Z., Robinet, J.C., David, K., Tournassat, C., Grambow, B., Landesman, C., 2014b. Key factors to understand in-situ behavior of Cs in Callovo–Oxfordian clay-rock (France). *Chem. Geol.* 387, 47–58. doi:10.1016/j.chemgeo.2014.08.008
- Cornell, R.M., 1993. Adsorption of cesium on minerals: A review. *J. Radioanal. Nucl. Chem. Artic.* 171, 483–500. doi:10.1007/BF02219872
- Cornu, J.Y., Elhabiri, M., Ferret, C., Geoffroy, V. a., Jezequel, K., Leva, Y., Lollier, M., Schalk, I.J., Lebeau, T., 2014. Contrasting effects of pyoverdine on the phytoextraction of Cu and Cd in a calcareous soil. *Chemosphere* 103, 212–219. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.11.070
- Dong, H., Jaisi, D.P., Kim, J., Zhang, G., 2009. Microbe-clay mineral interactions. *Am. Mineral.* 94, 1505–1519. doi:10.2138/am.2009.3246

- Dong, H., Lu, A., 2012. Mineral-microbe interactions and implications for remediation. *Elements* 8, 95–100. doi:10.2113/gselements.8.2.95
- Dumat, C., Staunton, S., 1999. Reduced adsorption of caesium on clay minerals caused by various humic substances. *J. Environ. Radioact.* 46, 187–200. doi:10.1016/S0265-931X(98)00125-8
- Endo, S., Kimura, S., Takatsuji, T., Nanasawa, K., Imanaka, T., Shizuma, K., 2012. Measurement of soil contamination by radionuclides due to the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant accident and associated estimated cumulative external dose estimation. *J. Environ. Radioact.* 111, 18–27. doi:10.1016/j.jenvrad.2011.11.006
- Esnault, L., Libert, M., Bildstein, O., Mustin, C., Marsal, F., Jullien, M., 2013. Impact of iron-reducing bacteria on the properties of argillites in the context of radioactive waste geological disposal. *Appl. Clay Sci.* 83-84, 42–49. doi:10.1016/j.clay.2013.08.018
- Ferret, C., Sterckeman, T., Cornu, J.-Y., Gangloff, S., Schalk, I.J., Geoffroy, V. a., 2014. Siderophore-promoted dissolution of smectite by fluorescent *Pseudomonas*. *Environ. Microbiol. Rep.* 6, n/a–n/a. doi:10.1111/1758-2229.12146
- Fujiwara, T., Saito, T., Muroya, Y., Sawahata, H., Yamashita, Y., Nagasaki, S., Okamoto, K., Takahashi, H., Uesaka, M., Katsumura, Y., Tanaka, S., 2012. Isotopic ratio and vertical distribution of radionuclides in soil affected by the accident of Fukushima Dai-Ichi nuclear power plants. *J. Environ. Radioact.* 113, 37–44. doi:10.1016/j.jenvrad.2012.04.007
- Gadd, G.M., 2010. Metals, minerals and microbes: Geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156, 609–643. doi:10.1099/mic.0.037143-0
- Gaines, G.L., Thomas, H.C., 1953. Adsorption Studies on Clay Minerals. II. A Formulation of the Thermodynamics of Exchange Adsorption. *J. Chem. Phys.* 21, 714. doi:10.1063/1.1698996
- Georgias, H., Taraz, K., Budzikiewicz, H., Geoffroy, V., Meyer, J.,. The structure of the pyoverdine from *Pseudomonas fluorescens* 1.3. Structural and biological relationships of pyoverdins from different strains. *ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCH. C-A J. Biosci.* 54, 301–308.
- Haack, E. a., Johnston, C.T., Maurice, P. a., 2008. Mechanisms of siderophore sorption to smectite and siderophore-enhanced release of structural Fe³⁺. *Geochim. Cosmochim. Acta* 72, 3381–3397. doi:10.1016/j.gca.2008.03.027
- Hersman, L., Lloyd, T., Sposito, G., 1995. Siderophore-promoted dissolution of hematite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 59, 3327–3330. doi:10.1016/0016-7037(95)00221-K
- Hinton, T.G., Kaplan, D.I., Knox, A.S., Coughlin, D.P., Nascimento, R. V., Watson, S.I., Fletcher, D.E., Koo, B.J., 2006. Use of illite clay for in situ remediation of ¹³⁷Cs-contaminated water bodies: Field demonstration of reduced biological uptake. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4500–4505. doi:10.1021/es060124x
- Jacobs, D.G., Tamura, T., 1960. THE MECHANISM OF ION FIXATION USING RADIOISOTOPE TECHNIQUES. *Trans. Intern. Congr. Soil Sci.*, 7th, Madison, Wisconsin, 1960 Vol: 2.

- Kato, H., Onda, Y., Teramage, M., 2012. Depth distribution of ^{137}Cs , ^{134}Cs , and ^{131}I in soil profile after Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant Accident. *J. Environ. Radioact.* 111, 59–64. doi:10.1016/j.jenvrad.2011.10.003
- Komarneni, S., 1979. Cesium sorption by clay minerals and shales at elevated temperatures. *J. Inorg. Nucl. Chem.* 41, 397–400. doi:10.1016/0022-1902(79)80153-0
- Lebeau, T., Braud, A., Jézéquel, K., 2008. Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: a review. *Environ. Pollut.* 153, 497–522. doi:10.1016/j.envpol.2007.09.015
- Nakao, A., Thiry, Y., Funakawa, S., Kosaki, T., 2008. Characterization of the frayed edge site of micaceous minerals in soil clays influenced by different pedogenetic conditions in Japan and northern Thailand. *Soil Sci. Plant Nutr.* 54, 479–489. doi:10.1111/j.1747-0765.2008.00262.x
- Newsome, L., Morris, K., Lloyd, J.R., 2014. The biogeochemistry and bioremediation of uranium and other priority radionuclides. *Chem. Geol.* 363, 164–184. doi:10.1016/j.chemgeo.2013.10.034
- Parkhurst, D.L., Appelo, C.A.J., 1999. User's guide to PHREEQC (Version 2): a computer program for speciation, batch-reaction, one-dimensional transport, and inverse geochemical calculations. Water-Resources Investig. Rep.
- Poinssot, C., Baeyens, B., Bradbury, M.H., 1999. Experimental and modelling studies of caesium sorption on illite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 63, 3217–3227. doi:10.1016/S0016-7037(99)00246-X
- Reinoso-Maset, E., Worsfold, P.J., Keith-Roach, M.J., 2013. Effect of organic complexing agents on the interactions of $\text{Cs}(+)$, $\text{Sr}(2+)$ and $\text{UO}(2)(2+)$ with silica and natural sand. *Chemosphere* 91, 948–54. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.105
- Sawhney, B., 1972. Selective sorption and fixation of cations by clay-minerals - review 20, 93–100.
- Sawhney, B.L., 1970. Potassium and Cesium Ion Selectivity in Relation to Clay Mineral Structure. *Clays Clay Miner.* 18, 47–52. doi:10.1346/CCMN.1970.0180106
- Sessitsch, A., Kuffner, M., Kidd, P., Vangronsveld, J., Wenzel, W.W., Fallmann, K., Puschenreiter, M., 2013. The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biol. Biochem.* 60, 182–194. doi:10.1016/j.soilbio.2013.01.012
- Smith, R.M., Martell, A.E., Motekaitis, R.J., 2003. NIST critically selected stability constants of metal complexes database.
- Staunton, S., Roubaud, M., 1997. Adsorption of ^{137}Cs on montmorillonite and illite: Effect of charge compensating cation, ionic strength, concentration of Cs, K and fulvic acid. *Clays Clay Miner.* 45, 251–260. doi:10.1346/CCMN.1997.0450213
- Tournassat, C., Gailhanou, H., Crouzet, C., Braibant, G., Gautier, A., Gaucher, E.C., 2009. Cation Exchange Selectivity Coefficient Values on Smectite and Mixed-Layer Illite/Smectite Minerals. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 73, 928. doi:10.2136/sssaj2008.0285
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.P., Frey-Klett, P., 2009. Mineral weathering by bacteria: ecology,

actors and mechanisms. *Trends Microbiol.* 17, 378–387. doi:10.1016/j.tim.2009.05.004

Wendling, L. a., Harsh, J.B., Palmer, C.D., Hamilton, M. a., Dion, H.M., Boyle, J.S., Flury, M., 2005a. Rhizosphere Effects on Cesium Fixation Sites of Soil Containing Micaceous Clays. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 69, 1652. doi:10.2136/sssaj2004.0286

Wendling, L. a., Harsh, J.B., Palmer, C.D., Hamilton, M. a., Flury, M., 2004. Cesium sorption to illite as affected by oxalate. *Clays Clay Miner.* 52, 375–381. doi:10.1346/CCMN.2004.0520312

Wendling, L. a., Harsh, J.B., Ward, T.E., Palmer, C.D., Hamilton, M. a., Boyle, J.S., Flury, M., 2005b. Cesium desorption from illite as affected by exudates from rhizosphere bacteria. *Environ. Sci. Technol.* 39, 4505–4512. doi:10.1021/es048809p

Annexe 3 : pH des sols

Tableau annexe : pH_{eau} des sols en début et en fin d'expérience de phytoextraction du Cs par le trèfle violet avec ajout ou non de PVD à $50 \mu\text{mol.kg}^{-1}$

$pH_{\text{(eau)}}$	T0	T12 jours
Sol témoin	5.7 (± 0.04)	5.6 (± 0.05)
Sol dopé	5.5 (± 0.2)	5.3 (± 0.02)
Sol dopé + PVD $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$	-	5.8 (± 0.07)
Sol dopé + PVD $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ après 2 ^{ème} plantation	-	5.8 (± 0.08)

Références

bibliographiques

- Agalesdes P, Manesse D, Philippe M, Israël F et Robeau D (2000). Inventaire des sources de césium. In: Le Césium de l'environnement à l'homme, EDP Sciences, 13-26
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2004. Toxicological Profile: Cesium.
- Ahmed, E., Holmström, S.J.M., 2014. Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microb. Biotechnol.* 7, 196–208. doi:10.1111/1751-7915.12117
- Albrecht-Gary, A.-M., Blanc, S., Rochel, N., Ocaktan, A.Z., Abdallah, M.A., 1994. Bacterial Iron Transport: Coordination Properties of Pyoverdine PaA, a Peptidic Siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorg. Chem.* 33, 6391–6402. doi:10.1021/ic00104a059
- Alemán, F., Caballero, F., Ródenas, R., Rivero, R.M., Martínez, V., Rubio, F., 2014. The F130S point mutation in the Arabidopsis high-affinity K(+) transporter AtHAK5 increases K(+) over Na(+) and Cs(+) selectivity and confers Na(+) and Cs(+) tolerance to yeast under heterologous expression. *Front. Plant Sci.* 5, 430. doi:10.3389/fpls.2014.00430
- Alloway BJ, 1995. Heavy metals in soils. Edited by Alloway, B J (Dir) London: Blackie Academic and Professional, 368 p
- Amellal, N., Bartoli, F., Villemin, G., Talouizte, A., Heulin, T., 1999. Effects of inoculation of EPS-producing *Pantoea agglomerans* on wheat rhizosphere aggregation. *Plant Soil* 211, 93–101. doi:10.1023/A:1004403009353
- Anderson, C., Johnsson, A., Moll, H., Pedersen, K., 2011. Radionuclide Geomicrobiology of the Deep Biosphere. *Geomicrobiol. J.*
- Appanna, V.D., Gáspár, L.G., Huang, J., St Pierre, M., 1996. Cesium stress and adaptation in *Pseudomonas fluorescens*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 833–838. doi:10.1007/s001289900121
- Arica, M.Y., Bayramoglu, G., Yilmaz, M., Bektaş, S., Genç, O., 2004. Biosorption of Hg²⁺, Cd²⁺, and Zn²⁺ by Ca-alginate and immobilized wood-rotting fungus *Funaria troglodytes*. *J. Hazard. Mater.* 109, 191–9. doi:10.1016/j.jhazmat.2004.03.017
- AVERY, S., CODD, G., GADD, G., 1992. CESIUM TRANSPORT IN THE CYANOBACTERIUM *ANABAENA-VARIABILIS* - KINETICS AND EVIDENCE FOR UPTAKE VIA AMMONIUM TRANSPORT SYSTEM(S). *FEMS Microbiol. Lett.* 95, 253–258.
- AVERY, S., TOBIN, J., 1993. MECHANISM OF ADSORPTION OF HARD AND SOFT METAL-IONS TO *SACCHAROMYCES-CEREVISIAE* AND INFLUENCE OF HARD AND SOFT ANIONS. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2851–2856.
- Avery, V., 1996. 96/04381 Fate of caesium in the environment; Distribution between the abiotic and biotic components of aquatic and terrestrial ecosystems. *Fuel Energy Abstr.* 37, 302. doi:10.1016/0140-6701(96)82653-1
- Awad, F., Römhild, V., 2000. Mobilization of heavy metals from contaminated calcareous soils by plant

- born, microbial and synthetic chelators and their uptake by wheat plants. *J. Plant Nutr.* 23, 1847–1855. doi:10.1080/01904160009382147
- Baakza, A., Vala, A.K., Dave, B.P., Dube, H.C., 2004. A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 311, 1–9. doi:10.1016/j.jembe.2003.12.028
- BADRI, D. V., VIVANCO, J.M., 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant. Cell Environ.* 32, 666–681. doi:10.1111/j.1365-3040.2009.01926.x
- Baeza, A., Guillén, J., Mietelski, J.W., Gaca, P., 2006. Soil-to-fungi transfer of ^{90}Sr , $^{239+240}\text{Pu}$, and ^{241}Am . *Radiochim. Acta* 94, 75–80. doi:10.1524/ract.2006.94.2.75
- Baker, A., McGrath, S., Reeves, R., Smith, J., 2000. Metal hyperaccumulator plants: A review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. *PHYTOREMEDIATION Contam. SOIL WATER* 85–107.
- Barazani, O., Friedman, J., 1999. Is IAA the Major Root Growth Factor Secreted from Plant-Growth-Mediating Bacteria? *J. Chem. Ecol.* 25, 2397–2406. doi:10.1023/A:1020890311499
- Barkay, T., Schaefer, J., 2001. Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 318–323. doi:10.1016/S1369-5274(00)00210-1
- Barren F (2012) Chelate assisted phytoextraction using oilseed Brassicas. *Plant Fam Brassicaceae* 21:289–311
- Behrends, T., Krawczyk-Bärsch, E., Arnold, T., 2012. Implementation of microbial processes in the performance assessment of spent nuclear fuel repositories. *Appl. Geochemistry* 27, 453–462. doi:10.1016/j.apgeochem.2011.09.014
- Bellenger, J.P., Staunton, S., 2008. Adsorption and desorption of ^{85}Sr and ^{137}Cs on reference minerals, with and without inorganic and organic surface coatings. *J. Environ. Radioact.* 99, 831–840. doi:10.1016/j.jenvrad.2007.10.010
- Benedicto, A., Missana, T., Fernández, A.M., 2014. Interlayer collapse affects on cesium adsorption onto illite. *Environ. Sci. Technol.* 48, 4909–4915. doi:10.1021/es5003346
- Bertrand, S., 2009. Les sidérophores de *Scedosporium apiospermum*: identification , synthèse et applications Remerciements.
- Bhandari, A., Surampalli, R.Y., Champagne, P., Ong, S.K., Tyagi, R.D., Lo, I.M., 2007. Remediation technologies for soils and groundwater [WWW Document]. Task Comm. Environ. Counc. Environ. Water Resour. Inst. Am. Soc. Civ. Eng. URL <http://ascelibrary.org/doi/pdf/10.1061/9780784408940.fm> (accessed 8.27.15).
- Blaylock, M.J., Salt, D.E., Dushenkov, S., Zakharova, O., Gussman, C., Kapulnik, Y., Ensley, B.D., Raskin, I., 1997. Enhanced Accumulation of Pb in Indian Mustard by Soil-Applied Chelating Agents. *Environ. Sci. Technol.* 31, 860–865. doi:10.1021/es960552a

- Borghei, M., Arjmandi, R., Moogouei, R., 2011. Potential of *Calendula alata* for phytoremediation of stable cesium and lead from solutions. *Environ. Monit. Assess.* 181, 63–8. doi:10.1007/s10661-010-1813-9
- Borst-Pauwels, G.W.F.H., 1993. Mutual interaction of ion uptake and membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1145, 15–24. doi:10.1016/0005-2736(93)90376-B
- BOSSEMEYER, D., SCHLOSSER, A., BAKKER, E., 1989. SPECIFIC CESIUM TRANSPORT VIA THE *ESCHERICHIA-COLI* KUP (TRKD) K⁺ UPTAKE SYSTEM. *J. Bacteriol.* 171, 2219–2221.
- BOSSIER, P., HOFTE, M., VERSTRAETE, W., 1988. ECOLOGICAL SIGNIFICANCE OF SIDEROPHORES IN SOIL. *Adv. Microb. Ecol.* 10, 385–414.
- Boukhalfa, H., Crumbliss, A.L., 2002. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *BioMetals* 15, 325–339. doi:10.1023/A:1020218608266
- Bouwman, L.A., Bloem, J., Römken, P.F.A.M., Japenga, J., 2005. EDGA amendment of slightly heavy metal loaded soil affects heavy metal solubility, crop growth and microbivorous nematodes but not bacteria and herbivorous nematodes. *Soil Biol. Biochem.* 37, 271–278. doi:10.1016/j.soilbio.2004.07.039
- Bradbury, M.H., Baeyens, B., 2005. Experimental and Modelling Investigations on Na-Illite: Acid-Base Behaviour and the Sorption of Strontium, Nickel, Europium and Uranyl. NAGRA Tech. Rep. 04-02.
- Bradbury, M.H., Baeyens, B., 2000. A generalised sorption model for the concentration dependent uptake of caesium by argillaceous rocks. *J. Contam. Hydrol.* 42, 141–163. doi:10.1016/S0169-7722(99)00094-7
- Brambilla, M., Fortunati, P., Carini, F., 2002. Foliar and root uptake of ¹³⁴Cs, ⁸⁵Sr and ⁶⁵Zn in processing tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J. Environ. Radioact.* 60, 351–63.
- Braud, A., Hannauer, M., Mislin, G.L.A., Schalk, I.J., 2009a. The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity. *J. Bacteriol.* 191, 3517–25. doi:10.1128/JB.00010-09
- Braud, A., Hoegy, F., Jezequel, K., Lebeau, T., Schalk, I.J., 2009b. New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. *Environ. Microbiol.* 11, 1079–1091. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01838.x
- Bréant, D., Jézéquel, K., Lebeau, T., 2002. Optimisation of the cell release from immobilised cells of *Bacillus simplex* cultivated in culture media enriched with Cd²⁺: Influence of Cd²⁺, inoculum size, culture medium and alginate beads characteristics. *Biotechnol. Lett.* 24, 1237–1241. doi:10.1023/A:1016278209599
- BRGM, 2010. Quelles techniques pour quels traitements - Analyse coûts-bénéfices [WWW Document]. URL http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/Quelle_technique_quel_traitement-brgm-v-final.pdf (accessed 11.27.15).
- Briat, J.-F., Lebrun, M., 1999. Plant responses to metal toxicity. *Comptes Rendus l'Académie des Sci. - Ser. III - Sci. la Vie* 322, 43–54. doi:10.1016/S0764-4469(99)80016-X
- Broadley, M., Escobar-Gutierrez, A., Bowen, H., Willey, N., White, P., 2001. Influx and accumulation of

- Cs⁺ by the akt1 mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. lacking a dominant K⁺ transport system. *J. Exp. Bot.* 52, 839–844.
- Broadley, M.R., Willey, N.J., 1997. Differences in root uptake of radiocaesium by 30 plant taxa. *Environ. Pollut.* 97, 11–15. doi:10.1016/S0269-7491(97)00090-0
- Brookshaw, D.R., Patrick, R. a. D., Lloyd, J.R., Vaughan, D.J., 2012. Microbial effects on mineral–radionuclide interactions and radionuclide solid-phase capture processes. *Mineral. Mag.* 76, 777–806. doi:10.1180/minmag.2012.076.3.25
- Budzikiewicz, H., 1997. Siderophores of Fluorescent *Pseudomonads*. *Zeitschrift für Naturforsch. C* 52, 713–720. doi:10.1515/znc-1997-11-1201
- Bystrzejska-piotrowska, G., 2004. The distribution of ¹³⁷ Cs in maize (*Zea mays* L .) and two millet species (*Panicum miliaceum* L . and *Panicum maximum* Jacq .) cultivated on the caesium-contaminated soil 49, 13–16.
- Bystrzejska-Piotrowska, G., Drozd, A., Stęborowski, R., 2005. Resistance of heather plants (*Calluna vulgaris* L.) to cesium toxicity. *Nukleonika* 50, 31–35.
- Bystrzejska-Piotrowska, G., Urban, P.L., 2004. Accumulation and translocation of cesium-137 in onion plants (*Allium cepa*). *Environ. Exp. Bot.* 51, 3–7. doi:10.1016/S0098-8472(03)00039-X
- Cancela, M. A., E. Álvarez, and R. Maceiras. "Polymers in Alimentary Industrie: Properties of the Sodium Alginate." *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 1579-4377 (2003): 380-87
- Carrasco, N., Kretzschmar, R., Pesch, M.L., Kraemer, S.M., 2008. Effects of anionic surfactants on ligand-promoted dissolution of iron and aluminum hydroxides. *J. Colloid Interface Sci.* 321, 279–287. doi:10.1016/j.jcis.2008.02.011
- Carver, A.M., Hinton, T.G., Fjeld, R. a., Kaplan, D.I., 2007. Reduced plant uptake of ¹³⁷Cs grown in illite-amended sediments. *Water. Air. Soil Pollut.* 185, 255–263. doi:10.1007/s11270-007-9447-4
- Casentini, B., Pettine, M., 2010. Effects of desferrioxamine-B on the release of arsenic from volcanic rocks. *Appl. Geochemistry* 25, 1688–1698. doi:10.1016/j.apgeochem.2010.08.016
- Cervini-Silva, J., Sposito, G., 2002. Steady-State Dissolution Kinetics of Aluminum-Goethite in the Presence of Desferrioxamine-B and Oxalate Ligands. *Environ. Sci. Technol.* 36, 337–342. doi:10.1021/es010901n
- Cezard, C., Farvacques, N., Sonnet, P., 2015. Chemistry and Biology of Pyoverdines, *Pseudomonas* Primary Siderophores. *Curr. Med. Chem.* 22, 165–186.
- Chaney R.L.(1983) Plant uptake of inorganic waste. In : Land treatment of hazardous waste, Parr J.E. (ed), Noyes Data corp, Park Ridge, IL, 50-76.
- Chapon, V., Piette, L., Vesvres, M.H., Coppin, F., Marrec, C. Le, Christen, R., Theodorakopoulos, N., Février, L., Levchuk, S., Martin-Garin, A., Berthomieu, C., Sergeant, C., 2012. Microbial diversity in

- contaminated soils along the T22 trench of the Chernobyl experimental platform. *Appl. Geochemistry* 27, 1375–1383. doi:10.1016/j.apgeochem.2011.08.011
- Chen, H., Cutright, T., 2001. EDTA and HEDTA effects on Cd, Cr, and Ni uptake by *Helianthus annuus*. *Chemosphere* 45, 21–28. doi:10.1016/S0045-6535(01)00031-5
- Chen, Z., Montavon, G., Ribet, S., Guo, Z., Robinet, J.C., David, K., Tournassat, C., Grambow, B., Landesman, C., 2014a. Key factors to understand in-situ behavior of Cs in Callovo–Oxfordian clay-rock (France). *Chem. Geol.* 387, 47–58. doi:10.1016/j.chemgeo.2014.08.008
- Chen, Z., Montavon, G., Ribet, S., Guo, Z., Robinet, J.C., David, K., Tournassat, C., Grambow, B., Landesman, C., 2014b. Key factors to understand in-situ behavior of Cs in Callovo–Oxfordian clay-rock (France). *Chem. Geol.* 387, 47–58. doi:10.1016/j.chemgeo.2014.08.008
- Chiang, P.N., Wang, M.K., Huang, P.M., Wang, J.J., 2011. Effects of low molecular weight organic acids on ¹³⁷Cs release from contaminated soils. *Appl. Radiat. Isot.* 69, 844–851. doi:10.1016/j.apradiso.2011.02.043
- Childers, S.E., Ciuffo, S., Lovley, D.R., 2002. *Geobacter metallireducens* accesses insoluble Fe(III) oxide by chemotaxis. *Nature* 416, 767–9. doi:10.1038/416767a
- CHINO, M., NAKAYAMA, H., NAGAI, H., TERADA, H., KATATA, G., YAMAZAWA, H., 2011. Preliminary Estimation of Release Amounts of ¹³¹I and ¹³⁷Cs Accidentally Discharged from the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant into the Atmosphere. *J. Nucl. Sci. Technol.* 48, 1129–1134. doi:10.1080/18811248.2011.9711799
- CLARKE, S., STUART, J., SANDERSLOEHR, J., 1987. INDUCTION OF SIDEROPHORE ACTIVITY IN ANABAENA SPP AND ITS MODERATION OF COPPER TOXICITY. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 917–922.
- Cline, J.F., Hungate, F.P., 1960. Accumulation of Potassium, Cesium, and Rubidium in Bean Plants Grown in Nutrient Solutions. *Plant Physiol.* 35, 826–9.
- Collander, R., 1941. SELECTIVE ABSORPTION OF CATIONS BY HIGHER PLANTS. *Plant Physiol.* 16, 691–720.
- Cornelis, P., Matthijs, S., 2002. Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. *Environ. Microbiol.* 4, 787–98.
- Cornell, R.M., 1993. Adsorption of cesium on minerals: A review. *J. Radioanal. Nucl. Chem. Artic.* 171, 483–500. doi:10.1007/BF02219872
- Cornu, J.Y., Elhabiri, M., Ferret, C., Geoffroy, V. a., Jezequel, K., Leva, Y., Lollier, M., Schalk, I.J., Lebeau, T., 2014. Contrasting effects of pyoverdine on the phytoextraction of Cu and Cd in a calcareous soil. *Chemosphere* 103, 212–219. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.11.070
- Couselo, J.L., Corredoira, E., Vieitez, A.M., Ballester, A., 2012. Plant tissue culture of fast-growing trees for phytoremediation research. *Methods Mol. Biol.* 877, 247–63. doi:10.1007/978-1-61779-818-4_19
- Cremers, A., Elsen, A., Preter, P. De, Maes, A., 1988. Quantitative analysis of radiocaesium retention in

- soils. *Nature* 335, 247–249. doi:10.1038/335247a0
- Cunningham, S.D., Berti, W.R., Huang, J.W., 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotechnol.* 13, 393–397. doi:10.1016/S0167-7799(00)88987-8
- Dahmani-Muller, H., van Oort, F., Gélle, B., Balabane, M., 2000. Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environ. Pollut.* 109, 231–238. doi:10.1016/S0269-7491(99)00262-6
- del Olmo, A., Caramelo, C., SanJose, C., 2003. Fluorescent complex of pyoverdine with aluminum. *J. Inorg. Biochem.* 97, 384–387. doi:10.1016/S0162-0134(03)00316-7
- Díaz de Villegas, M.E., Villa, P., Frías, A., 2002. Evaluation of the siderophores production by *Pseudomonas aeruginosa* PSS. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 44, 112–117.
- Diels, L., De Smet, M., Hooyberghs, L., Corbisier, P., 1999. Heavy metals bioremediation of soil. *Mol. Biotechnol.* 12, 149–58. doi:10.1385/MB:12:2:149
- Dong, H., Jaisi, D.P., Kim, J., Zhang, G., 2009. 1505-1519 Microbe-clay mineral interactions. *Am. Mineral.* 94, 1505–1519. doi:10.2138/am.2009.3246
- Dong, H., Jaisi, D.P., Kim, J., Zhang, G., 2009. Microbe-clay mineral interactions. *Am. Mineral.* 94, 1505–1519. doi:10.2138/am.2009.3246
- Dong, H., Lu, A., 2012. Mineral-microbe interactions and implications for remediation. *Elements* 8, 95–100. doi:10.2113/gselements.8.2.95
- Doumett, S., Lamperi, L., Checchini, L., Azzarello, E., Mugnai, S., Mancuso, S., Petruzzelli, G., Del Bubba, M., 2008. Heavy metal distribution between contaminated soil and *Paulownia tomentosa*, in a pilot-scale assisted phytoremediation study: influence of different complexing agents. *Chemosphere* 72, 1481–90. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.04.083
- Dreyer, I., Antunes, S., Hoshi, T., Müller-Röber, B., Palme, K., Pongs, O., Reintanz, B., Hedrich, R., 1997. Plant K⁺ channel α -subunits assemble indiscriminately. *Biophys. J.* 72, 2143–50. doi:10.1016/S0006-3495(97)78857-X
- Dubbin, W.E., Louise Ander, E., 2003. Influence of microbial hydroxamate siderophores on Pb(II) desorption from α -FeOOH. *Appl. Geochemistry* 18, 1751–1756. doi:10.1016/S0883-2927(03)00084-2
- Dumat, C., Fajula, F., Staunton, S., 1997. Action des substances humiques sur les propriétés de sorption des argiles: cas du césium. *Comptes Rendus l'Académie des Sci. - Ser. IIB - Mech.* 325, 363–367. doi:10.1016/S1251-8069(97)81155-4
- Dumat, C., Staunton, S., 1999. Reduced adsorption of caesium on clay minerals caused by various humic substances. *J. Environ. Radioact.* 46, 187–200. doi:10.1016/S0265-931X(98)00125-8
- Dworkin, M., Foster, J.W., 1958. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *J. Bacteriol.* 75, 592–603.

- Eapen, S., Singh, S., Thorat, V., Kaushik, C.P., Raj, K., D'Souza, S.F., 2006. Phytoremediation of radiostrontium ((90)Sr) and radiocesium ((137)Cs) using giant milky weed (*Calotropis gigantea* R.Br.) plants. *Chemosphere* 65, 2071–3. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.06.049
- Edberg, F., Kalinowski, B.E., Holmström, S.J.M., Holm, K., 2010. Mobilization of metals from uranium mine waste: the role of pyoverdines produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Geobiology* 8, 278–92. doi:10.1111/j.1472-4669.2010.00241.x
- Edwards, S.J., Kjellerup, B. V., 2013. Applications of biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products, and heavy metals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9909–21. doi:10.1007/s00253-013-5216-z
- Ehrlich, H.L., 1996. How microbes influence mineral growth and dissolution. *Chem. Geol.* 132, 5–9. doi:10.1016/S0009-2541(96)00035-6
- Endo, S., Kimura, S., Takatsuji, T., Nanasawa, K., Imanaka, T., Shizuma, K., 2012. Measurement of soil contamination by radionuclides due to the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant accident and associated estimated cumulative external dose estimation. *J. Environ. Radioact.* 111, 18–27. doi:10.1016/j.jenvrad.2011.11.006
- EPA, U., 1997. Exposure Factors Handbook - usepa_1997_efh.pdf [WWW Document]. URL http://www.epa.gov/oppt/exposure/presentations/efast/usepa_1997_efh.pdf (accessed 8.27.15).
- EPA, 2000 Introduction to phytoremediation. Environmental Protection Agency. EPA/600/R-99/107
- Esnault, L., Libert, M., Bildstein, O., Mustin, C., Marsal, F., Jullien, M., 2013. Impact of iron-reducing bacteria on the properties of argillites in the context of radioactive waste geological disposal. *Appl. Clay Sci.* 83-84, 42–49. doi:10.1016/j.clay.2013.08.018
- Evans, E.J., Dekker, A.J., 1969. EFFECT OF NITROGEN ON CESIUM-137 IN SOILS AND ITS UPTAKE BY OAT PLANTS. *Can. J. Soil Sci.* 49, 349–355. doi:10.4141/cjss69-048
- Fan, Q.H., Tanaka, M., Tanaka, K., Sakaguchi, a., Takahashi, Y., 2014. An EXAFS study on the effects of natural organic matter and the expandability of clay minerals on cesium adsorption and mobility. *Geochim. Cosmochim. Acta* 135, 49–65. doi:10.1016/j.gca.2014.02.049
- Ferret, C., Cornu, J.Y., Elhabiri, M., Sterckeman, T., Braud, A., Jezequel, K., Lollier, M., Lebeau, T., Schalk, I.J., Geoffroy, V.A., 2014a. Effect of pyoverdine supply on cadmium and nickel complexation and phytoavailability in hydroponics. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 2106–2116. doi:10.1007/s11356-014-3487-2
- Ferret, C., Cornu, J.Y., Elhabiri, M., Sterckeman, T., Braud, A., Jezequel, K., Lollier, M., Lebeau, T., Schalk, I.J., Geoffroy, V.A., 2014b. Effect of pyoverdine supply on cadmium and nickel complexation and phytoavailability in hydroponics. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 2106–2116. doi:10.1007/s11356-014-3487-2
- Ferret, C., Sterckeman, T., Cornu, J.-Y., Gangloff, S., Schalk, I.J., Geoffroy, V. a., 2014. Siderophore-promoted dissolution of smectite by fluorescent *Pseudomonas*. *Environ. Microbiol. Rep.* 6, n/a–n/a. doi:10.1111/1758-2229.12146

- Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623–33. doi:10.1038/nrmicro2415
- Forsberg, S., Strandmark, M., 2001. Migration and Chemical Availability of ^{137}Cs and ^{90}Sr in Swedish Long-Term Experimental Pastures. *Water. Air. Soil Pollut.* 127, 157–171. doi:10.1023/A:1005203900317
- Fuhrmann, M., Lanzirotti, A., 2005. ^{241}Am , ^{137}Cs , Sr and Pb uptake by tobacco as influenced by application of Fe chelators to soil. *J. Environ. Radioact.* 82, 33–50. doi:10.1016/j.jenvrad.2004.11.006
- Fujiwara, T., Saito, T., Muroya, Y., Sawahata, H., Yamashita, Y., Nagasaki, S., Okamoto, K., Takahashi, H., Uesaka, M., Katsumura, Y., Tanaka, S., 2012. Isotopic ratio and vertical distribution of radionuclides in soil affected by the accident of Fukushima Dai-Ichi nuclear power plants. *J. Environ. Radioact.* 113, 37–44. doi:10.1016/j.jenvrad.2012.04.007
- Fulekar, M.H., Singh, A., Thorat, V., Kaushik, C.P., Eapen, S., 2010. Phytoremediation of ^{137}Cs using *catharanthus roseus*. pdf 48, 516–519.
- Fuller, A.J., Shaw, S., Ward, M.B., Haigh, S.J., Mosselmans, J.F.W., Peacock, C.L., Stackhouse, S., Dent, A.J., Trivedi, D., Burke, I.T., 2015. Caesium incorporation and retention in illite interlayers. *Appl. Clay Sci.* 108, 128–134. doi:10.1016/j.clay.2015.02.008
- Gabos, M.B., Abreu, C.A. de, Coscione, A.R., 2009. EDTA assisted phytoremediation of a Pb contaminated soil: metal leaching and uptake by jack beans. *Sci. Agric.* 66, 506–514. doi:10.1590/S0103-90162009000400012
- Gabr, R.M., Hassan, S.H.A., Shoreit, A.A.M., 2008. Biosorption of lead and nickel by living and non-living cells of *Pseudomonas aeruginosa* ASU 6a. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 62, 195–203. doi:10.1016/j.ibiod.2008.01.008
- Gadd, G., 2001. Microbial metal transformations. *J. Microbiol.* 39, 83–88.
- Gadd, G.M., 2010. Metals, minerals and microbes: Geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156, 609–643. doi:10.1099/mic.0.037143-0
- Gadd, G.M., 2004. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma* 122, 109–119. doi:10.1016/j.geoderma.2004.01.002
- Gadd, G.M., 2000. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 271–279. doi:10.1016/S0958-1669(00)00095-1
- Gaines, G.L., Thomas, H.C., 1953. Adsorption Studies on Clay Minerals. II. A Formulation of the Thermodynamics of Exchange Adsorption. *J. Chem. Phys.* 21, 714. doi:10.1063/1.1698996
- Galimska-Stypa R., Sas-Nowosielska A., Kucharski R., Dushenkov S. (2000) Ecological risks caused by application of EDTA to soil. In Fifth International Symposium and Exhibition on Environmental Contamination in Central and Eastern Europe. Prague. Vol. N° 754.
- Garbeva, P., Veen, J.A., Elsas, J.D., 2004. Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia*

- solani AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47, 51–64. doi:10.1016/S0168-6496(03)00234-4
- GENTRY, T., RENSING, C., PEPPER, I., 2004. New Approaches for Bioaugmentation as a Remediation Technology. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 34, 447–494. doi:10.1080/10643380490452362
- Georgias, H., Taraz, K., Budzikiewicz, H., Geoffroy, V., Meyer, J.,. The structure of the pyoverdine from *Pseudomonas fluorescens* 1.3. Structural and biological relationships of pyoverdins from different strains. *ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCH. C-A J. Biosci.* 54, 301–308.
- Glick, B., Penrose, D., Li, J., 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* 190, 63–8. doi:10.1006/jtbi.1997.0532
- Glick, B.R., 2010. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* 28, 367–374. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.02.001
- Glick, B.R., 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol. Adv.* 21, 383–393. doi:10.1016/S0734-9750(03)00055-7
- Goncharova, N. V, 2009. Availability of Radiocesium in Plant From Soil: Facts , Mechanisms and Modelling 11, 260–266.
- Gorbushina, A. a., 2007. Life on the rocks. *Environ. Microbiol.* 9, 1613–1631. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01301.x
- Gram, L., 1996. The influence of substrate on siderophore production by fish spoilage bacteria. *J. Microbiol. Methods* 25, 199–205. doi:10.1016/0167-7012(95)00079-8
- Grant, M., Harsh, J.B., Keller, K., Thomashaw, L., Shi, Z., Boyle, J., 2012. Biofilm mediated chemical weathering of biotite. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* 243.
- Grčman, H., Velikonja-Bolta, Š., Vodnik, D., Kos, B., Leštan, D., 2001. EDTA enhanced heavy metal phytoextraction: metal accumulation, leaching and toxicity. *Plant Soil* 235, 105–114. doi:10.1023/A:1011857303823
- Grcman, H., Vodnik, D., Velikonja-Bolta, S., Lestan, D., 2003. Ethylenediaminedisuccinate as a new chelate for environmentally safe enhanced lead phytoextraction. *J. Environ. Qual.* 32, 500–6.
- Guillén, J., Baeza, A., Corbacho, J.A., Muñoz-Muñoz, J.G., 2015. Migration of (137)Cs, (90)Sr, and (239+240)Pu in Mediterranean forests: influence of bioavailability and association with organic acids in soil. *J. Environ. Radioact.* 144, 96–102. doi:10.1016/j.jenvrad.2015.03.011
- Gutierrez-Manero, F.J., Ramos-Solano, B., Probanza, A. n, Mehrouachi, J., R. Tadeo, F., Talon, M., 2001. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol. Plant.* 111, 206–211. doi:10.1034/j.1399-3054.2001.1110211.x
- Haack, E. a., Johnston, C.T., Maurice, P. a., 2008. Mechanisms of siderophore sorption to smectite and siderophore-enhanced release of structural Fe³⁺. *Geochim. Cosmochim. Acta* 72, 3381–3397. doi:10.1016/j.gca.2008.03.027

- HALL, B., 1998. Transport and survival of alginate-encapsulated and free lux-lac marked *Pseudomonas aeruginosa* UG2Lr cells in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 26, 51–61. doi:10.1016/S0168-6496(98)00021-X
- Hameeda, B., Reddy, Y.H.K., Rupela, O.P., Kumar, G.N., Reddy, G., 2006. Effect of carbon substrates on rock phosphate solubilization by bacteria from composts and macrofauna. *Curr. Microbiol.* 53, 298–302. doi:10.1007/s00284-006-0004-y
- Handley, R., Overstreet, R., 1961. Effect of various cations upon absorption of carrier-free cesium. *Plant Physiol.* 36, 66–9.
- Haydon, M.J., Cobbett, C.S., 2007. Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytol.* 174, 499–506. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02051.x
- Henner, P., Colle, C., Morello, M., 2005. Retention and translocation of foliar applied $^{239,240}\text{Pu}$ and ^{241}Am , as compared to ^{137}Cs and ^{85}Sr , into bean plants (*Phaseolus vulgaris*). *J. Environ. Radioact.* 83, 213–229. doi:10.1016/j.jenvrad.2005.04.006
- Henry, J.R., 2000. An Overview of the Phytoremediation of Lead and Mercury - henry.pdf [WWW Document]. US-EPA. URL <http://www.epa.gov/tio/download/remed/henry.pdf> (accessed 8.27.15).
- Hernlem, B.J., Vane, L.M., Sayles, G.D., 1999. The application of siderophores for metal recovery and waste remediation: examination of correlations for prediction of metal affinities. *Water Res.* 33, 951–960. doi:10.1016/S0043-1354(98)00293-0
- Hersman, L., Lloyd, T., Spósito, G., 1995. Siderophore-promoted dissolution of hematite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 59, 3327–3330. doi:10.1016/0016-7037(95)00221-K
- Hider, R.C., Kong, X., 2010. Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* 27, 637–57. doi:10.1039/b906679a
- Hiltner, L. (1904) Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arb. DLG*, 98, 59–78.
- Hinton, T.G., Kaplan, D.I., Knox, A.S., Coughlin, D.P., Nascimento, R. V., Watson, S.I., Fletcher, D.E., Koo, B.J., 2006. Use of illite clay for in situ remediation of ^{137}Cs -contaminated water bodies: Field demonstration of reduced biological uptake. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4500–4505. doi:10.1021/es060124x
- Hoflich, G., Metz, R., 1997. Interactions of plant-microorganism-associations in heavy metal containing soils from sewage farms. *BODENKULTUR* 48, 239–247.
- Höflich, G., Wiehe, W., Kühn, G., 1994. Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere microorganisms. *Experientia* 50, 897–905. doi:10.1007/BF01923476
- Holmén, B.A., Casey, W.H., 1996. Hydroxamate ligands, surface chemistry, and the mechanism of ligand-promoted dissolution of goethite [$\alpha\text{-FeOOH(s)}$]. *Geochim. Cosmochim. Acta* 60, 4403–4416. doi:10.1016/S0016-7037(96)00278-5

- Huang, X.-F., Chaparro, J.M., Reardon, K.F., Zhang, R., Shen, Q., Vivanco, J.M., 2014. Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities 1. *Botany* 92, 267–275. doi:10.1139/cjb-2013-0225
- Hubert, F., Caner, L., Meunier, a., Lanson, B., 2009. Advances in characterization of soil clay mineralogy using X-ray diffraction: From decomposition to profile fitting. *Eur. J. Soil Sci.* 60, 1093–1105. doi:10.1111/j.1365-2389.2009.01194.x
- Ibáñez, J.P., Umetsu, Y., 2004. Uptake of trivalent chromium from aqueous solutions using protonated dry alginate beads. *Hydrometallurgy* 72, 327–334. doi:10.1016/j.hydromet.2003.10.009
- Illmer, P., 2006. A commercially available iron-chelating agent, Desferal, promotes Fe- and Al-mobilization in soils. *Soil Biol. Biochem.* 38, 1491–1493. doi:10.1016/j.soilbio.2005.08.023
- Ivshina, I.B., Peshkur, T.A., Korobov, V.P., 2013. Efficient Uptake of Cesium Ions by Rhodococcus Cells. *Microbiology* 71, 357–361. doi:10.1023/A:1015875216095
- Jacobs, D.G., Tamura, T., 1960. THE MECHANISM OF ION FIXATION USING RADIOISOTOPE TECHNIQUES. *Trans. Intern. Congr. Soil Sci.*, 7th, Madison, Wisconsin, 1960 Vol: 2.
- Jacques, R.J.S., Okeke, B.C., Bento, F.M., Teixeira, A.S., Peralba, M.C.R., Camargo, F.A.O., 2008. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. *Bioresour. Technol.* 99, 2637–43. doi:10.1016/j.biortech.2007.04.047
- Jagetiya, B., Sharma, A., 2013. Optimization of chelators to enhance uranium uptake from tailings for phytoremediation. *Chemosphere* 91, 692–6. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.11.044
- Jones, D.L., 1998. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant Soil* 205, 25–44. doi:10.1023/A:1004356007312
- Jones, D.L., Kochian, L. V., 1996. Aluminium-organic acid interactions in acid soils. *Plant Soil* 182, 221–228. doi:10.1007/BF00029053
- Joshi, T., Iyengar, L., Singh, K., Garg, S., 2008. Isolation, identification and application of novel bacterial consortium TJ-1 for the decolorization of structurally different azo dyes. *Bioresour. Technol.* 99, 7115–21. doi:10.1016/j.biortech.2007.12.074
- Julou, T., Mora, T., Guillon, L., Croquette, V., Schalk, I.J., Bensimon, D., Desprat, N., 2013. Cell-cell contacts confine public goods diffusion inside *Pseudomonas aeruginosa* clonal microcolonies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 12577–82. doi:10.1073/pnas.1301428110
- Junter G.A. and Labbé M., (1987) Procédé pour la répartition et le maintien de l'activité de microorganismes dans des structures de ladite activité, structures résultantes et leurs applications analytique et bientechnologiques. Brevet Français n°2 597 498.
- Kabata-Pendias A, Pendias H., 2001. Trace elements in soils and plants. *3rd CRC Press, Boca Raton, London, New-York, Washington, D C*

- Kalinowski, B., Liermann, L., Brantley, S., Barnes, A., Pantano, C., 2000. X-ray photoelectron evidence for bacteria-enhanced dissolution of hornblende. *Geochim. Cosmochim. Acta* 64, 1331–1343. doi:10.1016/S0016-7037(99)00371-3
- Kang, D.J., Seo, Y.J., Saito, T., Suzuki, H., Ishii, Y., 2012. Uptake and translocation of cesium-133 in napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schum.) under hydroponic conditions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 82, 122–126. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.05.017
- Kanter, U., Hauser, A., Michalke, B., Draxl, S., Schaffner, A.R., 2010. Caesium and strontium accumulation in shoots of *Arabidopsis thaliana*: genetic and physiological aspects. *J. Exp. Bot.* 61, 3995–4009. doi:10.1093/jxb/erq213
- Karimzadeh, L., Nair, S., Merkel, B.J., 2013. Effect of Microbial Siderophore DFOB on Pb, Zn, and Cd Sorption Onto Zeolite. *Aquat. Geochemistry* 19, 25–37. doi:10.1007/s10498-012-9176-1
- Kato, H., Onda, Y., Teramage, M., 2012. Depth distribution of ¹³⁷Cs, ¹³⁴Cs, and ¹³¹I in soil profile after Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant Accident. *J. Environ. Radioact.* 111, 59–64. doi:10.1016/j.jenvrad.2011.10.003
- Kennedy, V.H., Sanchez, A.L., Oughton, D.H., Rowland, A.P., 1997. Use of Single and Sequential Chemical Extractants to Assess Radionuclide and Heavy Metal Availability From Soils for Root Uptake [WWW Document]. *Analyst*. URL <http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/1997/an/a704133k> (accessed 8.27.15).
- Khan, A.G., 2006. Mycorrhizoremediation--an enhanced form of phytoremediation. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 7, 503–14. doi:10.1631/jzus.2006.B0503
- Kierstan, M., Bucke, C., 1977. The immobilization of microbial cells, subcellular organelles, and enzymes in calcium alginate gels. *Biotechnol. Bioeng.* 19, 387–97. doi:10.1002/bit.260190309
- Kim, J., Dong, H., Seabaugh, J., Newell, S.W., Eberl, D.D., 2004. Role of microbes in the smectite-to-illite reaction. *Science* 303, 830–2. doi:10.1126/science.1093245
- Kim, K.Y., Jordan, D., Krishnan, H.B., 1998. Expression of genes from *Rahnella aquatilis* that are necessary for mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 159, 121–127. doi:10.1111/j.1574-6968.1998.tb12850.x
- Knox, A.S., 2005. Cesium-137 partitioning to wetland sediments and uptake by plants. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*
- Koarashi, J., Atarashi-Andoh, M., Matsunaga, T., Sato, T., Nagao, S., Nagai, H., 2012. Factors affecting vertical distribution of Fukushima accident-derived radiocesium in soil under different land-use conditions. *Sci. Total Environ.* 431, 392–401. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.05.041
- Komarneni, S., 1979. Cesium sorption by clay minerals and shales at elevated temperatures. *J. Inorg. Nucl. Chem.* 41, 397–400. doi:10.1016/0022-1902(79)80153-0
- Kong, M., Huang, L., Li, L., Zhang, Z., Zheng, S., Wang, M.K., 2014. Effects of oxalic and citric acids on three clay minerals after incubation. *Appl. Clay Sci.* 99, 207–214. doi:10.1016/j.clay.2014.06.035

- KORDAN, H.A., 1987. REVERSAL OF CAESIUM INHIBITION OF GROWTH BY POTASSIUM IN HYPOCOTYLS OF TOMATO SEEDLINGS (*LYCOPERSICON ESCULENTUM* L.). *New Phytol.* 107, 395–401. doi:10.1111/j.1469-8137.1987.tb00191.x
- Kraemer, S.M., 2004. Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquat. Sci.* 66, 3–18. doi:10.1007/s00027-003-0690-5
- Kraemer, S.M., Cheah, S.-F., Zapf, R., Xu, J., Raymond, K.N., Sposito, G., 1999. Effect of hydroxamate siderophores on Fe release and Pb(II) adsorption by goethite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 63, 3003–3008. doi:10.1016/S0016-7037(99)00227-6
- Kuhn, K.M., DuBois, J.L., Maurice, P. a., 2013. Strategies of aerobic microbial Fe acquisition from Fe-bearing montmorillonite clay. *Geochim. Cosmochim. Acta* 117, 191–202. doi:10.1016/j.gca.2013.04.028
- Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Bloemberg, G. V, Lugtenberg, B.J.J., 2004. Rhizoremediation : A Beneficial Plant-Microbe Interaction Bioremediation : A natural method 17, 6–15.
- Kumar, K. V, Singh, N., Behl, H.M., Srivastava, S., 2008. Influence of plant growth promoting bacteria and its mutant on heavy metal toxicity in *Brassica juncea* grown in fly ash amended soil. *Chemosphere* 72, 678–83. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.03.025
- Kuwahara, C., Fukumoto, A., Nishina, M., Sugiyama, H., Anzai, Y., Kato, F., 2011. Characteristics of cesium accumulation in the filamentous soil bacterium *Streptomyces* sp. K202. *J. Environ. Radioact.* 102, 138–144. doi:10.1016/j.jenvrad.2010.11.004
- Lagarde, D., Basset, M., Lepetit, M., Conejero, G., Gaymard, F., Astruc, S., Grignon, C., 1996. Tissue-specific expression of *Arabidopsis* AKT1 gene is consistent with a role in K⁺ nutrition. *Plant J.* 9, 195–203.
- Latour, X., Philippot, L., Corberand, T., Lemanceau, P., 1999. The establishment of an introduced community of fluorescent pseudomonads in the soil and in the rhizosphere is affected by the soil type. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30, 163–170.
- Lebeau, T., 2011. Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol, *Soil Biology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-19769-7
- Lebeau, T., Braud, A., Jézéquel, K., 2008. Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: a review. *Environ. Pollut.* 153, 497–522. doi:10.1016/j.envpol.2007.09.015
- Lee, C.P., Jan, Y.L., Lan, P.L., Wei, Y.Y., Teng, S.P., Hsu, C.N., 2007. Anaerobic and aerobic sorption of cesium and selenium on mudrock. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 274, 145–151. doi:10.1007/s10967-006-6883-3
- Lee, J., Sung, K., 2014. Effects of chelates on soil microbial properties, plant growth and heavy metal accumulation in plants. *Ecol. Eng.* 73, 386–394. doi:10.1016/j.ecoleng.2014.09.053
- LESPINAT, P., BERLIER, Y., 1975. EXTERNAL FACTORS ACTING ON ROOT EXUDATION. *Bull.*

- LA Soc. Bot. Fr. 122, 21–30.
- Liermann, L.J., Kalinowski, B.E., Brantley, S.L., Ferry, J.G., 2000. Role of bacterial siderophores in dissolution of hornblende. *Geochim. Cosmochim. Acta* 64, 587–602. doi:10.1016/S0016-7037(99)00288-4
- Lombi, E., Wenzel, W., Gobran, G., Adriano, D., 2001. Dependency of phytoavailability of metals on indigenous and induced rhizosphere processes: A review. *TRACE Elem. Rhizosph.* 3–24.
- Maathuis, F.J.M., Sanders, D., 1996. Mechanisms of potassium absorption by higher plant roots. *Physiol. Plant.* 96, 158–168. doi:10.1111/j.1399-3054.1996.tb00197.x
- Maes, N., Salah, S., Jacques, D., Aertsens, M., Van Gompel, M., De Cannière, P., Velitchkova, N., 2008. Retention of Cs in Boom Clay: Comparison of data from batch sorption tests and diffusion experiments on intact clay cores. *Phys. Chem. Earth, Parts A/B/C* 33, S149–S155. doi:10.1016/j.pce.2008.10.002
- Mao, Y., Hu, H., Yan, Y., 2011. Biosorption of cesium(I) from aqueous solution by a novel exopolymers secreted from *Pseudomonas fluorescens* C-2: Equilibrium and kinetic studies. *J. Environ. Sci.* 23, 1104–1112. doi:10.1016/S1001-0742(10)60522-0
- Mapelli, F., Marasco, R., Balloi, A., Rolli, E., Cappitelli, F., Daffonchio, D., Borin, S., 2012. Mineral-microbe interactions: Biotechnological potential of bioweathering. *J. Biotechnol.* 157, 473–481. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.11.013
- Marschner, H., 2011. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*.
- Marschner, P., Yang, C.-H., Lieberei, R., Crowley, D., 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 33, 1437–1445. doi:10.1016/S0038-0717(01)00052-9
- Massas, I., Skarlou, V., Haidouti, C., Giannakopoulou, F., 2010. ¹³⁴Cs uptake by four plant species and Cs-K relations in the soil-plant system as affected by Ca(OH)₂ application to an acid soil. *J. Environ. Radioact.* 101, 250–257. doi:10.1016/j.jenvrad.2009.11.010
- Matsunaga, T., Koarashi, J., Atarashi-Andoh, M., Nagao, S., Sato, T., Nagai, H., 2013. Comparison of the vertical distributions of Fukushima nuclear accident radiocesium in soil before and after the first rainy season, with physicochemical and mineralogical interpretations. *Sci. Total Environ.* 447, 301–314. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.12.087
- Maurice, P.A., Vierkorn, M.A., Hersman, L.E., Fulghum, J.E., 2001. Dissolution of well and poorly ordered kaolinites by an aerobic bacterium. *Chem. Geol.* 180, 81–97. doi:10.1016/S0009-2541(01)00307-2
- McBride MB, 1989. Reactions controlling heavy metal solubility in soils. *Advances in Soil Science* 10
- McNear Jr., D. H. 2013. The Rhizosphere - Roots, Soil and Everything In Between. *Nature Education Knowledge* 4(3):1
- Meers, E., Hopgood, M., Lesage, E., Vervaeke, P., Tack, F.M.G., Verloo, M.G., 2004. Enhanced phytoextraction: in search of EDTA alternatives. *Int. J. Phytoremediation* 6, 95–109.

doi:10.1080/16226510490454777

- Meyer, J.M., 2000. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch. Microbiol.* 174, 135–42.
- Meyer, J.-M., Geoffroy, V.A., Baida, N., Gardan, L., Izard, D., Lemanceau, P., Achouak, W., Palleroni, N.J., 2002. Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2745–53.
- Meyer, J.-M., Gruffaz, C., Raharinosy, V., Bezverbnaya, I., Schäfer, M., Budzikiewicz, H., 2008. Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. *Biometals* 21, 259–71. doi:10.1007/s10534-007-9115-6
- Middleton, L.J., Handley, R., Overstreet, R., 1960. Relative Uptake and Translocation of Potassium and Cesium in Barley. *Plant Physiol.* 35, 913–918. doi:10.1104/pp.35.6.913
- Miethke, M., Marahiel, M.A., 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 413–51. doi:10.1128/MMBR.00012-07
- Miretzky, P., Saralegui, A., Cirelli, A.F., 2004. Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). *Chemosphere* 57, 997–1005. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.07.024
- Moni, C., Rumpel, C., Virto, I., Chabbi, a., Chenu, C., 2010. Relative importance of sorption versus aggregation for organic matter storage in subsoil horizons of two contrasting soils. *Eur. J. Soil Sci.* 61, 958–969. doi:10.1111/j.1365-2389.2010.01307.x
- Moogouei, R., Borghei, M., Arjmandi, R., 2011. Phytoremediation of stable Cs from solutions by *Calendula alata*, *Amaranthus chlorostachys* and *Chenopodium album*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 2036–9. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.07.019
- Morino, Y., Ohara, T., Nishizawa, M., 2011. Atmospheric behavior, deposition, and budget of radioactive materials from the Fukushima Daiichi nuclear power plant in March 2011. *Geophys. Res. Lett.* 38, n/a–n/a. doi:10.1029/2011GL048689
- Müller, B., 2009. Impact of the bacterium *Pseudomonas fluorescens* and its genetic derivatives on vermiculite: Effects on trace metals contents and clay mineralogical properties. *Geoderma* 153, 94–103. doi:10.1016/j.geoderma.2009.07.025
- Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs, B.F., 2001. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. *J. Hazard. Mater.* 85, 111–125. doi:10.1016/S0304-3894(01)00224-2
- Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs, B.F., James, S., Bennett, H.P.J., 1999. Metal Removal from Contaminated Soil and Sediments by the Biosurfactant Surfactin. *Environ. Sci. Technol.* 33, 3812–3820. doi:10.1021/es9813055
- Nakamura, R., 1995. Expression of an Arabidopsis potassium channel gene in guard cells. *PLANT Physiol.* 109, 371–374. doi:10.1104/pp.109.2.371
- Nakao, A., Thiry, Y., Funakawa, S., Kosaki, T., 2008. Characterization of the frayed edge site of micaceous

- minerals in soil clays influenced by different pedogenetic conditions in Japan and northern Thailand. *Soil Sci. Plant Nutr.* 54, 479–489. doi:10.1111/j.1747-0765.2008.00262.x
- Nascimento, C.W.A. Do, Xing, B., 2006. Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation. *Sci. Agric.* 63, 299–311. doi:10.1590/S0103-90162006000300014
- Neubauer, U., Furrer, G., Kayser, A., Schulin, R., 2000. Siderophores, NTA, and Citrate: Potential Soil Amendments to Enhance Heavy Metal Mobility in Phytoremediation. *Int. J. Phytoremediation* 2, 353–368. doi:10.1080/15226510008500044
- Newsome, L., Morris, K., Lloyd, J.R., 2014. The biogeochemistry and bioremediation of uranium and other priority radionuclides. *Chem. Geol.* 363, 164–184. doi:10.1016/j.chemgeo.2013.10.034
- Nishita, H., Dixon, D., Larson, K.H., 1962. Accumulation of Cs and K and growth of bean plants in nutrient solution and soils. *Plant Soil* 17, 221–242. doi:10.1007/BF01376226
- Nowack, B., Kari, F.G., Kruger, H.G., 2001. The Remobilization of Metals from Iron Oxides and Sediments by Metal-EDTA Complexes. *Water. Air. Soil Pollut.* 125, 243–257. doi:10.1023/A:1005296312509
- O’Sullivan, D.J., O’Gara, F., 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 56, 662–676.
- Oliveira, C.A., Alves, V.M.C., Marriel, I.E., Gomes, E.A., Scotti, M.R., Carneiro, N.P., Guimarães, C.T., Schaffert, R.E., Sá, N.M.H., 2009. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biol. Biochem.* 41, 1782–1787. doi:10.1016/j.soilbio.2008.01.012
- Pal, A., Paul, A.K., 2008. Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Indian J. Microbiol.* 48, 49–64. doi:10.1007/s12088-008-0006-5
- Parekh, N.R., Poskitt, J.M., Dodd, B. a., Potter, E.D., Sanchez, a., 2008. Soil microorganisms determine the sorption of radionuclides within organic soil systems. *J. Environ. Radioact.* 99, 841–852. doi:10.1016/j.jenvrad.2007.10.017
- Parkhurst, D.L., Appelo, C.A.J., 1999. User’s guide to PHREEQC (Version 2): a computer program for speciation, batch-reaction, one-dimensional transport, and inverse geochemical calculations. *Water-Resources Investig. Rep.*
- Parmar, P., Sindhu, S., 2013. Potassium Solubilization by Rhizosphere Bacteria: Influence of Nutritional and Environmental Conditions. *J. Microbiol. Res.* 3, 25–31. doi:10.5923/j.microbiology.20130301.04
- Pazurkiewicz-Kocot, K., Galas, W., Kita, A., 2003. The effect of selenium on the accumulation of some metals in *Zea mays* L. plants treated with indole-3-acetic acid. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 8, 97–103.
- Perdrial, J.N., Warr, L.N., Perdrial, N., Lett, M.-C., Elsass, F., 2009. Interaction between smectite and bacteria: Implications for bentonite as backfill material in the disposal of nuclear waste. *Chem. Geol.* 264, 281–294. doi:10.1016/j.chemgeo.2009.03.012
- Perrin DD (1979) Stability constants of metal-ion complexes. Part B. International Union of Pure and Applied Chemistry, Data Series 22

- Peterson, R.L., Massicotte, H.B., Melville, L.H., 2004. Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology.
- Poinssot, C., Baeyens, B., Bradbury, M.H., 1999. Experimental and modelling studies of caesium sorption on illite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 63, 3217–3227. doi:10.1016/S0016-7037(99)00246-X
- Portier, R., Bianchini, M., Fujisaki, K., Henry, C., McMillin, D., 1989. Comparison of effective toxicant biotransformation by autochthonous microorganisms and commercially available cultures in the in situ reclamation of abandoned industrial sites. *Schriftenr. Ver. Wasser. Boden. Lufthyg.* 80, 273–92.
- Powell, P.E., Cline, G.R., Reid, C.P.P., Szaniszlo, P.J., 1980. Occurrence of hydroxamate siderophore iron chelators in soils. *Nature* 287, 833–834. doi:10.1038/287833a0
- Preter, P. de, 1990. Radiocesium retention in the aquatic, terrestrial and urban environment: a quantitative and unifying analysis.
- Ragon, M., Restoux, G., Moreira, D., Møller, A.P., López-García, P., 2011. Sunlight-exposed biofilm microbial communities are naturally resistant to chernobyl ionizing-radiation levels. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0021764
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M.N.V., Freitas, H., 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol.* 28, 142–9. doi:10.1016/j.tibtech.2009.12.002
- Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M.N. V, Freitas, H., 2012. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* 30, 1562–74. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.04.011
- Rajkumar, M., Vara Prasad, M.N., Freitas, H., Ae, N., 2009. Biotechnological applications of serpentine soil bacteria for phytoremediation of trace metals. *Crit. Rev. Biotechnol.* 29, 120–130. doi:10.1080/07388550902913772
- Raymond, K. N. et Dertz, E. A. (2004) Biochemical and physical properties of siderophores. In *Iron transport in bacteria* (eds Crosa, J. H., Mey, A. R. et Payne, S. M.) pp. 3-17. ASM Press.
- Reed, R.H., Rowell, P., Stewart, W.D.P., 1981. Uptake of potassium and rubidium ions by the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 11, 233–236. doi:10.1111/j.1574-6968.1981.tb06971.x
- Reichard, P.U., Kretzschmar, R., Kraemer, S.M., 2007. Dissolution mechanisms of goethite in the presence of siderophores and organic acids. *Geochim. Cosmochim. Acta* 71, 5635–5650. doi:10.1016/j.gca.2006.12.022
- Reinoso-Maset, E., Worsfold, P.J., Keith-Roach, M.J., 2013. Effect of organic complexing agents on the interactions of Cs(+), Sr(2+) and UO(2)(2+) with silica and natural sand. *Chemosphere* 91, 948–54. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.105
- Rigol, a., Vidal, M., Rauret, G., 2002. An overview of the effect of organic matter on soil-radiocaesium interaction: Implications in root uptake. *J. Environ. Radioact.* 58, 191–216. doi:10.1016/S0265-931X(01)00066-2

- Riise, G., Bjørnstad, H., Lien, H., Oughton, D., Salbu, B., 2005. A study on radionuclide association with soil components using a sequential extraction procedure. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*
- Rodriguez, H., Gonzalez, T., Goire, I., Bashan, Y., 2004. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften* 91, 552–5. doi:10.1007/s00114-004-0566-0
- Römkens, P., Bouwman, L., Japenga, J., Draaisma, C., 2002. Potentials and drawbacks of chelate-enhanced phytoremediation of soils. *Environ. Pollut.* 116, 109–121. doi:10.1016/S0269-7491(01)00150-6
- Rosenberg E.; Biofilms on water-insoluble substrates In: Characklis WG, Wilderer PA (eds) *Structure and function of biofilms*; 1989; Wiley, New York, 59-71
- Rosenberg, D.R., Maurice, P.A., 2003. Siderophore adsorption to and dissolution of kaolinite at pH 3 to 7 and 22°C. *Geochim. Cosmochim. Acta* 67, 223–229. doi:10.1016/S0016-7037(02)01082-7
- Ruggiero, C., Neu, M., Vanderberg, L., 1999. Plutonium and uranium interactions with siderophores of aerobic soil microbes. *J. Inorg. Biochem.* 74, 282–282.
- Russo, A., Moëgne-Loccoz, Y., Fedi, S., Higgins, P., Fenton, A., Dowling, D.N., O'Regan, M., O'Gara, F., 1996. Improved delivery of biocontrol *Pseudomonas* and their antifungal metabolites using alginate polymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 740–745. doi:10.1007/BF00178612
- Saito, T., Makino, H., Tanaka, S., 2014. Geochemical and grain-size distribution of radioactive and stable cesium in Fukushima soils: implications for their long-term behavior. *J. Environ. Radioact.* 138, 11–8. doi:10.1016/j.jenvrad.2014.07.025
- Saleh, H.M., 2012. Water hyacinth for phytoremediation of radioactive waste simulate contaminated with cesium and cobalt radionuclides. *Nucl. Eng. Des.* 242, 425–432. doi:10.1016/j.nucengdes.2011.10.023
- Salisbury, F. B. (1994) The role of plant hormones. In *Plant–Environment Interactions* (ed Wilkinson, R. E.) pp. 39–81. Marcel Dekker, New York, USA.
- Sanz-Montero, M.E., Rodríguez-Aranda, J.P., 2009. Silicate bioweathering and biomineralization in lacustrine microbialites: ancient analogues from the Miocene Duero Basin, Spain. *Geol. Mag.* 146, 527. doi:10.1017/S0016756808005906
- Sawhney, B., 1972. Selective sorption and fixation of cations by clay-minerals - review 20, 93–100.
- Sawhney, B.L., 1970. Potassium and Cesium Ion Selectivity in Relation to Clay Mineral Structure. *Clays Clay Miner.* 18, 47–52. doi:10.1346/CCMN.1970.0180106
- Sawhney, B.L., 1969. Regularity of Interstratification as Affected by Charge Density in Layer Silicates I. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 33, 42. doi:10.2136/sssaj1969.03615995003300010015x
- Schalk, I.J., Hannauer, M., Braud, A., 2011. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ. Microbiol.* 13, 2844–54. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02556.x
- Schalk, I.J., Kyslik, P., Prome, D., van Dorsselaer, A., Poole, K., Abdallah, M.A., Pattus, F., 1999.

- Copurification of the FpvA ferric pyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa* with its iron-free ligand: implications for siderophore-mediated iron transport. *Biochemistry* 38, 9357–65. doi:10.1021/bi990421x
- Seiffert, F., Bandow, N., Bouchez, J., von Blanckenburg, F., Gorbushina, A.A., 2014. Microbial Colonization of Bare Rocks: Laboratory Biofilm Enhances Mineral Weathering. *Procedia Earth Planet. Sci.* 10, 123–129. doi:10.1016/j.proeps.2014.08.042
- Sessitsch, A., Kuffner, M., Kidd, P., Vangronsveld, J., Wenzel, W.W., Fallmann, K., Puschenreiter, M., 2013. The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biol. Biochem.* 60, 182–194. doi:10.1016/j.soilbio.2013.01.012
- Shahid, M., Austruy, A., Echevarria, G., Arshad, M., Sanaullah, M., Aslam, M., Nadeem, M., Nasim, W., Dumat, C., 2013. EDTA-Enhanced Phytoremediation of Heavy Metals: A Review. *Soil Sediment Contam. An Int. J.* 23, 389–416. doi:10.1080/15320383.2014.831029
- Sharma, S., Singh, B., Manchanda, V.K., 2014. Phytoremediation: role of terrestrial plants and aquatic macrophytes in the remediation of radionuclides and heavy metal contaminated soil and water. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 946–962. doi:10.1007/s11356-014-3635-8
- Shaw, G., Hewamanna, R., Lillywhite, J., Bell, J.N.B., 1992. Radiocaesium uptake and translocation in wheat with reference to the transfer factor concept and ion competition effects. *J. Environ. Radioact.* 16, 167–180. doi:10.1016/0265-931X(92)90014-K
- Sheng, X.F., He, L.Y., 2006. Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. *Can. J. Microbiol.* 52, 66–72. doi:10.1139/W05-117
- Sheng, X.F., Zhao, F., He, L.Y., Qiu, G., Chen, L., 2008. Isolation and characterization of silicate mineral-solubilizing *Bacillus globisporus* Q12 from the surfaces of weathered feldspar. *Can. J. Microbiol.* 54, 1064–1068. doi:10.1139/W08-089
- Simanova, a., 2011. Molecular Perspectives on Goethite Dissolution in the Presence of Oxalate and Desferrioxamine-B.
- Singer, A.C., van der Gast, C.J., Thompson, I.P., 2005. Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation. *Trends Biotechnol.* 23, 74–7. doi:10.1016/j.tibtech.2004.12.012
- Singh, G., Ahuja, N., Batish, M., Capalash, N., Sharma, P., 2008. Biobleaching of wheat straw-rich soda pulp with alkalophilic laccase from gamma-proteobacterium JB: optimization of process parameters using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 99, 7472–9. doi:10.1016/j.biortech.2008.02.023
- Singh, R., Paul, D., Jain, R.K., 2006. Biofilms: implications in bioremediation. *Trends Microbiol.* 14, 389–97. doi:10.1016/j.tim.2006.07.001
- Singh, S., Eapen, S., Thorat, V., Kaushik, C.P., Raj, K., D'Souza, S.F., 2008. Phytoremediation of ¹³⁷cesium and ⁹⁰strontium from solutions and low-level nuclear waste by *Vetiveria zizanoides*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69, 306–311. doi:10.1016/j.ecoenv.2006.12.004

- Singh, S., Thorat, V., Kaushik, C.P., Raj, K., Eapen, S., D'Souza, S.F., 2009. Potential of *Chromolaena odorata* for phytoremediation of ¹³⁷Cs from solution and low level nuclear waste. *J. Hazard. Mater.* 162, 743–745. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.05.097
- Smith, R.M., Martell, A.E., Motekaitis, R.J., 2003. NIST critically selected stability constants of metal complexes database.
- Smolders, E., Kiebooms, L., Buysse, J., Merckx, R., 1996. (*Triticum aestivum* L. cv. Tonic) at varying K supply 211–220.
- Smolders, E., Shaw, G., 1995. Changes in radiocaesium uptake and distribution in wheat during plant development: a solution culture study. *Plant Soil* 176, 1–6. doi:10.1007/BF00017669
- Sokolova, T. a., 2011. The role of soil biota in the weathering of minerals: A review of literature. *Eurasian Soil Sci.* 44, 56–72. doi:10.1134/S1064229311010121
- Staunton, S., 2002. Direct and indirect effects of organic matter on metal immobilisation in soil. *SOIL Miner. MATTER-MICROORGANISM Interact. Ecosyst. Heal. VOL 28A Dyn. Mobil. Transform. Pollut. Nutr.* 28A, 79–97.
- Staunton, S., Roubaud, M., 1997. Adsorption of ¹³⁷Cs on montmorillonite and illite: Effect of charge compensating cation, ionic strength, concentration of Cs, K and fulvic acid. *Clays Clay Miner.* 45, 251–260. doi:10.1346/CCMN.1997.0450213
- Steenwerth, K.L., Drenovsky, R.E., Lambert, J.-J., Kluepfel, D.A., Scow, K.M., Smart, D.R., 2008. Soil morphology, depth and grapevine root frequency influence microbial communities in a Pinot noir vineyard. *Soil Biol. Biochem.* 40, 1330–1340. doi:10.1016/j.soilbio.2007.04.031
- Takahashi, J., Tamura, K., Suda, T., Matsumura, R., Onda, Y., 2015. Vertical distribution and temporal changes of ¹³⁷Cs in soil profiles under various land uses after the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant accident. *J. Environ. Radioact.* 139, 351–61. doi:10.1016/j.jenvrad.2014.07.004
- Takeda, A., Tsukada, H., Nakao, A., Takaku, Y., Hisamatsu, S., 2013. Time-dependent changes of phytoavailability of Cs added to allophanic Andosols in laboratory cultivations and extraction tests. *J. Environ. Radioact.* 122, 29–36. doi:10.1016/j.jenvrad.2013.02.005
- Teitzel, G.M., Parsek, M.R., 2003. Heavy Metal Resistance of Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2313–2320. doi:10.1128/AEM.69.4.2313-2320.2003
- Tessier, A., Campbell, P.G.C., Bisson, M., 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Anal. Chem.* 51, 844–851. doi:10.1021/ac50043a017
- Tišáková, L., Pipiška, M., Godány, a., Horník, M., Vidová, B., Augustín, J., 2013. Bioaccumulation of ¹³⁷Cs and ⁶⁰Co by bacteria isolated from spent nuclear fuel pools. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 295, 737–748. doi:10.1007/s10967-012-1932-6
- Todorov, B., Pekov, G., Djingova, R., 2008. Fractionation of ¹³⁷Cs and ⁶⁰Co in soils by sequential extractions. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*
- TOMIOKA, N., UCHIYAMA, H., YAGI, O., 1992. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF

- CESIUM-ACCUMULATING BACTERIA. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1019–1023.
- Torres, M.A., West, A.J., Neilson, K., 2014. Microbial Acceleration of Olivine Dissolution via Siderophore Production. *Procedia Earth Planet. Sci.* 10, 118–122. doi:10.1016/j.proeps.2014.08.041
- Tournassat, C., Gailhanou, H., Crouzet, C., Braibant, G., Gautier, A., Gaucher, E.C., 2009. Cation Exchange Selectivity Coefficient Values on Smectite and Mixed-Layer Illite/Smectite Minerals. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 73, 928. doi:10.2136/sssaj2008.0285
- Turgut, C., Katie Pepe, M., Cutright, T.J., 2004. The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cd, Cr, and Ni from soil using *Helianthus annuus*. *Environ. Pollut.* 131, 147–54. doi:10.1016/j.envpol.2004.01.017
- Uchida, S., Tagami, K., 2007. Soil-to-plant transfer factors of fallout ^{137}Cs and native ^{133}Cs in various crops collected in Japan. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 273, 205–210. doi:10.1007/s10967-007-0737-5
- Upchurch, R., Chiu, C.-Y., Everett, K., Dyszynski, G., Coleman, D.C., Whitman, W.B., 2008. Differences in the composition and diversity of bacterial communities from agricultural and forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 40, 1294–1305. doi:10.1016/j.soilbio.2007.06.027
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.P., Frey-Klett, P., 2009. Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. *Trends Microbiol.* 17, 378–387. doi:10.1016/j.tim.2009.05.004
- van Elsas, J.D., Heijnen, C.E., 1990. Methods for the introduction of bacteria into soil: A review. *Biol. Fertil. Soils* 10, 127–133. doi:10.1007/BF00336248
- van Elsas, J.D., Trevors, J.T., Jain, D., Wolters, A.C., Heijnen, C.E., van Overbeek, L.S., 1992. Survival of, and root colonization by, alginate-encapsulated *Pseudomonas fluorescens* cells following introduction into soil. *Biol. Fertil. Soils* 14, 14–22. doi:10.1007/BF00336297
- Venkata Mohan, S., Falkentoft, C., Venkata Nancharaiah, Y., Sturm, B.S.M., Wattiau, P., Wilderer, P.A., Wuertz, S., Hausner, M., 2009. Bioaugmentation of microbial communities in laboratory and pilot scale sequencing batch biofilm reactors using the TOL plasmid. *Bioresour. Technol.* 100, 1746–53. doi:10.1016/j.biortech.2008.09.048
- Veresoglou, D.S., Tsialtas, J.T., Barbayiannis, N., Zalidis, G.C., 1995. Caesium and strontium uptake by two pasture plant species grown in organic and inorganic soils. *Agric. Ecosyst. Environ.* 56, 37–42. doi:10.1016/0167-8809(95)00631-1
- Vinichuk, M.M., Johanson, K.J., Rosén, K., Nilsson, I., 2005. Role of the fungal mycelium in the retention of radiocaesium in forest soils. *J. Environ. Radioact.* 78, 77–92. doi:10.1016/j.jenvrad.2004.02.008
- Visca, P., Imperi, F., Lamont, I.L., 2007. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol.* 15, 22–30. doi:10.1016/j.tim.2006.11.004
- Volesky, B., 1990. Biosorption of Heavy Metals.
- Vyas, P., Gulati, A., 2009. Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiol.* 9, 174. doi:10.1186/1471-2180-9-174

- Wang, D., Wen, F., Xu, C., Tang, Y., Luo, X., 2012. The uptake of Cs and Sr from soil to radish (*Raphanus sativus* L.)- potential for phytoextraction and remediation of contaminated soils. *J. Environ. Radioact.* 110, 78–83. doi:10.1016/j.jenvrad.2012.01.028
- Wang, Q., Xiong, D., Zhao, P., Yu, X., Tu, B., Wang, G., 2011. Effect of applying an arsenic-resistant and plant growth-promoting rhizobacterium to enhance soil arsenic phytoremediation by *Populus deltoides* LH05-17. *J. Appl. Microbiol.* 111, 1065–74. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05142.x
- Wang, W.S., Shan, X.Q., Wen, B., Zhang, S.Z., 2003. Relationship between the extractable metals from soils and metals taken up by maize roots and shoots. *Chemosphere* 53, 523–30. doi:10.1016/S0045-6535(03)00518-6
- Wedepohl, K.H., Turekian, K.K., 1961. Distribution of the elements in some major units of the earth's crust [WWW Document]. URL <http://gsabulletin.gsapubs.org/content/72/2/175.full.pdf> (accessed 7.20.15).
- Wendling, L. a., Harsh, J.B., Palmer, C.D., Hamilton, M. a., Dion, H.M., Boyle, J.S., Flury, M., 2005a. Rhizosphere Effects on Cesium Fixation Sites of Soil Containing Micaceous Clays. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 69, 1652. doi:10.2136/sssaj2004.0286
- Wendling, L. a., Harsh, J.B., Palmer, C.D., Hamilton, M. a., Flury, M., 2004. Cesium sorption to illite as affected by oxalate. *Clays Clay Miner.* 52, 375–381. doi:10.1346/CCMN.2004.0520312
- Wendling, L. a., Harsh, J.B., Ward, T.E., Palmer, C.D., Hamilton, M. a., Boyle, J.S., Flury, M., 2005b. Cesium desorption from illite as affected by exudates from rhizosphere bacteria. *Environ. Sci. Technol.* 39, 4505–4512. doi:10.1021/es048809p
- WHITE, P., 1998. Calcium Channels in the Plasma Membrane of Root Cells. *Ann. Bot.* 81, 173–183. doi:10.1006/anbo.1997.0554
- White, P.J., 2000. Calcium channels in higher plants. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1465, 171–189. doi:10.1016/S0005-2736(00)00137-1
- White, P.J., 1999. The molecular mechanism of sodium influx to root cells. *Trends Plant Sci.* 4, 245–246. doi:10.1016/S1360-1385(99)01435-1
- White, P.J., 1997. Cation channels in the plasma membrane of rye roots. *J. Exp. Bot.* 48 Spec No, 499–514. doi:10.1093/jxb/48.Special_Issue.499
- White, P.J., Broadley, M.R., 2000. Mechanisms of caesium uptake by plants. *New Phytol.* 147, 241–256. doi:10.1046/j.1469-8137.2000.00704.x
- Wilderman, P.J., Vasil, A.I., Johnson, Z., Wilson, M.J., Cunliffe, H.E., Lamont, I.L., Vasil, M.L., 2001. Characterization of an Endoprotease (PrpL) Encoded by a PvdS-Regulated Gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 69, 5385–5394. doi:10.1128/IAI.69.9.5385-5394.2001
- Williams, L.E., Pittman, J.K., Hall, J., 2000. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1465, 104–126. doi:10.1016/S0005-2736(00)00133-4
- Wu, H., Tang, S., Zhang, X., Guo, J., Song, Z., Tian, S., Smith, D.L., 2009. Using elevated CO₂ to increase the biomass of a *Sorghum vulgare* ?? *Sorghum vulgare* var. *sudanense* hybrid and *Trifolium pratense*

- L. and to trigger hyperaccumulation of cesium. *J. Hazard. Mater.* 170, 861–870. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.05.069
- Xie, J., Liu, Y., Zeng, G., Liu, H., Zheng, B., Tang, H., Xu, W., Sun, Z., Tan, X., Nie, J., Jiang, Z., Gan, C., Wang, S., 2015. The effects of *P. aeruginosa* ATCC 9027 and NTA on phytoextraction of Cd by ramie (*Boehmeria nivea* (L.) Gaud). *RSC Adv.* 5, 67509–67517. doi:10.1039/C5RA13420J
- Yeterian, E., Martin, L.W., Lamont, I.L., Schalk, I.J., 2010. An efflux pump is required for siderophore recycling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol. Rep.* 2, 412–8. doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00115.x
- Yoshida, T., Hayashi, K., Ohmoto, H., 2002. Dissolution of iron hydroxides by marine bacterial siderophore. *Chem. Geol.* 184, 1–9. doi:10.1016/S0009-2541(01)00297-2
- Yoshikawa, N., Obara, H., Ogasa, M., Miyazu, S., Harada, N., Nonaka, M., 2014. ¹³⁷Cs in irrigation water and its effect on paddy fields in Japan after the Fukushima nuclear accident. *Sci. Total Environ.* 481, 252–9. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.01.129
- Zeng, F., Chen, S., Miao, Y., Wu, F., Zhang, G., 2008. Changes of organic acid exudation and rhizosphere pH in rice plants under chromium stress. *Environ. Pollut.* 155, 284–9. doi:10.1016/j.envpol.2007.11.019
- Zeza, N., Pasini, G., Lombardi, A., Mercenier, A., Spettoli, P., Zamorani, A., Nuti, M.P., 1993. Production of a bacteriocin active on lactate-fermenting clostridia by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* immobilized in coated alginate beads. *J. Dairy Res.* 60, 581. doi:10.1017/S002202990002793X
- Zhu, T., Wang, L., Ge, F.Z., 2010. Equilibrium and Kinetic Studies of Aqueous Cesium(I) Ions Biosorption by *Pseudomonas alcaligenes* Biomass as a Low-Cost Natural Biosorbent. *Adv. Mater. Res.* 171–172, 53–56. doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.171-172.53
- Zhu, Y.G., Shaw, G., 2000. Soil contamination with radionuclides and potential remediation. *Chemosphere* 41, 121–128. doi:10.1016/S0045-6535(99)00398-7
- Zhuang, X., Chen, J., Shim, H., Bai, Z., 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environ. Int.* 33, 406–13. doi:10.1016/j.envint.2006.12.005
- Zimmermann, S., Talke, I., Ehrhardt, T., Nast, G., Müller-Röber, B., 1998. Characterization of SKT1, an inwardly rectifying potassium channel from potato, by heterologous expression in insect cells. *Plant Physiol.* 116, 879–90.

Thèse de Doctorat

Alice Hazotte

Rôle de métabolites bactériens dans la mobilisation du césium d'une illite dopée : étude mécaniste et application à la phytoextraction

Résumé

Lors d'accidents nucléaires, divers radionucléides comme le césium-137 (Cs) sont dispersés dans l'atmosphère avant de retomber au sol. Afin d'éliminer le Cs accumulé dans l'horizon de surface des sols, à la fois *in situ* et à moindre coût, la phytoextraction se révèle être une méthode prometteuse. La combinaison de la bioaugmentation du sol et de la phytoextraction est susceptible de réduire la durée des traitements en augmentant la fraction de Cs mobilisable par la plante. La compréhension des mécanismes qui régissent les interactions Cs-sol-plante-bactéries fait l'objet de ce travail de thèse. Le premier volet porte sur la bioaccessibilité du Cs d'une illite purifiée et dopée, en considérant les actions directe ou indirecte de métabolites bactériens (acides citrique et oxalique, desferrioxamine mésylate, acide acétohydroxamique et la pyoverdine (PVD) produite par *P. fluorescens*). La PVD désorbe jusqu'à 45% du Cs de l'illite par des mécanismes directs (échange ionique) et indirects (altération de l'illite) combinés. Dans le deuxième volet, le trèfle violet (*Trifolium pratense*), choisi comme plante accumulatrice, est cultivé en hydroponie, en présence ou non de PVD. Sans PVD, 10,0 μmol de Cs par g^{-1} de matière sèche (MS) sont accumulés dans les racines et 5,9 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ MS dans ses parties aériennes alors qu'en sa présence, l'accumulation de Cs par le trèfle est réduite de 25 à 70% mais le facteur de translocation est plus élevé (0,5 sans et 1,1 avec). Dans le troisième volet, le trèfle est cultivé en pots de sol en présence ou en absence de PVD. Les résultats sont proches de ceux mesurés en hydroponie (118 Cs $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ MS de racines et 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ dans les parties aériennes).

Mots clés

altération microbienne, césium, illite, phytoextraction, *Pseudomonas fluorescens*, pyoverdine, sidérophores, *Trifolium pratense*

Abstract

Following nuclear accidents, various radionuclides such as cesium-137 (Cs) are dispersed in the atmosphere before being deposited on the soil. In order to eliminate Cs accumulated in the upper soil horizon, both *in situ* and at lower cost, phytoextraction is proving to be a promising method. The combination of bioaugmentation of soil and phytoextraction may reduce the treatment duration by increasing the fraction of Cs mobilized by the plant. Understanding the mechanisms that governs the Cs-soil-plant-bacteria interactions is the subject of this thesis. The first part of the thesis concerns the bioaccessibility of a purified and Cs-doped illite, considering the direct or indirect actions of bacterial metabolites (citric and oxalic acids, desferrioxamine mesylate, acetohydroxamic acid and pyoverdine (PVD) produced by *P. fluorescens*). PVD desorbs up to 45% of Cs from illite through direct (ion exchange) and indirect (illite weathering) mechanisms. In the second part, red clover (*Trifolium pratense*), chosen as accumulator plant, is hydroponically grown, with or without PVD. Without PVD, 10.0 μmol of Cs per g of dry matter (DM) are accumulated in roots and 5.9 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ DM in its aboveground parts while in its presence, Cs accumulation by red clover is reduced by 25 to 70% but the translocation factor was higher (0.5 without PVD and 1.1 with PVD). In the third part, the red clover is grown in pots in the presence or absence of PVD. The results are similar to those measured in hydroponics (118 Cs $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ MS in roots and 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ MS in the aboveground parts).

Key Words

cesium, illite, microbial weathering, phytoextraction, *Pseudomonas fluorescens*, pyoverdine, siderophores, *Trifolium pratense*