

EFFET DE LA POLLUTION PAR LES METAUX LOURDS SUR LA FLORE BACTERIENNE D'UN SOL AGRICOLE

S. Bensadek¹, A. Boudali¹, S. Benhammadi², A. Iddou³, A. Ziouane¹, A. Aoues⁴

¹ Laboratoire de valorisation des matériaux. Faculté des sciences et de la technologie. Université de Mostaganem. Bp. 227. Mostaganem 27000. Algérie.

² UST-Oran Mohamed Boudiaf. Bir El Djir. Oran 31000. Algérie

³ Laboratoire Ressources Naturelles Sahariennes. Faculté des Sciences et de la Technologie. Université Ahmed Draia. Adrar 01000. Algérie.

⁴ Laboratoire de Biochimie. Faculté des Sciences, Département de biologie. Université d'Oran (Es-Sénia). Algérie

Email of corresponding author: iddoua@gmail.com

Received: 21 October 2018

Accepted: 20 December 2018

Abstract

The total microbial flora of agricultural soil (Mostaganem area) grown in the laboratory showed some tolerance to heavy metals. The minimum concentration of inhibition (MIC) by lead was determined. The revealed MIC was located at the lowest concentrations (between 5 and 20mg / L in Pb²⁺). The flora contaminated by lead has been subjected to the action of antibiotics: Kanamycine et Nitroxoline. The response to these is evidenced by measuring the zone of inhibition. Variation in the size of this area has shown that metallic stress influences the response to antibiotics. Microbial species that seem to be resistant to the presence of lead are then isolated for identification. The establishment of an antibiogram for these species gave zones of inhibition allowing us to foresee a change in the structure of these bacterial species.

These results will allow us to propose an effective method for the remediation or the bioremediation of soils contaminated by heavy metals, and this by isolating the most tolerant or the most resistant species.

Keywords: Tolerance - heavy metals - total flora - soil - remediation - metallic stress. Lead.

Résumé

La flore microbienne totale d'un sol agricole (région de Mostaganem) cultivée au laboratoire a montré une certaine tolérance aux métaux lourds. La concentration minimale d'inhibition (CMI) par le plomb a été déterminée. La CMI révélée était située vers les concentrations les plus faibles (comprises entre 5 et 20mg/L en Pb²⁺). La flore contaminée par le plomb a été soumise à l'action des antibiotiques : Kanamycine et Nitroxoline. La réponse à ces derniers est mise en évidence par la mesure de la zone d'inhibition. La variation de la taille de cette zone a montré que le stress métallique influe sur la réponse aux antibiotiques. Les espèces microbiennes qui semblent bien résister à la présence du plomb sont ensuite isolées pour être identifiées. L'établissement d'un antibiogramme pour ces espèces a donné des zones d'inhibition nous laissant prévoir un changement dans la structure de ces espèces bactériennes.

Ces résultats nous permettront de proposer une méthode efficace pour la remédiation ou la bio-dépollution des sols contaminés par les métaux lourds, et ce en isolant l'espèce la plus tolérante ou la plus résistante.

Mots clés: Tolérance - métaux lourds - flore totale - sol - remédiation - stress métallique. Plomb.

INTRODUCTION

La microflore tellurique –ou la microflore vivant dans le sol– est composée d'espèces appartenant aux groupes des bactéries, des actinomycètes, des champignons, des algues et des protozoaires. Les surfaces concernées par la pollution métallique se trouvent principalement à proximité des sites industriels. Les métaux peuvent être soit fixés dans les roches et les sédiments, soit mobiles (sous forme ionique). Dans le premier cas, les quantités disponibles sont infimes et ils n'ont aucune signification sur la pollution. Mais lorsque les conditions changent de telle manière que les métaux redeviennent solubles, l'augmentation de la concentration devient alors une menace directe pour l'environnement. En outre, depuis quelques années, les pluies acides augmentent la mobilité des métaux dans le sol et causent donc une augmentation de leur concentration dans les produits agricoles. [1-5]

Deux types de polluants peuvent influencer sur les bactéries : les métaux lourds et les substances organiques (pesticides, hydrocarbures). Les métaux peuvent être essentiels à la vie à très faibles doses (oligoéléments), car ils sont impliqués dans le métabolisme cellulaire (cofacteur enzymatique, stabilisateur de structure secondaire des protéines...). Mais dans le cas de pollution, ils sont tous potentiellement toxiques à forte concentration. Parmi les métaux non essentiels à la vie, il faut citer les métaux lourds comme le cadmium, le mercure, l'aluminium et le plomb. Ils sont tous généralement présents à l'état de trace dans la biosphère, ce qui limite leur interaction avec les organismes vivants. Cependant, l'augmentation des teneurs en métaux dans les écosystèmes terrestres et aquatiques constitue un danger potentiel par « bioaccumulation » le long de la chaîne trophique [1, 3].

Les divers mécanismes de résistance aux métaux mis en place par les microorganismes résistants (excrétion, accumulation, transformation) peuvent entraîner une détoxification du milieu, permettant dans une certaine mesure la survie des populations sensibles et, ainsi, le maintien de l'intégrité de l'écosystème. L'exploitation de ces systèmes biologiques d'élimination des pollutions par les métaux lourds est encore en phase de développement [6].

La pollution des sols est un problème qui est toujours persistant malgré les rares méthodes de remédiation proposées, dont l'application reste très délicate et très onéreuse [7-9].

Notre contribution au problème de la pollution des sols revêt une approche particulière, puisque l'étude que nous proposons ne réglera pas le problème de pollution, mais ouvrira des perspectives à d'éventuelles méthodes de traitement de ses sols contaminés, particulièrement par les métaux lourds, sans avoir à s'investir financièrement, et ce d'une manière exagérée. Les agents de l'humification et les organismes vivants constituent la biomasse biologique, qui en fait est composée non seulement de la microflore (bactéries, champignon), mais aussi de la faune du sol.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Echantillonnage des sols : les échantillons des sols proviennent d'une terre agricole située dans la partie Est du plateau de Mostaganem. Les prélèvements ont concerné les sols situés à proximité de la route menant vers Alger. Les échantillons de sols sont prélevés dans des boîtes stériles, et sont conservés à 4°C.

Culture de la flore totale du sol : 1g de sol est macéré dans le milieu TSE (Trypton-Sel-Eau), le surnagent servira à effectuer des dilutions dans des tubes à essai stériles, contenant 9 ml d'eau distillée.

Une culture en masse, est ensuite réalisée dans des boîtes à pétri coulée avec la gélose TGEA (Trypton-Glucose-Extrait de levure-Agar). Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures.

Adaptation de la flore totale au plomb : Les manipulations ont consisté à préparer plusieurs échantillons :

- ✓ Un échantillon témoin qui n'a subi aucun stress métallique ;
- ✓ Un échantillon contaminé par une espèce métallique : on prend 1g de sol qu'on place dans une solution stérile contenant du plomb (sous forme de nitrates) à des concentrations variables (5, 40 et 100 mg/L) ;
- ✓ Un échantillon contaminé par plusieurs espèces métalliques : Nous avons introduit le plomb en combinaison avec le cuivre et le cadmium (sous forme de nitrates et de sulfates) (Pb/Cd et Pb/Cu).

Les échantillons sont incubés à 37°C pendant 24 heures. Des dilutions sont ensuite réalisées et sontensemencées en masse sur TGEA. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

Epreuve de sensibilité aux antibiogrammes : des disques préimprégnés d'antibiotique : Kanamycine et Nitroxoline, sont disposés à la surface d'une boîte coulée avec la gélose Müller étalée avec le surnageant des différentes macérations de sols (avec ou sans contamination). Les boîtes sont incubées pendant 24heures à 37°C.

Isolement et Purification : Le but de la purification est l'obtention d'espèces bien distinctes et bien isolées ; qui, par la suite seront identifiées. Pour cela, des aliquotes sont prélevés des échantillons (quel que soit l'échantillon) etensemencés sur les géloses : Hektoen (HEK) et Salmonella-Shiguelia (SS). Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

Tests Biochimiques d'identification : L'inoculum doit être prélevé des suspensions bactériennes. A l'aide de pipettes stériles, on remplit les cupules de la galerie Api E20. La galerie est incubée à 37°C pendant 24heures.

La Nomenclature des réactifs de la galerie est comme suit :

ONPG: Ortho-nitro-phényl-galactoside
ADH : Arginine dihydrolase
LDC : Lysine décarboxylase
ODC : Ornithine décarboxylase
CIT : Citrate de Simmons
H₂S : Sulfure d'hydrogène
URE : Urée
TDA : Tryptophane désaminase
IND : Indole
VP : Acétoine (acetyl-méthyl-carbinol

GEL : Gélatine
GLU : Glucose
MAN : Mannose
INO: Inositol
SOR: Sorbitol
RHA: Ramnose
SAC: Saccharose
MEL: Mélibiose
AMY: Amyladine
ARA: Arabinose

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Influence de la concentration en plomb : Les résultats que nous avons obtenus (Figure 1), montrent clairement l'effet du plomb sur la culture bactérienne. En effet, la concentration la plus faible (5mg/L) a montré un effet inhibiteur par rapport à la

concentration la plus élevée (100mg/L). Cela peut être expliqué par une certaine adaptation de la flore aux fortes concentrations et surtout à une éventuelle sporulation des espèces microbiennes existant dans le sol.

Nous constatons, par ailleurs, que la flore proliférant en présence de Pb^{2+} à 5mg/L ne représentent que 4% de la flore totale. Un même ordre de grandeur de la valeur du pourcentage de croissance est enregistré pour les deux échantillons contenant le Pb^{2+} à 40 et 100mg/L, ils sont de 9 et 7% respectivement. Ces taux nous informent sur la capacité des microorganismes du sol à tolérer les fortes concentrations en plomb. Les mêmes observations, quant à la résistance des bactéries aux métaux lourds a été rapporté par plusieurs auteurs [10].

Influence de la présence simultanée des métaux : Nous avons essayé, dans cette étude, de voir l'effet du cuivre à 20mg/L, introduit dans la suspension de sol, traitée par le plomb à concentrations variables de 5, 40 et 100mg/L.

L'ajout du cuivre à la solution de plomb (100mg/L) agit négativement sur la flore, cela est montré par le nombre de germes enregistré de 93.10^2 comparé à celui dénombré quand le plomb est présent seul à la même concentration (150.10^2 germes/mL) correspondant à un taux de présence de 4,6%.

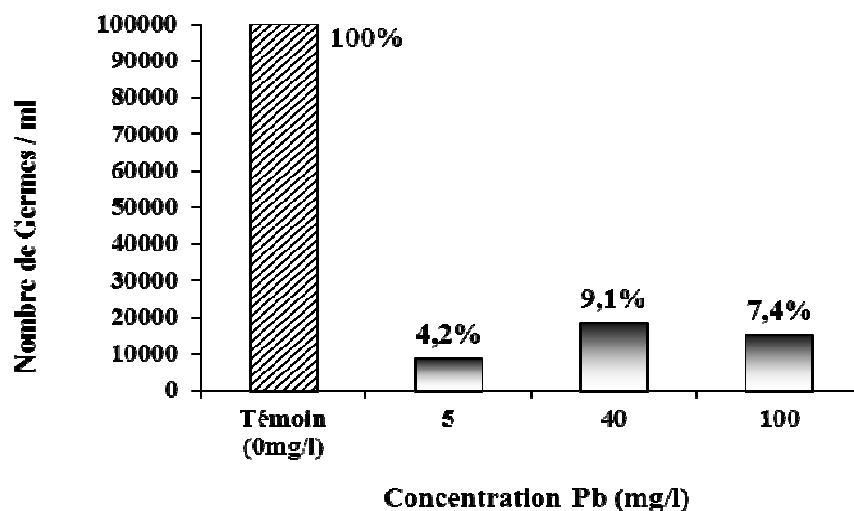


Figure 01 : Dénombrement de la flore totale sans et en présence du plomb.

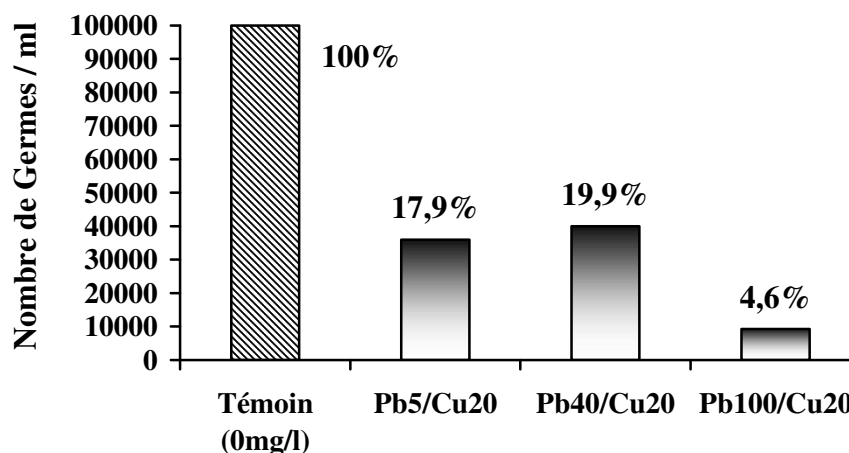


Figure 02 : Effet de l'ajout du cuivre sur la toxicité du plomb

Par contre, les autres essais (5 et 40mg de Pb/L) ont donné des résultats montrant que le cuivre diminue l'effet inhibiteur du plomb sur la culture bactérienne (Figure 2). Dans le premier cas (100mg Pb/L) le cuivre participe conjointement avec l'effet toxique du plomb. Il est probable, que dans le second cas (5 et 40mg Pb/l), le cuivre agit en compétition, en levant l'effet toxique du plomb ; cela s'est traduit par des taux de présence des espèces microbiennes de 17,9 et 19,9% respectivement. Ces taux sont plus importants que ceux enregistrés dans le cas de la contamination du sol par le plomb seul.

Antibiogramme de la flore contaminée : deux antibiotiques ont été testés : la Nitroxoline (NI) et la Kanamycine (K30). Les résultats de l'antibiogramme (Figure 3), montrent que la présence ou l'absence de la zone d'inhibition dépend du métal. C'est ainsi que la flore du sol contaminée par le plomb ne présente aucune zone, ce qui signifie l'affaiblissement de la résistance des espèces microbiennes, dû à la toxicité du plomb. La zone d'inhibition dans le cas du cuivre est proche de celle du témoin, signifiant une toxicité moins importante de cet élément seul. Peu de travaux rapportent la sensibilité des microorganismes du sol aux antibiotiques.

Certains auteurs [10-12] ont rapporté ce type de résistance aux antibiotiques d'espèces isolées du sol de l'antarctique. Peu d'espèces isolées ont montré leur résistance à la kanamycine en présence de métaux toxiques [13].

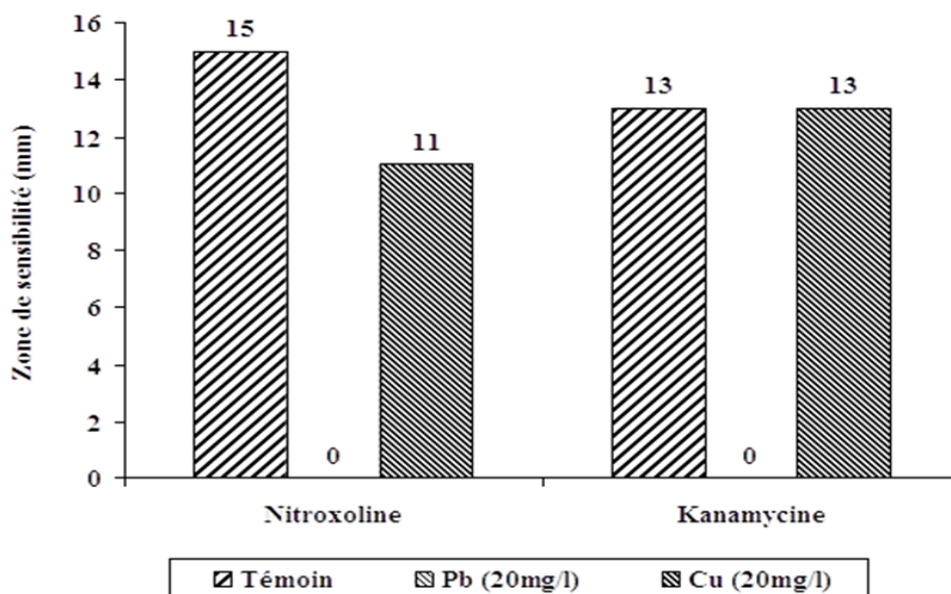


Figure 03 : Epreuve de sensibilité aux Antibiotiques.

Isolement et Identification biochimique : en vue de l'isolement des espèces qui ont montré une résistance à la présence des métaux lourds, seuls et en combinaison, nous avons choisi deux milieux spécifiques : Hektoen (HEK) et Gélose S-S, pour la flore prédominante des sols. La méthode choisie est celle dite en stries. Les résultats de l'isolement sur les deux milieux donnent une flore importante dans le cas du sol contaminé par le plomb.

Après incubation pendant 24heures à 37°C, nous avons observé une culture hétérogène le long des stries, indiquant l'existence de plusieurs types bactériens.

Plusieurs repiquages sont réalisés, en adoptant toujours la même méthodologie, jusqu'à l'obtention d'une flore présentant un même aspect et donne l'apparence d'une espèce pure.

Trois espèces ont été identifiées après comparaison avec le guide de référence et selon le Bergey's Manual of Determinative Bacteriology [14] (tableau 1). Les espèces sont :

Résultat 1 : *Enterobacter sakazakii*

Résultat 2 : *Salmonella arizonae*

Résultat 3 : *Pantoea Spp.*

Tableau 01 : Résultat de l'identification biochimique.

Test	Résultat 1	Résultat 2	Résultat 3
ONPG	+	+	+
ADH	+	+	-
LDC	-	+	-
ODC	+	+	-
CIT	+	+	+
H ₂ S	-	+	-
URE	-	-	-
TDA	-	-	-
IND	-	-	-
VP	+	-	-
GEL	-	-	-
GLU	+	+	+
MAN	+	+	+
INO	+	-	-
SOR	-	+	+
RHA	+	+	+
SAC	+	-	+
MEL	+	+	+
AMY	+	-	+
ARA	+	+	+

CONCLUSION

Cette étude, nous a conduits à un domaine complexe, mais fortement intéressant. Nous avons pu constater la relation qui existe entre la pollution des sols par les métaux lourds et la flore bactérienne. Il a été mis en évidence le comportement des microorganismes des sols contaminés par des métaux lourds, et il a été constaté que l'adaptation de la flore du sol, particulièrement les bactéries, dépend du type de métal et de sa concentration. C'est ainsi que, d'après les résultats, le métal le plus toxique s'est avéré être le plomb quand il est présent seul dans le sol. Sa présence simultanée avec le cuivre diminue sa toxicité. Les microorganismes présents sont majoritairement des cocci et des bacilles.

Ces résultats montrent clairement que le sol qui, à l'origine s'auto-épurerait naturellement, est confronté au problème de saturation par les métaux lourds, causés par la pollution. Il importe donc à l'homme d'intervenir pour enrichir les sols en question

par des espèces microbiennes capables de remédier à cette pollution, tout en gardant l'aspect d'origine et surtout en effectuant un apport qui ne risque pas de nuire à l'environnement et donc à la santé humaine.

DÉDICACES

Ce Travail est dédié à la mémoire de Monsieur le professeur Mohand Said OUALI – Université Abdelhamid Ibn Badis - Mostaganem.

RÉFÉRENCES

- [1] M.J. Wang, K.C. Jones-1994. Uptake of chlorobenzenes by carrots from spiked and sewage sludge-amended soil. *Environ. Sci. Technol.* 28, 1260-1267.
- [2] M.J. Wang, S.P. McGrath, K.C. Jones-1995. Chlorobenzenes in field soil with a history of multiple sewage sludge application. *Environ. Sci. Technol.* 29, 1360-1367.
- [3] J. Zhang, , W. Zhao, J. Pan, L. Qiu, Y. Zhu-2005. Tissue-dependent distribution and accumulation of chlorobenzenes by vegetables in urban area. *Environ. Int.* 31, 855-860.
- [4] M. Zolezzi, C. Cattaneo, J.V. Tarazona-2005. Probabilistic ecological risk assessment of 1,2,4-trichlorobenzene at a former industrial contaminated site. *Environ. Sci. Technol.* 39, 2920-2926.
- [5] M. Di Benedetto, S. Anfossi, E. Billiard, M. Bonnet, F. Henriot, F. Kraemer, L. Lechenne, M. Le Herissier, S. Lorin-1997. *Les métaux lourds*. Ecole Nationale Supérieure des Mines. France.
- [6] F. Ramade-1999. *Eléments d'écologie, écologie appliquée*. McGraw Hill, Paris.
- [7] C. Kim, Y. Lee, S.K. Ong-2003. *Factors affecting EDTA extraction of lead from lead-contaminated soils*. *Chemosphere*. 51, 845–853.
- [8] E. Macauley, A. Hong-1995. *Chelation extraction of lead from soil using pyridine-2,6-dicarboxylic acid*. *Journal of Hazardous Materials*. 40, 257–270.
- [9] A. Ike, R. Sriprang, H. Ono, Y. Murooka, M. Yamashita-2007. *Bioremediation of cadmium contaminated soil using symbiosis between leguminous plant and recombinant rhizobia with the MTL4 and the PCS genes*. *Chemosphere*. 66, 1670-1676.
- [10] S. Shiivaji, N.S. Rao, L. Saisree, V. Sheth, G.S.N. Reddy, P.M. Bhargava-1988. *Isolation and identification of Micrococcus roseus and Planococcus sp. from Schirmacher Oasis, Antarctica*. *Journal of Biosciences*. 13, 409-411.
- [11] S. Shiivaji, N.S. Rao, L. Saisree, V. Sheth, G.S.N. Reddy, P.M. Bhargava-1989. *Isolation and identification of Pseudomonas spp. from Schirmacher Oasis, Antarctica*. *Applied Environmental Microbiology*. 55, 767-770.
- [12] S. Shiivaji, N.S. Rao, L. Saisree, G.S.N. Reddy, G. Seshu Kumar, P.M. Bhargava-1989a. *Isolates of Arthrobacter from the soils of Schirmacher Oasis, Antarctica*. *Polar Biology*. 10, 225-229.
- [13] P.W. Ramteke, S. Khare, K. Gopal-2000. *Bacterial types and abundance in freshwater of Schirmacher Oasis, Antarctica*. *Journal of environmental biology*. 21(4), 349-353.
- [14] G. Holt, N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, S. T. Williams-1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Lippincott Williams & Wilkins. USA.