

DISS. ETH No. 21194

**FLOODING-INDUCED METALLIC AND METAL SULFIDE
NANOPARTICLE FORMATION IN SOIL:
THE ROLE OF TEMPERATURE AND BACTERIA**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

presented by

ANKE FREDERIKE HOFACKER

Dipl. Geoökol., University of Karlsruhe (TH)

born March 6, 1981

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Ruben Kretzschmar, examiner

Dr. Andreas Voegelin, co-examiner

Prof. Dr. Andreas Kappler, co-examiner

Prof. Dr. Jasquelin Peña, co-examiner

2013

Summary

Riparian floodplains are ecosystems at the interface of terrestrial and aquatic ecosystems, being characterized by fluctuations in water levels. Riparian soils have been contaminated for centuries from anthropogenic emissions. However, deposited contaminants may be mobilized and released into ground- and surface water bodies due to periodic flooding and associated changes in soil redox conditions that strongly affect the speciation and mobility of trace metals. Microbial reduction of sulfate to sulfide during flooding can lead to the sequestration of chalcophile trace metals by precipitation of sparingly soluble metal sulfides. Copper, cadmium and lead cannot only be sequestered as metal sulfides, but also be mobilized as metal sulfide colloids in soil pore water. During initial flooding when sulfide concentrations are low, copper can additionally form metallic copper nanoparticles associated with suspended bacteria in the pore water, which transform into Cu_xS upon sulfide release. The bacteria involved in metallic copper nanoparticle formation remain unknown. As temperature can affect the rates and interplay of microbial and abiotic geochemical processes, seasonal variations of temperature in temperate regions can control the fate of metal contaminants in riparian soils. The aim of the present study therefore was (i) to investigate the effect of temperature on metallic copper and metal sulfide nanoparticle formation, (ii) to study whether the chalcophile metal mercury can also be mobilized by colloid formation, and (iii) to identify the bacteria involved in metallic copper nanoparticle formation and to determine whether the metallic copper nanoparticles are formed at the outermost cell wall, inside the periplasm or in the cytoplasm of the bacteria. Laboratory microcosm experiments were performed with a riparian soil from the Mulde River (Germany) that was flooded for up to five weeks. The pore water and soil matrix were stud-

ied by wet-chemical analyses, X-ray absorption fine structure (XAFS) spectroscopy, electron microscopy and molecular microbiology techniques.

Microcosm experiments at temperatures of 23, 14, and 5 °C revealed that temperature controlled metal mobilization mainly via its influence on microbial reduction of terminal electron acceptors. Reductive dissolution of manganese and iron (hydr)oxides and the release of dissolved manganese and iron was significantly slower and less intense at lower temperature, causing a decrease of trace metal mobilization via dissolution of metal oxide sorbents and cation competition for sorption sites. Metallic copper nanoparticles associated with suspended bacteria were observed at all temperatures before sulfate reduction, as well as their transformation to copper sulfide nanoparticles upon sulfide release. Fast sulfate reduction at 23 and 14 °C resulted in metal sulfide nanoparticles dominating copper, cadmium, and lead pore water dynamics over several weeks of soil flooding, whereas high dissolved concentrations of these metals persisted at 5 °C due to delayed onset of sulfate reduction. The median size of freely dispersed metal sulfide nanoparticles that precipitated from the pore water increased from 21 nm at 23 °C to 70 nm at 5 °C. The results demonstrate that temperature strongly controls trace metal dynamics during soil flooding and that even at low temperatures, soil flooding may trigger the release of contaminants in dissolved and colloidal form from riparian soils.

Colloidal mercury was mobilized concomitant with copper prior to sulfate reduction at 23, 14, and 5 °C. Mercury was found to substitute for copper in metallic copper nanoparticles, suggesting copper-mercury alloy nanoparticle formation. With the onset of sulfate reduction, mercury associated with mixed metal sulfide nanoparticles. The incorporation of mercury in metallic and metal sulfide nanoparticles may influence the availability of mercury for methylation or volatilization and has substantial potential to drive mercury release from contaminated riparian soils into adjacent water bodies.

Bacteria involved in metallic copper nanoparticle formation were identified as *Clostridium* sp.. Backscattered electron (BSE) images collected at electron landing energies of 0.5 to 3 keV, revealed that metallic copper nanoparticles were below the outermost surface of the bacterial cells. A comparison of the BSE images to Monte Carlo simulations suggested metallic copper nanoparticles to be localized ~50 nm below the outermost surface of the bacteria, i.e. probably

in the periplasm. Additional BSE images revealed metallic copper nanoparticle bearing bacteria with terminal spores. Based on 16S rRNA gene clone sequences from pore water bacteria, a *Clostridium* sp. strain closely related to *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium roseum*, and *Clostridium diolis* was identified. The isolated *Clostridium* sp. carried a *copA* gene and therefore the genetic potential for actively pumping out Cu(I) from the cytoplasm into the periplasm, where the Cu(I) may disproportionate to metallic Cu(0) and Cu(II). Clostridia are widespread fermenting soil bacteria, well-adapted to periodic flooding and drying due to their ability to form spores. During waterlogging of redox-dynamic soils, Clostridia may play an important role in copper cycling and metallic copper formation.

This dissertation demonstrates how temperature and bacteria influence trace metal mobilization via metallic and metal sulfide nanoparticle formation in waterlogged soils. Fermenting bacteria, namely Clostridia, seem to be the main players in metallic nanoparticle formation, suggesting their important role in copper and mercury cycling in anaerobic soils. This study provides valuable insights into the mobilization of trace metals as metallic and metal sulfide nanoparticles into the pore water of soils, which need to be considered for metal release and risk assessment of metal-contaminated redox-dynamic soils, especially when used for agriculture or pasture.

Zusammenfassung

Flussauen sind durch Wasserstandsschwankungen geprägte Ökosysteme an der Schnittstelle zwischen terrestrischen und aquatischen Ökosystemen. Über Jahrhunderte haben Flussauenböden als Senke für Schadstoffe aus anthropogenen Emissionen gedient. Dennoch können abgelagerte Schadstoffe aufgrund von regelmässigen Überflutungen, welche mit sich verändernden Redoxbedingungen einhergehen und zu einer Änderung der Spezierung und Mobilität von Spurenmetallen führen, mobilisiert und in Grund- und Oberflächenwasser ausgetragen werden. Mikrobielle Reduktion von Sulfat zu Sulfid während Überflutungsereignissen kann durch die Ausfällung von schwerlöslichen Metallsulfiden zu einer Festlegung von chalkophilen Spurenmetallen führen. Kupfer, Cadmium und Blei können nicht nur in Metallsulfiden festgelegt werden, sondern auch durch Metallsulfidkolloide im Bodenporenwasser mobilisiert werden. Kupfer kann zusätzlich während der anfänglichen Überflutung bei geringen Sulfidkonzentrationen mit Bakterien assoziierte, metallische Kupfernanopartikel bilden, welche sich durch Sulfidfreisetzung in Kupfersulfid umwandeln. Die an der Kupfernanopartikelbildung beteiligten Bakterien wurden bisher nicht identifiziert. Temperatur kann die Raten und Wechselwirkungen mikrobieller und abiotischer geochemischer Prozesse beeinflussen, so dass jahreszeitliche Temperaturschwankungen in den gemässigten Breiten den Verbleib von Spurenmetallschadstoffen in Auenböden kontrollieren können. Die Ziele dieser Arbeit waren daher (i) den Einfluss der Temperatur auf die Bildung von metallischen Kupfer- und Metallsulfidnanopartikeln zu untersuchen, (ii) zu untersuchen ob das chalkophile Metall Quecksilber auch durch Kolloidbildung mobilisiert werden kann und (iii) die an der metallischen Kupfernanopartikelbildung beteiligten Bakterien zu identifizieren sowie zu bestimmen, ob die metallischen Kupfernanopartikel an der äusseren Zellwand, im Periplasma oder im Cytoplasma gebildet werden. Zur Untersuchung dieser Fragen

wurden Mikrokosmenexperimente mit einem Auenboden des Flusses Mulde (Deutschland) mit Überflutungsdauern von bis zu 5 Wochen durchgeführt. Porenwasser und Bodenmatrix wurden mit nasschemischen Methoden, Synchrotron-basierter Röntgenabsorptionsspektroskopie, Elektronenmikroskopie, und molekularbiologischen Methoden untersucht.

Die Mikrokosmenexperimente bei Temperaturen von 23, 14, und 5 °C haben gezeigt, dass Temperatur die Metallmobilisierung vor allem durch ihren Einfluss auf mikrobielle Reduktion und terminale Elektronenakzeptoren beeinflusst. Die reduktive Auflösung von Mangan- und Eisen(hydr)oxiden und die Freisetzung von gelöstem Mangan und Eisen war bei niedriger Temperatur erheblich langsamer und weniger ausgeprägt, wodurch sich die durch Auflösung von Metalloxidsorbenten und Konkurrenz von Kationen an Sorptionsplätzen bedingte Mobilisierung von Spurenmetallen verringerte. Bei allen Temperaturen wurden mit Bakterien assoziierte, metallische Kupfernanopartikel nachgewiesen, sowie deren Umwandlung in Kupfersulfid durch Sulfidfreisetzung. Schnelle Sulfatreduktion bei 23 und 14 °C führte dazu, dass Metallsulfidnanopartikel das Verhalten von Kupfer, Cadmium und Blei im Porenwasser bestimmten, wohingegen bei 5 °C die gelösten Konzentrationen dieser Metalle durch das verspätete Einsetzen der Sulfatreduktion dominierten. Die mittlere Grösse (Median) der frei im Porenwasser suspendierten Metallsulfidnanopartikel stieg von 21 nm bei 23 °C auf 70 nm bei 5 °C an. Diese Ergebnisse zeigen, dass Temperatur einen grossen Einfluss auf die Spurenmetallodynamik während Überflutungsereignissen hat und dass Überflutungen sogar bei niedrigen Temperaturen die Freisetzung von Schadstoffen aus Auenböden bewirken können.

Kolloidales Quecksilber wurde bei 23, 14, und 5 °C gleichzeitig mit Kupfer vor der Sulfatreduktion mobilisiert. Es stellte sich heraus, dass Quecksilber in die metallischen Kupfernanopartikel eingebaut wurde, was auf die Bildung eines Gemisches aus Kupfer und Quecksilber hindeutet, also eine Amalgamierung darstellt. Mit einsetzender Sulfatreduktion wurde Quecksilber in Verbindung mit gemischten Metallsulfiden gefunden. Der Einbau von Quecksilber in metallische und Metallsulfidnanopartikel kann die Verfügbarkeit des Quecksilbers für Methylierung und Volatilisierung beeinflussen, sowie zu einem erheblichen Austrag aus kontaminierten Auenböden in Grund- und Oberflächenwasser führen.

Die an der Bildung des metallischen Kupfers beteiligten Bakterien wurden als *Clostridium* sp. identifiziert. Die bei Landeenergien der Elektronen von 0.5 bis 3 keV aufgenommenen Rückstreuielektronenbilder zeigten, dass keine metallischen Kupfernanopartikel an der äusseren Oberfläche der Bakterien zu sehen waren. Der Vergleich der Rückstreuielektronenbilder mit Monte Carlo Simulationen wies darauf hin, dass sich die metallischen Kupfernanopartikel ~ 50 nm unterhalb der äussersten Oberfläche der Bakterien befanden, d.h. im Periplasma. Zusätzliche Rückstreuielektronenbilder zeigten Bakterien mit metallischem Kupfer und endständigen Sporen. Mithilfe von 16S rRNA-Gen Klonsequenzen der Porenwasserbakterien wurde ein *Clostridium* sp. Stamm mit hoher Ähnlichkeit zu *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium roseum* und *Clostridium diolis* identifiziert. Weiterhin wurde bei allen isolierten *Clostridium* sp. ein *copA*-Gen detektiert, welches auf ihr genetisches Potenzial für aktiven Cu(I) Transport aus dem Cyto- ins Periplasma hindeutet, wo Cu(I) zu metallischem Cu(0) und Cu(II) disproportionieren kann. Clostridien sind weitverbreitete, fermentierende Bodenbakterien, welche durch ihre Möglichkeit zur Sporenbildung gut an regelmässige Überflutung angepasst sind. Sie können während der Vernässung von redox-dynamischen Böden eine wichtige Rolle für den Kupferkreislauf und die metallische Kupferbildung spielen.

In dieser Dissertation wird aufgezeigt inwiefern Temperatur und Bakterien die Spurenmetallmobilisierung in überfluteten Auenböden durch die Bildung von metallischen und Metallsulfidnanopartikeln beeinflussen können. Fermentierende Bodenbakterien (Clostridien) scheinen die Hauptakteure bei der Bildung metallischer Nanopartikel zu sein, was auf ihre bedeutende Funktion im Kreislauf von Kupfer und Quecksilber in anoxischen Böden hindeutet. Diese Arbeit trägt wesentliche Erkenntnisse zur Mobilisierung von Spurenmetallen ins Porenwasser von Böden durch metallische und Metallsulfidnanopartikel bei und zeigt auf, dass diese Nanopartikel in Studien zur Freisetzung von Metallen und in der Risikobewertung von kontaminierten, redox-dynamischen Auenböden berücksichtigt werden sollten, insbesondere wenn diese Flächen als Acker- oder Weideland genutzt werden.