

Réhabilitation des écosystèmes métallifères par l'utilisation des micro-organismes. (Metalliferous ecosystems Rehabilitation using micro-organisms)

Nouri Mohamed*, Haddioui Abdelmajid

Laboratoire de Gestion et valorisation des ressources naturelles, Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultan Moulay Slimane, PO 523, Beni-Mellal 23000, Maroc.

* **Corresponding author. E-mail:** mohamednouri35@gmail.com; **Tel:** +212 6 54 25 21 63

Received 14 Oct 2016, Revised 15 Nov 2016, Accepted 20 Nov 2016

Résumé

La présente étude a pour objectif l'étude des variations de la diversité des populations bactériennes indigènes dans des sols contaminés par le fer. Les communautés microbiennes dans le sol ont été prélevées dans vingt échantillons de la zone minière de fer (Ait Ammar, Oued Zem) et un échantillon non touché (référence), ont été comparés afin de déterminer les effets des concentrations des métaux sur la diversité fonctionnelle (EcoPlaques Biolog®). La diversité fonctionnelle a été évaluée à l'aide de plusieurs indices comme l'activité métabolique globale de la plaque (AWCD), la richesse (R), Shannon-Weaver (H) et l'indice de régularité (E_H). Ces indices ont été calculés suivant le niveau de profilage physiologique des communautés (CLPP) en utilisant le système Biolog. L'analyse en composantes principales (ACP) des données Biolog ont montré que ni la direction, ni la distance à partir de la mine de fer, n'ont pas de l'affection significative sur la diversité fonctionnelle de la communauté bactérienne du sol. La toxicité des métaux dans les sols fortement contaminés par Fe et P n'a aucune incidence sur les quantités de populations microbiennes spécifiques et aucun changement significatif dans la diversité microbienne des sols contaminés.

Mots clés: Mine de fer, Oued Zem, EcoPlaques Biolog, Diversité microbienne, sol.

Abstract

The aim of the present study was to study changes in the diversity of native bacterial populations in soils contaminated by iron. The soil microbial communities were collected from twenty samples from the mining of iron area (Ait Ammar, Oued Zem) and unaffected sample (reference), were compared to determine the effects of metal concentrations on the functional diversity (EcoPlaques Biolog®). The functional diversity (catabolic potential) was assessed using several indicators such as Average Well Color Development (AWCD), Richness (R), Shannon-Weaver index (H) and Evenness index (E_H). These indices were calculated following the community level physiological profiling (CLPP) using Biolog® system. The principal component analysis (PCA) of Biolog data showed that no direction no distance from the iron mine have significant affection on the functional diversity of the bacterial community in the soil. The metal toxicity in highly contaminated soils with Fe and P did not affect the amounts of specific microbial populations and did not significantly change the microbial diversity of contaminated soils.

Key words: Iron mine, Oued Zem, BIOLOG EcoPlates, Microbial diversity, Soil

1. Introduction

Les techniques de bioremédiation utilisent les propriétés dépolluantes de microorganismes (des bactéries essentiellement, mais également des champignons) endogènes ou exogènes au terrain contaminé [1] but de dégrader ou transformer les contaminants à une forme moins contaminée [2]. Les microorganismes ont besoin de nutriments et de source carbonée pour fournir l'énergie nécessaire à leur croissance et leur survie. La bioremédiation doit faire face à un environnement hétérogène dans lequel la plupart du temps, les contaminants sont présents en association avec des particules, dissous dans la solution du sol, etc. Pour cette raison, la bioremédiation se doit d'avoir une approche pluridisciplinaire prenant ainsi en compte la microbiologie, l'ingénierie, l'écologie, l'écotoxicologie, la pédologie et la chimie.

La mise en œuvre de ces techniques se fait sur le site même (*in situ*). Certaines nécessitent l'excavation des terres et sont réalisés sur site (excavation des terres qui sont traitées sur le site même) ou hors site (excavation et transport des terres vers un centre de dépollution) [2]. Ces techniques peuvent être subdivisées en sept catégories selon le principe biologique ou le mode de dépollution mis en œuvre:

- *biodégradation*: Utilisation de la capacité de certains microorganismes à transformer le polluant en substrat (source de carbone, d'énergie) [2];
- *bioimmobilisation*: Utilisation de la capacité de certains microorganismes à immobiliser un ou plusieurs composants présents à l'état soluble (bactéries) [3];
- *biolixiviation*: Solubilisation et entraînement dans la phase aqueuse par les microorganismes de polluants fixés ou piégés dans le sol [4];
- *bioslurry* (traitement en bioréacteur): Création d'une boue épaisse en mettant la partie fine du sol dans l'eau (concentration de solide entre 10 et 50 % en poids). L'eau utilisée étant de l'eau de rivière ou de l'eau souterraine, contaminée ou non et ajout de nutriments pour stimuler la croissance de la population microbienne. Un système d'aération est employé pour les procédés aérobies. En fin de traitement, les phases solides et liquides sont séparées et le sol est remis en place [5];
- *biorestauration*: Ajout de nutriments (azote/phosphore) pour stimuler la croissance des microorganismes indigènes et favoriser la dégradation des polluants [6];
- *bioaugmentation*: Introduction dans le sol de microorganismes exogènes adaptés aux polluants à traiter [7];
- *biostimulation*: Réensemencement de populations prélevées sur le site dont la croissance a été stimulée en laboratoire ou en bioréacteurs installés sur site [8].

L'importance fonctionnelle de la biodiversité n'est plus discutable, 4 rôles lui sont attribués par le *Millennium Ecosystems Assessment MA 2005* [9]: (i) un rôle de support qui considère la biodiversité comme le pilier d'un écosystème, (ii) un rôle de régulateur par l'influence que joue la biodiversité sur la productivité, la stabilité et la résilience des écosystèmes, (iii) un rôle culturel touchant à l'ensemble des bénéfices non matériels et (iv) un rôle de ressource par la production directe ou indirecte de nourriture.

Notre travail se positionne dans cette problématique d'inventaire de la diversité microbienne des sols et pousse son ambition sur des sols pollués par des métaux lourds dans la mine de fer d'Ait Ammar. L'approche fonctionnelle se base sur l'étude de la diversité métabolique potentielle des bactéries cultivables du sol. L'objectif principal de cette partie de notre étude est d'obtenir des informations sur la diversité microbienne des sols pollués par des métaux lourds en présence des concentrations très importantes du fer et du phosphore.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Site étudié

La zone d'étude est un gisement de fer, se situe dans le nord-ouest de la ville d'Oued Zem (environ 25 km) dans la province de Khouribga. Le climat de la région est de type méditerranéen, aride à semi-aride avec une saison sèche d'Avril à Octobre et une saison de pluie de Novembre à Mars. Les précipitations moyennes annuelles sont de 350 mm avec une grande variation dans le temps et l'espace. La moyenne d'évaporation annuelle est d'environ 1800

mm. Les températures connaissent des variations saisonnières très importantes: un pic en Août de 40 °C et un minimum en Janvier de 3 °C [10].

Le gisement de fer d'Ait Ammar (33° 04' N; 6° 38' W) se trouve dans le massif hercynien central. Ce dernier, correspond au vaste plateau, qui occupe la partie septentrionale de la meseta marocaine occidentale. Il est limité au nord par le miocène de l'avant pays rifain, au sud par le plateau des phosphates et à l'est par le causse moyen atlasique.

2.2. Protocole d'échantillonnage

Tableau 1. Description du site d'étude dans la région d'Oued Zem.

Code d'échantillon	Coordonnées UTM
T.1.1	29 S 720066 3661172
T.1.2	29 S 720065 3661173
T.1.3	29 S 720105 3661134
T.1.4	29 S 720103 3661134
T.1.5	29 S 720129 3661071
T.2.1	29 S 720014 3661211
T.2.2	29 S 720023 3661218
T.2.3	29 S 720029 3661255
T.2.4	29 S 720035 3661292
T.2.5	29 S 720070 3661337
T.3.1	29 S 719983 3661228
T.3.2	29 S 719958 3661273
T.3.3	29 S 719927 3661294
T.3.4	29 S 719908 3661320
T.3.5	29 S 719855 3661372
T.4.1	29 S 719992 3661144
T.4.2	29 S 719929 3661132
T.4.3	29 S 719866 3661100
T.4.4	29 S 719750 3661031
T.4.5	29 S 719686 3660957
Réf	29 S 727740 3634697

Etant donné que les sites pollués ont souvent une composition très hétérogène, un échantillonnage systématique a été conçu. La zone étudiée a été divisée en quatre transepts (T.1, T.2, T.3 et T.4). Des échantillons de sol contaminé (4 transepts avec 5 points chacun) et un échantillon non contaminé comme référence (Réf) ont été prélevés (0 - 20 cm de profondeur). Les coordonnées géographiques de chaque échantillon dans le site ont été déterminées avec un système de localisation mondial (GPS). Les coordonnées de chaque site sont présentées dans le [tableau 1](#).

2.2. Diversité métabolique: BIOLOG® EcoPlaque

L'analyse des Profils physiologiques des communautés microbiennes (*Community Level Physiological Profil: CLPP*), a été conduite avec des microplaques commerciales Biolog® EcoPlaque (Biolog, Inc., Hayward, CA). Environ 2 g du sol ont été pesé deux fois en deux tubes à essais et incubés dans l'obscurité à 20-28 °C pendant une semaine. Après cette période, on ajoute 20 ml d'une solution de pyrophosphate de 0,2 % dans chaque tube à essai. Après, 1 ml du mélange de l'échantillon a été transféré dans un autre tube à essai, et on ajoute 18 ml de pyrophosphate. Le tube a été mélangé et 140 µl d'aliquotes de cette solution ont été placés dans les puits de la microplaque du Biolog®. Les microplaques inoculées (un pour chaque échantillon) ont été incubées dans l'obscurité à 20-28 °C pendant 15 jours. Les lectures sont réalisées et enregistrées deux fois par jour dans un spectrophotomètre

(Tecan Sunrise) pour la mesure de l'absorbance à 590 nm, et en se terminant lorsque la couleur des puits ne change plus.

3. Traitement de données et analyse statistique

3.1. Le positionnement multidimensionnel

Nous avons choisi le positionnement multidimensionnel MDS (*Multidimensional Scaling*) qui est une méthode d'analyse courante en écologie. Les erreurs entre les matrices de similarité de rang et la représentation MDS ont été évaluées grâce à une valeur d'un paramètre appelé «stress». De faibles valeurs de stress (0 à 0,2) indiquent une bonne représentation par le MDS de l'information contenue dans la matrice de similarité de rang. De fortes valeurs de stress (supérieures à 0,2) indiquent que le MDS ne permet pas une bonne représentation de l'information. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test de Bray Curtis et un test non-paramétrique (ANOSIM). Le test de similarité, l'ANOSIM, teste la proximité ou la similarité entre les groupes ou traitements. Cette similarité est calculée à travers le chiffre R-global. Cette valeur se définit comme le rapport de (moyenne des distances de rang entre groupes - moyenne des distances de rang intragroupes)/(le nombre de rang/2). La valeur de R-global est considérée comme statistiquement «utilisable» au seuil de $p < 0,05$. Si $R\text{-ANOSIM} > 0,75$ les groupes sont bien séparés; $0,5 < R\text{-ANOSIM} < 0,75$ les groupes sont considérés comme séparés mais légèrement chevauchant; $0,25 < R\text{-ANOSIM} < 0,5$ les groupes séparés mais fortement chevauchant; $R\text{-global} < 0,25$ les groupes non séparés. Les ANOSIM ont été réalisés avec le logiciel Primer v5 (PrimerE, Ltd, Luton, United Kingdom). La matrice de similitude a été obtenue avec la distance euclidienne normalisée des valeurs d'AWCD transformées en $\log(x + 1)$.

3.2. Analyse par classification hiérarchique

Le principe de la classification ascendante hiérarchique (CAH) consiste à créer une nouvelle partition de l'ensemble des données en agrégeant les deux éléments les plus proches selon une distance choisie a priori. La ressemblance des individus est mesurée par la distance euclidienne. CAH a été réalisés avec le logiciel SPSS 17.

3.3. Indices de diversité

La diversité fonctionnelle à partir des données Biolog[®] a été évaluée en calculant: Richesse (S), les indices de Shannon-Wiener (H), la régularité (E_H) et l'activité totale selon les équations suivantes:

$$H = - \sum_{i=1}^N P_i (\ln P_i)$$

$$E_H = H/H_{\max} = H/\ln S$$

Substrat richesse = nombre moyen des puits positifs ($DO > 0,15$)

L'activité totale = Somme moyenne des valeurs d'absorption en triple plaques

Où P_i est le rapport de l'activité d'un substrat particulier sur la somme des activités de tous les substrats et S est la richesse du substrat [11]. Les AWCD (*Average Well colour development*) ont été calculé pour chaque microplaque.

L'AWCD pour chaque microplaque a été calculé:

$$AWCD = \Sigma (C - R)/n$$

Où :

C = DO de chaque substrat;

R= DO du témoin d'eau stérile;

n = nombre de substrats (31).

Les AWCD (*Average Well colour development*) ont été calculé pour chaque microplaque: les valeurs d'absorbance brutes des puits à différents temps de lecture ont d'abord été retournées à blanc premièrement par rapport à la lecture du temps "zéro", puis les valeurs, ont été retournées à blanc deuxièmement par rapport au puits qui ne contenant pas de source de carbone (puits témoin négatif) de chacune des plaques. Toutes les valeurs négatives ont été remises à zéro. AWCD a été calculé comme la moyenne des valeurs d'absorbance obtenues pour les 95 des puits [12]. Pour chaque temps de lire les valeurs de DO_{590} ont été utilisées pour quantifier la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes du sol en calculant le nombre de substrats utilisés ($DO_{590} > 0,15$) par la communauté

(richesse). Pour comparer l'effet de la toxicité des échantillons, les données d'utilisation des substrats ont également été divisées en six catégories de substrat représentant différentes guildes de substrat (glucides, des acides carboxyliques, des polymères, des acides aminés, des amines et des substrats divers) et l'absorbance moyenne dans chaque catégorie a été analysée [13].

4. Résultats

4.1. Capacités de dégradation et les indices de diversité

La capacité d'utilisation des différents substrats par les communautés bactériennes des échantillons a été estimée par le nombre de puits positifs par plaque alors que la diversité a été estimée à partir de la valeur relative des absorptions pour chaque substrat.

La capacité de dégradation de chaque échantillon (richesse) est également déterminée, elle permet d'estimer la proportion de sources de C non utilisées par les communautés microbiennes. Enfin, l'indice de Shannon est un indicateur de diversité des communautés bactériennes [14]. L'indice de régularité (E_H) est un élément important de la diversité, donc le maximum de diversité sera atteint quand les espèces auront une répartition très régulière. La richesse de substrat (S), l'indice de Shannon (H) et l'indice de régularité (E_H) pour les différents échantillons du sol sont présentés dans le tableau 2. L'indice de diversité de Shannon est plus faible pour le sol T.1.4 et plus grand pour le sol T.3.4 et il varie selon l'ordre suivant: T.3.4 > REF > T.1.5 > T.4.3 > T.3.5 > T.2.3 > T.2.4 > T.1.2 > T.3.1 > T.4.4 > T.1.3 > T.2.2 > T.1.1 > T.3.2 > T.2.5 > T.4.5 > T.2.1 > T.4.2 > T.4.1 > T.3.3 > T.1.4. La population microbienne du sol T.3.4 a montré le plus haut indice de richesse suivie par les sols T.1.5, T.4.3 et de référence (Tableau 2). Selon Lexterad et Eid (2006) [15], des valeurs de l'indice de régularité supérieures à 0.7 correspondent aux structures les plus irrégulières se comportant sous la forme dite «uniforme». Donc, sur la base de cette conclusion, on note que la structure de tous les échantillons analysés est très irrégulière.

Les indices de richesse, de Shannon, de régularité et l'activité totale n'ont été pas affectés de manière significative par la distance de la mine ou par la direction et donc ils sont identiques pour tous les échantillons analysés, selon le test de student: S ($t = -0,003$, $p = 0,998$), H ($t = -0,042$, $p = 0,967$), E_H ($t = 0,224$, $p = 0,825$) et activité totale ($t = 0,00$, $p = 1,00$).

Tableau 2. Indices de richesse (S), de Shannon (H) et de régularité (E_H) de la communauté microbienne des différents échantillons étudiés.

Sol	H	S	E_H	Capacité d'utilisation des substrats (%)
T.1.1	2,900	20	0,968	64,52
T.1.2	3,104	24	0,977	77,42
T.1.3	2,958	20	0,988	64,52
T.1.4	2,376	12	0,956	38,71
T.1.5	3,213	26	0,986	83,87
T.2.1	2,668	16	0,962	51,61
T.2.2	2,919	19	0,991	61,29
T.2.3	3,154	24	0,992	77,42
T.2.4	3,141	25	0,976	80,65
T.2.5	2,867	19	0,974	61,29
T.3.1	3,091	24	0,973	77,42
T.3.2	2,886	20	0,963	64,52
T.3.3	2,410	14	0,913	45,16
T.3.4	3,311	29	0,983	93,55
T.3.5	3,178	25	0,987	80,65
T.4.1	2,577	15	0,952	48,39
T.4.2	2,604	16	0,939	51,61
T.4.3	3,179	26	0,976	83,87
T.4.4	2,978	21	0,978	67,74
T.4.5	2,729	17	0,963	54,84
REF	3,234	26	0,993	83,87

Le [tableau 2](#) montre que la capacité d'utilisation des différents substrats ($S/31 \times 100$) varie de 93,55 % à 38,71 %. Les échantillons T.3.4, Réf, T.1.5 et T.4.3 présentent plus d'activités métaboliques diverses, mais le niveau de pollution ne modifie pas la richesse des échantillons (sont identiques selon test t).

Les valeurs de l'indice de Shannon confirment bien les résultats précédents. Une plus grande diversité des activités dans les échantillons (*intra*), avec un indice de Shannon plus élevé pour les échantillons T.3.4, Réf, T.1.5 et T.4.3, et pas de diversité significative entre les différents échantillons (*inter*) (Test t).

4.2. Activités par catégories biochimiques

Pour réduire le nombre de variables dans les analyses de données, les sources de carbone sont classées selon Zak et al. (1994) [11] en 6 groupes biochimiques: polymères, amines et amides, carbohydrates, acides organiques, acides aminés, et divers contenant notamment des alcools et des bases nucléiques.

Les utilisations des substrats carbonés par les micro-organismes en fonction de la contamination des sols pour les données Biolog sont présentées dans la [Figure 1](#) à partir du développement coloré pour chaque substrat ou «well colour development» (WCD). Leur utilisation est très difficile à expliquer par le fait que les substrats entrent souvent dans plusieurs cycles métaboliques. A nos connaissances, aucune étude dans la littérature n'a tenté d'expliquer leur utilisation dans les sols contaminés. Cependant, des hypothèses ont été formulées pour nos données.

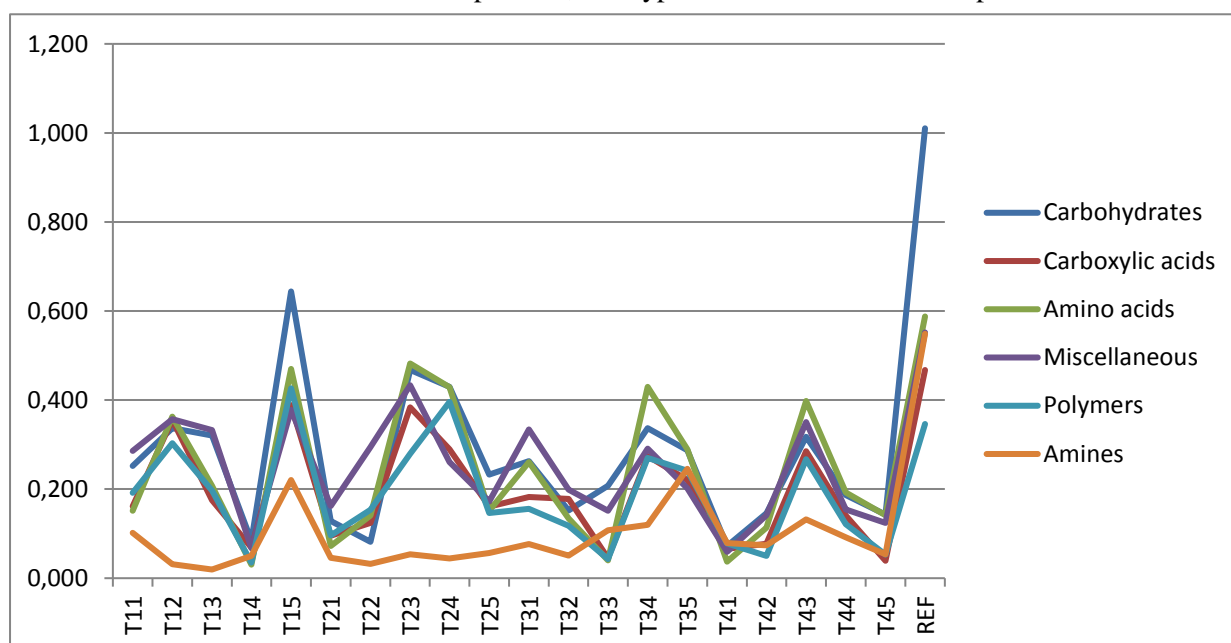


Figure 1. Evolution des valeurs de WCD en fonction du lieu des prélèvements.

L'utilisation des six principaux substrats pour les données Biolog EcoPlaques permet de distinguer deux types de substrats ([Figure 1](#)). Le premier type composé des amines est caractérisé par l'utilisation très faible par les micro-organismes du sol. L'hypothèse formulée d'après ces résultats montre que ce composé est plus difficilement dégradé par ces micro-organismes. Le deuxième concerne les autres substrats qui sont sans doute adaptés aux micro-organismes du sol minier et sont plus facilement dégradables. Mais, en général, plus on s'éloigne de la mine, on remarque une augmentation très faible de l'utilisation des substrats par les micro-organismes du sol de la mine de fer ([Figure 2](#)).

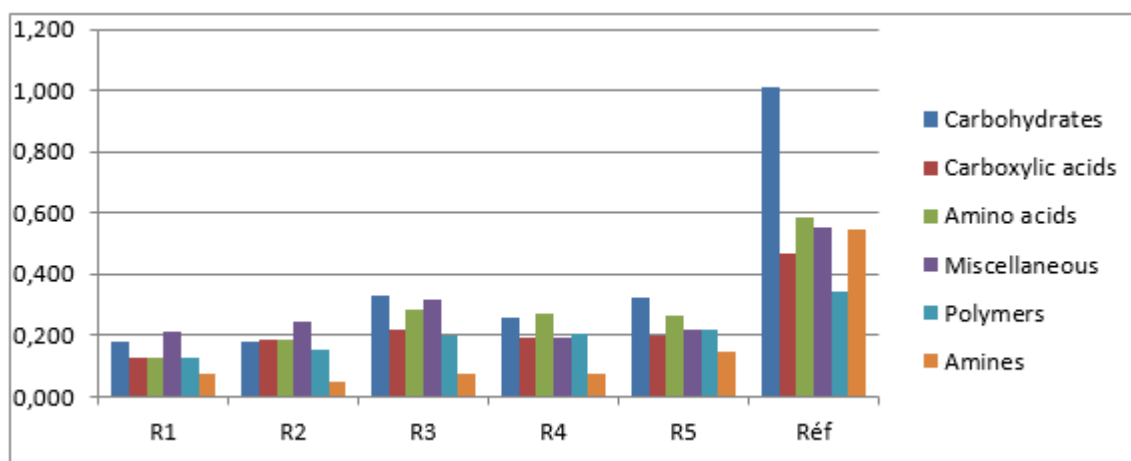


Figure 2. Evolution des valeurs de WCD en fonction de la distance de la mine

4.3. Classification des sols suivant leur AWCD

La première analyse multivariée pratiquée est une classification hiérarchique des phénotypes bactériens en utilisant les distances euclidiennes. Cette technique permet d'obtenir des dendrogrammes compartimentant les sols en fonction des phénotypes des communautés bactériennes *i.e.* la valeur d'AWCD pour chaque substrat. Les résultats obtenus pour les prélèvements des sols sont présentés dans la Figure 3.

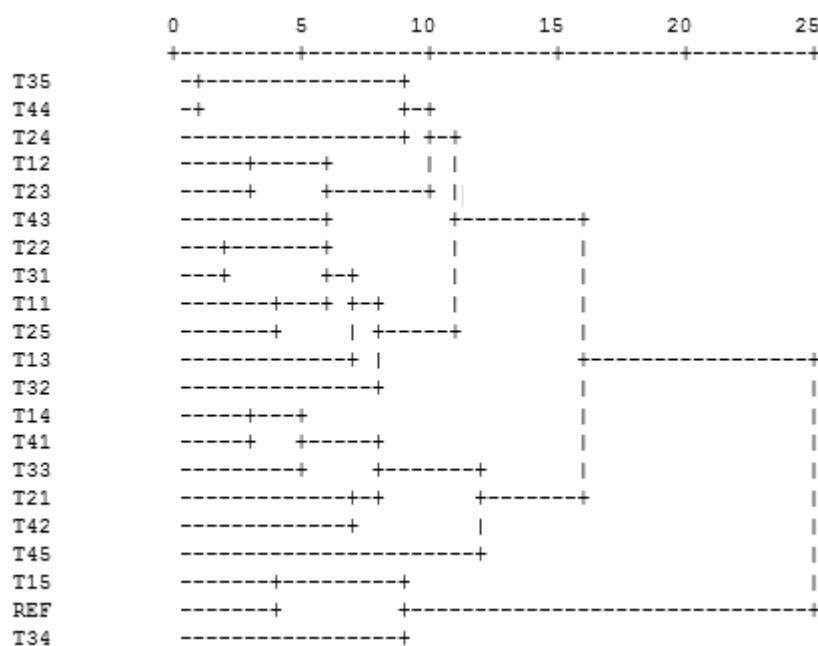


Figure 3. Classification hiérarchique des profils physiologiques des échantillons étudiés.

Le dendrogramme obtenu montre deux groupes mais non clairement séparés (distances euclidiennes très élevées). Les deux échantillons de sol (T.1.5 et Réf) ont présenté des profils microbiens liés ensemble à une distance euclidienne bas de 4 et ils sont reliés avec T.3.4 à distance euclidienne de 8,5. Cependant, ces échantillons de sol étaient différents des autres échantillons ayant des profils microbiens à une distance euclidienne considérablement plus élevée. Cette compartimentation en deux groupes distincts correspond, peut-être, à une séparation entre les sols plus ou moins contaminés.

En effet, un premier groupe englobe presque tous les prélèvements sauf la Réf, T.1.5 et T.3.4. L'analyse des CLPP par classification ne révèle pas donc une diversité significative des profils métaboliques des micro-organismes en fonction de leur contamination. De nombreux auteurs ont utilisé cette méthode dans le cadre de l'étude de

communautés microbiennes, à partir des données issues de microplaques Biolog® [11, 16-17]. Néanmoins, un aspect défavorable dans l'analyse par classification est l'absence d'informations sur l'influence de la nature des substrats carbonés sur le processus de classification.

4.2. Analyse en composante principale des CLPP

L'application de l'ACP sur les mêmes données a été effectuée dans le but de pallier au manque d'information de l'analyse par classification. La Figure 4 présente la carte factorielle en fonction des valeurs d'WCD de chacun des prélèvements. Les sols sont ordonnés en fonction de leur contamination. En effet, aucune séparation claire n'est visible entre les prélèvements du site d'Ait Ammar. Par contre l'échantillon non contaminé est séparé des autres échantillons du site minier.

Pour de plus amples détermination des communautés microbiennes dans les différents sols, les résultats du Biolog après 266,5 heures (AWCD) ont été soumis à l'ACP. Les résultats montrent une seule composante avec 97,02 % de la variation, inclus tous les échantillons de sol qui sont fortement corrélés et n'ont indiqué aucune différence dans les activités métaboliques des communautés microbiennes du sol en fonction de la distance de la mine (Tableau 3). L'ACP, en utilisant toutes les 31 sources de carbone à 163,5 heures, n'a pas révélée une séparation des échantillons du site, ce qui montre des capacités semblables d'utilisation potentiel du carbone et les communautés microbiennes sont comparables avec une faible différence pour l'échantillon non contaminé.

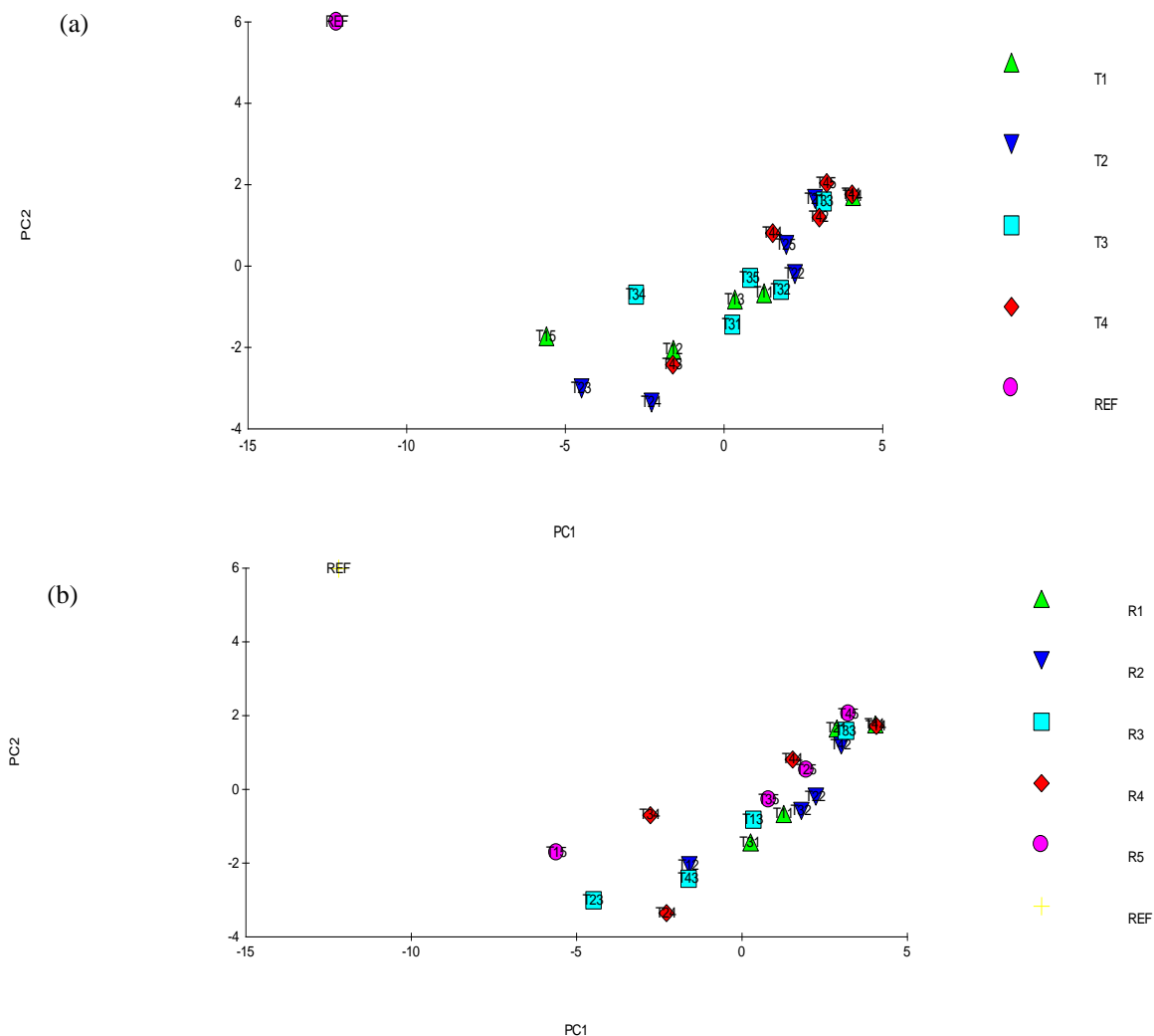


Figure 4. Carte factorielle de l'ACP des sols de la mine d'Ait Ammar en fonction des données WCD de chaque substrat des microplaques EcoPlaques à 163,5 heures d'incubation. a) par transect b) par ronde.

Tableau 3. Variance totale et coefficient de saturation d'ACP des valeurs d'AWCD.

Composantes	Valeurs initiales propres			Les sommes carrées des extractions		
	Total	% de Variance	Cumule %	Total	% de Variance	Cumule %
1	20,374	97,020	97,020	97,374	97,020	97,020
2	0,352	1,678	98,698			
3	0,242	1,150	99,848			
4	0,015	0,073	99,921			
5	0,006	0,028	99,949			

5. Les métaux lourds, dans notre cas le Cd, Cr, Cu, Zn et Pb en présence du fer et du phosphore, ont-ils une influence sur la population bactérienne bioremédiatrice?

Les résultats des tests d'ANOSIM confirment ceux des MDS (Figure 5): les caractéristiques fonctionnelles des bactéries des échantillons des transepts et des rondes sont identiques (R-global = 0,086, $p = 16,2\%$) (R-global = 0,023, $p = 34,8\%$), respectivement. De même, entre les différents points d'échantillonnage des sols il n'y pas de différence significative entre les transepts et les rondes ANOSIM 2 (test de Spearman; $\rho = 0,034$, $p = 36,6\%$, $\rho = 0,121$, $p = 18,6\%$, respectivement). Donc, selon les caractéristiques fonctionnelles des bactéries, la direction ou la distance par rapport au gisement de fer n'ont pas d'influence significative sur la population bactérienne du sol. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par les caractéristiques structurales des bactéries des échantillons (résultats non affichés).

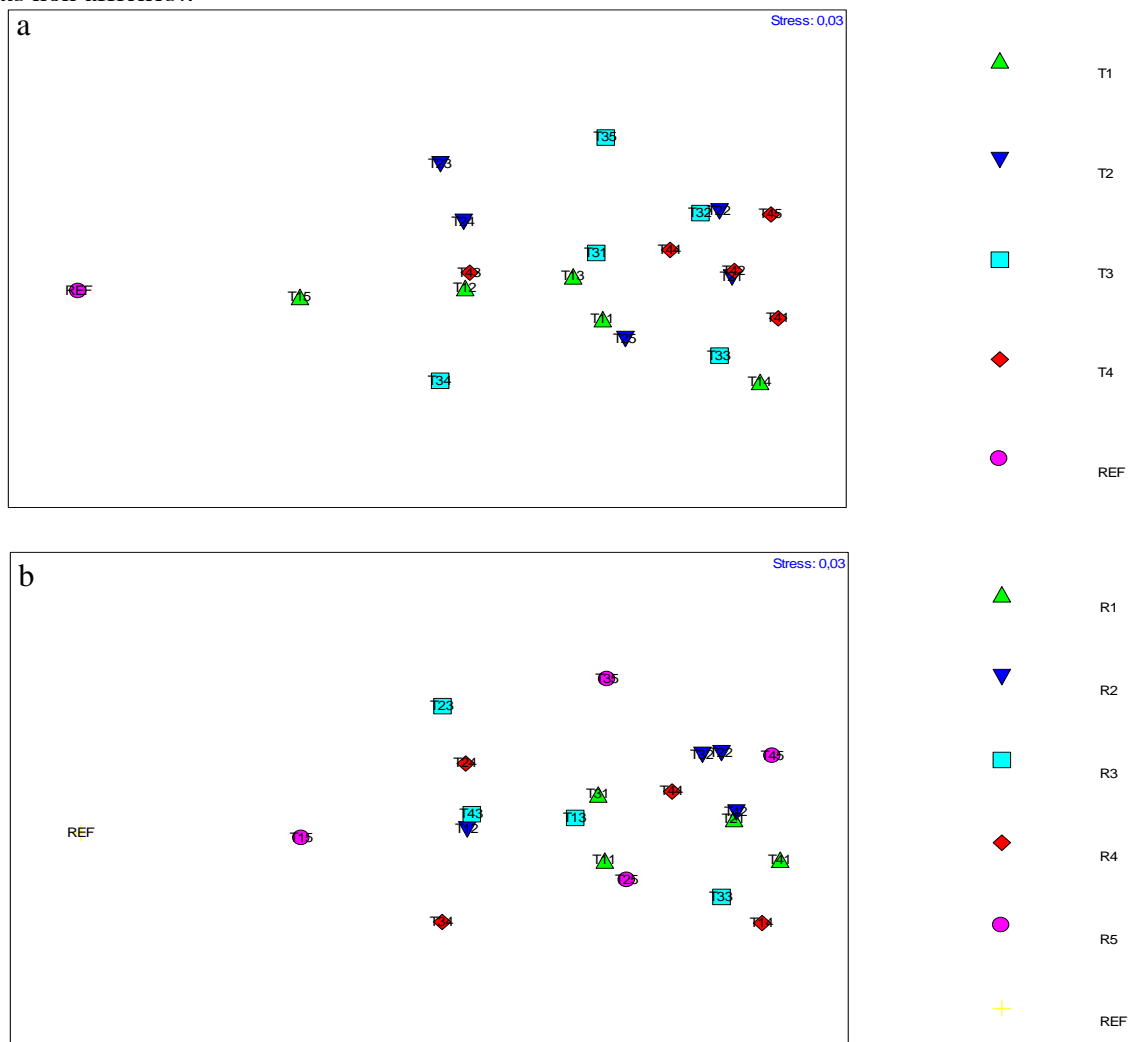


Figure 5. Analyse Multidimensionnelle non métrique (MDS) réalisée sur les résultats de Biolog (AWCD) obtenus à partir de 4 transepts (T.1-T.4) avec 5 points chacun (1-5) et le sol de référence. a) par transept b) par ronde.

5. Discussion

L'analyse Biolog® permet d'évaluer la diversité fonctionnelle de la communauté microbienne du sol. Bien qu'elle soit relativement facile à utiliser, elle est reproductible et peut produire une grande quantité de données reflétant les caractéristiques métaboliques des communautés microbiennes de la rhizosphère [11] et elle souffre de plusieurs inconvénients. Seules quelques bactéries métaboliquement actives et cultivables peuvent être détectées, alors que les champignons du sol et les bactéries à croissance lente ne peuvent pas être évaluées [12; 18]. Les profils métaboliques obtenus par Biolog ne reflètent pas la diversité fonctionnelle réelle [19] et ne mesurent pas le potentiel fonctionnel des bactéries numériquement dominantes mais plutôt celui des bactéries à croissance rapide [20]. La technique est sensible à la densité de l'inoculum [21] et peut ne pas refléter la diversité métabolique potentielle *in situ* [12]. En outre, les sources de carbone et le pH du milieu dans les plaques Biolog® peuvent ne pas être représentatifs de celles présentes dans le sol [18].

La plaque EcoPlaque de Biolog a été utilisée pour déterminer l'effet toxique des métaux sur le fonctionnement biologique du sol et contrôler son impact sur la phytoextraction [22]. Comme il a déjà été montré dans des études précédentes, les capacités de dégradation potentielle de la communauté microbienne sont les plus souvent considérablement réduites dans des sols contaminés par les métaux lourds [23-25]. La contamination des sols par des métaux lourds peut avoir un effet négatif sur l'activité et la fonction microbienne et diminue la respiration du sol et de la biomasse microbienne [26]. De nombreuses études ont montré que même de petites quantités de métaux lourds dans l'environnement ont des effets néfastes sur tous les organismes vivants et diminuent la décomposition de la litière et les cycles des éléments nutritifs par la suite dans l'ensemble de l'écosystème [27-29].

Dans notre cas, En tant que sous-produit de 27 années d'activité minière, les sols entourant la mine de fer d'Ait Ammar sont contaminés par des métaux tels que le Fe, le Cu, le Zn, le Pb, le Cd et le Cr et du P [30]. La pollution n'affecte pas significativement la diversité métabolique des bactéries, car en présence de plante, le nombre de substrats utilisés est plus élevé que sans plante ce qui suggère un effet stimulant de la plante probablement en raison des exsudats racinaires comme été rapporté par Heinonsalo et al. (2000) [31] et Epelde et al. (2008) [22]. Nous avons aussi constaté que les indices de Shannon, de richesse et de régularité évoluent dans le même sens.

Konopka et al. (1999) [32] ont signalé que la présence des métaux lourds diminuait la biomasse microbienne soit directement soit en inhibant certaines propriétés biochimiques du sol indispensables à leur survie. Cependant, l'action des métaux est souvent spécifique. Certains micro-organismes résistants peuvent survivre à un stress environnemental alors que d'autres plus sensibles disparaissent en présence de ce stress [33]. Ainsi, un certain nombre d'études n'ont pas mis en évidence la diminution de la biomasse microbienne en présence de métaux lourds [23; 34-35]. Par ailleurs, les communautés bactériennes peuvent être influencées par de nombreux autres facteurs environnementaux tels que le pH, la température, la teneur en nutriments et la nature des exsudats racinaires. Ainsi, des variations dans la biomasse bactérienne ne sont pas systématiquement et directement imputables à la présence du métal [36]. Par exemple, si la contamination d'un sol affecte le développement des plantes, la réduction de la biomasse bactérienne observée n'est pas nécessairement due à un effet direct de la toxicité du métal sur les bactéries mais peut-être au manque de matière organique d'origine végétale [32]. La biomasse microbienne augmente en effet en présence de plantes, les exsudats racinaires servant de source de carbone et d'énergie pour les micro-organismes du sol [37].

Dans cette étude, les sols contaminés échantillonnés autour de la mine de fer avaient été soumis à la pollution au cours d'une longue période de temps. Les changements dans la structure de la communauté microbienne autour de la mine de fer ne pouvaient pas montrer des réels changements dans les communautés de ces organismes microbiens du sol contaminés par le Fe, le P, le Cu, le Zn et le Cr. Aucun changement dans la diversité fonctionnelle de la communauté microbienne n'a été trouvé. Toutefois, cela n'est pas surprenant puisque durant les dernières décennies, les oxydes de Fe ont été utilisés dans le développement de nouvelles technologies d'assainissement en raison de leur caractère de sorption et de réactivité [38]. Les méthodes de traitement d'assainissement *in situ* en utilisant le Fe sont potentiellement rentables [39]. Les oxydes de fer sont utilisés pour le retrait et la diminution des effets néfastes de certains métaux lourds tels que le Cr [40], le Pb, le Cu, le Cr et le Cd [38].

Mamindy-Pajany et al. (2013) [41] ont montré que l'hématite et le fer zéro-valent a permis de réduire le lessivage des métaux de 50% et une diminution de la toxicité des sédiments marins pollués. Ces traitements «d'assainissements naturelles assistés» diminuent les concentrations des métaux dans les lixiviats des sols et de l'eau du sol et réduire la toxicité microbienne [39]. Par conséquent, plusieurs technologies d'assainissement à base de fer sont encore en stade d'expérimentation et il est nécessaire de vérifier leur application effective sur le terrain à grande échelle [39]. En plus que le Fe réduit la solubilité des métaux, les enrichissements en phosphate sont également efficaces dans la réduction phytodisponibilité de Pb et d'autres métaux. En outre, l'association avec la matière organique, la substitution de Fe^{3+} avec d'autres ions et les défauts structuraux notamment les nanoparticules d'oxyde de Fe naturel réduit la cristallinité des métaux et augmente la disponibilité microbienne [42]. He et al. (2011) [43] ont rapporté que l'analyse a révélé que l'ajout de nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer pourrait stimuler une croissance bactérienne et changer la structure de la communauté bactérienne du sol, bien que l'abondance des bactéries ne change pas. Par conséquent, le fonctionnement normal d'une communauté microbienne dans les sols autour de la mine de fer n'aurait pas été affaibli. Cependant, il est possible d'acquérir la tolérance aux métaux lourds dans l'environnement par ce que les gènes contrôlant la résistance aux métaux sont présents dans les plasmides de la plupart des organismes.

Pourtant, des questions subsistent quant à la capacité pour les métaux de modeler les communautés microbiennes dans les sols et l'uniformité de leurs réponses au stress métallique à travers les types de sols. Dans cette étude, le site de référence non affecté, a soutenu une communauté bactérienne presque similaire à celle du site minier du point de vue de l'activité et de la biomasse.

Cette étude révèle que le Cr, le Cu, le Pb, le Zn et le Cd en présence du Fe et du P n'ont pas des impacts négatifs sur la diversité fonctionnelle des communautés bactériennes. Les résultats obtenus suggèrent donc que l'utilisation de la diversité microbienne fonctionnelle pour étudier les effets des métaux lourds dans le sol peut être difficile en raison de fortes influences des autres facteurs environnementaux.

Conclusion

Dans cette étude, nous n'avons pas observé des effets des différents métaux et du phosphore de sols sur la population bactérienne. L'étude des variations de la diversité fonctionnelle des populations bactériennes a montré qu'il n'y avait pas de différences significatives dans l'utilisation des substrats par la communauté microbienne des échantillons du sol. L'analyse des similitudes (ANOSIM) et l'analyse en composantes principales (ACP) des données Biolog ont montré que ni la direction, ni la distance à partir de la mine n'ont pas d'affection significative sur la diversité fonctionnelle de la communauté bactérienne du sol. En effet, la toxicité des métaux dans les sols fortement contaminés par le Fe et le P n'a aucune incidence sur la quantité des populations microbiennes et aucun changement significatif dans la diversité microbienne des sols contaminés. L'utilisation de la diversité microbienne fonctionnelle pour étudier les effets des métaux lourds dans le sol peut être difficile en raison de fortes influences d'autres facteurs environnementaux.

Les micro-organismes présents dans les mines jouent un rôle central dans ces écosystèmes de leur implication dans les processus à l'origine de leur génération mais également de leur remédiation. Une meilleure caractérisation de la diversité fonctionnelle de ces communautés microbiennes ainsi que leurs interactions entre elles et avec leur environnement est une étape indispensable à la compréhension du fonctionnement de ces écosystèmes pour pouvoir développer des stratégies de remédiation. Il est donc nécessaire de développer des méthodes d'analyse permettant d'appréhender l'ensemble des communautés microbiennes présentes dans ces écosystèmes.

Remerciements

Cette étude a été soutenue financièrement par l'Organisation du Traité Atlantique Nord (OTAN), Science Programme pour la paix (Réf. SFP.983311). Les auteurs tiennent à remercier le professeur J. P. SOUSA (Université de Coimbra, Portugal) pour l'aide à la réalisation du Biolog.

References

1. R. Boopathy. **Int. Biodeter. Biodeg.** **46**, 29-36 (2000).
2. M. Vidali. **Pure Appl. Chem.**, **73**, 1163-1172 (2001).
3. T. Barkay, J. Schaefer. **Cur. Opinion Microbiol.**, **4**, 318-323 (2001).
4. T. Rohwerder, T. Gehrke, K. Kinzler, W. Sand. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **63**, 239-248 (2003).
5. M.E. Zappi, B.A. Rogers, C.L. Teeter, D. Gunnison, R. Bajpai. **J. Hazard. Mater.**, **46**, 1-12 (1996).
6. S.R. Hutchins, G.W. Sewell, D.A. Kovacs, G.A. Smith. **Environ. Sci. Tech.**, **25**, 68-76 (1991).
7. G.S. Sayler, S. Ripp. **Curr. Opin. Biotechnol.**, **11**, 286-289 (2000).
8. C.J. Cunningham, J.C. Philip. **Land Contam. Reclam.**, **8**, 261-269 (2000).
9. MA (Millenium ecosystem assessment). **Tech. rep., Island Press, Washington DC** (2005).
10. A. Bellouti, F. Cherkaoui, M. Benhida, A. Debbarh, B. Soudi, M. Badraoui 2002. **Actes de l'atelier du PCSI, 28-29 mai (2002).**
11. J.C. Zak, M.R. Willig, D.L. Moorhead, H.G. Wildman. **Soil Biol. Biochem.**, **26**, 1101-1108 (1994).
12. J.L. Garland, A.L. Mills. **Appl. Environ. Microbiol.**, **57**, 2351-2359 (1991).
13. G. Garau, P. Castaldi, L. Santona, P. Deiana, P. Melis. **Geoderma**, **142**, 47-57 (2007).
14. L. Krista, K.L. De Fede, A.J. Sexstone. **Soil Biol. Biochem.**, **33**, 1547-1554 (2001).
15. N. Lexerad, T. Eid. **For. Ecol. Manage.**, **222**, 17-28 (2006).
16. D. Costa, H. Freitas, J.P. Sousa. **Eur. J. Soil Biol.**, **59**, 22-30 (2013).
17. A. Kenarova, G. Radeva, I. Traykov, S. Boteva. **Ecotoxicol. Environ. Safe**, **100**, 226-232 (2014).
18. H. Yao, Z. He, M.J. Wilson, C.D. Campbell. **Microbial. Ecol.**, **40**, 223-237 (2000).
19. J.E. Lindstrom, R.P. Barry, J.F. Braddock. **Soil Biol. Biochem.**, **30**, 231-239 (1998).
20. K. Smalla, U. Wachtendorf, H. Heuer, W. Liu, L. Forney. **Appl. Environ. Microbiol.**, **64**, 1220-1225 (1998).
21. J.L. Garland. **Soil Biol. Biochem.**, **28**, 223-230 (1996).
22. L. Epelde, J.M. Becerril, J. Hernandez-Allica, O. Barrutia, C. Garbisu. **Appl. Soil Ecol.**, **39**, 299-310 (2008).
23. B. Knight, S. McGrath, A. Chaudri. **Appl. Environ. Microbiol.**, **63**, 39-43 (1997).
24. J.J. Kelly, R.L. Tate. **J. Environ. Qual.**, **27**, 609-617 (1998).
25. R.J. Ellis, B. Neish, M.W. Trett, B.J. George, A.J. Weightman, P. Morgan, J.C. Fry. **J. Microbiol. Methods**, **45**, 171-185 (2001).
26. E. Bååth. **Water Air Soil Pollut.**, **47**, 335-379 (1989).
27. M. Niklińska, M. Chodak, R. Laskowski. **Soil Biol. Biochem.**, **37**, 2185-2194 (2005).
28. Z. Li, J. Xu, C. Tang, J. Wu, M. Akmal, H. Wang. **Chemosphere**, **62**, 1374-1380 (2006).
29. J. Zhu, J. Zhang, Q. Li, T. Han, J. Xie, Y. Hu, L. Chai. **Mar. Pollut. Bull.**, **70**, 134-139 (2013).
30. M. Nouri, F. Gonçalves, J. P. Sousa, J. Römbke, M. Ksibi, R. Pereira, A. Haddioui. **J. Mater. Environ. Sci.**, **5**, 271-280 (2014).
31. J. Heinonsalo, K.S. Jorgensen, K. Haahtela, R. Sen. **Can. J. Microbiol.**, **46**, 451-464 (2000).
32. A. Konopka, T. Zakharova, M. Bischoff, L. Olivier, C. Nakatsu, R.F. Turco. **Appl. Environ. Microbiol.**, **65**, 2256-2259 (1999).
33. E. Giller, K. Witter, P.S. Mcgrath. **Soil. Biol. Biochem.**, **30**, 1389-1414 (1998).
34. H. Fritze, J. Perkiömäki, U. Saarela, R. Katainen, P. Tikka, K. Yrjälä, M. Karp, J. Haimi, M. Romantschuk. **FEMS Microbiol. Ecol.**, **32**, 43-51 (2000).
35. L. Landi, G. Renella, J.L. Moreno, L. Falchini, P. Nannipieri. **Biol. Fertil. Soils**, **32**, 8-16 (2000).
36. E. Bååth, M. Díaz-Raviña, Å. Frostegård, C.D. Campbell. **Appl. Envir. Microbiol.**, **64**, 238-245 (1998).
37. J. Braunschweig, J. Bosch, R.U. Meckenstock. **New Biotechnol.**, **30**, 793-802 (2013).
38. P. Xu, G.M. Zeng, D.L. Huang, C.L. Feng, S. Hu, M.H. Zhao, C. Lai, Z. Wei, C. Huang, G.X. Xie, Z.F. Liu. **Sci. Total Environ.**, **424**, 1-10 (2012).
39. A.B Cundy, L. Hopkinson, R.L.D. Whitby. **Sci. Total Environ.**, **400**, 42-51 (2008).
40. M.M. Scherer, S. Richter, R.L. Valentine, P.J.J. Alvarez. **Environ. Sci. Technol.**, **30**, 363-411 (2000).
41. Y. Mamindy-Pajany, C. Hurel, F. Geret, M. Roméo, N. Marmier. **J. Hazard. Mater.**, **252-253**, 213-219 (2013).
42. O. Butenschoen, S. Marhan, S. Scheu. **Appl. Soil Ecol.**, **38**, 152-160 (2008).
43. S. He, Y. Zhang, N. Gu, Y. Feng, X. Lin, H. Ren. **J. Soils Sediments**, **11**, 1408-1417 (2011).