

Publications Scientifiques

METAL TOLERANCE AND BIOACCUMULATION POTENTIAL OF FILAMENTOUS FUNGI ISOLATED FROM LEAD AND COPPER CONTAMINATED SOILS

Hind Moukhtari, Bouchra Ababou, Khadija Boukachabine*

Hassan 1st University, Faculty of Sciences and Technologies, Laboratory of Environmental Sciences and Development, Settat-Morocco

ABSTRACT

Introduction: Pretreated wastewaters originated from Settat's industries are directly released into BouMoussa River (Settat city -Morocco). Heavy metals such as lead (Pb) and copper (Cu) are found in the surrounding environment in significant concentrations exceeding the standards (27 ppm for Pb and 38.90 ppm for Cu) [1].

Objectives: The research carried out aimed to explore the potential uptake capacity of soils fungi from heavy metal polluted soils. Isolation of fungal strains from three sites along BouMoussa river trajectory revealed a significant biodiversity of filamentous fungi such as *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizomucor* sp., and *Acremonium* sp.

Methods: The tolerance capacity and the bioaccumulation potential of the two studied metals (Pb and Cu) were tested.

Results: From a total of 55 fungal isolates, eleven species (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Acremonium* sp. and *Rhizomucor* sp.) were found to be highly tolerant to lead and copper at very high concentrations (1000 ppm) with an accumulation potential.

Conclusions: Potential applications suggest that these eleven species could be used for bioremediation of metal contaminated soils.

Keywords: industrial wastewater, filamentous fungi, lead, copper, tolerance, bioaccumulation.

REZUMAT

Introducere: Apele uzate pre-tratate care provin din industriile din Settat se varsă direct în râul BouMoussa (orașul Settat - Maroc). Metalele grele, cum ar fi plumbul (Pb) și cuprul (Cu), se găsesc în mediul înconjurător în concentrații semnificative, care depășesc standardele (27 ppm pentru Pb și 38,90 ppm pentru Cu) [1].

Obiective: Cercetarea efectuată a avut drept scop explorarea potențialului de absorbție a fungilor din solurile poluate cu metale grele. Izolarea tulpinilor fungice din trei locuri situate de-a lungul râului BouMoussa a evidențiat o biodiversitate semnificativă a fungilor filamentoși, cum ar fi *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizomucor* sp. și *Acremonium* sp.

Metode: Au fost testate capacitatea de toleranță și potențialul de bioacumulare ale celor două metale studiate (Pb și Cu).

Rezultate: Dintr-un total de 55 de tulpini fungice, 11 specii (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Acremonium* sp. și *Rhizomucor* sp.) s-au dovedit a fi înalt tolerate la plumb și cupru în concentrații foarte mari (1000 ppm), cu potențial de acumulare.

Concluzii: Potențialele aplicații sugerează că aceste 11 specii ar putea fi utilizate pentru bioremedierea solurilor contaminate cu metale.

Cuvinte-cheie: ape uzate industriale, fungi filamentoși, plumb, cupru, toleranță, bioacumulare.

INTRODUCTION

Settat city has become one of the affected regions by the increase of industrialization, which has induce

some serious environmental and health problems over the years, due to the continuous release of industrial wastewaters from metal processing into surrounding environment. The industrial effluents are elimi-

*Corresponding author: Khadija Boukachabine, Hassan 1st University, Faculty of Sciences and Technologies, Laboratory of Environmental Sciences and Development, P.O. Box: 577, Settat-Morocco, Telephone: +212 5 23 40 07 36, Email: khadija.boukachabine@uhp.ac.ma

nated into BouMoussa River, resulting in soil contamination by toxic chemical elements, in particular lead and copper [2]. The presence of heavy metals in soils causes not only a decrease in its microbial mass but can lead to extreme modifications in soil microorganism functions, especially in the morphological and physiological structures which ultimately affects all soil microflora, soil composition, mineral recycling and associated metabolic activities [3]. Several methods for removing heavy metals from the environment have been studied, such as ion exchange, chemical precipitation, membrane technologies and electrochemical treatment. However, these methods are ineffective and uneconomical [4]. As an alternative, fungi could represent an effective bioremediation strategy for detoxification of polluted environments [5] by converting toxic compounds to harmless products [6]. The application of suitable fungi to contaminated ecosystems for the reconstitution of their natural state has been proved quite successful as they remove metals effectively via their metal tolerance either by biosorption or bioaccumulation [7]. Metal tolerance is the ability of an organism to survive a metal toxicity by using a mechanism in response to metal pollution [7]. There are several mechanisms in fungi to tolerate and detoxify metals, such as biosorption and bioaccumulation. Biosorption occurs when metal ions are sequestered onto the cell wall through surface bonding. Bioaccumulation is when metal ions are assimilated intracellularly [8]. Several studies [6, 9, 10] showed that fungal species such as *Aspergillus*, *Rhizopus* and *Penicillium*, have demonstrated correlation between metal tolerance and their ability to remove metals.

The present study is in fact the first to be performed with fungi in this region and aims to: 1) analyze soil samples contaminated with Pb and Cu collected from BouMoussa River in order to isolate and phenotypically identify fungal species, determine the fungal tolerance

capacity and bioaccumulation towards these two metals and then test the heavy metal impact on the fungal growth and 2) help detoxify an agricultural region from harmful elements that can cause irreversible damages not only for humans but also the environment.

MATERIAL AND METHODS

Study area and soil samples

Soil samples (Table 1) were collected from the surface soil layer (0-10 cm) from three sites [4]. Site A is found in upstream levels of the industrial effluent (Fig. 1), as for sites B and C, they are located downstream of discharge (untreated wastewater). Soil samples were conserved on ice and transported to the laboratory for instant and direct analysis [11].

The analysis of heavy metals in soils

Soil samples were treated according to standards (2 ml HNO₃ (65%) and 6 ml HCL) [12]. The measurements (Fig. 2) were done in triplicates and concentrations of Copper (Cu) and Lead (Pb) were determined by atomic absorption spectrometry (ICP-AES) (Varian Spectra A 220G Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometer) [13].

Data and Statistical analysis

The achieved results were analyzed by JMP SAS software (JMP®, Version <12> SAS Institute Inc., 2015). Data were subjected to variance (ANOVA) analysis of F-test to evaluate different interactions. Significance between means was tested by Student's t-test. Difference was considered significant if p<0.05.

Isolation and morphological characterization of fungi

Filamentous fungi were isolated by standard spread plate technique after dilutions in distilled water (up to 10⁻¹⁰) using Rose Bengal.

Table 1 - Location of sampling sites

Site	Latitude (N)	Longitude (W)	Altitude (m)	Distance (Km)/Industrial Zone
A	33°0.857'N	7°36.974'O	386	2.1 upstream
B	33°0.857'N	7°37.412'O	344	4.6 downstream
C	33°3.828'N	7°37.548'O	284	10 downstream

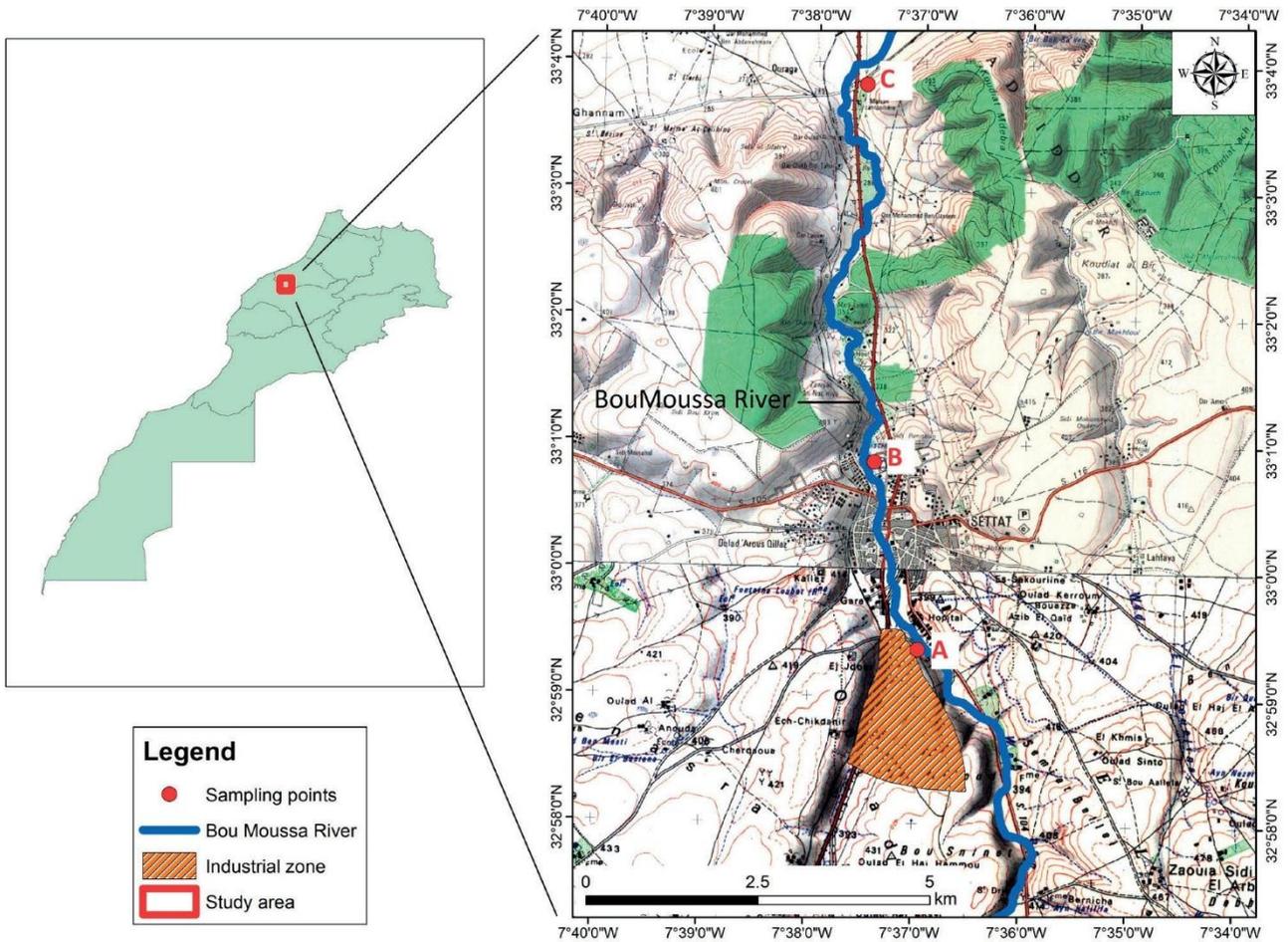


Fig. 1 - Map of the studied area (Settat city- Morocco)

Chloramphenicol (RBA) agar medium [14]. Mycelia appearance, sporangiophore position, columella and spore shape were identified by microscopic examination of morphological features, with key

identification [15] from sub-culture of each isolate on Potato Dextrose Agar medium (PDA) after 7 days at 28°C (Table 2) [16]. The spores and mycelial fragments of the filamentous fungi were

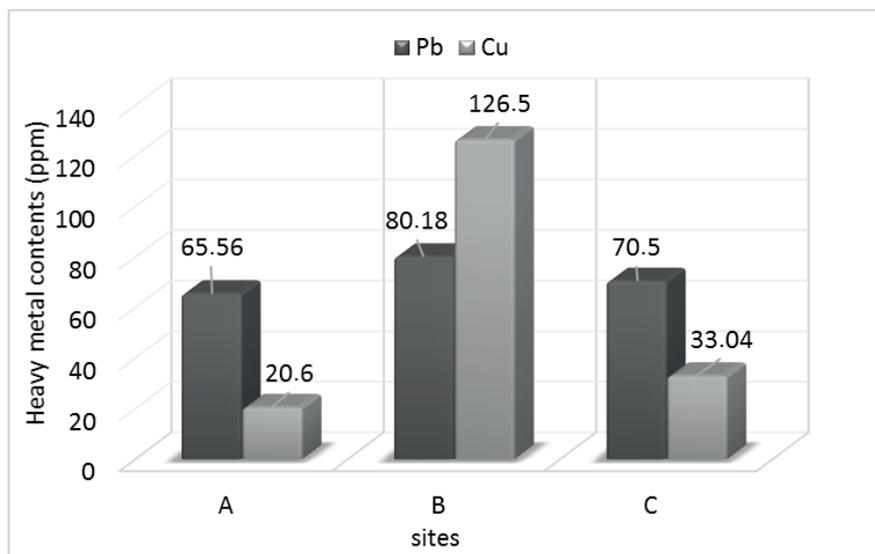


Fig. 2 - Pb and Cu contents found in each of the studied sites

preserved in glycerol (20%) supplemented with tween 80 (0.1%).

Screening of Heavy Metal-Accumulating fungi

Fungal isolates were streaked on Malt Agar (MA) plates containing 600 ppm of Pb (NO₃)₂ or Cu (NO₃)₂ [17] at 28°C in the dark. After 7 days of incubation, the cultures were exposed for 10 minutes to H₂S gas in a sealed container (resulting from the reaction of Na₂S with HCl) (Table 3). The strain's metal-accumulation potential was demonstrated by appearance of a clear zone around the colonies (Fig. 3) [18].

Minimum Inhibitory Concentrations (MICs)

The MIC values were determined as the lowest concentrations of metals that inhibited visible growth of the isolates. Metal ions were added separately to MA medium at concentrations ranging from 200 ppm to 1000 ppm [19]. Fungal strains selected from the bioaccumulation test were exposed to varying concentrations of Pb and Cu for 7 days in the dark at 28±2°C (Table 4). Non-amended medium served as control.

Screening for Heavy Metal-Tolerant Fungi

Seven days old accumulating Pb and Cu fungal cultures were assessed for heavy metal influence on mycelium growth, at 200 ppm (Figs. 4 and 5), by calculating the percentage of growth inhibition I (%) using the equation (1) [20]:

$$I (\%) = \frac{dc - dt}{dc} \times 100 - \frac{dc - dt}{dc} \times 100 \quad (1)$$

dc: diameter of control colony

dt: diameter of metal treated colony

The degree of fungi tolerance to Pb and Cu at 200 to 1000 ppm was expressed by calculating the Tolerance Index (TI) (Figs. 6, 7, 8 and 9) based on equation (2) [9]. Non-amended medium served as control. The experiment was conducted in triplicates.

$$TI = \frac{\text{Fungal growth in the presence of metal}}{\text{Fungal growth without metal exposure in the same time period}} \quad (2)$$

RESULTS

Total heavy metals content of the soil samples

The total Pb and Cu content of the studied soil samples (Fig. 2) were higher than the permissible limits, 27 ppm and 38.90 ppm respectively [1, 21]. Cu levels recorded in site B (126.5 ppm), largely exceeded permissible limits then decreased in site C (at 10 km downstream of the discharge point). The Cu and Pb levels in site B were the highest, probably due to the directly release of industrial effluents into the natural environment. The statistical analysis showed a significant difference between sampling sites with regards to the heavy metal content (p<0.001).

Fungal diversity

A total of 55 species were isolated from the collected samples. The isolated fungi belonged to *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Acremonium* sp., *Rhizomucor* sp. genera and other groups (Table 2). *Aspergillus* sp. was the most frequently encountered (21 out of 55) genus, followed by *Penicillium* sp. (17 out of 55), 2 *Acremonium* sp. and 15 others (Table 2). These results are in agreement with

Table 2 - Fungal diversity in analysed soil samples

	Sites			Total
	A	B	C	
<i>Aspergillus</i> sp.	4	12	5	21
<i>Penicillium</i> sp.	6	7	4	17
<i>Acremonium</i> sp.	1	1	0	2
<i>Rhizomucor</i> sp.	0	1	0	1
Others	6	4	4	14
Total	17	25	13	55

those reported by Valix *et al.* and Aktar *et al.* [9, 22]. The diversity of the fungal community is influenced by heavy metal levels; according to [19] and [24]. *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizomucor* sp. and *Acremonium* sp. are the most commonly occurring fungi species in heavy metals contaminated soils [22].

Assessment of heavy metal bioaccumulation potential

Fungal strains with bioaccumulation potential revealed a clear zone around the colonies (Fig. 3). Some species belonging to *Aspergillus* sp. Genus were the most prevalent found in the collected samples (Table 3).

The results demonstrated that the isolates belonging to *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. possess adaptation mechanisms that allow them to accumulate heavy metals from soils including extra and intracellular precipitation, transformation of metals, and biosorption to the cell wall [7]. These findings

are in agreement with those reported by Iram *et al.* and Dusun *et al.* [25, 26]. The *Rhizomucor* sp. and *Penicillium simplicissimum* isolates, detected in high amount in the soil samples from site B, were able to accumulate Pb, indicating a high bioaccumulation potential for removing lead from the environment [8, 19]. Only two *Acremonium* sp. isolates recovered from soil samples collected from sites A and B were able to accumulate Cu; it has been showed by Zapotoczny *et al.* [27] that *Acremonium* sp.

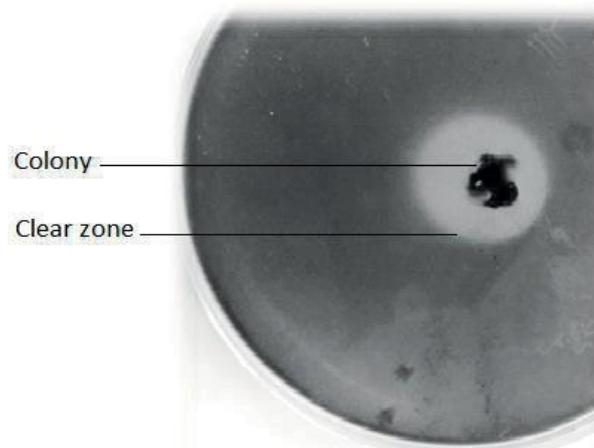


Fig. 3 - Clear zone around *Acremonium* sp. colony

possess mechanisms for accumulating Cu at high levels indicating their potential in removing it from polluted soils.

Determination of Pb and Cu against the fungal isolates

The results of MIC assessment of Pb and Cu against the fungal isolates are presented in Table 4.

Aspergillus niger (A, B, C), *Aspergillus carbonarius* (A, B, C), *Acremonium* sp. (A, B)

and *P. simplicissimum* (B₃) were able to grow at high MIC values of Pb and Cu (1000 ppm). *Penicillium* sp.1 (B) and *Rhizomucor* sp₆ (B) growth was inhibited by copper at 200 ppm and 400 ppm respectively.

These results indicate that these fungal isolates are able to tolerate high levels of heavy metals. The heavy metal limits for contaminated soils are of 27 ppm for Pb and 38.90 ppm for Cu.

Table 3 - Isolated fungal species with the ability to accumulate heavy metals

Sites	Metal	
	Pb	Cu
A	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus carbonarius</i>	<i>Acremonium</i> sp ₁ .
B	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus carbonarius</i> <i>Penicillium simplicissimum</i> <i>Penicillium</i> sp ₁ . <i>Rhizomucor</i> sp ₁ .	<i>Acremonium</i> sp ₂ .

Table 4 - MIC of tested isolates

Test organism	Pb	Cu
<i>Aspergillus niger</i> (A ₁)	1000	1000
<i>Aspergillus carbonarius</i> (A ₂)		
<i>Acremonium sp.</i> (A ₃)		
<i>Aspergillus niger</i> (B ₁)	1000	1000
<i>Aspergillus carbonarius</i> (B ₂)		
<i>Penicillium simplicissimum</i> (B ₃)		
<i>Acremonium sp.</i> (B ₄)		400
<i>Rhizomucor sp.</i> (B ₅)		200
<i>Penicillium sp.1</i> (B ₆)		
<i>Aspergillus niger</i> (C ₁)	1000	1000
<i>Aspergillus carbonarius</i> (C ₂)		

*A - Site A, B - Site B, C - Site C

Evaluation of tolerance

Heavy metals have a negative impact on fungal growth. Isolates recovered from the soil samples from the three sites behave differently at 200 ppm Pb concentration (Fig. 4). The lowest percentage of inhibition for Pb is noticed for *Penicillium sp.* (B₆) with 4.25%. The highest percentage of inhibition is noticed for *A. niger* (C₁) with 44.44%. Strains of the same species behave differently with respect to Pb as shown for *A. niger* (A₁), *A. niger* (B₁) and *A. niger* (C₁). *Penicillium sp.* (B₆) appeared less affected by Pb, probably due to

its great adaptation to site environment. These results agree well with the results obtained by Cernansky *et al.* [28]. *Acremonium sp.* (B₄) was more affected by Cu (42,85%) compared to *Acremonium sp.* (A₃) (14.28%) (Fig. 5). These results are in agreement with those reported by Zapotoczny *et al.* [27] as they demonstrated *Acremonium sp.* is able to tolerate high Cu levels. It appears that under these conditions, fungal strains develop a special tolerance to high heavy metal levels, as revealed for *A. niger* (Fig. 6), *A. carbonarius* (Fig. 7) and other species (Fig. 8).

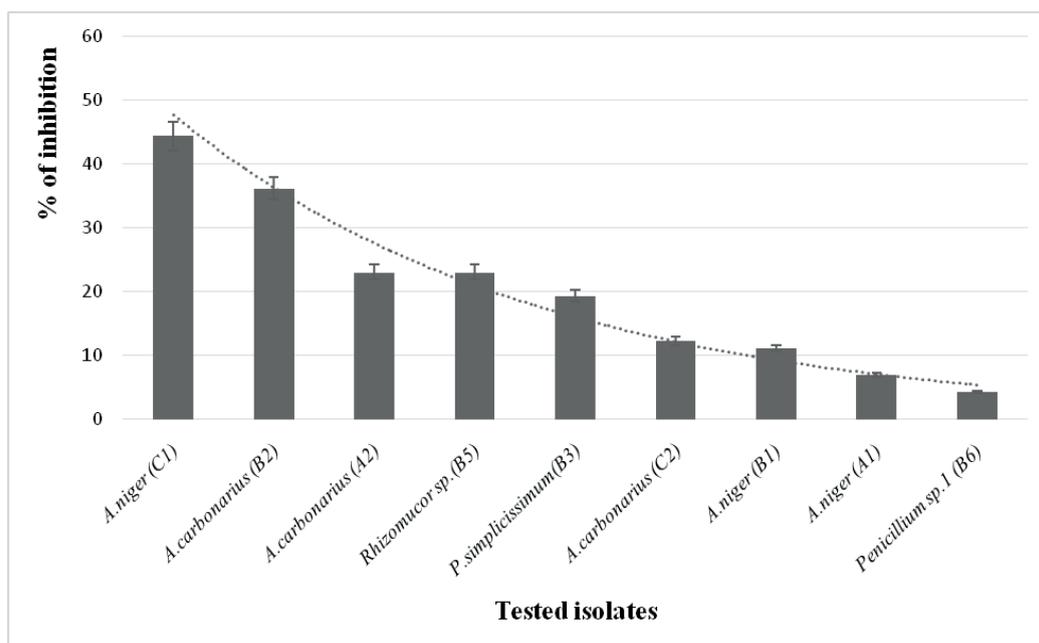


Fig. 4 - Percentage of inhibition of Pb-accumulating fungi

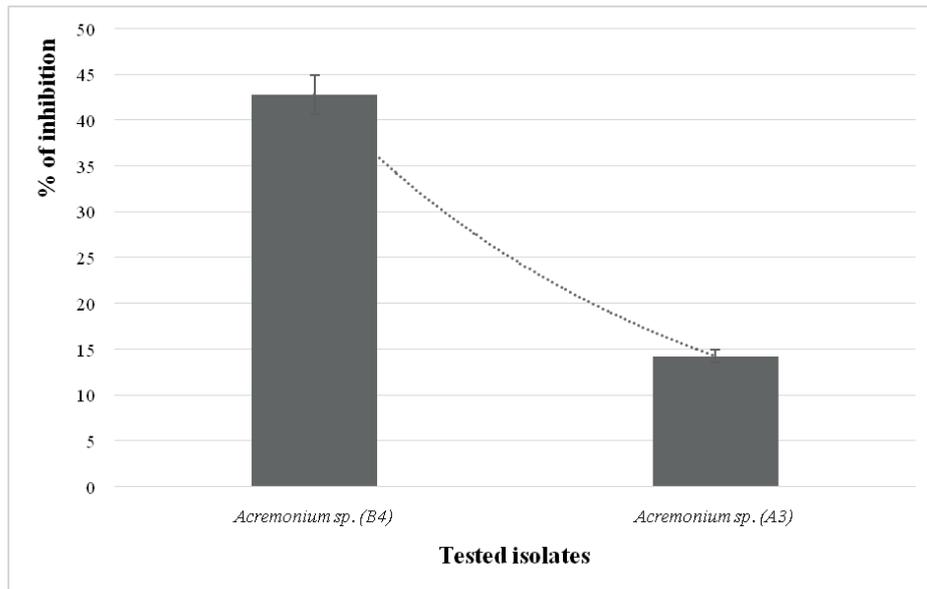


Fig. 5 - Percentage of inhibition of Cu-accumulating fungi

A significant difference ($p < 0.05$) has been noticed between TI of each species.

As shown in [9], each Tolerance Index has a rate: 0.00–0.39 (very low tolerance); 0.40–0.59 (low tolerance); 0.60–0.79 (moderate tolerance); 0.80 – 0.99 (high tolerance); 1.00–>1.00 (very high tolerance). All the strains were rated high to moderate tolerance at 200 ppm and decreased with the increase of metal concentrations (1000 ppm). The best TI for

Pb was noticed for *A. niger* (A_1) ranging from 0.93 at 200 ppm to 0.45 at 1000 ppm, followed by *A. carbonarius* (C_2) ranging from 0.87 to 0.61 and *Penicillium sp.*₁ (B_6) from 1.04 to 0.35. *Penicillium simplicissimum* (B_3) remained at 0.8 at all increasing concentrations, showing a good tolerance towards Pb (Fig. 8). It was reported that the high levels of Pb stimulating effects of concentrations on the tolerance of *Penicillium simplicissimum* are ambiguous [10].

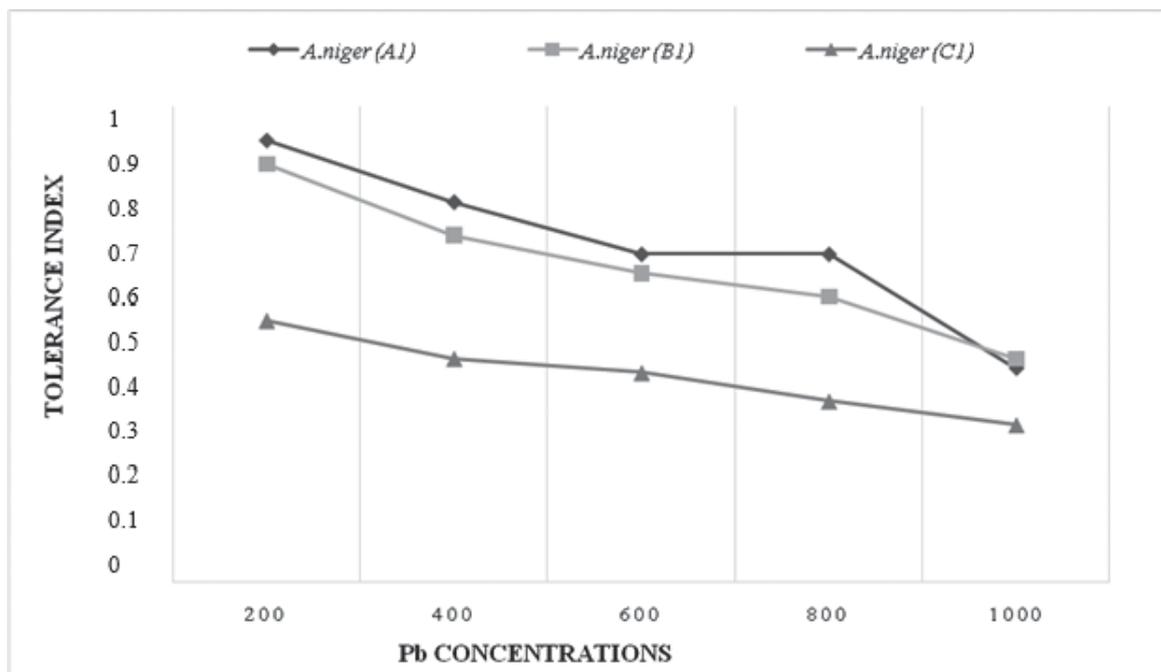


Fig. 6 - Tolerance Index of *Aspergillus niger*

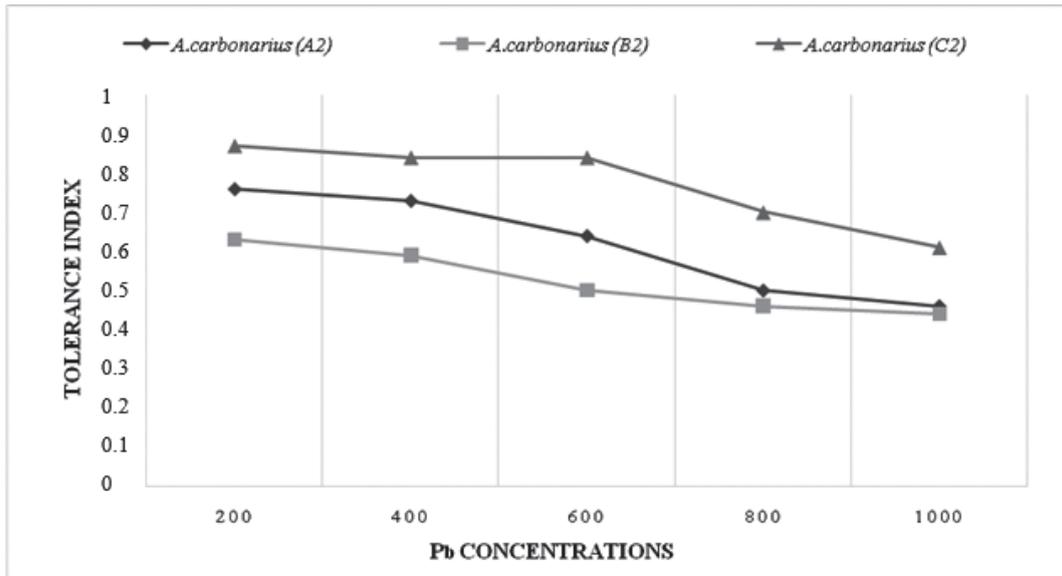


Fig. 7 - Tolerance Index of *Aspergillus carbonarius*

The evaluation of tolerance for Cu showed that TI's *Acremonium* sp. (A₃) is ranging from 0.85 to 0.57 compared to *Acremonium* sp. (B₄) ranging from 0.57 to 0.17 (Fig. 9). Both strains are rated very high tolerant at 200 ppm. However, *Acremonium* sp. (A₃) tolerated better.

DISCUSSION

The occurrence of *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius*, *Penicillium simplicissimum*, *Rhizomucor* sp. and *Acremonium* sp. on heavy metal contaminated sites was

confirmed in this study. The presence of fungal species in various polluted sites with elevated heavy metal concentrations has been well documented.

Iskandar *et al.* and Zafar *et al.* [4, 29] reported the occurrence of fungal strains in soils with elevated Cu and Pb concentrations.

Iskandar *et al.* and Iram *et al.* [4, 25] also pointed to the occurrence of fungal species in heavy metal contaminated industrial wastewaters and the tolerance displayed by these fungal species to heavy metals.

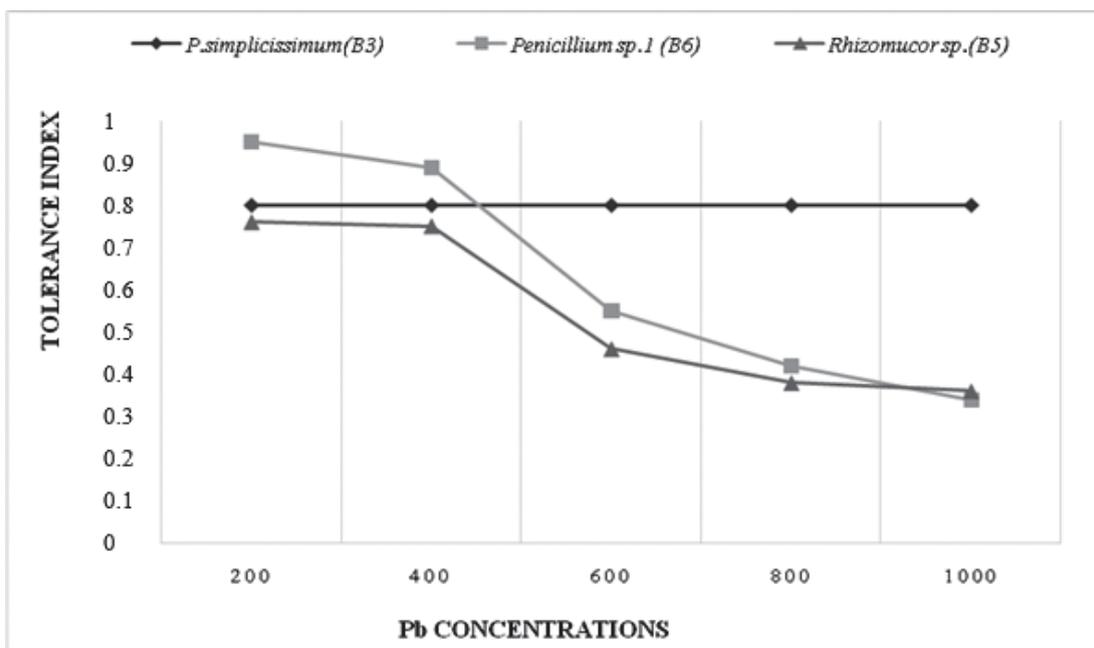


Fig. 8 - Tolerance Index of *Penicillium* sp. and *Rhizomucor* sp.

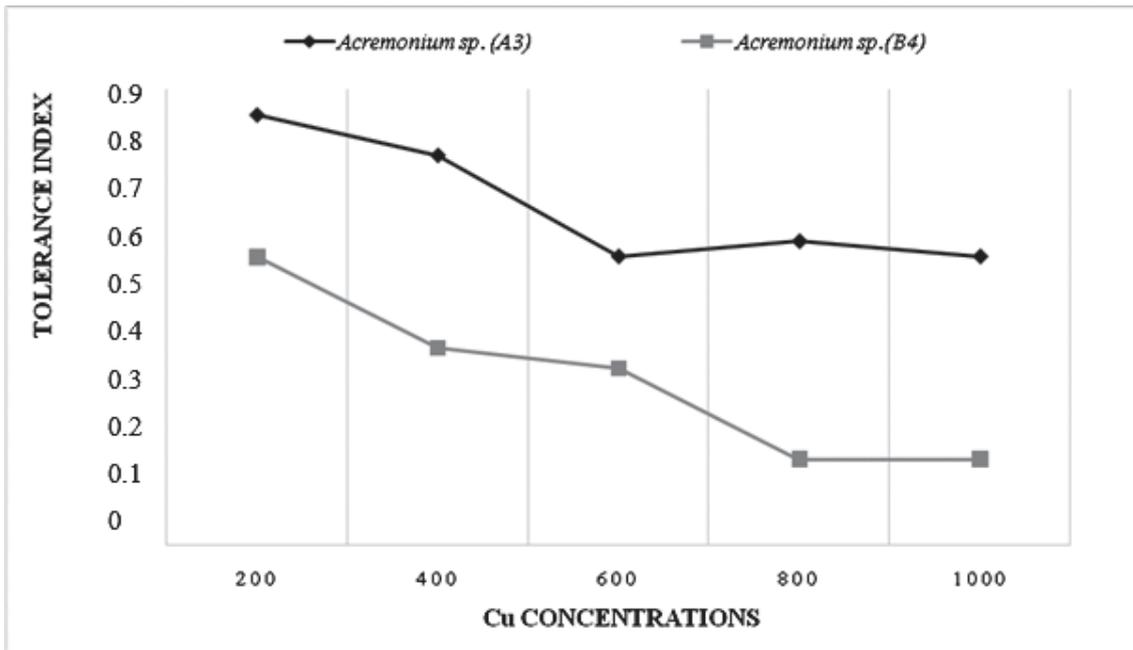


Fig. 9 - Tolerance Index of *Acremonium sp.*

Fungal species tolerate metals at elevated concentrations [19]. In particular, indigenous filamentous fungi isolated from contaminated sites have shown tolerance to heavy metals. This exceptional characteristic may be attributed to the isolates tolerance strategies to elevated heavy metal contaminations as reported by Formina *et al.* [30] that these tolerance mechanisms include metal binding to cell walls, production of intracellular/extracellular enzymes, intracellular sequestration, extracellular metal sequestration and precipitation, suppressed influx, enhanced metal efflux and complexation. Metals are able to induce harmful effects by their strong coordinating abilities. Heavy metals affect microorganisms in natural environment by reducing their numbers and their diversity thereby causing the increase of a metal resistant population (Table 2) [6]. It is also commonly assumed by Akhtar *et al.* [22] that metal exposure leads to the establishment of a resistant and tolerant microbial population.

The amount of Cu and Pb found in the analyzed soil samples collected (Fig. 2) are in agreement with Kao *et al.* [2]; elevated concentrations of heavy metals in the soils are most likely due to long-term continuous application of untreated industrial effluent containing these heavy metals. The calcareous

and clay nature of the region soil plays a key role in the retention of metals, which explains the downstream decrease in both metal contents of site C [2]. There were morphological and physiological differences between fungal genera, species and strains, and therefore, their response was not similar to the concentrations of the heavy metal ions (Figs. 4 and 5).

The MIC values of fungal isolates observed in this study (Table 4) were higher than those reported by Zafar *et al.* [29] as they reported that MIC values for Cu ranged between 50 and 75 ppm for *Aspergillus sp.* genera. However, the MIC values observed in this study are similar to those reported by Ezzouhri *et al.* [31].

As for tolerance results (Figs. 6, 7, 8 and 9), Chan *et al.* and Anahid *et al.* [8, 10] reported that TI varies with time of exposure to the heavy metals and type of strains. But a decrease in TI with an increasing concentration of heavy metals maybe due to the poor adaptive behavior nature of each fungus. This is maybe attributed to the isolates tolerance strategies to elevated heavy metal contaminations [30].

CONCLUSION

This study isolated and characterized fungal strains belonging to *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Acremonium sp.* and *Rhizomucor*

sp that could be further used as potential successful agents for bioremediation of the agricultural region of Settât - Morocco from Heavy metals and restore environmental balance. It is in fact a preliminary work, which would be interesting to complete by evaluating and validating the possibilities of using these isolates in the metal depollution of Pb and Cu contaminated sites at a large scale. There are still several aspects and tests that deserve further studies such as studying accumulation take up or the biosorption potential.

Acknowledgements

The authors would like to thank Ms. F. Gaboun from the National Institute for Agricultural Research (Rabat) and Mr. Y. El Goumi from Agri-food Health Biotechnology and Genetics, Faculty of Sciences and Technologies (Settât) for their help in the achievement of the statistical analysis.

Conflict of interests: None to declare.

REFERENCES

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Plant Production and Protection Series – Agroclimatological Data for Africa. Ctries. North Equator. Rome, Italy. 1984.
2. Kao T, Mejahed K E L and Bouzidi A. Evaluation de la pollution métallique dans les sols agricoles irrigués par les eaux usées de la ville de Settât (Maroc), Bull. l'Institut Sci. Rabat, Sect Sci la Vie. 2007;29:89–92.
3. Xie Y, Fan J, Zhu W, Amombo E, Lou Y, Chen L and Fu J. Effect of Heavy Metals Pollution on Soil Microbial Diversity and Bermudagrass Genetic Variation. *Front. Plant Sci.* 2016;7:1-12.
4. Iskandar N L, Zainudin N A I M and Tan S G. Tolerance and biosorption of copper (Cu) and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a freshwater ecosystem. *J. Environ Sci.* 2011;23(5):824–830.
5. Khan G, Kuek C, Chaudhry T M, Khoo CS, and Hayes WJ. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere.* 2000;41:197–207.
6. Saba G, Thirumarimurugan M and Sivakumar VM. Heavy Metal Tolerance Potential of Fungus Isolated From Copper Smelting Industry. *Int. Res. J. Pharm.* 2017; 8 (6): 120–125.
7. Mohammadian E, Babai Ahari A, Arzanlou M, Oustan S, and Khazaei S H. Tolerance to heavy metals in filamentous fungi isolated from contaminated mining soils in the Zanjan Province, Iran. *Chemosphere.* 2017;185:290–296.
8. Chen S H, Ng S L, Cheow Y L and Ting A S Y. A Novel study based on adaptive metal tolerance behavior in fungi and SEM-EDX analysis. *J. Hazard. Mater.* 2017;334: 132–141.
9. Valix M and Loon L. O. Adaptive tolerance behaviour of fungi in heavy metals. *Miner. Eng.* 2003;16(3):193–198.
10. Anahid S, Yaghmaei S and Ghobadinejad Z. Heavy metal tolerance of fungi. *Sci. Iran.* 2011; 18(3):502–508.
11. Mohammadian Fazli M, Soleimani N, Mehrasbi M, Darabian S, Mohammadi J and Ramazani A. Highly cadmium tolerant fungi: their tolerance and removal potential. *J. Environ. Heal. Sci. Eng.* 2015;13:1-19.
12. AFNOR NF X 31-101. Qualité des sols environnement. Association française de normalisation (AFNOR), Paris. 1996.
13. Sirven J. Detection of heavy metals in soils by laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). 2007. p.253.
14. Yazdani M, Yap C K, Abdullah F and Tan S G. *Trichoderma atroviride* as a bioremediator of Cu pollution: An in vitro study. *Toxicol. Environ. Chem.* 2009; 91(7): 1305–1314.
15. Botton P, Breton B, Fevre A, Gauthier M, Guy S and Larpent J P. *Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle.* Masson, Paris, Ed. Masson, 2^{ème} Ed. 1990. p 442.
16. Mouria B, Ouazzani-Touhami A. Isolement et identification de la mycoflore du compost des déchets urbains solides. *Revue «Nature & Technologie».* C- Sciences de l'Environnement. 2013; (09): 13- 28.
17. Malayeri BE. Décontamination des sols contenant des métaux lourds à l'aide de plantes et de microorganismes. Thèse, UHP-Université Henri Poincaré, France. 1995. p 116.
18. El Baz S, Baz M, Barakate M, Hassani L, El Gharmali A and Imzilen B. Resistance to and accumulation of heavy metals by actinobacteria isolated from abandoned mining areas. *Sci World J.* 2015;(2015):14.
19. Oladipo O G, Awotoye O, Olayinka A, Bezuidenhout C and Maboeta M S. Heavy metal tolerance traits of filamentous fungi isolated from gold and gemstone mining sites. *Brazilian J Microbiol.* 2017:1–9.
20. Kuate JR, Bessière JM, Zollo PHA and Kuate S P. Chemical composition and antidermatophytic

properties of volatile fractions of hexanic extract from leaves of *Cupressus lusitanica* Mill. from Cameroon. *J. Ethnopharmacol.*2006; 103(2):160–165.

21. Kabata-Pendias. Trace Elements in Soils and Plants. Florida CRC Press. Taylor Fr. Gp. 2011;(4):534.
22. Akhtar S, Mahmood-ul-Hassan M, Ahmad R, Suthor V and Yasin M. Metal tolerance potential of filamentous fungi isolated from soils irrigated with untreated municipal effluent. *Soil Environ.*2013;32(1):55–62.
23. Doillon D. Déterminants moléculaires de la tolérance au zinc des microorganismes eucaryotes. Thèse de Doctorat, Université Henri Poincaré, Nancy, France. 2010. 208p.
24. Bellion M, Courbot M, Jacob C, Blaudez D and Chalot M. Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;254(2):173–181.
25. Iram S and Abrar S. Biosorption of copper and lead by heavy metal resistant fungal isolates. *Int J Sci Res Publ.*2015;5(1):1–5.
26. Dursun Y, Uslu G, Tepe O, Cuci Z and Ekiz HA. Comparative investigation on the properties of volatile fractions of hexanic extract from leaves of *Cupressus lusitanica* Mill. from Cameroon. *J. Ethnopharmacol.*2006; 103(2):160–165.
27. Zapotoczny S, Jurkiewicz A, Tylko G, Anielska T and Turnau K. Accumulation of copper by *Acremonium pinkertoniae*, a fungus isolated from industrial wastes. *Microbiol Res.* 2007;162(3):219–228.
28. Cernansky E H, Urik SM, Seve J and Littera P. Biosorption of arsenic and cadmium from aqueous solution. *African J Biotechnol.* 2007; 6: 1932–1934.
29. Zafar S, Aqil F and Ahmad I. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresour Technol.* 2007;98(13):2557–2561.
30. Fomina M A, Alexander I J, Colpaert J V and Gadd G M. Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. *Soil Biol Biochem.* 2005;37(5):851–866.
31. Ezzouhri L, Castro E, Moya M, Espinola F and Lairini K. Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. *African J Microbiol Res.* 2009;3(2):35-48

REGULAR ARTICLE

BIOACCUMULATION AND BIOSORPTION OF LEAD AND COPPER BY RESISTANT FUNGAL ISOLATES

Hind Moukhtari¹, Fatima Gaboune², Abdelmajid Zouahri², Bouchra Ababou¹, Khadija Boukachabine^{1*}

Address: Professor Khadija Boukachabine

¹Hassan 1st University, Faculty of Sciences and Technologies, Laboratory of Agrifood and Health, P.O. Box: 577, Settat-Morocco, Phone: +212666390844; Fax: +212523400969

² Regional Center for Agricultural Research of Rabat, B.P: 6356 - Rabat, Institutes -MAROC B.P. 415, Rabat- Morocco

*Corresponding author: khadija.boukachabine@uhp.ac.ma

ABSTRACT

Heavy metal pollution causes a major threat to all life forms in the environment due to its toxic effects which has required the need for eco-friendly clean-up strategies such as the use of fungi in depollution strategies. The research carried out aimed to explore the potential up take of soils fungi from a heavy metal polluted soil irrigated by BouMoussa river that contains pretreated Settat's (Morocco) wastewater industries. Heavy metal resistant fungal species were assessed for their accumulation and biosorption performance as a function of 3 hours of contact time and initial Lead and Copper ion concentrations (50, 100, 200 ppm). A significant fungal strains biodiversity of 24 species were isolated from a composite sample, only 5 species belonging to *Aspergillus sp.*, *Candida sp.*, *Cryptococcus sp.*, and *Trichosporon sp.* genera revealed an interesting bioaccumulation and biosorption capacity against Pb (II) and Cu (II). The higher Pb (II) accumulation capacity was noticed at *Aspergillus niger* and *Candida versatilis* at 200ppm with 10.28 and 15.64 mg/g respectively. For Pb (II) biosorption, *Aspergillus niger* and *Candida versatilis* also reached the highest values 9.62 and 9.36 mg/g respectively. As for Cu (II), it has been noticed that *Trichosporon ovoides* has the highest accumulation capacity at 200ppm by reaching 11.43 and *Candida versatilis* by reaching 6.55 mg/g.

Keywords: Heavy metals, Accumulation, Biosorption, Filamentous fungi, Yeasts.

INTRODUCTION

Today's world is confronted to soils, water and air contaminations by many toxic xenobiotics. The rapid development of industries induces waste containing metals that are directly or indirectly discharged into the biosphere increasingly, producing thereby a significant threat to the human health (Zafar *et al.*, 2007; Iskandar *et al.*, 2011) and serious environmental pollutions because of their toxicity, accumulation in the food chain and persistence in nature (Wang *et al.*, 2006). Heavy metals are present in nature and industrial wastewater. Due to their mobility in natural ecosystems and their toxicity, their presence in surface water and groundwater causes a major inorganic contamination problem (Ballester *et al.*, 2007). The common techniques applied in removing heavy metals from wastewater include chemical (precipitation/ neutralization) or physical (ion exchange, membrane separation, electrodialysis and activated carbon adsorption) methods produce a large amount of metallic sludge, making metal recovery difficult and increase the pollution load on the environment (Ali *et al.*, 2010). Biological methods of metal removal have been recommended as cheaper and more effective techniques to solve the water pollution problems (Khoo *et al.*, 2001). In metal uptake, either alive or dead fungi, complex metal ions through the action of ligands or functional groups located on the outer surface of the cell (Ali *et al.*, 2010). There are several mechanisms in fungi to tolerate and detoxify metals, such as biosorption and

bioaccumulation. Biosorption occurs when metal ions are sequestered onto the cell wall through surface bonding. Bioaccumulation is when metal ions are assimilated intracellularly (Chen *et al.*, 2017). The mechanism of uptake differs depending on the species used, the origin, processing of the biomass and the nature of the metal (Khoo *et al.*, 2001). Several studies (Dönmez *et al.*, 2001; Dursun *et al.*, 2003) showed that Fungal species such as *Aspergillus* sp. and *Candida* sp. have demonstrated correlation between metal tolerance and their ability to remove Pb (II) and Cu (II). The present study is in fact the first to be performed with filamentous fungi and yeasts in this region and aims to analyze soil samples contaminated with Pb (II) and Cu (II) collected from BouMoussa River in order to identify and determine their fungal bioaccumulation and biosorption capacity towards these two metals in order to find an effective alternative to detoxify the region from these toxic elements.

MATERIAL AND METHODS

1. Study area and sample collection

Surface soil sample (not exceeding 10 cm depth) used in this study were collected from an agricultural field of the region of SETTAT - MOROCCO (7°37'28,5''W, 33°1'24,42''N) which is irrigated with untreated wastewater coming from the Boumoussa river, a mixture of rain water and industrial effluents. A composite soil sample was collected, transported to laboratory and stored at 4°C to ensure minimal biological activity (Iskandar *et al.*, 2011).

2. Heavy metals Analysis

Soil sample (1g) was pretreated according to standards (AFNOR NF X 31-101, 1996) [2 ml HNO₃ (65%) and 6 ml HCL]. The analyses were done in triplicates. The concentrations of Pb (II) and Cu (II) were determined by Atomic Absorption Spectrophotometer (Varian - SpectrAA 220G Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometer) with an air-acetylene flame. The working currents/wavelengths for Pb and Cu were 7.5 mA/283.3 nm and 7.5 mA/324.8 nm, respectively. The instrument calibration was checked periodically by using standard metal solutions.

3. Isolation and morphological characterization of fungi

Isolation of fungi was carried out within 24 hours of sample collection by standard spread plat technique after dilutions (up to 10⁻¹⁰) using Rose Bengal Chloramphenicol (RBA) agar medium (Yazdani *et al.*, 2009). Mycelia appearance, sporangiophore position, columella and spore shape were identified by microscopic examination of morphological features with key identification (Botton *et al.*, 1990). Yeasts identification was carried out thanks to the exploitation of all the results obtained (morphological and physiological tests) by the "Yeast Identification PC" program (Mouria *et al.*, 2013).

4. Heavy metal bioaccumulating fungi

4.1. Screening

Filamentous fungi isolates were streaked on Malt Agar (MA) media and yeasts on Malt Yeast Glucose Peptone (MYGP). Each media contains 600 ppm of Pb (NO₃)₂ or Cu (NO₃)₂. H₂O then left at 28°C for 3 days for yeasts and 7 days for filamentous fungi (Malayeri, 1995). Plates were exposed to H₂S gas in a sealed container (resulting from the reaction of Na₂S with HCl). The clear zone around the colony proves the strain's metal-accumulation potential (El Baz *et al.*, 2015).

4.2. Live fungal biomass

Fungal biomass was obtained in 100 mL Potato dextrose broth medium at 27 ± 2°C for 3 days for yeasts and 7 days for filamentous fungi (Vadkertiová *et al.*, 2006; Al-Garni *et al.*, 2009). The biomass was then homogenized, filtered and washed with sterile water. Live cells were then weighed (0.1g fresh weight) and introduced into 50 mL metal solutions (50, 100, 200 ppm) in 250 ml flasks (Chen *et al.*, 2017). The mixture was incubated at 3 hours with agitation (150 rpm, 27 ± 2°C), harvested and centrifuged (3500 rpm/ 10 min)(El Baz *et al.*, 2015). Cell-free supernatant was analyzed by Atomic Absorption Spectroscopy (AAS). The remaining biomass was oven dried at 80°C until constant weight to measure dry weight (Dönmez *et al.*, 2001). Controls (metal solutions without fungal inoculation) were tested in the same conditions. The bioaccumulation capacity (q, mg g⁻¹) were calculated based on the following equation (Simonescu *et al.*, 2012):

$$q = \frac{[(C_0 - C_f) * V]}{M}$$

C_0 (mg L⁻¹): initial metal concentration, C_f (mg L⁻¹): final metal concentration, V (L): volume of solution, M (g): dry weight of biomass

5. Heavy metal biosorption fungi

5.1. Dried biomass

Fungal biomass obtained was separated from the culture medium by centrifugation at 6000 rpm for 15 min. Harvested cells were washed twice with deionized distilled water and dried in an oven at 80°C for 24 h (Dönmez *et al.*, 2001). The dried sample was then ground, using a blender and sieved to pass through a 250 mm mesh sieve to obtain uniform particle size (Al-Garni *et al.*, 2009).

5.2. Biosorption experiment

Biosorption of Pb (II) and Cu (II) from an aqueous solution was investigated at various concentrations (50, 100, 200 ppm) for 3h (El Baz *et al.*, 2015). The Pb (II) and Cu (II) solutions were prepared in distilled water. Dried biomass (0.1 g) was added to 50 mL metal solution and shaken on an orbital shaker at 125 rpm at 25°C ±0.1 for 3h. The performance of the biomass was investigated under the optimum conditions (Batch cultures in 250 mL Erlenmeyer flasks at 27±1°C, pH = 7; agitation rate: 125 rpm) (Bhainsa *et al.*, 2009; Al-Garni *et al.*, 2009).

After centrifugation at 3600 rpm/10 min the supernatant was analyzed for residual metal ion concentration. All the experiments were carried out in triplicate. The amount of adsorbed metal ions per gram of biomass was obtained by using the general equation (Fan *et al.*, 2008):

$$q_e = \frac{[(C_i - C_e) * V]}{M}$$

q_e (mg g⁻¹): amount of metal biosorbed ions, C_i (mg L⁻¹): initial metal ion concentration in solution, C_e (mg l⁻¹): equilibrium metal ion concentration in solution, V (L): volume of the medium, M (g): amount of the biomass used in the reaction mixture.

6. Statistical analysis

The tests are carried out in triplicate and the obtained data was analyzed with Analysis of Variance (ANOVA) using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 22.0. Means are compared by Tukey's honestly significant difference test (P <0.05).

RESULTS

1- Total Heavy metals content

Pb levels recorded in this site (191.768ppm) largely exceeded permissible limits (27ppm). This is probably due to the irrigation by BouMoussa river water which mainly contains heavy metals in large quantities. However, the total Cu (II) content (26.604 ppm) did not exceed the limits (38.90 ppm) (FAO, 1984; Kabata-Pendias, 2011).

2- Fungal diversity

A total of 24 species were isolated from the collected samples. 13 filamentous fungi belonging to *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* and 11 yeasts belonging to *Candida sp.*, *Cryptococcus sp.*, *Trichosporon sp.* and other unspecified genera (Table 1).

Table 1 Fungal diversity

Fungal genera	Filamentous fungi	Yeasts	Total
<i>Aspergillus sp.</i>	1	N	1
<i>Penicillium sp.</i>	4	N	4
<i>Candida sp.</i>	n	4	4
<i>Cryptococcus sp.</i>	n	1	1
<i>Trichosporon sp.</i>	n	1	1
Unspecified	8	5	13
Total	13	11	24

Legend : n - no isolates

Penicillium sp. and *Candida sp.* were the most frequently encountered. These results are in agreement with those reported by Akhtar *et al.*, (2013). According to Dönmez *et al.*, (1999); Bellion *et al.*, (2006); Doillon (2010) and Akhtar *et al.*, (2013) *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Candida sp.* are the most commonly occurring in the heavy metals contaminated soils.

3- Screening of Heavy Metal-Accumulating fungi

Fungal strains with bioaccumulation potential revealed a clear zone around the colonies (Figure 1). All collected species were tested against Metals (Table 2).

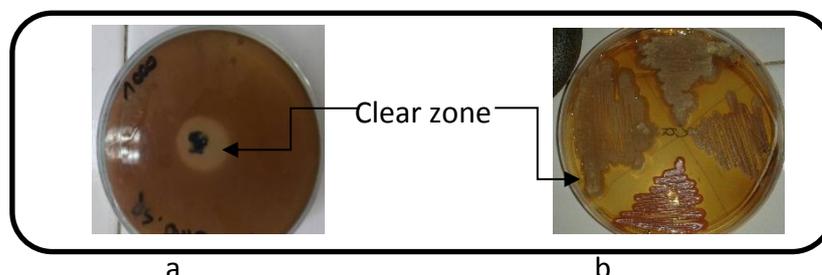


Figure 1 Clear zone around colony. a: filamentous fungi, b: yeasts

Table 2 Fungal species with the ability of accumulating heavy metals

Isolates	Metal	
	Pb (II)	Cu (II)
Filamentous fungi	<i>Aspergillus niger</i>	n
Yeasts	<i>Candida versatilis</i> <i>Candida bertae</i> <i>Cryptococcus albidus</i> <i>Trichosporon ovoides</i>	

Legend: n - no accumulating strains found

Aspergillus niger had an accumulation capacity against Pb (II). However, *Candida versatilis*, *Candida bertae*, *Cryptococcus albidus* and *Trichosporon ovoides* accumulation capacity was found common between the two tested metals.

4- Live Fungal Metal-Accumulation

Based on the results from previous sections, the bioaccumulation potential was examined for the five isolates for the selected toxic metals Cu (II) and Pb (II) to validate the bioaccumulation potential against their toxicity under the optimum conditions. In this study, the bioaccumulation capacities of the tested strains were influenced by the initial metal concentration (Figure 2, 3, 4).

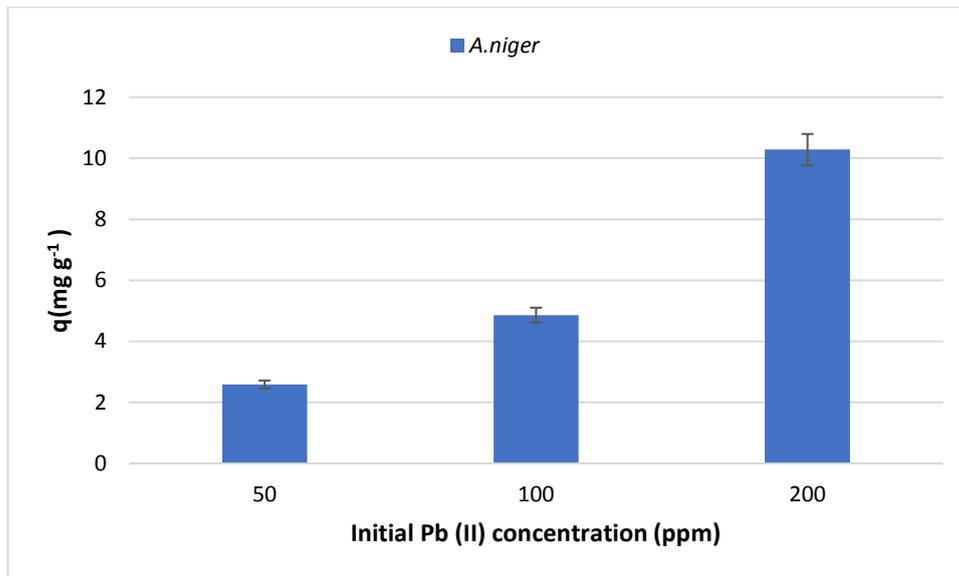


Figure 2 Effect of initial metal ion concentration on the Pb (II) bioaccumulation for *Asp. niger*

Live cells showed promising bioaccumulation potential in aqueous solutions. The accumulation of Pb (II) and Cu (II) ions increased with increasing initial metal ion concentration. The accumulation capacity of *Asp. niger* was 2.59-10.28 mg g⁻¹ with initial concentration 50 - 200 ppm for Pb (II).

Live cells of the tested yeasts showed a better bioaccumulation potential for Pb than for Cu (Figure 3, 4).

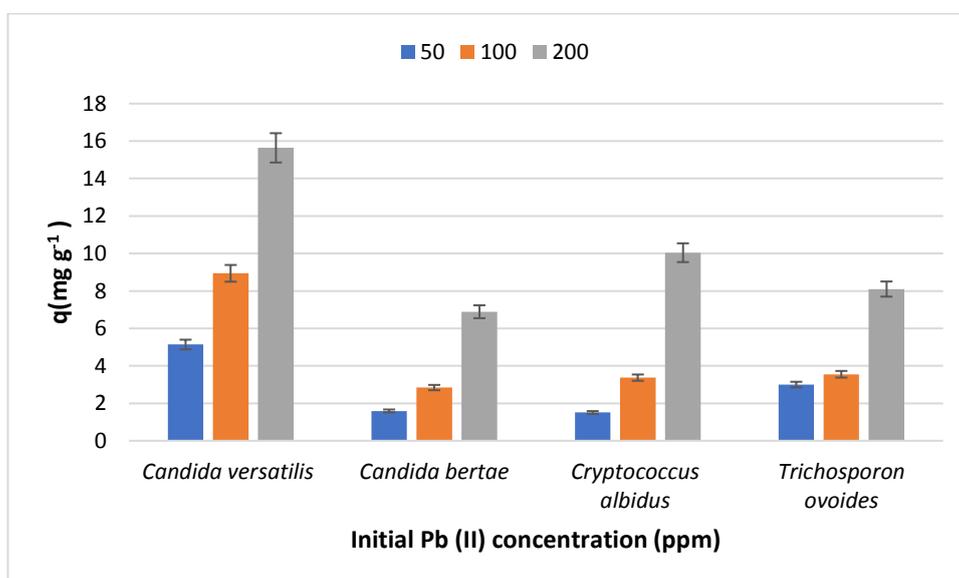


Figure 3 Effect of initial metal ion concentration on the Pb (II) bioaccumulation for yeasts

The accumulation capacity increased with the increase of initial concentration. *Candida versatilis* showed a higher potential (15.64 mg g⁻¹) at 200 ppm followed by *Cryptococcus albidus* (10.04 mg.g⁻¹), *Trichosporon ovoides* (8.10 mg.g⁻¹) and *Candida bertae* (6.89 mg.g⁻¹).

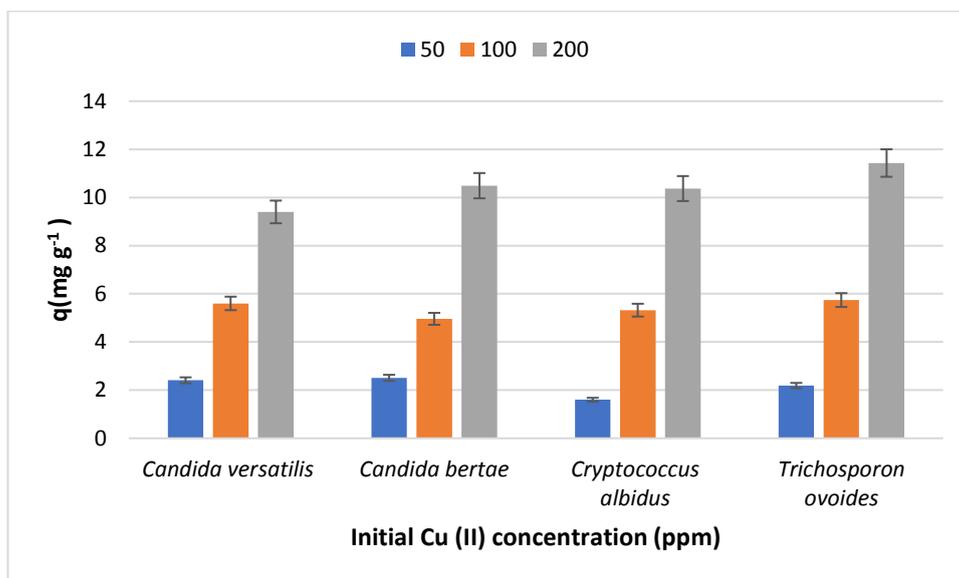


Figure 4 Effect of initial metal ion concentration on the Cu (II) bioaccumulation for yeasts

As for Cu, the yeast isolates accumulated less. The best rates were noticed at 200 ppm for *Trichosporon ovoides* (11.43 mg g^{-1}). The difference between the accumulation capacity of Pb (II) and Cu (II) is due to the toxicity of Cu as explained by Uren (2005). The bioaccumulation capacities of the tested isolates were influenced by the initial concentrations of metals. All isolates demonstrated similar trends, an increase in the concentration of Pb (II) and Cu (II) from 50 ppm to 200 ppm resulted in improved metal uptake. These results are similar with those of Chen *et al.* (2017).

The Statistical analysis shows that there is significant difference between fungal species and concentrations for the two tested metals. The Pb (II) and Cu (II) accumulation influence on the metal ion up take. This suggested that at low initial metal concentration, ion exchange between the cell binding sites and metal ions may have occurred. Increasing the initial metal concentration (to 200 ppm in this study) helped overcome mass transfer resistance between metal solution and fungal cell wall, allowing more collisions between these two to yield enhanced metal uptake (Mishra *et al.*, 2012).

5- Biosorption fungi

The effect of initial metal ion concentration on the biosorption capacity was studied under the optimum conditions. The biosorption of Pb (II) and Cu (II) ions increased with increasing initial concentration of metal ions, becoming saturated at 200ppm for Pb (II) and Cu (II) ions (Figure 5, 6 and 7).

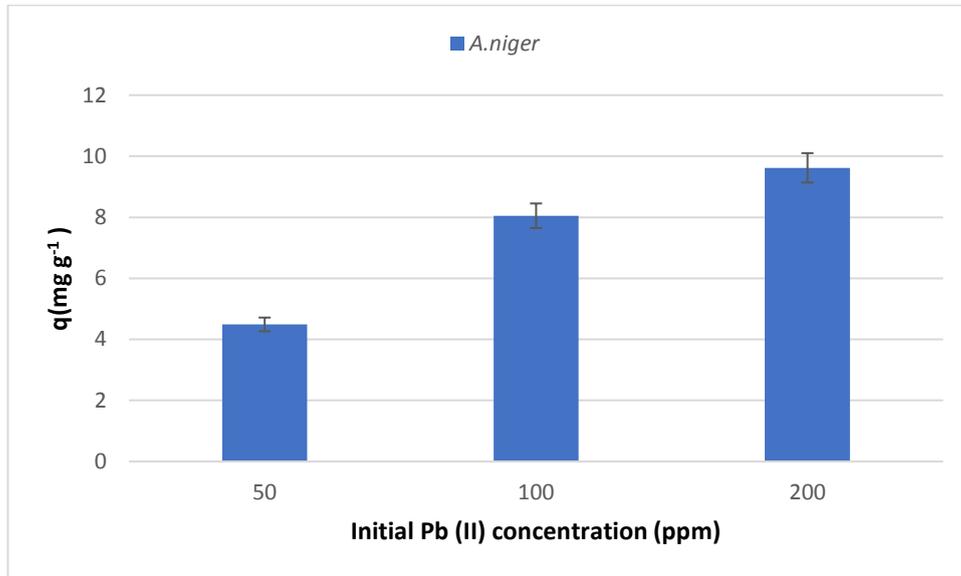


Figure 5 Effect of initial metal ion concentration on the Pb (II) biosorption for *Asp. niger*

The biosorption of *Asp. niger* was 4.49 -8.05 and 9.62 mg.g⁻¹ with initial concentration 50 – 100 and 200 ppm of Pb (II). *Aspergillus niger* isolate has revealed, in this study, a high biosorption capacity as proved by formal studies (Iskandar *et al.*, 2011).

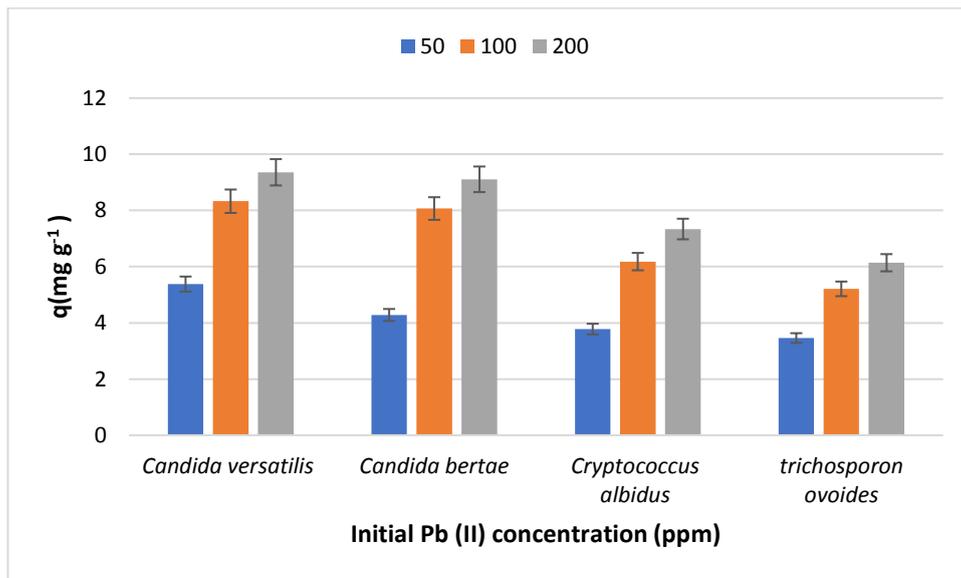


Figure 6 Effect of initial metal ion concentration on the Pb (II) biosorption for yeasts

The higher biosorption rate was revealed at 200 ppm. The best biosorption capacity was 9.36 mg.g⁻¹ for *Candida versatilis*, followed by *Candida bertae*, *Cryptococcus albidus* and *trichosporon ovoides* with 9.11 – 7.34 and 6.14 mg.g⁻¹ respectively.

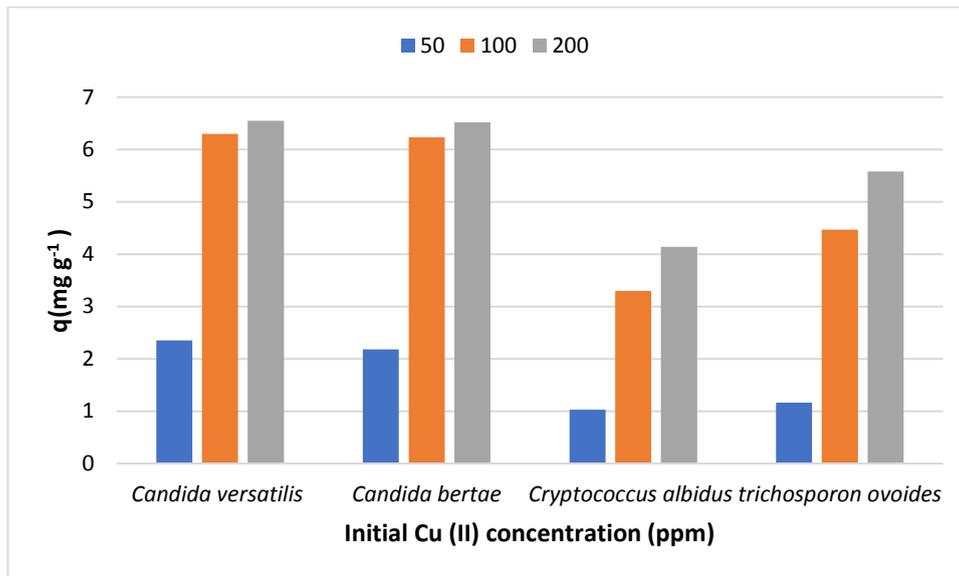


Figure 7 Effect of initial metal ion concentration on the Cu (II) biosorption for yeasts

As for Cu, the higher biosorption rate was noticed at 200 ppm. *Candida versatilis* and *Candida bertae* were the best rated values (6.55 and 6.52 mg.g⁻¹ respectively).

The Statistical analysis showed that there is a significant difference between isolate concentrations for the two tested metals. The Pb (II) and Cu (II) biosorption influence on the metal ion up take. These results are similar to Dönmez *et al.*, (1999) as they showed that *Candida sp.* was highly resistant to Cu (II) when compared with other yeasts as it was able to grow and accumulate higher Cu (II) concentration for up to 700 ppm.

The effect of contact time (3h) on higher Pb (II) and Cu (II) concentrations (50- 200ppm) is shown in this study. The higher Pb accumulation capacity was noticed at *Aspergillus niger* and *Candida versatilis* at 200ppm with 10.28 and 15.64 mg g⁻¹ respectively. As for biosorption, *Aspergillus niger* and *Candida versatilis* also reached the highest values with 9.62 and 9.36 mg.g⁻¹ respectively.

Therefore, at Cu concentrations, it has been noticed that *Trichosporon ovoides* has the highest accumulation capacity at 200ppm by reaching 11.43 mg g⁻¹ and *Candida versatilis* has the highest biosorption capacity by reaching 6.55 mg.g⁻¹ at the same initial concentration.

DISCUSSION

Cu and Pb contents found in the studied site are in agreement with Kao *et al.* (2007). Elevated concentrations of heavy metals in soil are most likely due to long-term continuous application of untreated industrial effluent containing these heavy metals. The calcareous and clay nature of the region soil plays a key role in the retention of metals as explained by Kao *et al.*, (2007).

Metals are able to induce harmful effects by their strong coordinating abilities. They affect microorganisms in natural environment by reducing their numbers and their diversity causing thereby the increase of a metal resistant population (Saba *et al.*, 2017). It is also commonly assumed by Akhtar *et al.*, (2013) that metal exposure leads to the establishment of a resistant and tolerant microbial population. There were morphological and physiological differences between fungal genera, species and strains, and therefore, their response was not the same to the concentrations of the heavy metal ions.

The effect of the contact time on the accumulation and biosorption capacity of Pb (II) and Cu (II) on *Aspergillus sp.* and some yeast biomass is shown in this study. It has been explained by Dönmez *et al.* (1999) and Iram *et al.* (2015) that rapid uptake of Pb and Cu was observed in 30 and 15 min, respectively. The maximum ion removal occurs in 3 h and then the uptake of metal ions became very

slow. This rapid initial uptake is consistent with the previous reports on the biosorption of Pb and Cu (Kapoor *et al.*, 1998 and Say *et al.*, 2001).

It has been explained by Fadel *et al.* (2017) that the biosorption uptake of metal ions by microorganisms occur in two stages: an initial rapid stage (passive uptake), followed by much slower process (active uptake). The biosorption equilibrium occurs at the end of rapid physical adsorption stage (first-stage).

At low concentration of metal ions, the number of available binding sites on the biomass surface is high which make the metal uptake very effective. At high concentration levels, more Pb (II) or Cu (II) ions are left unadsorbed in solution due to the saturation of binding sites on the biomass surface. These results may be explained by an increase in the number of metal ions competing for the available binding sites in the biomass and the lack of binding sites for complexation of Pb (II) and Cu (II) ions at higher concentration levels (Akar *et al.*, 2006).

In accordance with these findings, it was reported that the capacity of the biomass can be increased by physical and chemical treatments, which led to removal, hiding or exposing chemical groups that binding or exchange with the adsorbed metal ions. Heating and boiling are of the physical factors, while detergents, organic solvents, alkali and acids of the chemical factors (Kapoor *et al.*, 1998 ; Al-Garni *et al.*, 2009).

CONCLUSION

The Accumulation and biosorption characteristics of *Aspergillus niger*, *Candida sp.* and *Trichosporon ovoides* were studied for Pb (II) and Cu (II) ions. The results indicated that these isolates could be used as an inexpensive, effective and easily available biosorbent for the removal of Pb (II) and Cu (II) ions. They could be, in fact, a potential successful depollution agent of the agricultural region of Settat - Morocco from heavy metals.

This study is, in fact, the first study in the region to treat the accumulation and biosorption capacity of *Trichosporon ovoides* as it has been noticed that it has an important accumulation and biosorption capacity at 200ppm for both metals. The higher Pb (II) and Cu (II) accumulation capacity was noticed at *Aspergillus niger* and *Candida versatilis* at 200 ppm with 10.28 mg g⁻¹, 15.64 mg g⁻¹ for Pb and 9.62 mg g⁻¹, 9.36 mg g⁻¹ for Cu. As for Cu (II) biosorption, *Candida versatilis* reached the highest values 6.55 mg g⁻¹. There are still several aspects and tests that deserves further studies such as the study of the bioremediation potential for the tested isolates.

REFERENCES

- AFNOR NF X 31-101. (1996). Qualité des sols environnement. Association française de normalisation (AFNOR), Paris.
- Akar, T., & Tunali, S. (2006). Biosorption characteristics of *Aspergillus flavus* biomass for removal of Pb(II) and Cu(II) ions from an aqueous solution. *Bioresource Technology*, 97(15), 1780–1787.
- Akhtar, S., Mahmood-ul-Hassan, M., Ahmad, R., Suthor, V., & Yasin, M. (2013). Metal tolerance potential of filamentous fungi isolated from soils irrigated with untreated municipal effluent. *Soil and Environment*, 32(1), 55–62.
- Al-Garni, S. M., Ghanem, K. M., & Bahobail, A. S. (2009). Biosorption characteristics of *Aspergillus fumigatus* in removal of cadmium from an aqueous solution. *African Journal of Biotechnology*, 8(17), 4163–4172.
- Ali, E. H., & Hashem, M. (2010). Removal Efficiency of the Heavy Metals Zn(II), Pb(II) and Cd(II) by *Saprolegnia delica* and *Trichoderma viride* at Different pH Values and Temperature Degrees. *Mycobiology*, 35(3), 135.
- Ballester, A., Bla, M. L., Mun, J. A., Romera, E., & Gonza, F. (2007). Comparative study of biosorption of heavy metals using different types of algae, 98, 3344–3353.
- Bellion, M., Courbot, M., Jacob, C., Blaudez, D., & Chalot, M. (2006). Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 254(2), 173–181.
- Bhainsa, K. C., & D'Souza, S. F. (2009). Thorium biosorption by *Aspergillus fumigatus*, a filamentous fungal biomass. *Journal of Hazardous Materials*, 165(1–3), 670–676.
- Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, P.H., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y. & Veau, P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. *Masson, Paris, 2eme Ed, 2eme édit*, 442.
- Chen, S. H., Ng, S. L., Cheow, Y. L., & Ting, A. S. Y. (2017). A novel study based on adaptive metal tolerance behavior in fungi and SEM-EDX analysis. *Journal of Hazardous Materials*, 334, 132–141.

- Doillon, D. (2010). *Déterminants moléculaires de la tolérance au zinc des microorganismes eucaryotes*. Université Henri Poincaré.
- Dönmez, G., & Aksu, Z. (1999). The effect of copper(II) ions on the growth and bioaccumulation properties of some yeasts. *Process Biochemistry*, 35(1–2), 135–142.
- Dönmez, G., & Aksu, Z. (2001). Bioaccumulation of copper(ii) and nickel(ii) by the non-adapted and adapted growing CANDIDA SP. *Water Research*, 35(6), 1425–1434.
- Dursun, a. Y., Uslu, G., Tepe, O., Cuci, Y., & Ekiz, H. (2003). A comparative investigation on the bioaccumulation of heavy metal ions by growing Rhizopus arrhizus and Aspergillus niger. *Biochemical Engineering Journal*, 15(2), 87–92.
- El Baz, S., Baz, M., Barakate, M., Hassani, L., El Gharmali, A., & Imziln, B. (2015). Resistance to and accumulation of heavy metals by actinobacteria isolated from abandoned mining areas. *Scientific World Journal*, 2015.
- Fadel, M., Hassanein, N. M., Elshafei, M. M., Mostafa, A. H., Ahmed, M. A., & Khater, H. M. (2017). Biosorption of manganese from groundwater by biomass of Saccharomyces cerevisiae. *HBRC Journal*, 13(1), 106–113.
- Fan, T., Liu, Y., Feng, B., Zeng, G., Yang, C., Zhou, M., ... Wang, X. (2008). Biosorption of cadmium(II), zinc(II) and lead(II) by Penicillium simplicissimum: Isotherms, kinetics and thermodynamics. *Journal of Hazardous Materials*, 160(2–3), 655–661.
- Food and Agricultural Organization of the United Nations(FAO). (1984). Plant Production and Protection Series – Agroclimatological Data for Africa. *Countries North of the Equator. Rome, Italy: FAO, 1.*
- Iram, S., & Abrar, S. (2015). Biosorption of copper and lead by heavy metal resistant fungal isolates. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 5(1), 1–5.
- Iskandar, N. L., Zainudin, N. A. I. M., & Tan, S. G. (2011). Tolerance and biosorption of copper (Cu) and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a freshwater ecosystem. *Journal of Environmental Sciences*, 23(5), 824–830.
- Kabata-Pendias. (2011). Trace Elements in Soils and Plants. *Florida: CRC Press, Taylor & Francis Gp, 4th ed, 534 pp.*
- Kao, T., Mejahed, K. E. L., & Bouzidi, A. (2007). Evaluation de la pollution métallique dans les sols agricoles irrigués par les eaux usées de la ville de Settat (Maroc). *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, Section Sciences de La Vie*, (29), 89–92.
- Kapoor, a, & Viraraghavan, T. (1998). Biosorption of heavy metals on Aspergillus niger: effect of pretreatment. *Bioresource Technology*, 63, 109–113.
- Khoo, K. M., & Ting, Y. P. (2001). Biosorption of gold by immobilized fungal biomass. *Biochemical Engineering Journal*, 8(1), 51–59.
- Malayeri, B. E. (1995). Décontamination des sols contenant des métaux lourds à l'â€™ aide de plantes et de microorganismes, 116.
- Mishra, A., & Malik, A. (2012). Simultaneous bioaccumulation of multiple metals from electroplating effluent using Aspergillus lentulus. *Water Research*, 46(16), 4991–4998.
- Mouria Btissam, Ouazzani-touhami Amina, D. A. (2013). Nature & Technologie Isolement et identification de la mycoflore du compost des déchets urbains solides.
- Saba, G., M, T., & V M, S. (2017). Heavy Metal Tolerance Potential of Fungus Isolated From Copper Smelting Industry. *International Research Journal of Pharmacy*, 8(6), 120–125.
- Say, R., Denizli, A., & Aröca, M. Y. (2001). Biosorption of cadmium (II), lead (II) and copper (II) with the ® lamentous fungus Phanerochaete chrysosporium, 76.
- Simonescu, C. M., & Ferdeş, M. (2012). Fungal biomass for cu(II) uptake from aqueous systems. *Polish Journal of Environmental Studies*, 21(6), 1831–1839.
- Uren, S. (2005). Biosorption of cadmium and lead ions by ethanol treated waste baker ' s yeast biomass Yekta G o ß, 96, 103–109.
- Vadkertiová, R., & Sláviková, E. (2006). Metal tolerance of yeasts isolated from water, soil and plant environments. *Journal of Basic Microbiology*, 46(2), 145–152.
- Wang, J., & Chen, C. (2006). Biosorption of heavy metals by Saccharomyces cerevisiae : A review, 24, 427–451.
- Yazdani, M., Yap, C. K., Abdullah, F., & Tan, S. G. (2009). Trichoderma atroviride as a bioremediator of Cu pollution: An in vitro study. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 91(7), 1305–1314.
- Zafar, S., Aqil, F., & Ahmad, I. (2007). Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresource Technology*, 98(13), 2557–2561.

Avant-propos

Nom et prénom de l'auteur :

Hind MOUKHTARI

Intitulé du travail :

Contribution des champignons telluriques saprotrophes à la bioremédiation des sols pollués.

Sous la direction de :

Professeur Khadija BOUKACHABINE : Professeur de l'Enseignement Supérieur, Laboratoire Agroalimentaire et Santé, Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan 1^{er}, Settat, Maroc.

Co- encadré par :

Professeur Bouchra ABABOU : Professeur de l'Enseignement Supérieur, Laboratoire Agroalimentaire et Santé, Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan 1^{er}, Settat, Maroc.

Laboratoire de recherche :

Laboratoire Agroalimentaire et Santé, Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan 1^{er}, Settat, Maroc.

L'analyse par ICP – AES des échantillons a été effectué au sein du Centre National de Recherche Scientifique et Techniques (CNRST – Rabat) et à l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA- Rabat).

Début des travaux de recherche :

Septembre 2014

Fin des travaux de recherche :

Juin 2020

Dédicaces :

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut. Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, Le respect et la reconnaissance.

Je dédie cette Thèse à :

Mes Très Chers Parents,

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour vous. Vous n'avez jamais cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, vous étiez toujours présent à mes côtés pour me consoler quand il fallait. Vous avez su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Vos conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Votre patience sans fin, votre compréhension et votre encouragement sont pour moi le soutien indispensable que vous avez toujours su m'apporter. Je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain. Je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir. Que Dieu le tout puissant vous préserve, vous accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et vous protège de tout mal.

Mes Chers Grand parents,

Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez jamais cessé de formuler dans vos prières. Que Dieu vous préserve santé et longue vie.

A la mémoire de mes défunts grand parents qui ont été toujours dans mon esprit et dans mon cœur, je vous dédie aujourd'hui ma réussite. Que Dieu, le miséricordieux, vous accueille dans son éternel paradis.

Mon Mari et Ma fille Israe,

Vos encouragements étaient la bouffée d'espoir qui me réanimait dans les moments pénibles, de solitude et de souffrance. Merci d'être toujours à mes côtés, par votre présence, votre amour et profonde tendresse. Merci d'avoir donné du goût et du sens à notre vie de famille. En témoignage de mon amour, de mon admiration et de ma grande affection, je vous prie de trouver dans ce travail l'expression de mon estime et mon sincère attachement. Je prie dieu le tout puissant pour qu'il vous donne bonheur et prospérité. Je vous aime de tout cœur

Mon frère, Ma sœur, Yasmine, Alae, Yacout et Chama,

En souvenir d'une enfance dont nous avons partagé les meilleurs et les plus agréables moments. Pour toute la complicité et l'entente qui nous unissent, pour toute l'ambiance dont vous m'avez entouré, pour tout votre élan chaleureux, Je vous dédie ce travail. Puisse Dieu le tout puissant exhausser tous vos vœux.

Ma Grande Famille Oncles, Tantes, Cousins, Cousines, et belle famille,

Je ne pourrais jamais exprimer l'amour que j'ai pour vous. Vos prières, vos encouragements et votre soutien m'ont toujours été d'un grand secours. Puisse Dieu, le tout puissant vous préserve du mal, vous comble de santé, de bonheur et vous procure une longue vie.

A **Ibtihal Amalou, Widad Cheddani, Farah Hably, Boudina Fatima Zahra, Yassine Boudallaa, Samira Hentour** et à l'âme de la défunte mais présente dans nos cœurs **Soukaina**, je ne pourrai exprimer toute l'amour et la gratitude que j'ai pour vous, je vous remercie infiniment, acceptez ce modeste travail de votre fidèle amie.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.

Remerciements :

« Merci au bon DIEU de m’ avoir aidé à être ce que je suis aujourd’hui »

A l’ occasion de mon projet de thèse doctorale, j’ adresse d’ abord mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m’ ont apporté leur aide et qui ont contribué, de près ou de loin, à l’ élaboration de ce travail.

Mes remerciements s’ adressent à :

Madame la Présidente de l’ Université Hassan 1^{er} Madame **Khadija Essafi** et Monsieur le Doyen de la Faculté des Sciences et Techniques de Settat Monsieur **Jamal Naja** de m’ avoir permis d’ intégrer le cycle doctoral, ainsi que d’ achever ce travail dans les meilleures conditions.

Professeur **Khadija Boukachabine**, Directrice de la présente thèse, de m’ avoir proposée ce sujet de thèse, reflétant ma Formation Universitaire dans le domaine de l’ Environnement et de m’ avoir dirigée tout au long de la réalisation de ce projet. Merci chère professeur pour votre confiance, votre disponibilité, votre encouragement et votre générosité en partageant vos idées et recommandations.

Professeur **bouchra Ababou**, ma Co-encadrante qui s’ est toujours montrée à l’ écoute, pour son inspiration, son aide et le temps qu’ elle a toujours bien voulu me consacrer.

Docteur **Fatima Gaboune**, Ingénieur, Chercheur chargée de Bioinformatique/Biométrie. Unité de Recherche en Biotechnologie Institut National de la Recherche Agronomique (CRR- INRA-Maroc) pour sa valeur ajoutée en domaine des statistiques et pour l’ intérêt particulier accordée à mes recherches. Que cette thèse témoigne mes vifs remerciements et mes respects les plus sincères.

Docteur **Abdelmajid Zouahri**, Ingénieur, Chercheur en Biotechnologie, Institut National de la Recherche Agronomique (CRR- INRA-Maroc) pour sa générosité à effectuer la plupart des dosages au sein de son Unité de Recherche. Que cette thèse témoigne mes vifs remerciements.

Monsieur **Younes El Goumi**, pour son aide au niveau de l’ analyse statistique de l’ article 1.

Professeur **Namira El Amrani**, pour ses précieux conseils dans la localisation géographique des points de prélèvement sur la carte.

Monsieur **Abderrazak Bassir**, Etudiant en M2 du Master *Sciences Appliquées à l’ Environnement* pour sa précieuse aide au niveau de la réalisation de la carte de la zone d’ étude.

Membres du Jury, **M. Abderraouf EL ANTARI**, **M. ENNAJI Moulay Mustapha**, **Mme Hafsa HOUMAIRI** et **Mme Naima EL GHACHTOULI** d’ avoir accepté de juger et d’ être parmi les membres du Jury à ma thèse. Qu’ ils trouvent ici l’ expression de ma gratitude.

Enfin, je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Directeur du CDOC ainsi qu’ à l’ ensemble du personnel Enseignant et Administratif de la Faculté et de l’ université Hassan 1^{er} pour leur accueil et leur collaboration.

Résumé

L'utilisation intensive et abusive des ressources associée au rejet excessif et continu des déchets contribuent à détériorer notre environnement. La pollution par les métaux lourds constitue un risque de préoccupation prioritaire de par leur accumulation et leur transfert qui affectent la chaîne alimentaire et le milieu naturel dans son ensemble, dont spécialement le sol, qui constitue un écosystème complexe abritant de nombreux organismes biologiques. Les sols de la région de Settat sont majoritairement irrigués par les eaux de l'Oued Boumoussa, chargées de polluant métalliques, dont le Plomb et le Cuivre et provenant majoritairement des rejets industriels.

L'objectif de bioremédiation présenté dans ce travail a été d'isoler des champignons telluriques saprotrophes de sols pollués par ces métaux et d'étudier leur éventuelle capacité de bioremédiation vis-à-vis du Pb et du Cu. Des échantillons de sol sont prélevés au niveau de quatre points (A, B, C et D), choisis en fonction de leur distance par rapport à la zone industrielle. Une analyse physico-chimique des échantillons de sol prélevé a été effectuée pour caractériser le milieu naturel des souches fongiques préexistantes. La biodiversité fongique a été déterminée pour chaque échantillon de sol après isolement et identification des souches. Un criblage des isolats fongiques est effectué sur la capacité de bioaccumulation de leur biomasse vivante et la capacité de biosorption de la biomasse morte à différentes concentrations testées de Pb et de Cu. L'évaluation d'une éventuelle capacité de bioremédiation a été déduite par la biomasse fongique vivante des isolats qui ont montré un pouvoir d'accumulation et de biosorption du Plomb (Pb) et/ou du Cuivre (Cu). Les teneurs en Pb et en Cu retrouvées dans les échantillons de sol étudiés sont supérieures aux limites autorisées, soit 27 ppm pour le Pb et 38.90 ppm pour le Cu.

L'évaluation de la biodiversité a indiqué la présence de 102 isolats, dont 68 champignons filamenteux appartenant principalement aux Genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Rhizomucor* et 34 isolats de levures, dont *Rhodotorula*, *Candida*, *Cryptococcus*, et *Trichosporon*. L'évaluation qualitative de l'accumulation sur milieu solide a révélé que 10 isolats de champignons filamenteux et 12 isolats de levure avaient un potentiel de bioaccumulation de ces deux métaux étudiés. Tandis que l'évaluation quantitative sur milieu liquide a montré une capacité de bioaccumulation variable selon les isolats ; La meilleure capacité par point d'échantillonnage est enregistrée à 200 ppm de Pb et de Cu pendant 72h de contact chez *Aspergillus niger*, *Acremonium sp.* et *Rhodotorula glutinis* en provenance du sol correspondant au point A. *Penicillium simplicissimum*, *Acremonium sp.* et *Rhodotorula glutinis* proviennent du sol du point B ; *Aspergillus niger* et *Candida versatilis* du point C et *Aspergillus carbonarius* et *Rhodotorula glutinis* du point D. Ces mêmes isolats ont dévoilé le meilleur potentiel de biosorption à 200 ppm après 3h de contact.

Les isolats ayant démontré une bioremédiation importante sont essentiellement *Aspergillus niger* (A), (C), *Penicillium simplicissimum* (B), *Aspergillus carbonarius* (D), *Acremonium sp.* (A), (B), *Rhodotorula glutinis* (A), (B), (D) et *Candida versatilis* (D). Ces isolats fongiques identifiés par leur capacité de bioremédiation seraient des souches prometteuses pour réduire les fortes teneurs en Pb et en Cu retrouvés au niveau des sols pollués par ces deux métaux, avec moins d'apport de produits chimiques, d'énergie et de temps.

Mots clés : Métaux lourds, Accumulation, Biosorption, bioremédiation, champignons.

Abstract

The intensive and abusive use of resources associated with the excessive and continuous dumping of waste are highly contributing to the deterioration of our environment. Pollution by heavy metals, therefore, causes a risk of priority concern due to their accumulation and transfer which affects the food chain and the natural environment as well, especially the soil, which is a complex ecosystem sheltering many biological organisms. Soils of Settat region are mainly irrigated by Oued Boumoussa waters, charged with metallic pollutants, including Lead and Copper, mainly coming from industrial discharges.

The aim of this work, is to find saprotrophic telluric fungi, able to survive and bioremediate these polluted soils. For that aim, Soil samples are taken from four points (A, B, C and D), chosen according to their distance from the industrial area. A physico-chemical analysis of soil samples was carried out to characterize the natural environment of the pre-existing fungal strains. The fungal biodiversity was determined for each soil sample after isolation and identification of the strains. A screening of fungal isolates was done based on the capacity of bioaccumulation on solid medium and biosorption on liquid medium of the living fungal biomass of each isolate at different concentrations of Pb and Cu.

The evaluation of the possible bioremediation capacity was deduced from the dead fungal biomass of the isolates who showed an accumulation and biosorption capacity to Lead (Pb) and / or Copper (Cu). The Pb and Cu contents found in the soil samples are above the authorized limits (27 ppm for Pb and 38.90 ppm for Cu). The biodiversity assessment indicated the presence of 102 isolates, including 68 filamentous fungi mainly belonging to the Genus *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Rhizomucor* and 34 yeast isolates, including *Rhodotorula*, *Candida*, *Cryptococcus*, and *Trichosporon*. The qualitative assessment of the accumulation on solid medium revealed that 10 isolates of filamentous fungi and 12 isolates of yeast had a potential for bioaccumulation of these two metals. While the quantitative evaluation on liquid medium showed a variable bioaccumulation capacity according to the isolates; the best capacity by sampling points is recorded at 200 ppm of Pb and Cu during 72 hours of contact for *A.niger*, *Acremonium sp.* and *Rhodotorula glutinis* from the soil corresponding to point A. *Penicillium simplicissimum*, *Acremonium sp.* and *Rhodotorula glutinis* from soil of point B; *A.niger* and *Candida versatilis* from point C and *A.carbonarius* and *Rhodotorula glutinis* from point D.

The isolates who revealed significant bioremediation capacities are essentially *A.niger* (A), (C), *Penicillium simplicissimum* (B), *A. carbonarius* (D), *Acremonium sp.* (A), (B), *Rhodotorula glutinis* (A), (B), (D) and *Candida versatilis* (D). These fungal isolates known by their bioremediation capacity would be a suitable tool to reduce the high Pb and Cu contents found in soils polluted by these two metals, with less input of chemicals, energy and time.

Keywords: Heavy metals, Accumulation, Biosorption, bioremediation, fungi.

المخلص

يساهم الاستخدام المكثف والمسيء للموارد المرتبط بالإلقاء المفرط والمستمر للنفايات في تدهور بيئتنا. يشكل التلوث بالمعادن الثقيلة خطراً مجهداً بسبب تراكمها ونقلها مما يؤثر على السلسلة الغذائية والبيئة الطبيعية ككل، وخاصة التربة، التي تشكل نظاماً بيئياً معقداً يحمي العديد من الكائنات البيولوجية. تُروى تربة منطقة سطات بشكل رئيسي بمياه وادي بوموسى، وهي مشحونة بالملوثات المعدنية، بما في ذلك الرصاص والنحاس والتي تأتي بشكل رئيسي من مياه الصرف الصناعية.

إن الهدف من هذا العمل هو إيجاد فطريات قادرة على معالجة هذه التربة الملوثة. تؤخذ عينات التربة على مستوى أربع نقاط (أ، ب، ج، د)، يتم اختيارهم حسب بعدهم عن المنطقة الصناعية. تم بعد ذلك إجراء التحليل الفيزيائي والكيميائي لعينات التربة المأخوذة للتعرف على البيئة الطبيعية للسلاسل الفطرية الموجودة. تم تحديد التنوع الحيوي الفطري لكل عينة تربة بعد عزل وتحديد كل منها. استند فحص العزلات الفطرية إلى قدرة التراكم الأحيائي لكتلتهم الحيوية الحية وقدرة الامتصاص الحيوي للكتلة الحيوية الميتة بتركيزات مختلفة من الرصاص والنحاس. تم استنتاج قدرة المعالجة الحيوية المحتملة من الكتلة الحيوية الفطرية الحية والتي أظهرت تراكم وقوة امتصاص حيوي للرصاص (Pb) و / أو النحاس (Cu).

محتوى الرصاص والنحاس الموجود في عينات التربة التي تمت دراستها، أعلى من الحدود المسموح بها (27 جزء في المليون للرصاص و38.90 جزء في المليون للنحاس). أشار تقييم التنوع البيولوجي إلى وجود 102 عزلة، بما في ذلك 68 فطريات خيطية تنتمي بشكل رئيسي إلى جنس *Aspergillus* و *Rhizomucor* و *Acremonium* و *Penicillium* و 34 عزلة خميرية، تنتمي إلى جنس *Rhodotorula* و *Candida* و *Cryptococcus* و *Trichosporon*. كشف التقييم النوعي للتراكم على وسط صلب أن 10 عزلات من الفطريات الخيطية و12 عزلة من الخميرة لديها احتمالية للتراكم الأحيائي لهذين المعدنين المدروسين. بينما أظهر التقييم الكمي للوسط السائل قدرة تراكم حيوي متغيرة حسب العزلات. يتم تسجيل أفضل سعة لكل نقطة أخذ عينات عند 200 جزء في المليون من Pb و Cu خلال 72 ساعة من التلامس عند *Aspergillus niger* , *Acremonium sp* و *Rhodotorula glutinis* من التربة الموافقة للنقطة أ- ثم *Penicillium simplicissimum*، *Acremonium sp* و *Rhodotorula glutinis* من النقطة ب-؛ ثم *Aspergillus niger* و *Candida versatilis* من النقطة ج- و *Aspergillus carbonarius* و *Rhodotorula glutinis* من النقطة د-.

العزلات التي أظهرت معالجة بيولوجية كبيرة هي في الأساس السلالات (أ) و (ج) *Aspergillus.niger* ، (ب) *Penicillium simplicissimum* ، (د) *Aspergillus carbonarius* ، (هـ) و (و) *Acremonium sp* ، (ز) و (ح) و (ط) و (ي) *Rhodotorula glutinis* و *Candida versatilis*. هذه العزلات الفطرية التي تم تحديدها من خلال قدرتها على المعالجة الحيوية ستكون أداة مناسبة لتقليل المحتوى العالي للرصاص والنحاس الموجود في التربة الملوثة، مع ادخار أقل للمواد الكيميائية والطاقة والوقت أيضاً.

المفتاح: المعادن الثقيلة، التراكم، الامتصاص البيولوجي، المعالجة الحيوية، الفطريات.

Table des matières

Introduction Générale	1
Synthèse bibliographique.....	3
I. Sol, Pollution et Dépollution.....	4
II. Propriétés physiques des sols.....	7
1- Structure.....	7
2- Texture.....	7
III. Propriétés chimiques.....	8
1- PH.....	8
2- Capacité d'échange cationique.....	8
3- Le Potentiel Redox.....	9
IV. Pollution des sols par les métaux lourds.....	10
1- Origine de la contamination des sols par les métaux lourds.....	11
2- Dangers de pollution en métaux lourds.....	13
3- Formes des éléments métalliques dans la matrice du sol.....	13
4- Paramètres influençant la mobilité et la biodisponibilité des métaux lourds.....	16
4-1- La teneur en argile.....	16
4-2- Le PH.....	17
4-3- Le potentiel redox.....	17
4-4- L'activité biologique.....	17
4-5- La matière organique.....	18
5- Pollution par le Plomb (Pb) et le cuivre (Cu).....	19
5-1- Cas du Plomb.....	19
5-2- Cas du Cuivre (Cu).....	22
6- Effet des métaux lourds sur les microorganismes du sol.....	25
6-1- Biomasse.....	27
6-2- Tolérance.....	27
6-3- Structure génétique et fonctionnelle de la communauté microbienne.....	28
6-4- Activité enzymatique.....	29
7- Chiffres et réglementations.....	29
8- Les mécanismes de réponse au stress métallique.....	30
9- Les méthodes de dépollution.....	31
9-1- Dépollution classique.....	31

9-2- Dépollution biologique	32
Présentation de la Région Casablanca - Settat	38
I. Espace régional Casablanca-Settat.....	39
1- Cadre administratif.....	39
2- Cadre géographique général.....	39
3- Climat et précipitations	41
4- Ressources hydrographiques.....	41
4-1- Les eaux de surface	41
4-2- Les eaux souterraines	42
II. Présentation du milieu d'étude : Ville de Settat.....	43
1- Situation géographique	43
2- Situation géologique	44
3- Stratigraphie.....	44
4- Climatologie.....	45
4-1- Précipitation	45
4-2- Température	45
4-3- Evapotranspiration	46
5- Pédologie	46
6- Hydrologie	46
6-1- Les eaux de surface	47
6-2- Les eaux souterraines	47
7- Activité agricole.....	47
8- Activité industrielle.....	48
Matériel et Méthodes	50
I. Matériel d'étude.....	51
1- Localisation des points de prélèvement	51
2- Echantillons des sols	53
3- Métaux étudiés	53
4- Milieux de culture	53
II. Méthodes d'étude.....	54
1- Mesure de certains paramètres physico-chimiques des sols	54
1-1- PH	54
1-2- Température	54
1-3- Humidité	54
2- Analyse des teneurs en Pb et en Cu au niveau des sols	55
2-1- Prétraitement des échantillons de sol	55

2-2-	Dosage par ICP-AES (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry)	55
3-	Isolement et Purification des isolats fongiques.....	55
4-	Identification et conservation des isolats	56
5-	Tolérance au Pb et au Cu	56
5-1-	Mise en culture des isolats conservés.....	56
5-2-	Evaluation de la tolérance.....	57
5-3-	Calcul de l'indice de tolérance.....	57
6-	Capacité de bioaccumulation	58
6-1-	Evaluation qualitative de l'accumulation.....	58
6-2-	Evaluation quantitative de l'accumulation.....	58
7-	Test de Biosorption.....	59
7-1-	Préparation de la biomasse sèche.....	59
7-2-	Biosorption.....	59
8-	Test de Bioremédiation	60
9-	Analyse statistique	60
	Résultats et Discussion	61
I.	Analyse des teneurs en Plomb et en Cuivre au niveau des sols	62
II.	Mesure de certains paramètres physico-chimiques.....	63
III.	Biodiversité fongique des sols	64
IV.	Screening des isolats	66
V.	Evaluation de la Tolérance.....	68
1-	Tolérance des champignons filamenteux.....	68
2-	Tolérance des levures.....	72
VI.	Evaluation quantitative de l'accumulation.....	74
1-	Bioaccumulation des champignons filamenteux.....	74
1-1-	Effet de la bioaccumulation du Pb à différentes concentrations par les isolats filamenteux	74
1-2-	Effet de la bioaccumulation du Cu à différentes concentrations par les isolats filamenteux	77
2-	Bioaccumulation des isolats de levure	78
2-1-	Effet de la bioaccumulation du Pb à différentes concentrations par les isolats de levure.....	78
2-2-	Effet de la bioaccumulation du Cu à différentes concentrations par les isolats de levure :	82
VII.	Test de Biosorption	87
1-	Biosorption des champignons filamenteux	87
1-1-	Effet de la biosorption du Pb à différentes concentrations par les isolats filamenteux.....	87
1-2-	Effet de la biosorption du Cu à différentes concentrations par les isolats filamenteux	90
2-	Biosorption des isolats de levure	91
2-1-	Effet de la biosorption du Pb à différentes concentrations par les isolats de levure	91

2-2- Effet de la biosorption du Cu à différentes concentrations par les isolats levure	95
VIII. Test de bioremédiation.....	101
Conclusion et Perspectives	105
Annexes	i
Annexe 1 : Moyennes de l'accumulation du Pb et de Cu par les filamenteux.....	ii
Annexe 2 : Moyennes de l'accumulation du Pb par les levures	iii
Annexe 3 : Moyennes de l'accumulation du Cu par les levures	iv
Annexe 4 : Moyennes de la biosorption du Pb et de Cu par les filamenteux.....	v
Annexe 5 : Moyennes de la biosorption du Pb par les levures	vi
Annexe 6 : Moyennes de la biosorption du Cu par les levures	vii
Annexe 7 : Moyennes de la bioremédiation.....	viii
Annexe 8 : Milieux de culture	ix
Annexe 9 : Analyse par ICP- AES.....	xiii

Liste des Figures

Figure 1. Carte du monde de l'état des sols dégradés par l'activité humaine (Eswaran <i>et al.</i> , 2001).....	9
Figure 2. Origine des métaux lourds dans le sol (Singh <i>et al.</i> , 2003)	11
Figure 3. Disponibilité des éléments trace métalliques (ETM) dans le sol (Luo <i>et al.</i> , 2006).....	14
Figure 4. a) Dépôts de Pb dans l'épiphyse du poignet, b) œdème cérébral (Goyer et Clarkson, 2001)	22
Figure 5. Provinces et préfectures de la région Casablanca-Settat (Ministère de l'Urbanisme et de l'Aménagement du Territoire).	39
Figure 6. Types de sols de la région (Haut-Commissariat aux Eaux et Forêts et à la Lutte contre la Désertification, 2013)	40
Figure 7. Pluviométries moyennes annuelles de la région (Office National de l'Electricité et de l'Eau Potable, 2013)	41
Figure 8. Ressources en eaux de la région (Office National de l'Electricité et de l'Eau Potable, 2013).....	42
Figure 9. Colonne stratigraphique des formations géologiques du plateau de Settat (O.N.E.P,2005)	44
Figure 10. Localisation géographique des points de prélèvement	51
Figure 11. Iconographies des lieux relatifs aux points de prélèvement	52
Figure 12. Teneurs en ppm du Pb et du Cu retrouvées dans les sols étudiés	62
Figure 13. Colonies fongiques obtenues à différentes dilutions du sol du point A sur milieu RBA	64
Figure 14. (a et c : filamenteux, b et d : levure) : Zone claire montrant l'absence de métal autour de la colonie, les figures c et d des figures témoin avec aucune zone claire apparente	66
Figure 15. Variation de l'IT des 4 isolats d' <i>A.niger</i> en fonction des concentrations de Pb.....	70
Figure 16. Indice de tolérance des trois isolats d' <i>A.carbonarius</i> en fonction des concentrations de Pb testées...	70
Figure 17. Variation de l'IT des deux isolats de <i>Penicillium sp.</i> en fonction des concentrations de Pb.....	70
Figure 18. Variation de l'IT de <i>Rhizomucor sp.</i> en fonction des concentrations de Pb	70
Figure 19. IT d' <i>Acremonium sp.</i> au Cu.....	72
Figure 20. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de bioaccumulation des quatre isolats d' <i>Aspergillus niger</i>	74
Figure 21. Effet du temps de contact et de sa concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de bioaccumulation des trois isolats d' <i>Aspergillus carbonarius</i>	75
Figure 22. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de bioaccumulation des deux isolats de <i>Penicillium sp.</i>	76
Figure 23. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de bioaccumulation de <i>Rhizomucor sp.</i>	76
Figure 24. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Cu (II) sur la capacité de bioaccumulation d' <i>Acremonium sp.</i>	77
Figure 25. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de bioaccumulation des deux isolats de <i>Cryptococcus albidus</i>	79
Figure 26. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de bioaccumulation des quatre isolats de <i>Candida bertae</i>	79
Figure 27. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de bioaccumulation de <i>Rhodotorula glutinis</i>	80
Figure 28. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de bioaccumulation des deux isolats de <i>Candida versatilis</i>	81
Figure 29. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de bioaccumulation de <i>Trichosporon ovoides</i>	81
Figure 30. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Cu (II) sur la capacité de bioaccumulation de Cu (II) pour les deux isolats de <i>Cryptococcus albidus</i>	82

Figure 31. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Cu (II) sur la capacité de bioaccumulation pour les quatre isolats de <i>Candida bertae</i>	83
Figure 32. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Cu (II) sur la capacité de bioaccumulation des trois isolats de <i>Rhodotorula glutinis</i>	84
Figure 33. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Cu (II) sur la capacité de bioaccumulation des deux isolats de <i>Candida versatilis</i>	84
Figure 34. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Cu (II) sur la capacité de bioaccumulation de <i>Trichosporon ovoides</i>	85
Figure 35. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de biosorption des quatre isolats d' <i>Aspergillus niger</i>	87
Figure 36. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de biosorption d' <i>Aspergillus carbonarius</i>	88
Figure 37. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de biosorption de <i>Penicillium sp.</i>	89
Figure 38. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de biosorption de <i>Rhizomucor sp.</i>	90
Figure 39. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Cu (II) sur la capacité de biosorption de <i>Acremonium sp.</i>	91
Figure 40. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de biosorption de <i>Cryptococcus albidus</i>	92
Figure 41. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de biosorption de <i>Candida bertae</i>	92
Figure 42. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de biosorption de <i>Rhodotorula glutinis</i>	93
Figure 43. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de biosorption de <i>Candida versatilis</i>	94
Figure 44. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de biosorption de <i>Trichosporon ovoides</i>	95
Figure 45. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Cu (II) sur la capacité de biosorption de <i>Cryptococcus albidus</i>	95
Figure 46. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Cu (II) sur la capacité de biosorption de <i>Candida bertae</i>	96
Figure 47. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Cu (II) sur la capacité de biosorption de Cu (II) pour <i>Rhodotorula glutinis</i>	97
Figure 48. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Cu (II) sur la capacité de biosorption de <i>Candida versatilis</i>	98
Figure 49. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Cu (II) sur la capacité de biosorption de <i>Trichosporon ovoides</i>	98
Figure 50. Valeurs de Pb et Cu retrouvées dans le sol avant et après la bioremédiation	102

Liste des Tableaux

Tableau I. Type et abondance des organismes vivants dans le sol (Calvet et Mariotti, 2003)	6
Tableau II. Contenu des roches en éléments en traces (ppm) (Kabata-pendias, 2011).....	12
Tableau III. Pollutions associées aux Métaux lourds et autres métalloïdes dérivés de l'activité humaine (O'Connell <i>et al.</i> , 2008)	12
Tableau IV. Valeurs seuils provisoires (ppm) retenues pour la définition de l'état chimique des eaux souterraines (Circulaire DCE 2006/18).....	29
Tableau V : Synthèse de certains travaux antérieurs réalisés	35
Tableau VI. Caractéristiques de la Zone Industrielle de Settât (RADEEC, 2009)	48
Tableau VII. Etat d'avancement du projet de dépollution industrielle dans la Zone Industrielle de Settât au 31/12/2018	49
Tableau VIII. Localisation des points étudiés.....	51
Tableau IX. Evaluation de la Tolérance (Valix et Loon, 2002).....	57
Tableau X .Paramètres physico-chimiques des sols étudiés : Moyennes des valeurs mesurées.....	63
Tableau XI. Nombre d'isolats par Genre fongiques et par point de prélèvement.....	65
Tableau XII. Espèces fongiques identifiées et potentiellement bioaccumulatrices du Pb et/ou du Cu	67
Tableau XIII. Tolérance des isolats fongiques à 1000 ppm de Pb et de Cu	69
Tableau XIV. Tolérance des isolats de levures à différentes concentrations de Pb et de Cu.....	73
Tableau XV. Classification des isolats en fonction de la meilleure capacité d'accumulation.....	85
Tableau XVI. Résultats des tests ANOVA pour les filamenteux et levure en contact avec le Pb et Cu en fonction de la concentration initiale et du temps de contact	86
Tableau XVII. Classification des isolats avec la meilleure capacité de biosorption en fonction des points	99
Tableau XVIII. Analyse de la variance (ANOVA).....	100
Tableau XIX. Isolats choisis pour la bioremédiation des sols pollués par Pb et Cu.....	101

Liste des abréviations

ANOVA : Analyse de la variance

CE : Conductivité électrique

CEC : Capacité d'échange cationique

Cu : Cuivre

Eh : Potentiel Redox

ICP-AES: Inductive coupled plasma - atomic emission spectrometry

IT : Indice de tolérance

MA: Malt Agar

MO : Matière organique

MYGP: Malt Yeast Glucose Peptone

Pb : Plomb

PDA: Potato Dextrose Agar

PH : Potentiel d'hydrogène

ppm : partie par million

RBA: Rose Bengal Agar

UFC : Unité formant colonie

ZI : zone industrielle

Introduction Générale

Les nouvelles politiques de gestion de l'Environnement au Maroc dans le cadre du plan Maroc vert et du développement durable, s'engagent à protéger l'environnement et éviter les risques sanitaires.

Les activités anthropiques sont la source de nombreux polluants disséminés dans l'environnement. Les éléments traces métalliques (ETM), incluant des métaux et des métalloïdes, font partie de ces polluants à risque de préoccupation prioritaire du fait qu'ils sont très toxiques et non dégradables. Leur rémanence dans l'environnement entraîne ainsi une toxicité chez les êtres vivants et perturbe le bon fonctionnement des écosystèmes. Les sols qui constituent des écosystèmes complexes abritant de nombreux organismes biologiques sont fortement impactés par les polluants métalliques dont les concentrations ont connu de fortes augmentations au cours du 20^{ème} siècle.

Les travaux de Majumdar *et al.* (2010) ; Farooq *et al.* (2010) et Siddiquee *et al.* (2015) se sont intéressés, à l'identification et à l'élimination des métaux de l'environnement. A cet effet, le recours souvent à l'adsorption sur des biomasses mortes ou vivantes, de par leur pouvoir dépolluant, s'avère très prometteur à étudier.

Dans le sol, les ETM se distribuent en fractions non labiles, potentiellement mobiles et immobiles. Ces fractions demeurent néanmoins fragiles quant à leurs équilibres dans le milieu du fait des processus physico-chimiques et biochimiques inhérents de la dynamique du sol (Pathak *et al.*, 2009).

Les eaux usées prétraitées de la zone industrielle de la ville de Settat sont déversées directement dans l'Oued Boumoussa, principale source d'irrigation des agriculteurs de la région.

Cette eau polluée en métaux lourds peut irréversiblement altérer la qualité du sol de la région et atteindre ainsi le bon fonctionnement des différentes chaînes alimentaires.

La nécessité de réduire les risques sanitaires de ces polluants dans les sols de la région de Settat, afin de trouver des solutions pour revaloriser ces sols agricoles pollués, impose l'utilisation de techniques peu coûteuses et adaptables à la région pour dépolluer ces sols.

Dans ce contexte de protection de l'environnement, la bioremédiation serait une solution alternative et efficace permettant de restaurer les structures et les fonctions de ces sols pollués par les métaux lourds.

Les sols agricoles irrigués par les eaux usées de la ville de Settat sont largement pollués par les métaux lourds, tels l'Arsenic, le Cadmium, le Zinc, le Plomb et le Cuivre (Kao, 2008). L'impact de ces eaux usées sur la qualité des eaux souterraines et sur la santé humaine de la population de la commune de Mzamza a été reporté par El Aslouj (2008).

La présente étude s'intéresse à différents sites irrigués par les eaux de l'Oued Boumoussa localisés à différentes distances de la zone industrielle.

L'objectif est de contribuer à biore médier des sols pollués notamment par le Plomb et le Cuivre retrouvés dans la région de Settat, par des champignons telluriques saprotrophes, dotés d'un potentiel de tolérance à ces deux métaux. Le choix de ces microorganismes a été dicté par l'absence d'études antérieures à l'échelle nationale, d'où cette approche innovante dans ce domaine.

Les travaux d'El Aslouj *et al.* (2007) et de Matech *et al.* (2014) ont montré d'importantes concentrations de Plomb et de Cuivre respectivement de 341.50 ppm et 712.05 ppm dans les sols de la région de Settat, raison principale pour laquelle ces deux métaux sont choisis. Une analyse actuelle des sols est ainsi réalisée afin de déterminer les conditions physico-chimiques auxquelles les souches fongiques sont confrontées dans leur milieu naturel.

Un isolement suivi d'une identification des souches autochtones du sol de la région permet d'évaluer la biodiversité fongique de ce sol. Un criblage à travers différents tests de bioaccumulation et de biosorption sur milieu solide et liquide à différentes concentrations de Pb et de Cu est effectué suivi d'un test de biore médiation pour évaluer la performance épuratoire des isolats fongiques autochtones à l'égard de ces deux métaux.

Synthèse bibliographique

Sol, Pollution et Dépollution

Propriétés physiques des sols

Propriétés chimiques

Pollution des sols par les métaux lourds

I. Sol, Pollution et Dépollution

Les sols sont des systèmes multiphasiques complexes et hétérogènes, composés d'air, d'eau et de solides (sable, limon, argile, matière organique, nutriments, écosystèmes, etc.). En outre, les sols sont des médias ouverts et dynamiques, échangeant de la matière et de l'énergie avec l'atmosphère, la biosphère et l'hydrosphère (Sposito, 2000) et sont dotés d'une multitude de fonctions dont la liste varie selon les auteurs. Selon Nortcliff (2002), les sols doivent pouvoir accomplir cinq fonctions principales de base :

- ✓ Offrir un habitat physique, chimique et biologique pour les organismes vivants,
- ✓ Réguler les flux d'eau, le stockage et le recyclage des cycles des nutriments et d'autres éléments,
- ✓ Maintenir les activités et diversités biologiques pour subvenir à la croissance des plantes et la productivité des animaux,
- ✓ Filtrer, tamponner, transformer, immobiliser et détoxifier les substances organiques et inorganiques,
- ✓ Fournir un support mécanique aux organismes vivants et à leurs structures.

Ces fonctions sont déterminantes pour le fonctionnement du cycle biologique qui a un impact majeur sur le bien-être humain : les nutriments des sols jouent un rôle essentiel dans l'équilibre des écosystèmes qui sont eux-mêmes la base de services rendus à l'homme (production de nourriture, biens de confort et consommation, etc.) (Millenium ecosystem assessment, 2005).

Le sol peut être défini comme la couche supérieure de la croûte terrestre composée de particules minérales, de matière organique, d'eau, d'air et d'organismes. Le sol est donc un système hétérogène et complexe. Il est composé d'une phase solide représentée par les particules du sol, une phase liquide représentée par l'eau du sol (qui peut être enrichie en de nombreux composés et particules) et une phase gazeuse constituée par l'air emprisonné dans le sol. Ceci permet de déterminer un domaine non saturé et un domaine saturé. La zone non saturée constitue une interface entre l'atmosphère et l'hydrosphère. Dans cette partie, les pores du sol ne sont que partiellement remplis par l'eau et le gaz y prédomine. La zone saturée est une zone où l'ensemble des pores est rempli d'eau.

Les phases solides, liquides et gazeuses varient d'un type de sol à un autre, mais aussi au cours du temps et des épisodes climatiques. La phase solide est constituée d'une fraction minérale dont les fragments de roches et grains minéraux dépendent en taille et en nature du type et du niveau d'altération de la roche mère et d'une fraction organique minoritaire régulièrement renouvelée. L'arrangement de cette phase solide ménage des pores, lesquels seront occupés soit par la solution du sol (eau et substances dissoutes), soit par une phase gazeuse (Calvet et Mariotti, 2003).

La fraction minérale se divise en fonction de la taille des composants :

- Ceux de taille supérieure à 2mm (pierres, cailloux, graviers et autres) sont souvent considérés comme chimiquement peu réactifs bien que ceci puisse être modulé selon la composition minéralogique, l'état d'altération et les phénomènes de météorisation accélérée de ces éléments grossiers (Calvet et Mariotti, 2003). Par contre, ces éléments conditionnent différents phénomènes comme le drainage, la germination, la levée des plantules ou l'enracinement des végétaux (Calvet et Mariotti, 2003).
- Quant aux composants minéraux inférieurs à 2 mm, ils englobent les sables (taille entre 2 mm et 50 μ m), les limons (2 μ m < taille < 50 μ m) et les argiles (taille < 2 μ m) (Afnor, 1996). Les sables et limons ont aussi peu de charges électriques et une faible surface spécifique ; ce sont souvent des quartzs, des feldspaths ou des carbonates. Par contre, les argiles présentent une réactivité chimique importante du fait de leur structure, dont l'unité de base est un feuillet constitué par la superposition d'au moins deux couches tétraèdres de silicium ou d'octaèdres d'aluminium. Ces feuillets sont séparés par des espaces interfoliaires occupés par des cations secs ou hydratés et par de l'eau si les feuillets présentent une charge (Kvesitidze *et al.*, (2006). Les proportions relatives en sables, limons et argiles définissent la texture du sol, laquelle détermine certaines propriétés du sol. Les sables et les limons améliorent la porosité, qui se traduit par une augmentation de la perméabilité et les lieux aptes aux phénomènes de transport de différentes natures (eau, éléments dissous, gaz, chaleur), tandis que les argiles favorisent la rétention et l'échange des ions (Beylich *et al.*, 2010).

La fraction organique fait référence aux résidus des organismes accumulés dans le sol après la mort ainsi que les produits des transformations chimiques, physiques et biologiques de la matière organique. Parmi ces produits, l'humus correspond à la matière organique du sol décomposée et non identifiable à l'oeil par sa forme. Selon le procédé d'extraction utilisé, trois types de substances humiques peuvent être distingués dans l'humus : les humines (insolubles dans les alcalins et les acides), les acides humiques (solubles dans les alcalins et insolubles dans les acides) et les acides fulviques (solubles dans les alcalins et les acides) (Ramos *et al.*, 2005). Ces macromolécules de poids moléculaire élevé, portent une grande variété de groupements fonctionnels (carboxyles, hydroxyles, phénols) qui leur confère une capacité d'échange de cations supérieure à celle des argiles mais qui varie en fonction de l'acidité du milieu.

Les substances humiques améliorent la structure du sol en augmentant la stabilité des agrégats ce qui peut réduire les taux d'infiltration et les croûtes de battance accrue, éviter l'érosion accélérée due aux

eaux de ruissellement (Nardi *et al.*, 2002). De plus, les substances humiques stimulent la croissance des cellules végétales et le développement de la plante. Cet effet semble essentiellement s'exercer sur les fonctions de la membrane cellulaire, favorisant par exemple l'absorption des nutriments (Nardi *et al.*, 2002).

Les phases liquides et gazeuses du sol sont des indicateurs de sa fertilité physique. Leur proportion doit être équilibrée dans le sol : un stockage élevé de l'eau signifie souvent un stockage bas d'air et, en cas de saturation, entraîner une anoxie qui modifie les transformations chimiques et l'activité des organismes présents (Calvet et Mariotti 2003). Entre ces différentes phases, un équilibre entre les concentrations des composés qu'elles contiennent (composés organiques volatiles, CO₂, etc.) déterminera la capacité de leur diffusion (Calvet et Mariotti 2003). Les interactions des trois phases du sol (i.e. solides, liquides et gazeuses) donnent lieu à des nombreuses réactions chimiques essentielles aux processus naturels.

L'interphase solide-liquide est le lieu des réactions d'adsorption et de désorption, de précipitation et de dissolution. Ces réactions qui peuvent se produire simultanément ou indépendamment en fonction de l'hétérogénéité du sol et des conditions du milieu, influent la richesse de la solution de sol en éléments nutritifs (Calvet et Mariotti, 2003). Outre les réactions chimiques présentes entre les différentes phases du sol, de nombreux microorganismes sont hébergés et jouent un rôle fondamental dans la dynamique du sol (tableau I).

Tableau I. Type et abondance des organismes vivants dans le sol (Calvet et Mariotti, 2003)

	Nombre (N/g sol)	Biomasse (Kg/ha)
Bactéries	10 ⁶ -10 ¹⁰	300-3000
Actinomycètes	10 ⁵ -10 ⁷	50-500
Champignons	10 ⁴ -10 ⁶	500-5000
Protozoaires	10 ⁴ -10 ⁵	7-20
Algues	10 ³ -10 ⁵	50-200
Faunes	10 ³ -10 ⁴	500-2000 (vers de terre)

La microflore peut représenter une à quelques tonnes de matière sèche par ha de terrain.

La fraction biologique du sol doit donc être associée aux propriétés physicochimiques afin de déterminer la qualité du sol (Ritz *et al.*, 2009). Cependant, les propriétés biologiques ont reçu moins d'attention, car leurs effets sont difficiles à mesurer, à prévoir ou à quantifier (Breure *et al.*, 2005). Les

organismes tels les mycètes, les bactéries, les vers de terre et les végétaux sont les responsables du travail du sol ainsi que de sa fertilisation (Naidu, 2008). La plupart des services écosystémiques fournis par les sols dépendent souvent des organismes qui y habitent. Ils contribuent à la redistribution de la matière organique et des nutriments. Pour leur part, les mycètes et les bactéries vont mettre à disposition, les nutriments contenus dans la matière organique (e.g. N, P, S, éléments en trace), les minéraux (e.g. K, Mg, Ca, Fe) ou les composés gazeux (e.g. fixation du N). Les bactéries et les mycètes sont les organismes les plus présents dans le sol et chaque espèce joue un rôle particulier.

II. Propriétés physiques des sols

1- Structure

La stabilité structurale dépend de la teneur en argile et de la matière organique des sols. Le complexe argilo humique joue un rôle structural, qui est plus au moins important selon les teneurs en eau du sol et varie en fonction du type d'argile. La matière organique augmente la stabilité des agrégats. Une mauvaise structure peut donc empêcher l'écoulement des eaux dans le sol, les échanges gazeux entre le sol et l'atmosphère. Une bonne structure va assurer une grande facilité de circulation d'eau, donc laisse s'écouler l'excès, assure une bonne aération des racines, une bonne germination, une pénétration profonde des racines et une bonne exploration par les racines des ressources nutritives du sol (Soltner, 2000).

2- Texture

Elle est à la base de la majorité des autres propriétés, qui traduit la composition granulométrique de la terre fine (Gobat *et al.*, 2010).

La texture constitue donc un caractère fondamental du sol, car elle influe sur :

- La perméabilité du sol à l'eau et à l'air,
- La perméabilité est indépendante du taux de la matière organique. Le critère retenu pour mesurer la perméabilité est la vitesse de percolation de l'eau exprimée en cm³ /heures. Le taux élevé de la

matière organique n'implique pas forcément une bonne perméabilité (Preetha *et al.*, 2005). Cependant, son degré de décomposition a une influence sur cette dernière ; plus la matière organique est décomposée, plus la perméabilité est faible et vice-versa,

- La rétention de l'eau sous forme de vapeur ou de liquide, l'eau occupe environ un quart du volume d'un sol, quand ce dernier est saturé, l'eau qui percole à travers une tranche du sol le fait sous l'influence de la gravité (Koller, 2004). La teneur en air est complémentaire de la teneur en eau, puisque ces deux fluides se partagent l'espace poreux.

III. Propriétés chimiques

Plusieurs facteurs peuvent influencer favorablement ou défavorablement la bioremédiation.

1- PH

Il permet d'approfondir les modalités d'interactions entre les ions et les surfaces absorbantes du sol (Calvet et Mariotti, 2003).

2- Capacité d'échange cationique

Les cations (Li^+ , Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+}) (Baize, 2004) sont liés aux feuillets d'argile par des forces de nature électrostatique et possèdent la propriété d'être échangeables. Par ordre de capacité de remplacement croissante, les ions se classent comme suit (Wakim, 2005) :



L'utilisation inadaptée des terres et les pratiques inappropriées de gestion peuvent entraîner la dégradation des sols et de leurs fonctions (Figure 1), parfois amplifiée par les phénomènes naturels (facteurs topographiques, climatiques, etc.) (Ballayan, 2000 ; Eswaran *et al.*, 2001).

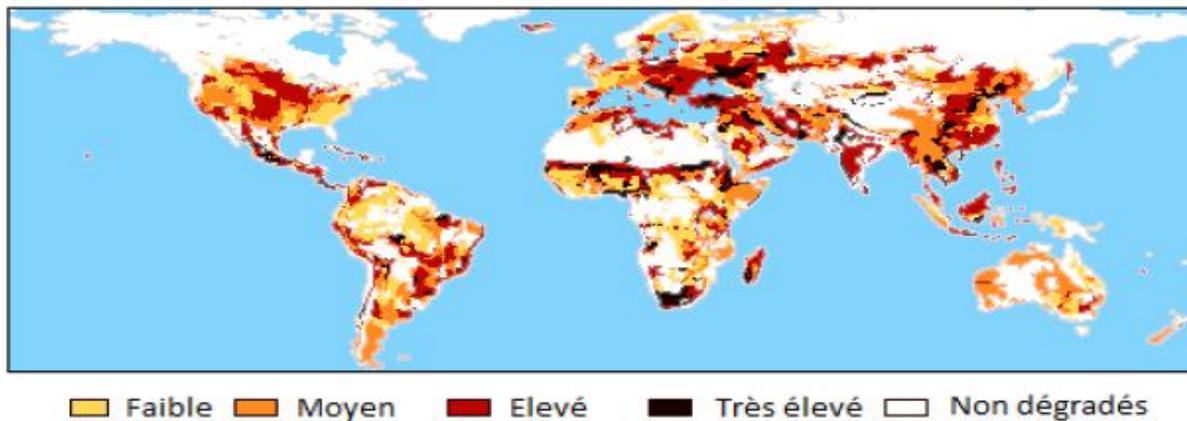


Figure 1. Carte du monde de l'état des sols dégradés par l'activité humaine (Eswaran *et al.*, 2001)

La détérioration chimique du sol (i.e. perte des nutriments, salinisation, pollution et acidification) couvre environ 239 Mha au niveau mondial, soit 12% de la superficie totale affectée par la dégradation des sols d'origine anthropique. Environ 18,6 Mha des terres sont détériorées par une dégradation chimique de type *Pollution* (accumulation des déchets industriels ou urbains, utilisation excessive de pesticides, acidification par les polluants atmosphériques, fumure excessive...) parmi lesquelles 4,1 Mha présentent un degré léger de dégradation, 14,3 Mha un degré modéré, 0,1 Mha sont fortement dégradées (Fagiewicz, 2011). Ces altérations réduisent la productivité et les fonctions originelles du sol et requièrent parfois une intervention pour restaurer le terrain.

Le projet GLASOD (Global Assessment of Soil Degradation) proposé par le Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE) identifie cinq différentes causes d'intervention physique humaine entraînant la dégradation des sols :

- La déforestation et la suppression de la végétation naturelle,
- Le surpâturage de la végétation ou le surpâturage de la végétation par le bétail,
- Les activités agricoles, soit une mauvaise gestion des terres agricoles,
- La surexploitation de la couverture végétale pour l'usage domestique, et
- Des activités (bio)industrielles menant à la pollution chimique (Fagiewicz, 2011).

3- Le Potentiel Redox

Lorsqu'un corps oxyde un autre corps, il est lui-même réduit et inversement. Ces transformations ont lieu par suite du transfert d'électrons (Fagiewicz, 2011).



Cette réaction peut s'appliquer au passage de deux ions de valence différente (fer ferrique ou fer ferreux) ou bien au passage de l'hydrogène moléculaire à la forme ionique.



Par analogie avec la notation PH, $r\text{H}_2$ est l'inverse du logarithme de la pression de l'hydrogène moléculaire.

$$r\text{H}_2 = \log 1/[\text{H}_2] \quad (3)$$

Les valeurs de $r\text{H}_2$ se situent entre 0 (la pression de l'hydrogène est égale à 1 atmosphère) qui correspond à la réduction la plus forte et 40 où la pression de l'hydrogène est extrêmement faible et celle de l'oxygène très forte). La valeur 27 correspond à l'équilibre entre l'oxydation et la réduction. La mesure du potentiel de redox a été appliquée essentiellement à l'étude des sols hydromorphes. Différents auteurs ont constaté que le pseudogley correspond à un $r\text{H}_2$ de 25 environ, un gley à $r\text{H}_2$ de 20 et moins. Il est toujours bon de considérer ensemble les conditions de PH et $r\text{H}_2$. L'apport d'électrons nécessaires pour effectuer les réductions peut être beaucoup plus faible en milieu acide qu'en milieu neutre. C'est ce que l'on observe dans le cas du fer, du manganèse, du soufre, etc. Les phénomènes de réduction les plus intenses se manifestent plus facilement dans les sols les plus acides. Dans les rizières, un certain degré de réduction doit être atteint pour un bon développement des plantes, mais un excès de fer ferreux est toxique (Fagiewicz, 2011).

IV. Pollution des sols par les métaux lourds

D'un point de vue purement chimique, les éléments de la classification périodique formant des cations en solution sont des métaux. D'un point de vue physique, le terme *Métaux lourds* désigne les éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes (environ 65 éléments), caractérisés par une forte masse volumique supérieure à 5 g.cm^{-3} (Adriano, 2004).

Au niveau biologique, deux types sont distingués en fonction de leurs effets physiologiques et toxiques, les métaux essentiels et les métaux toxiques. Les métaux essentiels sont des éléments indispensables à l'état de trace pour de nombreux processus cellulaires et qui se trouvent en proportion très faible dans les tissus biologiques (Adriano, 2004). Certains peuvent devenir toxiques lorsque la concentration dépasse un certain seuil, tel le cas du cuivre (Cu), du nickel (Ni), du zinc (Zn), du fer (Fe).

Les métaux toxiques, tels le plomb (Pb), le mercure (Hg) et le cadmium (Cd), ont un caractère polluant avec des effets toxiques pour les organismes vivants même à faible concentration. Ils n'ont aucun effet bénéfique connu pour la cellule (Adriano, 2004). Le terme *Métaux lourds* ou *Heavy Metal*, implique aussi une notion de toxicité. Le terme *Eléments Traces Métalliques* (ETM) est aussi utilisé pour décrire ces mêmes éléments, car ils se retrouvent souvent en très faible quantité dans

l'environnement. Le terme *Métaux lourds* est souvent utilisé, dans le sens de l'impact toxique sur les humains et les environnements.

1- Origine de la contamination des sols par les métaux lourds

Le problème principal avec les métaux lourds comme le plomb, le cadmium, le cuivre et le mercure est qu'ils ne peuvent pas être biodégradés, et donc persistent pendant de longues périodes dans les sols (Singh *et al.*, 2003). Leur présence dans les sols peut être naturelle ou anthropogénique (Figure 2).

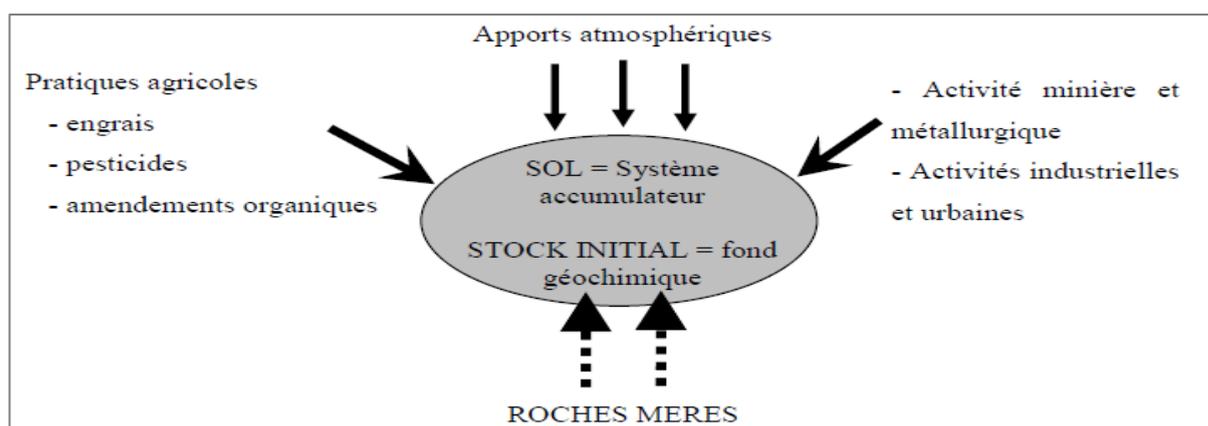


Figure 2. Origine des métaux lourds dans le sol (Singh *et al.*, 2003)

Les métaux lourds sont présents naturellement dans les roches, ils sont libérés lors de l'altération de celles-ci pour constituer le fond géochimique (Singh *et al.*, 2003). La concentration naturelle de ces métaux lourds dans les sols varie selon la nature de la roche, sa localisation et son âge.

L'apport anthropique des métaux lourds au sol dans le monde s'est étendu ; 22 000 tonnes de cadmium, 939 000 t de cuivre, 783 000 t de plomb et 1350 000 t de zinc (Singh *et al.*, 2003). Les principaux types de pollutions anthropiques responsables de l'augmentation des flux de métaux, sont la pollution atmosphérique (rejets urbains et industriels), la pollution liée aux activités agricoles et la pollution industrielle.

Certaines pratiques agricoles sont à l'origine de l'introduction de métaux lourds dans le sol. Les produits destinés à améliorer les propriétés physico-chimiques du sol sont souvent plus riches en métaux lourds que le sol lui-même par exemple les engrais, les composts et les boues de station d'épuration (Singh *et al.*, 2003).

La pollution industrielle provenant des usines de production de l'activité humaine tels que les matières organiques et graisses (industries agro-alimentaires), les produits chimiques divers (industries chimiques), les matières radioactives (centrales nucléaires, traitement des déchets radioactifs) et la métallurgie (Singh *et al.*, 2003). Les déchets miniers et les terrils industriels sont une source particulièrement importante de pollution par le zinc, le plomb et le cadmium.

Le rôle des pratiques industrielles et agricoles dans la contamination des sols doit être pris en compte. Leur accumulation et leur transfert constituent donc un risque pour la santé humaine via la contamination de la chaîne alimentaire, mais aussi pour le milieu naturel dans son ensemble (Singh *et al.*, 2003).

Les métaux lourds sont des éléments minéraux réputés toxiques, naturellement présents dans les sols et les roches en faibles concentrations (fond géochimique) (Tableau II).

Tableau II. Contenu des roches en éléments en traces (ppm) (Kabata-pendias, 2011)

Éléments	Roches magmatiques			Roches sédimentaires		
	Roches basiques	Roches intermédiaires	Roches acides	Roches argileuses sableuses	Grès	Carbonates
Cd	0,13-0,22	0,13	0,09-0,20	0,22-0,30	0,05	0,035
Co	35-50	1,0-10	1-7	11-20	0,3-10	0,1-3,0
Cr	170-200	15-50	4-25	60-100	20-40	5-16
Cu	60-120	15-80	10-30	40	5-30	2-10
Hg	0,0x	0,0x	0,08	0,18-0,40	0,04-0,10	0,04-0,05
Mn	1200-2000	500-1200	350-600	500-850	100-500	200-1000
Mo	1,0-1,5	0,6-1,0	1-2	0,7-2,6	0,2-0,8	0,16-0,40
Ni	130-160	5-55	5-15	50-70	5-20	7-20
Pb	3-8	12-15	15-24	18-25	5-10	3-10
V	200-250	30-100	40-90	100-130	10-60	10-45
Zn	80-120	40-100	40-60	80-120	15-30	10-25

Or, les sociétés industrielles, grandes productrices et consommatrices de métaux, larguent dans l'environnement des quantités considérables de ces éléments toxiques, tels que Pb, Hg, Zn, Cd, Cu et Cr. Les principales sources de pollution anthropiques de ces métaux sont les activités industrielles, minières et agricoles mais aussi les quantités croissantes de déchets domestiques (Tableau III).

Tableau III. Pollutions associées aux Métaux lourds et autres métalloïdes dérivés de l'activité humaine (O'Connell *et al.*, 2008)

Industrie	ETM	Pollution résultante	Référence
Mines métallifères	Cd, Cu, Ni, Cr, Co, Zn	Drainage miniers acides, résidus, terrils	Babich <i>et al.</i> (1985), Aswathanarayana (2003)
Matériaux agricoles Fertilisant	Cd, Cr, Mo, Pb, U, V, Zn	Ruissellement, pollution des eaux superficielles et souterraines, bioaccumulation par les plantes	Nicholson <i>et al.</i> (2003) Otero <i>et al.</i> (2005)
Boues d'épuration engrais	Zn, Cu, Ni, Pb, Cd, Cr, As, Hg	Menace pour l'épandage des eaux souterraines et de surface	Nicholson <i>et al.</i> (2003) Cheung and Wong (1983) Walter <i>et al.</i> (2006)
Industries métallurgiques Spécialiste d'alliages et de l'acier	Pb, Mo, Ni, Cu, Cd, As, Te, U, Zn	Fabrication, l'élimination et le recyclage des métaux. Terrils de résidus miniers et des scories	Alloway and Ayres (1993) Rule <i>et al.</i> (2006) Cheng (2003)
Elimination des déchets Lixiviats de décharge	Zn, Xu, Cd, Pb, Ni, Cr, Hg	Lixiviats de décharge, pollution des eaux souterraines et de surface	Kjeldson <i>et al.</i> (2002) Fernandez <i>et al.</i> (2005)
Electronique	Pb, Cd, Hg, Pt, Au, Cr, As, Ni, Mn	Aqueux et des déchets solides métalliques provenant de la fabrication et le recyclage de processus	Veglio <i>et al.</i> (2003)
Industrie des métaux de finition Galvanoplastie	Cr, Ni, Zn, Cu	Les effluents liquides des processus de placage	Castelblanque and Salimbeni (2004) Zhao <i>et al.</i> (1999) Alvarez-Aynuso <i>et al.</i> (2003)
Sources diverses Batteries	Pb, Sb, Zn, Cd, Ni, Hg	Déchets de liquide de batterie, pollution des sols et des eaux souterraines	EU Directorate general of the Environment (2004)
Peintures et pigments	Pb, Cr, As, Ti, Ba, Zn	Déchets aqueux provenant de la manufacture, détérioration de la peinture ancienne et pollution du sol	Davis and Burns (1999) Barnes and Davis (1996) Monken (2000)

Les industries métallurgiques sont des sources importantes de retombées atmosphériques qui contaminent les sols aux alentours, ainsi que les nombreux sites de stockage de déchets et les sols de friches industrielles fortement concentrés en polluants métalliques.

Les activités minières, bien que ponctuelles, sont aussi à l'origine de fortes teneurs en métaux dans les sols et dans ce cas le risque de dissémination dans l'environnement est lié au phénomène de drainage minier. Les apports d'origine agricole sont une troisième source de contamination des sols en métaux lourds ; les amendements organiques, les engrais phosphatés et les pesticides contiennent de grandes quantités de métaux qui s'accumulent dans les sols cultivés. Tous les déchets issus de la consommation et de la vie urbaine (gaz d'échappement, boues de stations d'épuration, composts, effluents et déchets divers) complètent la liste des apports en métaux d'origine anthropique.

2- Dangers de pollution en métaux lourds

L'accumulation des métaux dans l'environnement amène ainsi à la perturbation du fonctionnement des écosystèmes naturels mais aussi des agrosystèmes. Des teneurs élevées en métaux dans les sols agricoles réduisent les rendements des cultures, ce qui est problématique face à la demande alimentaire croissante de la population mondiale. Par ailleurs, les métaux d'origine anthropique tendent à s'accumuler dans les horizons de surface et sont relativement mobiles, ils peuvent facilement être absorbés par les végétaux qui constituent le premier maillon de la chaîne alimentaire. La pollution des sols est ainsi le point de départ de la contamination des réseaux trophiques. De plus, la mobilité des métaux dans les sols et leur lixiviation peut entraîner une contamination des eaux de surfaces et des nappes phréatiques posant de sérieux problèmes sanitaires où l'eau devient une ressource rare et disputée. D'autre part, contrairement aux molécules organiques, les métaux ne sont pas dégradables et restent donc présents durablement dans l'environnement. Associé à l'aspect non renouvelable de la ressource sol, ce caractère rémanent des ETM renforce leur dangerosité (O'Connell *et al.*, 2008).

3- Formes des éléments métalliques dans la matrice du sol

La teneur totale en métaux permet de définir l'étendue du métal et le niveau de pollution du sol, mais elle ne donne pas l'information nécessaire pour déterminer la mobilité, la biodisponibilité et finalement l'impact des éléments dans l'écosystème (Michalke, 2003). En effet, à la différence des polluants organiques, les métaux ne sont pas minéralisés ou dégradés pour devenir des composés moins complexes. Cependant, leur spéciation chimique, leur fractionnement et leur partition entre les phases aqueuse, solide ou gazeuse, complexés à la matière organique dans le sol peuvent changer (Michalke,

2003; Adriano *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2006). Ceci conditionne les transferts des métaux dans les milieux (mobilité) ou vers les organismes (biodisponibilité) (Figure 3).

La mobilité et la biodisponibilité caractérisent tous deux un potentiel de transfert plus qu'un transfert effectif (Luo *et al.*, 2006). Depuis 1979, Tessier et ses collaborateurs ont étudié le partitionnement des métaux dans les différentes formes chimiques, capables d'être libérées dans la solution du sol sous différentes conditions environnementales ; ils ont distingué 5 fractions :

- Fraction échangeable,
- Fraction liée aux carbonates,
- Fraction liée aux oxydes de fer et de manganèse,
- Fraction liée à la matière organique,
- Fraction résiduelle.

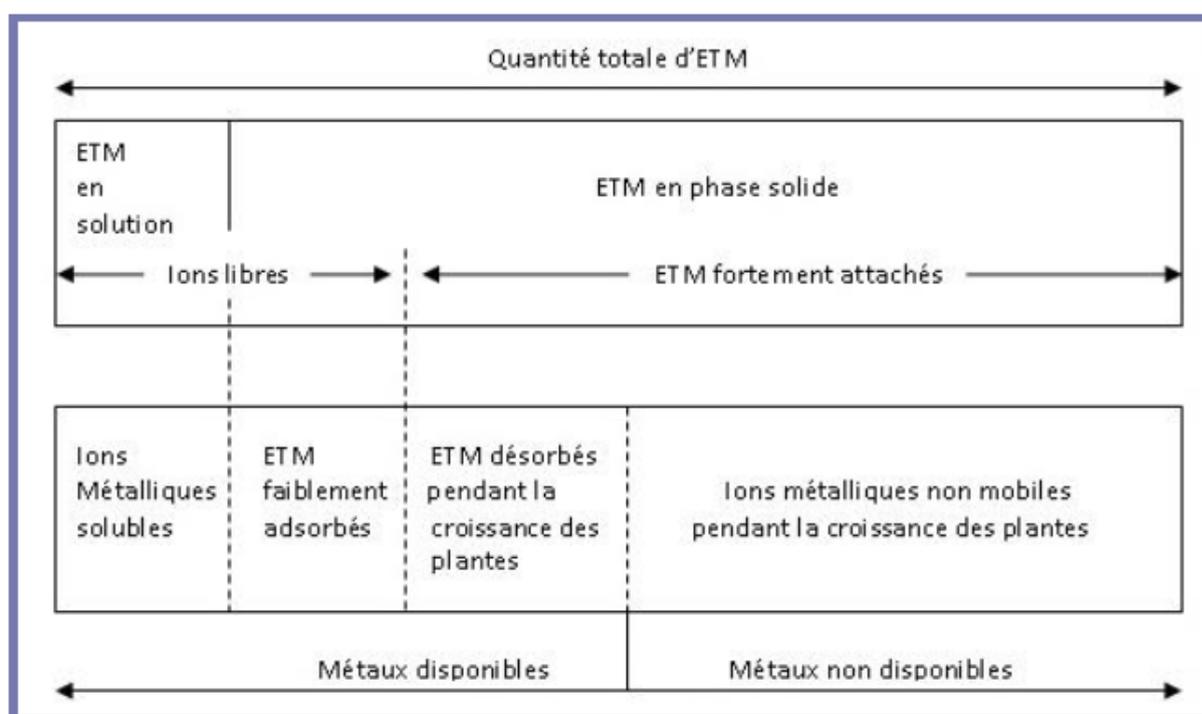


Figure 3. Disponibilité des éléments trace métalliques (ETM) dans le sol (Luo *et al.*, 2006)

Plus globalement, les métaux sont distribués en différentes fractions dans le sol : non labiles (inactifs et inertes), potentiellement mobiles (capables de se solubiliser, biodisponibles) et mobiles (lessivables). Ces trois fractions demeurent dans un équilibre constant mais fragile dans le milieu, résultat des processus physico-chimiques et biochimiques inhérents de la dynamique du système sol (Pathak *et al.*, 2009).

Les extractions des métaux à partir des différentes fractions du sol sont souvent utilisées pour prédire la quantité d'éléments qui peut être potentiellement absorbée par les organismes exposés (Peijnenburg *et al.*, 2007; Meers *et al.*, 2007). Cependant, la fraction des métaux contenus dans la solution du sol, est considérée comme la principale source d'exposition des plantes et des organismes. Cette fraction mobile correspond plus particulièrement aux métaux faiblement adsorbés à la surface de la phase solide du sol (retenus par des faibles interactions électrostatiques) qui peuvent être libérées par des processus d'échange cationique qui constitue le principal facteur régulant l'exposition des éléments vivants du sol. A l'exception des argiles, qui présentent toujours une charge négative quelle que soit l'acidité du sol, celle des autres constituants peut varier. La charge des oxydes et oxyhydroxydes de fer, d'aluminium et de manganèse, varie selon l'acidité en raison du caractère amphotère des groupements OH de surface (Jonušaitė *et al.*, 2004). La présence des carbonates associée à des conditions alcalines du sol, peut contribuer à l'augmentation des phénomènes de sorption des métaux sur les particules minérales et favoriser leur précipitation (Matos *et al.*, 2001; Lafuente *et al.*, 2008; Sipos *et al.*, 2008).

La répartition des métaux dans les différentes fractions du sol est donc éphémère. Les substances humiques ont un rôle important dans le transport des métaux dans le sol : mobilité, concentration des ions métalliques libres dans la solution du sol et les eaux de surface ou souterraine (Koopal *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2006). En effet, si les métaux sont fortement liés à la matière organique mobile, leur transport dans l'environnement est favorisé (transport colloïdal) ; dans le cas inverse (matière organique indissoluble, particules minérales ou matière organique soluble mais liée aux particules minérales), les métaux ne seront pas mobiles. Simultanément, les matières organiques participent à la variation de la biodisponibilité des éléments suivant la force du complexe organo-minéral. Ceci peut intervenir dans des processus métaboliques comme la production des phytochélatines (Figuerola *et al.*, 2008) ou la bioaccumulation des métaux par les vers de terre (Hobbelen *et al.*, 2006).

L'ensemble des facteurs physico-chimiques du sol ainsi que son activité biologique conditionnent donc la dynamique des métaux, à savoir le passage des éléments liés à la phase solide vers la fraction liquide du sol ou vice-versa, et en conséquence, leur incidence dans l'écosystème (Hund-Rinke et Kördel, 2003; Moreno-Jiménez *et al.*, 2009). Il est nécessaire de compléter les outils physico-chimiques avec des dosages biologiques tels les organismes du sol et les plantes concernées (Peijnenburg *et al.*, 2007).

Les formes chimiques des métaux, leurs interactions et l'association avec les différents constituants du sol (argiles, oxy-hydroxydes, carbonates, phosphates et matières organiques) conditionnent leur biodisponibilité pour les organismes vivants ainsi que leur mobilité par le transfert dans la solution du sol.

Cependant, l'affinité entre métaux et constituants du sol varie selon le métal et le constituant considéré. Un métal peut donc se trouver associé aux différents constituants du sol sous différentes formes. Les processus physico-chimiques à l'interface solide/liquide, qui peuvent permettre le piégeage des métaux lourds, sont l'adsorption, la complexation de surface, la précipitation, la substitution et l'inclusion (Peijnenburg *et al.*, 2007).

4- Paramètres influençant la mobilité et la biodisponibilité des métaux lourds

La toxicité d'un métal dépend de sa forme chimique, autant que des facteurs environnementaux (Peijnenburg *et al.*, 2007). Dans le sol, les métaux lourds peuvent exister sous forme d'ion libre ou sous forme liée à des particules de sol. Cependant, un métal n'est toxique pour les organismes vivants que s'il est sous forme libre ; donc biodisponible. Comme tout élément chargé positivement, les cations métalliques peuvent interagir dans le sol avec toute particule organique ou minérale chargée négativement. De l'équilibre entre les formes libres et fixées de l'ion va dépendre sa biodisponibilité, directement liée à sa toxicité. Enfin, la biodisponibilité des métaux lourds varie en fonction de plusieurs facteurs du sol, telle la capacité d'échange de cation (CEC), le PH, le potentiel redox, la teneur en phosphate disponible, la teneur en matière organique et les activités biologiques.

4-1- La teneur en argile

Les argiles, de par leurs propriétés physico-chimiques, jouent un rôle très important dans la disponibilité des métaux lourds. Li et Li, (2000) et Lamy (2002) ont montré que les métaux lourds peuvent être absorbés et immobilisés par les minéraux argileux ou également être complexés par la matière organique du sol en formant alors un complexe organométallique (Lamy, 2002). En effet, la charge électronégative des argiles les rend aptes à contracter des liaisons électrostatiques avec toute entité chargée positivement, comme les cations métalliques. Ces liaisons sont réversibles et les cations fixés sont échangeables : ils peuvent être remplacés par d'autres cations présents dans la phase aqueuse du sol. Cette capacité d'échange de cations (CEC) exprimée en milliéquivalents pour 100 g est une caractéristique importante de chaque argile qui conditionne grandement la biodisponibilité d'un métal dans le sol.

4-2- Le PH

Le PH est un autre facteur important influençant la solubilité et la spéciation du métal et donc sa toxicité (Peijnenburg *et al.*, 2007). Quand le PH diminue d'une unité, la concentration des cations métalliques libres augmente d'environ un facteur 2 dans la solution de sol et par conséquent améliore la phytoextraction (Li et Li, 2000). Les organismes et les microorganismes eux-mêmes peuvent influencer la disponibilité des métaux lourds dans leur environnement proche par acidification locale lors d'une réaction métabolique ou par la production de composés complexant les métaux lourds (Peijnenburg *et al.*, 2007).

4-3- Le potentiel redox

Bien que l'influence des conditions oxydoréductrices du sol semble très importante au regard de la mobilité des éléments métalliques, il n'en demeure pas moins que ce facteur apparaît souvent comme secondaire par rapport au PH. En effet, pour un sol donné, le potentiel redox varie en fonction inverse du PH, il augmente quand le PH diminue (Deneux-Mustin *et al.*, 2003). Les faibles valeurs du potentiel redox favorisent la dissolution des hydroxydes et entraînent une augmentation de la concentration des métaux associés avec des composants (Chaignon, 2001). De plus, la modification du degré d'oxydation des ligands ou des éléments se liant avec le métal influence indirectement la solubilité des métaux lourds ; en conditions réductrices, les sulfates sont réduits en sulfure qui piègent volontiers les éléments métalliques tels que Pb, Cd, Zn (Deneux-Mustin *et al.*, 2003).

4-4- L'activité biologique

La compréhension globale des phénomènes biologiques jouant sur la solubilité des métaux lourds dans les sols est rendue difficile par la multiplicité des actions et interactions à tous les niveaux. Les activités métaboliques de nombreuses populations bactériennes et fongiques influencent la mobilité des métaux lourds. Les principaux modes d'action sur la mobilité des polluants métalliques sont la solubilisation, l'insolubilisation et la volatilisation :

- La solubilisation provient de la production de composés acides tels que les acides carboxyliques, phénoliques, aliphatiques, nitrique et sulfurique. Certaines bactéries chimiolithotrophes (*Thiobacillus*, *Leptospirillum*, *Galionella*) oxydent les formes réduites du fer et du soufre contenues dans les sulfures et produisent de l'acide sulfurique, susceptible de dissoudre les silicates, les phosphates, les oxydes et les sulfures, libérant ainsi les métaux lourds. Les champignons et les

racines des plantes excrètent eux aussi des acides afin d'augmenter leur absorption de nutriments, ou tout simplement comme déchets métaboliques (Chaignon, 2001 ; Deneux-Mustin *et al.*, 2003). Cette acidification favorise aussi la mobilité des autres éléments qui ne sont pas indispensables pour le métabolisme végétal. D'autre part plusieurs autres molécules organiques, capables de complexer spécifiquement certains éléments en solution, peuvent être également libérées en cas de carence nutritive. Parmi ces agents complexants, les sidérophores, composés organiques de faible masse moléculaire, produits par les bactéries et les champignons mais aussi par les plantes. Ces molécules favorisent les déplacements d'éléments métalliques et un transfert diffusif se fait jusqu'aux plantes dans lesquelles ils s'accumulent (Chaignon, 2001).

- L'insolubilisation constitue le phénomène opposé. Bien que le phénomène de détoxification externe des métaux lourds par des exsudats racinaires n'ait jamais été démontré (Deneux-Mustin *et al.*, 2003), certains acides organiques de faible masse moléculaire comme les acides oxalique, citrique ou fumarique qui interviennent dans la complexation intracellulaire d'éléments nutritifs, peuvent être sécrétés dans le milieu extérieur. Ils limiteraient ainsi les transferts par des processus de complexation.
- La volatilisation repose sur l'action directe de certains microorganismes sur le degré d'oxydation de l'espèce métallique. C'est le cas du mercure, de l'arsenic et du sélénium (Se). La biométhylation permet le transfert de groupements méthyl directement aux atomes, Pb, Sn (étain), As, Sb (antimoine) et Se, permettant leur volatilisation dans l'atmosphère (Deneux-Mustin *et al.*, 2003).

4-5- La matière organique

La matière organique joue un rôle essentiellement important dans la rétention des métaux lourds par le sol. Cependant, le devenir d'un métal peut dépendre de sa liaison avec la matière organique (Mo) et de la biodégradabilité de cette dernière. En effet le métal est peu mobile lorsque la MO de l'association organométallique est peu dégradable (Oste *et al.*, 2002).

La matière organique s'accumule dans les horizons de surface du sol ; généralement et de façon naturelle, elle résulte de la décomposition des plantes. Bien que la teneur de la MO dans le sol soit souvent faible comparativement à celle de l'argile, la fraction organique a une influence significative sur la fixation des métaux (Oste *et al.*, 2002).

Deux mécanismes physico-chimiques inclus dans la rétention de métaux par la MO impliquent à la fois la complexation et l'adsorption. Les composés actifs dans la fixation de métaux par la MO sont

les groupes fonctionnels chargés négativement comme les groupes phénols, carboxyles et amines. Ces groupes s'étendent en nombre durant l'humification de la MO. Les groupes fonctionnels s'ionisent davantage quand le PH augmente et les complexes organométalliques sont également plus stables dans ces conditions (Oste *et al.*, 2002).

5- Pollution par le Plomb (Pb) et le cuivre (Cu)

Le choix s'est penché sur ces deux métaux car dans la plupart des études effectués, notamment celles d'El Aslouj *et al.* (2007), Matech *et al.* (2014) et Barrani *et al.* (2015), ont démontré la forte présence et persistance de ces derniers au niveau des sols et des nappes phréatiques de la région.

5-1- Cas du Plomb

Le plomb, élément du groupe IV-A du tableau périodique, de masse atomique 207,2 g/mol, possède une densité élevée de 11,3 g.cm⁻³. Le plomb possède un point de fusion de 327°C et sa température d'ébullition est d'environ 1700°C. Il est difficilement détruit, et non dégradable (Raskin et Ensley, 2000). Dans le sol, le Pb peut se retrouver sous forme ionique, dissoute, ou liée plus ou moins fortement aux particules (Raskin et Ensley, 2000). L'accumulation de Pb, provenant des retombées atmosphériques, ou de déchets contaminés déposés sur le sol, se fait principalement en surface (Sterckeman *et al.*, 2000) et plus précisément dans les horizons riches en matière organique. Les teneurs en Pb diminuent, ensuite, plus en profondeur. Ceci s'explique par le fait que le Pb est peu mobile. Etant principalement associé aux argiles, aux oxydes, aux hydroxydes de fer et à la matière organique, il n'est mobile que lorsqu'il forme des complexes organiques solubles et/ou que le sol a dépassé sa capacité d'absorption pour le Pb (Raskin et Ensley, 2000). Les principales sources de contamination en Pb sont les rejets anthropiques.

5-1-1- Origine

La concentration moyenne du Pb dans la croûte terrestre serait de l'ordre de 13 à 16 mg/kg. Certaines études (Raskin et Ensley, 2000) ont proposé un certain nombre de valeurs moyennes pour différentes roches : Gabbro (1,9 mg/kg); Andésite (8,3 mg/kg); Granite (22,7 mg/kg); Schiste (23 mg/kg); Grès (10 mg/kg); Calcaire et Dolomie (71 mg/kg). Les schistes noirs riches en pyrites et en matières organiques seraient riches en Pb (30 mg/kg).

5-1-2- Le plomb dans le sol

Le Pb dans le sol provient essentiellement - en système non anthropisé - de la roche mère. A l'heure actuelle la concentration de Pb des couches pédologiques mondiales est estimée en moyenne à

25ppm (de 22 à 28ppm pour la plus grande partie des sols, 44ppm pour les histosols). Les sulfures de Pb s'oxydent lentement au cours des processus d'altération des roches mères. Le Pb forme des carbonates et/ou s'incorpore au sein du réseau cristallin des argiles minéralogiques. Il peut également s'associer aux oxydes de Fe et de Mn, de même qu'aux substances humiques (Raskin et Ensley, 2000). Le comportement géochimique du Pb s'apparente à celui des cations bivalents alcalinoterreux, de sorte que le Pb peut remplacer le Ba et le Sr et éventuellement le Ca dans les structures cristallines des minéraux et sur leur site d'adsorption. Aux teneurs naturelles du Pb aux sols, peuvent s'ajouter des apports anthropogènes : une utilisation des composés organométalliques (antidétonant des moteurs à explosion), les sources industrielles (usine de batterie, affinage du Pb...), les déblais de mines, les sources urbaines (boues des stations d'épuration), traitement pesticide à base de Pb. D'après Li et Li (2000), de nombreux auteurs s'accorderaient pour affirmer que les sols non contaminés contiendraient de 10 à 30 mg/kg (moyenne 15 mg/kg), tandis que les sols, situés loin des centres urbains et industriels mais affectés par des contaminations diffuses, présenteraient des concentrations comprises entre 30 et 100 mg/kg. Des teneurs supérieures à 110ppm de Pb traduiraient l'existence d'une source polluante à proximité.

5-1-3- Comportement du plomb dans le sol : spéciation et mobilité

Le Pb introduit dans le sol ne subit que peu de transformation et migre relativement peu à travers les différents horizons. Etant peu mobile, il reste généralement fixé à la partie supérieure du sol. Il n'est pas entraîné en profondeur par le lessivage, il en résulte un gradient de concentration selon la profondeur. Le Pb serait le micropolluant métallique le moins mobile dans le sol (Aranguren, 2008). Ainsi dans la gamme de PH de 5 à 9 et à concentration totale identique ; le Pb serait 100 fois moins mobile que le Cd. La grande affinité de la matière organique vis-à-vis de ce métal expliquerait l'accumulation préférentielle de ce métal dans les horizons de surface. Ceci fait qu'il est très difficile de distinguer ce qui provient des retombées atmosphériques lointaines et ce qui provient du seul cycle biogéochimique naturel. En règle générale l'horizon de surface humifère est l'horizon le plus riche en Pb au sein d'un même sol. Lorsque le sol dans son ensemble est vraiment très chargé en Pb (anomalie pédogéologique) l'horizon de surface n'est plus forcément celui qui montre la concentration maximale au sein du sol. Selon Pais et Benton (2000), une texture légère et un PH acide (4,1 à 4,3) provoqueraient un lessivage important et une contamination en profondeur. Le degré d'oxydation du Pb est de Pb^{2+} mais également Pb^{4+} . Le Pb forme de nombreux composés insolubles dans l'eau.

5-1-4- Biodisponibilité du plomb

L'absorption racinaire du Pb est actuellement considérée comme passive. Elle est réduite par le chaulage et les basses températures. Bien que le Pb soit dans le sol un élément très peu soluble, il peut s'accumuler dans les racines et particulièrement dans les membranes cellulaires. En règle générale, les

concentrations en Pb dans un organisme sont étroitement corrélées aux concentrations en Pb du sol, mais cette corrélation doit être nuancée et tenir compte en particulier de l'organe et son absorption n'est effective qu'au-delà d'un certain seuil dans le sol, elle dépend entre autres facteurs, de la concentration totale dans le sol, de la concentration dans la solution du sol et de la spéciation (Sterckeman *et al.*, 2000).

5-1-6- Utilisation du Plomb par l'homme dans les cycles biologiques et sa toxicité

L'intoxication au Pb par l'intermédiaire de l'alimentation n'est pas un grand risque pour l'homme. Il n'est que très peu soluble dans le sol et les poussières contenant le Pb se déposent sur les fruits et légumes poussant près des sources atmosphériques fortement polluées (autoroutes) sont retirées à 90% par lavage. Le symptôme le plus marquant est le saturnisme : troubles digestifs (coliques), sanguins (anémie, perturbation de la synthèse d'hémoglobine), nerveux (paralysie des extenseurs de la main, encéphalopathie), troubles rénaux (néphrites).

L'homme utilise le Pb depuis plus de 7 000 ans en raison de sa grande diffusion, sa facilité d'extraction, sa grande malléabilité et son bas point de fusion. Il était utilisé lors de l'âge du bronze avec l'antimoine et l'arsenic. Très facile à fondre et mettre en forme, il a notamment été utilisé pour la plomberie dans l'Antiquité. Lors du Moyen Âge, les alchimistes croyaient que le Pb était le métal le plus ancien et l'associaient à la planète Saturne. En alliage avec l'étain et l'antimoine, il était utilisé pour la fabrication des caractères d'imprimerie. Actuellement plusieurs applications de ce métal sont encore trouvées, bien que beaucoup d'applications historiques du Pb ont maintenant été proscrites en raison de sa toxicité lorsqu'il est absorbé par les organismes vivants (Anonyme, 2007). Le plomb avec l'arsenic et l'antimoine sont utilisés encore dans la fabrication de munitions de guerre ou de chasse (Anonyme, 2007).

Le Pb est aussi utilisé dans l'industrie du verre et il est d'une grande utilité pour construire des protections pour atténuer les rayons γ , les rayons X. Les accumulateurs électriques sont devenus la principale utilisation du Pb (Anonyme, 2007). En 2004, les batteries au Pb, destinées à l'automobile ou à l'industrie, représentent 72 % de la consommation de Pb. Les pigments et autres composés chimiques représentent 12 % de la consommation (Anonyme, 2007). A la différence de As et Zn, le Pb n'est pas un oligo-élément et il possède un caractère toxique bien connu (O'Connell *et al.*, 2008). Les formes organiques et inorganiques du Pb ont des effets toxiques chez l'homme. Cependant, la toxicité des espèces organiques est beaucoup plus grande que celle des espèces inorganiques, son passage privilégié chez l'homme l'est par la chaîne alimentaire. L'Organisation Mondiale de la Santé signale aussi le risque grave produit par la forme de Pb inorganique introduite dans l'homme par la voie de la consommation de l'eau (O'Connell *et al.*, 2008).

Les effets pathologiques d'une intoxication au Pb sont nombreux et peuvent être séparés en deux catégories : effets physiologiques et neurologiques (Plumlee et Ziegler, 2003). Les premiers produisent

une augmentation de la tension artérielle et l'apparition de dommages vasculaires et intestinaux, ainsi que des troubles au niveau des reins (néphropathie saturnine). Chez l'enfant, le Pb peut remplacer Ca dans les os (Figure 4), ce qui est facilement détectable à travers les radiographies (Aranguren, 2008). Enfin, des cas de stérilité ont été aussi détectés quand l'exposition a été prolongée au Pb (Goyer et Clarkson, 2001).

Finaleme nt chez la femme quand elle est enceinte, le Pb peut entraîner de très sérieux problèmes pour le fœtus.

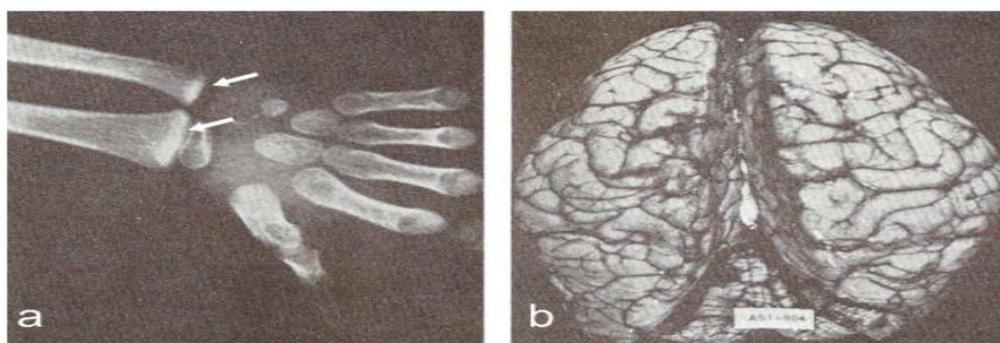


Figure 4. a) Dépôts de Pb dans l'épiphyse du poignet, b) œdème cérébral (Goyer et Clarkson, 2001)

Les troubles neurologiques sont des affections des systèmes central et périphérique, les symptômes le plus fréquents sont les pertes de mémoire et des perturbations des fonctions cognitives et comportementales. Ces troubles sont la conséquence des changements produits dans le cerveau par l'empoisonnement au Pb. Les enfants sont plus affectés par ces effets du Pb que les adultes (Goyer et Clarkson, 2001 ; Plumlee et Ziegler, 2003).

5-2- Cas du Cuivre (Cu)

Le cuivre est un métal de la première série de transition. Il fait partie du groupe 11 (IB) dans le tableau périodique des éléments. Il est malléable, ductile et résiste à la corrosion de l'air et de l'eau mais est attaqué par les acides. Son numéro atomique est égal à 29 et sa masse molaire est de $63,57 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Les deux isotopes naturels sont le ^{63}Cu (69%) et le ^{65}Cu (31%) (Emsley 2003).

Le cuivre est particulièrement toxique pour les micro-organismes. Dans les eaux douces naturelles, l'ajout de CuSO_4 à des doses infimes perturbe les processus de biominéralisation (Mathieu, 2012). Sur un sol limoneux amandé avec des rejets, l'émission de CO_2 est perturbée à des seuils inférieurs à $10 \text{ mgCu/kg sol sec}$. Utilisé dans l'eau potable, il entraîne, à des doses variant de $0,025$ à $0,05 \text{ mgCu}\cdot\text{L}^{-1}$, la mort des bactéries coliformes. La phytotoxicité du Cu varie cependant énormément d'une espèce à l'autre. Ainsi l'addition de sulfate de Cu réduit la biomasse alguaire en favorisant les

chlorophycées vis-à-vis des cyanobactéries. Dans un sol de rizière, l'addition de cuivre provoque l'augmentation de la population des champignons, tout en diminuant la biodiversité (Mathieu, 2012).

5-2-1- Origine

Le Cu est un métal largement répandu dans la nature. Sa concentration moyenne dans la croûte terrestre serait comprise entre 45 et 70 mg/kg (Emsley, 2003). Il est trouvé dans la nature soit sous forme libre d'oxyde de cuivre (88,8%) soit sous forme d'oxyde de sulfure. Il est particulièrement abondant dans les roches mafiques et intermédiaires. Les teneurs les plus élevées (>80 mg/kg) seraient observées dans les roches magmatiques basiques riches en minéraux ferromagnésiens. Les roches granitiques contiennent en général beaucoup moins de Cu. Parmi les roches sédimentaires, les argiles et les schistes présentent des concentrations plus fortes que les roches détritiques (grés, sable). Il est au contraire très peu représenté dans les roches carbonatées (Emsley, 2003).

5-2-2- Le cuivre dans le sol

Les teneurs moyennes en Cu d'un sol non contaminé, sont comprises entre 13 et 24 ppm. Emsley (2003) donne une concentration maximale normale de 100 ppm et une moyenne dans les sols de 20 ppm. Les moyennes les plus élevées sont rencontrées dans les chernozems et les sols châtaîns. Les teneurs les plus basses sont observées dans les podzols et dans les histosols. Les ferrasols et les fluvisols peuvent également contenir des teneurs élevées en Cu.

Aux teneurs naturelles, les sols se trouvent également enrichis par l'utilisation excessive de fertilisants et de produits agrosanitaires tels les insecticides, les fongicides, les algicides qui sont à la base de sels de Cu, notamment les sulfates de Cu; l'utilisation directe des boues d'épuration sans oublier l'activité industrielle (bains de décapage et bains de plaquage dans l'industrie du Cu et de ses alliages). Les eaux de drainage des régions minières, l'industrie électrique, les activités urbaines (ordures ménagères, brûlage de comestibles et circulation automobiles salage des routes, etc).

5-2-3- Comportement du cuivre dans le sol : spéciation et mobilité

Les nombreuses formes minérales libérées au cours des processus d'altération sont des composés très solubles notamment en milieu acide. Le Cu est donc considéré comme l'élément le plus mobile des métaux lourds, par référence aux processus supergènes. Bien que la formule la plus commune soit, dans les sols, Cu^{2+} ; de nombreuses espèces chimiques sont également libérées au cours des processus d'altération, dont Cu; CuOH; $\text{Cu}(\text{OH})_2$; CuO; $\text{Cu}(\text{OH})_2\text{CO}_3$; CuCO_3 ; $\text{Cu}(\text{CO}_3)_2^{2-}$; $\text{Cu}(\text{OH})^{3-}$; $\text{Cu}(\text{OH})_4^{2-}$; CuO^{2-} et quelques formes incluses au sein des minéraux, Cu-O-Fe; Cu-O-Al; Cu-O-Mn. Tous les ions de Cu sont fortement liés aux sites d'échange minéraux et organiques. Selon Adriano (2004), 56 98% du Cu soluble dans le sol se trouvent complexés par la matière organique, alors que

Kebir (2012) estime que seulement 80% du Cu soluble est sous forme chélatée. Le Cu réagit très facilement avec les surfaces sorbantes et les constituants organiques du sol. Il est facilement précipité en présence de différents anions, plus particulièrement les anions sulfures, carbonates et hydroxydes. Le Cu est donc très peu mobile dans les sols, sauf dans les conditions extrêmes d'acidité (podzols) ou de gleyification. Ceci fait que le principal danger du Cu vient de son accumulation à la surface des sols. Il semble que dans les sols cultivés très pauvres en argile, sable ou limon, les apports massifs opérés en surface (traitement fongicide) soient capables de migrer en profondeur (Kebir, 2012).

5-2-4- Biodisponibilité

Le Cu est un des éléments les plus essentiels pour les plantes et les animaux. En effet, l'organisme ne peut croître complètement en son absence. Il ne peut être remplacé par un autre élément ; il a une influence directe sur l'organisme et le bon fonctionnement de son métabolisme. Par contre, il est toxique pour les champignons et les algues. Les plantes absorbent le Cu dans la solution du sol. Cependant, les mécanismes impliqués dans cette absorption ne sont pas encore élucidés. Si l'absorption active est, à l'évidence, le mécanisme le plus représenté, il n'en demeure pas moins qu'une absorption passive peut aussi se mettre en place, notamment dans les sols à forte contamination et présentant des signes évidents de phytotoxicité (Kebir, 2012). Le Cu présent dans les racines est entièrement sous forme complexée, mais la pénétration racinaire doit se réaliser sous les formes dissociées. La vitesse de pénétration dans les racines est très faible. Elle est la plus faible des éléments essentiels pour les végétaux. Elle diffère en fonction de la spéciation du métal. Kebir, (2012) a pu montrer que le Cu anthropogène ajouté à un milieu sous forme de CuO était beaucoup mieux assimilé par une orge que le Cu géogène.

5-2-5- L'utilisation du Cu par l'homme dans les cycles biologiques et sa toxicité

Le cuivre pourrait bien être le premier métal à avoir été utilisé, étant donné que des pièces datant de 8700 avant J.-C. ont été trouvées. En 2004, la production mondiale de Cu est de 16.015 millions de tonnes. Les principaux producteurs sont le Chili (37.3%), les États-Unis (8%, dont 62 % en Arizona), le Pérou (7.1%) et l'Indonésie (5.7%). En Europe, le principal producteur est la Pologne avec 585 000 t an-1 (Anonyme, 2007).

Ses vertus bactéricides et antifongiques et sa ductilité ont aussi, comme pour le Pb (qui est lui bien plus toxique), justifié son utilisation dans les canalisations d'eau et dans certains pays pour les toitures et gouttières. Sa résistance à la corrosion et sa toxicité empêchant la prolifération et la fixation d'algues et d'organismes marins a encouragé ses usages dans la marine, sous forme de cuivre ou plus souvent de laiton (clous, hublots, serrures, charnières, etc.). Les sels de Cu, comme le sulfate ou

l'oxychlorure, présentent des propriétés fongicides mises à profit pour la viticulture et l'agriculture (Anonyme, 2007). Le Cu, à très faible dose est un oligo-élément indispensable à la vie (Chakraborty et Das, 2014). Il est notamment nécessaire à la formation de l'hémoglobine et remplace même le fer pour le transport de l'oxygène chez le limule (arthropode), dont le sang est bleu (Chakraborty et Das, 2014).

Régulé par le foie chez l'homme et les mammifères, le Cu intervient dans la fonction immunitaire et contre le stress oxydant. Son manque cause le syndrome de Menke (Plumlee et Ziegler, 2003). Le cuivre est aussi, à dose plus élevée et sous ses formes oxydées, un puissant poison pour l'Homme, causant la maladie de Wilson (Plumlee et Ziegler, 2003). Le Cu contamine les eaux environnantes à des doses et concentrations infimes de l'ordre de $10 \mu\text{g l}^{-1}$ pour de nombreux organismes tels les algues, mousses, microorganismes marins, champignons microscopiques (Chakraborty et Das, 2014).

Le maximum *normal* rencontré dans les plantes, selon McKnight *et al.* (2004) est de 15 ppm par matière sèche. Le Cu représente un danger quand il est présent en concentration élevée dans l'environnement. Par son action sur les racines des plantes, le Cu altère leur développement et la perméabilité de leur membrane cellulaire causant le lessivage de certains ions (K^+ ; PO_4^{2-}). Il en résulte des effets toxiques sur les plantes et des baisses de rendement.

D'après Pais et Benton (2000) des teneurs totales en $\text{Cu} \leq 7\text{ppm}$ entraînent des carences cupriques et en revanche des toxicités apparaissent au-delà de 180ppm. Chez l'homme, des symptômes de toxicité aiguë se manifestent par des diarrhées, des nausées, des vomissements et des irritations intestinales. 1g de CuSO_4 constitue une dose mortelle ; pour plus de 44mg/L d'eau de boisson, il y a manifestation de gastro-entérites. La toxicité chronique du Cu n'a pas été démontrée chez l'homme, mais une partie de la population y est sensible (maladie de Wilson).

6- Effet des métaux lourds sur les microorganismes du sol

Le sol est un compartiment de l'écosystème possédant de multiples fonctions comme : support pour les organismes et microorganismes vivants, réservoir de matière organique et minérale, lieu de transformations, système épurateur, régulateur des flux et des échanges dans les cycles biogéochimiques (cycle de l'azote, du carbone...) (Gobat *et al.*, 2010). De nombreux organismes participent à la réalisation de ces fonctions. Le sol est un remarquable réservoir de microorganismes. Huynh (2009) a estimé à $2,6 \times 10^{29}$ le nombre total de cellules procaryotes vivant dans les sols. Différents types de microorganismes sont représentés dans le sol où ils jouent un rôle crucial dans les cycles biogéochimiques des éléments. En moyenne, on compte 10^7 Bactéries, 10^5 Champignons, 10^5 Protozoaires et 10^4 Algues par g de sol sec (Gobat *et al.*, 2010). L'importance écologique des

bactéries du sol ne se limite pas à leur nombre ou à leur biomasse, même si ces paramètres y contribuent grandement. En effet, leur atout principal réside dans leur grande diversité génétique et fonctionnelle.

La diversité bactérienne dans le sol est en effet plus importante que celle des environnements aquatiques (Torsvik et Ovreas, 2002). Cette diversité est à l'origine d'un très large éventail de propriétés physiologiques mais aussi d'activités métaboliques et de fonctions que les microorganismes peuvent accomplir dans le sol. La diversité métabolique couplée à leur imposante biomasse fait que les microorganismes du sol sont capables de métaboliser tous les composés naturels disponibles mais aussi la majorité des composés d'origine anthropique présents dans le sol, après un délai nécessaire à la mise en place des voies métaboliques. Les microorganismes sont en effet les acteurs principaux des grands processus de transformation de la matière et des flux d'énergie dans le sol. Certaines étapes clé du cycle des éléments ne peuvent d'ailleurs être réalisées que par les microorganismes.

Les virus existent dans l'environnement comme génomes (ADN) enfermés dans des couches protéiques. L'adaptation locale et les interactions virus-hôte jouent un rôle important dans la susceptibilité d'un hôte à l'infection et par conséquent la régulation des populations microbiennes du sol.

Il est déjà bien établi que cette toxicité des métaux lourds affecte aussi l'activité et la dynamique des communautés microbiennes du sol (McGrath *et al.*, 2001). Selon l'intensité de la contamination métallique dans les sols, les processus biologiques peuvent être fortement ralentis voir inhibés. Ainsi, la réduction de l'activité de certaines enzymes telles la phosphatase et l'uréase dans les sols contaminés en métaux diminue la minéralisation du phosphore et de l'azote, influençant la fertilité du sol (Kandeler *et al.*, 2000). Lorsque les teneurs en métaux augmentent, la respiration globale du sol (CO₂ dégagé) et la dégradation de la cellulose sont aussi diminuées, conduisant à l'accumulation des litières. Une baisse de la biomasse bactérienne fixatrice d'azote à cause d'un stress métallique peut affecter le bon fonctionnement de la symbiose avec les légumineuses et donc la fixation de N₂. La modification de ces fonctions microbiennes peut donc avoir un impact fort sur les écosystèmes dans la mesure où ce sont des processus contrôlant des étapes importantes des cycles biogéochimiques (Kandeler *et al.*, 2000).

L'effet néfaste des métaux lourds sur les microorganismes symbiotiques des plantes est, par ailleurs, préjudiciable à la bonne croissance des plantes. Outre les bactéries, les champignons mycorhiziens sont aussi sensibles aux pollutions métalliques (Entry *et al.*, 2002). Or, ces champignons symbiotiques, qui colonisent 90% des plantes terrestres, favorisent la croissance des plantes. Même si les champignons mycorhiziens ont un fort potentiel d'adaptation et que des isolats tolérants aux métaux ont déjà été mis en évidence (Entry *et al.*, 2002), une baisse de la diversité fongique peut réduire la biodiversité des plantes dans un écosystème terrestre (Redon, 2009). Selon les conditions du sol et selon les espèces mycorhiziennes étudiées, les métaux lourds peuvent en effet avoir des effets toxiques sur les

champignons (Gadd, 2000) menant à une baisse de la densité de spores et du potentiel infectieux du champignon. Leur disparition ne permet donc plus de garantir à long terme la fertilité du sol. C'est pourquoi, l'impact écologique des métaux lourds sur les communautés bactériennes telluriques a fait l'objet de très nombreuses études dans ces vingt dernières années. Il est généralement admis que les microorganismes sont plus sensibles aux métaux lourds que les plantes ou les animaux vivant dans les sols pollués (Redon, 2009). Les impacts des métaux lourds sur les communautés microbiennes peuvent être abordés de diverses façons : la densité (CFU), la taille, la structure des communautés (génétique et fonctionnelle) et également l'activité enzymatique.

6-1- Biomasse

Les métaux lourds sont réputés pour leur toxicité sur la plupart des microorganismes telluriques. Leurs effets de dénaturation des protéines ou de destruction de l'intégrité de la membrane cellulaire affectent la croissance, la morphologie et le métabolisme de ces microorganismes telluriques (Huynh (2009). Ces altérations conduisent à des réductions de biomasse microbienne. Ekelund *et al.* (2003) ; Fomina *et al.* (2005) ont montré que la biomasse bactérienne d'un sol a tendance à diminuer suite à une contamination par un métal. Ils estiment que, même à long terme et pour des faibles teneurs en métaux lourds, les microorganismes ne sont pas capables de maintenir une biomasse équivalente à celle d'un sol non pollué. Les expérimentations de Fomina *et al.* (2005) ont montré qu'il y a une corrélation entre la diminution du nombre des génomes bactériens et les niveaux de concentration en métaux lourds. Dans le sol non contaminé, le génome bactérien est estimé à 16 000/g de sol, dans le sol de contamination moyenne à 6 400/g de sol et de seulement 2 000/g de sol dans un sol fortement contaminé.

6-2- Tolérance

Les principaux mécanismes de tolérance observés chez les champignons sont :

- La complexation et la précipitation extracellulaire

Plusieurs types de molécules peuvent être sécrétés et se complexer avec les métaux lourds. Un des principaux mécanismes permettant la tolérance aux métaux des cellules implique l'excrétion d'acides organiques (Haferburg et Kothe, 2007). Différentes molécules organiques, et en particulier des acides di- et tricarboxyliques, sont en effet excrétées par les cellules et servent ainsi à chélater les ions métalliques. L'induction de l'efflux de l'acide oxalique est étroitement corrélée avec la tolérance au cuivre chez les champignons de la pourriture brune (Green & Clausen, 2003), et l'excrétion accrue d'acide oxalique contribue probablement à la tolérance aux métaux.

- La fixation aux parois cellulaires

La paroi cellulaire est le premier site d'interaction directe. Chez les champignons, la composition de la paroi comprend des polymères tels que la chitine, des glucanes, des galactosamines et des protéines. Ainsi, un grand nombre de sites potentiels de liaison y exposent des groupements libres (carboxyle, amino, hydroxyle, mercapto ou phosphate) (Lanfranco *et al.*, 2002). Il a été démontré que la liaison du cadmium aux parois cellulaires représente une fraction importante du métal. Elle peut être considérée comme un mécanisme de tolérance important chez les champignons (Frey *et al.* 2000). La présence de mélanines parmi les composants de la paroi cellulaire peut encore augmenter la capacité de biosorption de métaux

- La séquestration intracellulaire et efflux de métaux

Des protéines de transport de composés métalliques peuvent être impliqués dans la tolérance aux métaux, soit par efflux hors de la cellule des ions métalliques toxiques à partir du cytosol ou en permettant la séquestration du métal dans des compartiments intracellulaires (Hall, 2002).

- La chélation intracellulaire des métaux

De nombreuses études (Chiaverini et De Ley, 2010; Fang et al., 2010; Klaassen et al., 2009) ont suggéré que la tolérance aux métaux pour les champignons est basée sur la présence de métallothionéines. Celles-ci forment une classe de protéines riches en cystéine et sont présentes de façon ubiquitaire. Elles ont un faible poids moléculaire et contiennent des agrégats de métaux à base de soufre. Un rôle crucial de ces protéines est leur implication dans l'homéostasie des oligo-éléments essentiels tels le zinc et le cuivre, ou la séquestration des métaux toxiques pour l'environnement, tels le Plomb, le cadmium et le mercure.

6-3- Structure génétique et fonctionnelle de la communauté microbienne

Le stress par les métaux lourds entraîne des modifications plus ou moins drastiques dans la structure des communautés microbiennes telluriques. Les études de l'impact de métaux lourds sur la diversité de la communauté microbienne dans le sol ont montré surtout une influence négative (Smith *et al.*, 2000 ; Sandaa *et al.*, 2001 ; Moffett *et al.*, 2003). Les bactéries et les champignons isolés à partir de sols pollués sont plus tolérants à une forte contamination par les métaux lourds que ceux des sols non pollués (Mertens *et al.*, 2006). L'ajout de métaux lourds entraîne donc la disparition des populations les plus sensibles et subséquemment l'adaptation des populations les plus résistantes. Ainsi, les équilibres peuvent basculer et les dominances s'inverser (Mertens *et al.*, 2006).

6-4- Activité enzymatique

D'autres propriétés biologiques largement étudiées dans les études d'impact concernent les activités enzymatiques, dont les activités respiratoires. L'effet néfaste des métaux lourds sur les activités enzymatiques du sol a souvent été souligné (Renella *et al.*, 2003). La sensibilité des activités vis-à-vis des métaux peut dépendre du type d'enzyme (Renella *et al.*, 2003). Kandeler *et al.* (2000) ont montré l'impact de différents métaux sur 13 enzymes impliquées dans les cycles du carbone (C), de l'azote (N), du phosphore (P) et du soufre (S), par la réduction de leurs activités qui était plus ou moins sévère : celles impliquées dans le cycle du carbone étaient moins affectées que celles liées aux cycles du N, P ou S. Les sols contaminés par les métaux lourds peuvent donc perdre certaines de leurs propriétés biochimiques indispensables au bon fonctionnement de l'écosystème.

7- Chiffres et réglementations

Parmi les 9 éléments métalliques à risque (Cd, Pb, Hg, As, Ni, Cr, Cu, Zn, et Se) pour la santé humaine, quatre éléments sont particulièrement préoccupants : le cadmium, le plomb, le mercure et l'arsenic (Tankari Dan-Badjo *et al.*, 2013). Cd, Pb et Hg ont ainsi été identifiés comme *substances dangereuses prioritaires* par la commission européenne (Décision 2455/2001/CE du conseil Européen modifiant la Directive Européenne sur l'Eau2000/60/CE). En vertu de cette directive 2000/60/CE, les états membres de l'Union Européenne sont ainsi tenus d'adopter des mesures de prévention et de contrôle de la pollution des eaux souterraines et de fixer des valeurs seuils (Tableau IV).

Tableau IV. Valeurs seuils provisoires (ppm) retenues pour la définition de l'état chimique des eaux souterraines (Circulaire DCE 2006/18)

Paramètres	Valeurs seuils pour les eaux souterraines retenues en France	Valeurs seuils pour les sols retenues en France	Valeurs seuils dans les sols préconisés par la FAO
Arsenic	0.01*	-	20
Cadmium	0.005	2	0.41
Plomb	0.01**	100	27.0
Mercure	0.001	1	-
Ammonium	0.0005*	-	0.8
Cuivre	31	100	38.90

(*) valeur seuil applicable uniquement aux aquifères non influencés pour ce paramètre par le contexte géologique

(**) dans le cas d'un aquifère en lien avec les eaux de surface et qui les alimente de façon significative, prendre comme valeur seuil celle retenue pour les eaux douces de surface (circulaire du 28 juillet 2005) en tenant compte éventuellement des facteurs de dilution et d'atténuation.

Afin d'accompagner la dynamique juridique et institutionnelle que connaît le domaine de l'environnement au Maroc, à travers la promulgation des lois environnementales et de nouveaux textes couvrant diverses composantes de l'environnement et divers domaines, une réflexion est prévue pour les années à venir à travers l'élaboration d'un projet de loi spécifique relatif à la protection environnementale des sols au même titre que pour l'eau et l'air.

8- Les mécanismes de réponse au stress métallique

En réponse à la toxicité métallique, les organismes ont développé un certain nombre de mécanismes de protection. Pour réduire le stress métallique, les organismes peuvent limiter l'accumulation des métaux dans les cellules (exclusion), stocker l'élément toxique dans les vacuoles (chélation et séquestration) et/ou activer les systèmes antioxydants (protéines de réponse au stress) (Hall, 2002).

Alors que l'efflux des ions toxiques concerne plutôt les bactéries (Nies, 2003), les plantes peuvent immobiliser les métaux dans la rhizosphère en exsudant des acides organiques, citrate et malate (Nies, 2003) ou en favorisant le développement de certains microorganismes (mycorhization). Néanmoins, pour des métaux tels le mercure, l'arsenic ou le sélénium, les plantes sont capables de les évacuer par exsudation racinaire ou volatilisation. Mais le mécanisme de protection le plus utilisé chez les êtres vivants est la séquestration des ions métalliques pour détoxifier les cellules (Clemens, 2006). La chélation des métaux, une fois entrés dans le cytosol de la cellule, est effectuée par des peptides tels que les métallothionéines (MT) et les phytochélatines (PC) (Cobbet, 2000). En réponse au stress oxydant, les cellules peuvent aussi synthétiser des protéines de réponse au stress telles que les *heat-shockproteins*, des peroxydases ou la superoxyde dismutase (SOD) pour lutter contre les Espèces Réactifs de l'Oxygène (ERO). Face à la pression de sélection causée par le stress métallique, les organismes les plus aptes génétiquement à développer ces systèmes de réponse à la toxicité sont plus résistants que les autres, c'est la notion de tolérance. Ainsi, des individus et des populations tolérants aux métaux lourds ont souvent été identifiés, en particulier chez les microorganismes (Clemens, 2006). La distinction entre des individus tolérants et sensibles aux métaux est basée sur leurs performances de croissance (survie, biomasse, reproduction) sur des substrats contaminés (Deneux-Mustin *et al.*, 2003). Des microorganismes résistants s'installeront ainsi mieux dans un sol pollué, survivront mieux et produiront plus de biomasse que des microorganismes non-tolérantes. Par ailleurs, il existe une certaine plasticité de la tolérance, il semblerait en effet que la tolérance aux métaux puisse être perdue ou au contraire induite par acclimatation (Deneux-Mustin *et al.*, 2003).

9- Les méthodes de dépollution

9-1- Dépollution classique

Le but de la dépollution des sols est de restituer les sites dans un état aussi proche que possible de l'état antérieur à la pollution. En outre, la ou les techniques de traitement des sols ne doivent pas être plus polluantes que le résultat de la dépollution (Legrand, 2006). C'est-à-dire qu'il ne doit pas y avoir de transfert de pollution et ainsi répondre aux critères suivants de dépollution :

- Les matières incriminées doivent être enlevées ou neutralisées,
- Les ressources mises en œuvre (eau, air, énergie, capital...) ne doivent pas être largement utilisées,
- Les émissions secondaires (eau et air du processus) ne doivent pas contenir de polluants.
- Le matériau traité doit avoir un taux important de recyclage,
- La quantité et le danger potentiel des matières résiduelles doivent être minimisés,
- L'enlèvement ou le transfert de substances toxiques existantes ne doivent pas régénérer de nouvelles.

La dépollution des sites contaminés par des sources de pollution variées est contrainte par différents facteurs, telle en premier lieu, la nature de la pollution. Toutefois, la dépollution d'un site encore en activité sera beaucoup plus contraignante que celle d'un site fermé (Legrand, 2006). Les traitements proposés peuvent être définis en trois procédés ; procédés *in situ* réalisés dans le sol en état ; *on site*, traitements sur place des sols excavés ou *ex situ*, nécessitant l'évacuation.

Ces différents procédés sont dépendants d'un facteur de temps, sachant que les traitements *in situ* demandent un temps plus long que ceux réalisés hors site (Legrand, 2006). De plus, le type de traitement choisi dépend également de la nature biodégradable ou non du polluant, Des traitements physico-chimiques, thermiques ou de confinement peuvent s'appliquer pour le traitement de polluants non biodégradables.

Les méthodes les plus employées actuellement sont des techniques physicochimiques, souvent onéreuses, lourdes à mettre en place et peu respectueuses de l'environnement ; des méthodes émergentes exploitant des processus biologiques ou bioremédiation ont vu le jour mais celles-ci méritent encore d'être optimisées et sont encore peu utilisées (Mulligan *et al.*, 2001).

9-2- Dépollution biologique

Des méthodes biologiques s'appuient sur le métabolisme et l'activité des communautés de bactéries, champignons, végétaux supérieurs, pour évacuer, dégrader ou stabiliser les polluants. L'accumulation de substances toxiques variées dans les écosystèmes, couplée au caractère non renouvelable de la ressource sol, oblige la société humaine à mettre en place des moyens pour dépolluer les sols ou remédiation. Face à la demande croissante de surfaces cultivables, la question de la reconversion des sites pollués est en effet de plus en plus fréquente. La pollution par les métaux est particulièrement problématique à cause de leur persistance dans l'environnement, alors que les pollutions organiques sont dégradables. La sélection de la méthode de remédiation la plus appropriée dépend ainsi du type de pollution, des caractéristiques du site, des concentrations en contaminants, et surtout du devenir du site (Redon, 2009).

Le procédé de la bioremédiation consiste à activer la capacité naturelle que possèdent de nombreux organismes, la plupart des temps microscopiques (bactéries, microalgues, champignons), à dégrader les polluants en composés inertes, comme l'eau et le gaz carbonique. Ces organismes peuvent être indigènes, ou exogènes, ou encore être prélevés sur le site contaminé, cultivées au laboratoire puis réintroduits dans le sol. La bioremédiation se déroule généralement en condition d'aérobie, cependant l'application de systèmes de bioremédiation en condition d'anaérobie permet la dégradation d'un certain nombre de molécules récalcitrantes (Redon, 2009). Les procédés de bioremédiation peuvent concerner les traitements de dépollution *in situ* ou *ex situ*.

L'utilisation des plantes, comme approche de la bioremédiation *in situ* est utilisée comme outil de dépollution (phytoextraction) pour extraire les polluants du sol (phytoextraction et phytovolatilisation) ou réduire leur mobilité (phytostabilisation) (Redon, 2009).

La bioremédiation emploie des méthodes naturelles qui n'ont donc pas un impact négatif sur l'écosystème et dont le coût peut être moins élevé que celui des techniques physico-chimiques, thermiques ou de confinement. Par contre, la limitation principale de ce type de remédiation est la lenteur du procédé et la difficulté à bien maîtriser les mécanismes biologiques. Il s'agit d'utiliser des microorganismes, bactéries ou champignons, pour modifier la forme chimique des polluants afin de les extraire du sol ou les immobiliser.

Les microorganismes sont impliqués dans les cycles biogéochimiques des métaux par une variété de processus biochimiques qui influencent la spéciation et la mobilité des métaux. Ainsi, selon les conditions et selon les microorganismes, l'action microbienne peut soit mobiliser soit immobiliser les métaux, processus pouvant être exploités en bioremédiation (Gadd, 2000 ; Hazen et Tabak, 2005). La

mobilisation des métaux permet de les extraire de la matrice solide du sol, dans ce cas les propriétés microbiennes qui peuvent être exploitées sont la lixiviation, la dissolution des composés métalliques insolubles, la chélation par des métabolites, dont les sidérophores et la biométhylation.

La lixiviation autotrophe par des bactéries acidophiles (G/Thiobacillus) qui permet de solubiliser le fer et d'autres métaux en produisant H_2SO_4 a déjà des applications industrielles, non pas en bioremédiation mais en *biomining* qui vise à extraire certains métaux précieux des sols. La biolixiviation en tas ou en bioréacteur permet d'extraire les métaux à l'aide de bactéries du genre Acidithiobacillus, dans des conditions particulières (aérobie, PH acide, $15 < T^\circ < 55^\circ C$). Les propriétés oxydantes ou réductrices des bactéries peuvent aussi être utilisées pour transformer les métaux en des formes moins toxiques, telle la réduction du Cr (VI) en Cr (III), moins mobile et moins toxique (Desjardin *et al.*, 2002), ou encore les bactéries sulfato-réductrices qui permettent de précipiter les métaux (M) sous forme de sulfure métallique (MS).

Enfin, la biométhylation principalement, du Se, As ou Hg, permet de le volatiliser (Thayer, 2002). Cette réaction de méthylation peut être réalisée par de nombreux organismes vivants et aurait un rôle de détoxification (Gadd, 2000). Mais, au même titre que les différents phénomènes de lixiviation hétérotrophes mettant en jeu une acidification du milieu ou la dissolution par réactions redox des métaux piégés sous formes d'oxydes, phosphates ou sulfures, la dissolution des métaux par les microorganismes est plutôt développée en laboratoire dans des réacteurs ou en biopiles. De même, des méthodes de solubilisation des métaux grâce à la production de sidérophores sont en développement.

Dans certains cas, il peut être préférable d'immobiliser les polluants. La capacité de biosorption des microorganismes est déjà bien utilisée pour traiter les eaux polluées (Desjardin *et al.*, 2002). La biomasse microbienne peut en effet fixer les métaux par adsorption, liaison sur la paroi cellulaire ou accumulation dans les structures intracellulaires. L'utilisation de biomasse fixée (biofilm) de bactéries, cyanobactéries, algues ou champignons en bioréacteurs fait ainsi l'objet d'applications pour fixer les polluants présents dans des suspensions de sols, boues ou eaux usées (Desjardin *et al.*, 2002).

D'autre part, la production par les microorganismes de toute une gamme de composés fixant les métaux (acides organiques, polysaccharides, métallothionéines...), ou encore la précipitation des métaux par changement de leur état d'oxydation (bactéries sulfato-réductrices) ou sous forme de phosphates (Citrobacter sp.) et de carbonates, sont en cours de développement (Audet et Charest, 2007a).

En conditions *in situ*, à cause des risques de transfert des polluants, les techniques d'immobilisation sont préférables aux techniques de mobilisation (Audet et Charest, 2007a). Toutefois, les traitements *in situ* ont l'avantage d'être moins coûteux que les traitements *ex situ* et d'être applicables

à des contaminations diffuses, diluées ou inaccessibles. Les techniques de bioremédiation *in situ* peuvent être réalisées, par bioaugmentation, biostimulation ou par atténuation naturelle.

De plus, l'efficacité de la méthode diminue lors de la présence de plusieurs métaux (pollution polymétallique) et lorsque les concentrations en métaux sont trop élevées (Audet et Charest, 2007a). Il peut dans ce cas être préférable de s'orienter vers d'autres méthodes telle la mycoremédiation.

La nécessité de dépolluer les sites contaminés a conduit au développement de nouvelles technologies de l'environnement qui ont pour objectif de détruire les composés xénobiotiques plutôt que de les accumuler dans les décharges. La bioremédiation est une option qui offre la possibilité de détruire ou de rendre moins toxiques les polluants, en utilisant des activités biologiques naturelles. Les microorganismes sont utilisés depuis environ un siècle pour le traitement des eaux usées et des composts. Ce qui est nouveau c'est l'utilisation de ce procédé microbiologique pour nettoyer les sols, les eaux souterraines, les estuaires etc. Les systèmes sont différents en raison de la nature du polluant et du milieu où se déroule la dégradation. Les sites sont fréquemment contaminés par un mélange de composés organiques très complexes comme par exemples les huiles minérales ou les solvants industriels. A cela s'ajoutent des polluants inorganiques comme les métaux lourds.

Les traitements *in situ* s'imposent dans les cas où les polluants ont pénétré profondément dans les sols, et sont répartis sur des surfaces importantes, rendant l'excavation trop coûteuse. Ces traitements visent à activer les processus de biodégradation et à améliorer l'accessibilité des micro-organismes à l'oxygène (Audet et Charest, 2007a).

Les traitements *ex situ* peuvent être utilisés dans le cas où les contaminants n'ont pas pénétré trop profondément, les sols peuvent alors être excavés puis traités, soit en réacteur ou bioslurry (Dubourguier, 2000), soit par compostage (Sharma *et al.*, 2002), soit par bio terre ou landfarming (Mougin *et al.*, 1996). L'utilisation de ces procédés hors site permet la plupart du temps une réduction des durées de traitement (Ademe, 2004).

9-1-1- Mycoremédiation

La mycoremédiation prône l'utilisation de champignons possédant les capacités enzymatiques pour dégrader certains polluants retrouvés sur des sites miniers, des sols contaminés par un surplus de pesticides ou d'engrais chimiques et dans les procédés de traitements des effluents industriels (Khan, 2006). De nombreux travaux se sont intéressés à cette mycoremédiation (Tableau V).

Pour ce faire, il est possible d'utiliser le mycélium entier, ou de procéder à l'isolement de l'enzyme fongique d'intérêt. Aussi, la mycoremédiation peut se présenter comme une forme optimisée de la

phyto-rémediation puisqu'elle prend en compte, non seulement les plantes, mais aussi les microorganismes fongiques du sol avec lesquelles elles vivent. La myco-rémediation préconise, entre autres, l'utilisation de plantes colonisées par des champignons mycorhiziens tolérants aux contaminants en question pour la végétalisation de sites perturbés par des contaminants de toutes sortes (Khan, 2006).

Tableau V : Synthèse de certains travaux antérieurs réalisés

Référence	Etudes antérieurs	Date de réalisation
Mohammadian et al.	Tolerance to heavy metals in filamentous fungi isolated from contaminated mining soils in the Zanzan Province, Iran	2017
Vendruscolo et al.	Biosorption of hexavalent chromium by microorganisms	2016
Shukla et al.	Role of Trichoderma Species in Bioremediation Process: Biosorption Studies on Hexavalent Chromium	2014
Kurniati1 et al.	Potential bioremediation of mercury-contaminated substrate using filamentous fungi isolated from forest soil	2014
Akhtar et al.	Metal tolerance potential of filamentous fungi isolated from soils irrigated with untreated municipal effluent	2013
Belouchrani et al.	Contribution à l'étude de l'effet des micro-organismes dans la bioremediation d'un sol pollué par le zinc	2013

Les microorganismes utilisés en myco-rémediation proviennent de milieux très variés et peuvent vivre dans des conditions extrêmes : des températures en dessous de 0°C ou au contraire, très élevées, dans des milieux inondés ou en plein désert, en présence d'un excès d'oxygène ou milieu anaérobie. En raison de leur pouvoir d'adaptation, ces microorganismes sont utilisés pour éliminer les composés xénobiotiques. Parmi les bactéries aérobies reconnues pour leur pouvoir de dégradation, plusieurs genres tels *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas* et *Mycobacterium*, utilisés pour dégrader les pesticides, les hydrocarbures, les alcanes et les composés polyaromatiques. Le polluant est donc utilisé comme source de carbone et d'énergie (Khan, 2006).

Les microorganismes telluriques saprophytes sont capables de se nourrir de matière organique morte en mobilisant le carbone et l'azote à partir de composés complexes (cellulose, hémicellulose et lignine).

Un grand nombre d'espèces présentes appartiennent à des groupes écologiques inconnus, généralement des Ascomycètes, pouvant être des champignons endophytes ou des agents de

bleuissement (Rajala *et al.*, 2012). La plupart des endophytes, déjà présents au sein des arbres vivants, pourraient évoluer du statut d'endophytes latents vers saprophytes à la mort de l'hôte (Menkis *et al.*, 2004; Parfitt *et al.*, 2010).

9-1-2- Champignons telluriques saprotrophes

L'effet des métaux lourds sur les champignons est présent au niveau de la croissance, de la reproduction, de l'activité biochimique et de la morphologie. Les effets biochimiques se manifestent par l'inhibition de l'activité de certaines enzymes de respiration des cellules et de synthèse d'ARN et des protéines. En général, les doses élevées des métaux lourds diminuent le taux de croissance et la biomasse produite (Gadd, 2000). Cependant, dans certaines circonstances ils peuvent stimuler l'activité des champignons. L'excès de métaux lourds se traduit au niveau des populations par des changements de la microflore et la réduction du nombre de micro – organismes. D'une part les composés métalliques agissent sur la microflore du sol, d'autre part les micro-organismes peuvent agir avec les métaux présents dans le sol (Gadd, 2000).

L'absorption des métaux lourds par les champignons est conditionnée par de nombreux facteurs physico-chimiques tels que le PH, la température, la matière organique, la nature des cations et des anions (Peijnenburg *et al.*, 2007). La forme chimique du polluant, sa concentration, ses interactions possibles avec d'autres éléments constituent des paramètres essentiels déterminants l'interaction entre les métaux lourds et les champignons. L'absorption et la précipitation dépendent aussi de l'âge de la souche. Ceci est dû à la différence de composition moléculaire de la paroi entre une souche jeune et une souche âgée.

Les champignons absorbent des métaux en deux phases, active et passive, dépendant ou indépendant du métabolisme (Gadd, 2000). L'accumulation active dépendante des réactions métaboliques, peut parfois largement excéder les phénomènes d'adsorption physicochimique.

La fixation directe de métaux par les champignons se produit dans certains cas au niveau des parois. La paroi des champignons filamenteux est constituée d'une série de couches de biopolymères glucidiques comme la chitine, le chitosane, les glycanes, les polyuronides, les mannanes, les celluloses ... (Amini *et al.*, 2008). Ceux-ci portent de nombreux groupements anioniques, véritables pièges des cations métalliques même lorsque ces champignons sont morts. Dans ce cas, les champignons morts sont insensibles à la toxicité des polluants.

Pour détoxifier les sites pollués par les champignons, deux mécanismes peuvent être mis en évidence, l'adsorption par des biomasses mortes ou l'accumulation par des champignons vivants (Kayalto, 2009).

La bioaccumulation par des champignons vivants est un système auto renouvelable par la croissance de ces micro-organismes. Dans ce système, les métaux sont immobilisés par la modification chimique, par le transport intracellulaire, à l'aide de la dégradation enzymatique des composés organométalliques ou encore par la synergie de plusieurs micro-organismes. Mais il est nécessaire d'utiliser des souches résistantes et nourrir ces champignons. Certains produits secondaires du métabolisme peuvent nuire à l'épuration ou à la solubilisation des métaux (Davranche *et al.*, 2013).

La biosorption ou l'accumulation des métaux lourds par des biomasses mortes est un système facile à modéliser, rapide, sans contraintes physiologiques, indépendant de la température et insensible à la toxicité. Un tel système n'a pas besoin de nutrition mais sa capacité de récupération des métaux est limitée (Amini *et al.*, 2008). Dans certain cas, la quantité des métaux accumulée à la surface de la cellule est plus importante chez les organismes morts que chez les vivants. Ceci peut être dû à l'effet toxique des métaux sur les organismes vivants (Davranche *et al.*, 2013).

Présentation de la Région
Casablanca - Settat

I. Espace régional Casablanca-Settat

1- Cadre administratif

La région de Casablanca-Settat s'étend sur une superficie de 19 448 km² et compte 6.862 milliers d'habitants (Recensement Général de la Population et de l'Habitat, 2014), soit une densité de 353 habitants au km² et une superficie de 2,7% du Territoire National. Elle est limitée au Nord-Est par la région de Rabat-Salé-Kénitra, à l'Est par la région de Beni Mellal-Khénifra, au Sud par la région de Marrakech-Safi et au Nord et à l'Ouest par l'Océan Atlantique (Figure 5). La région compte deux préfectures Casablanca et Mohammedia et sept provinces, dont Settat, El Jadida, Ben Slimane, Mediouna, Nouaceur, Berrechid, et Sidi Bennour. 29 communes urbaines et 124 rurales, soit 10 % de l'ensemble des communes à l'échelon national.

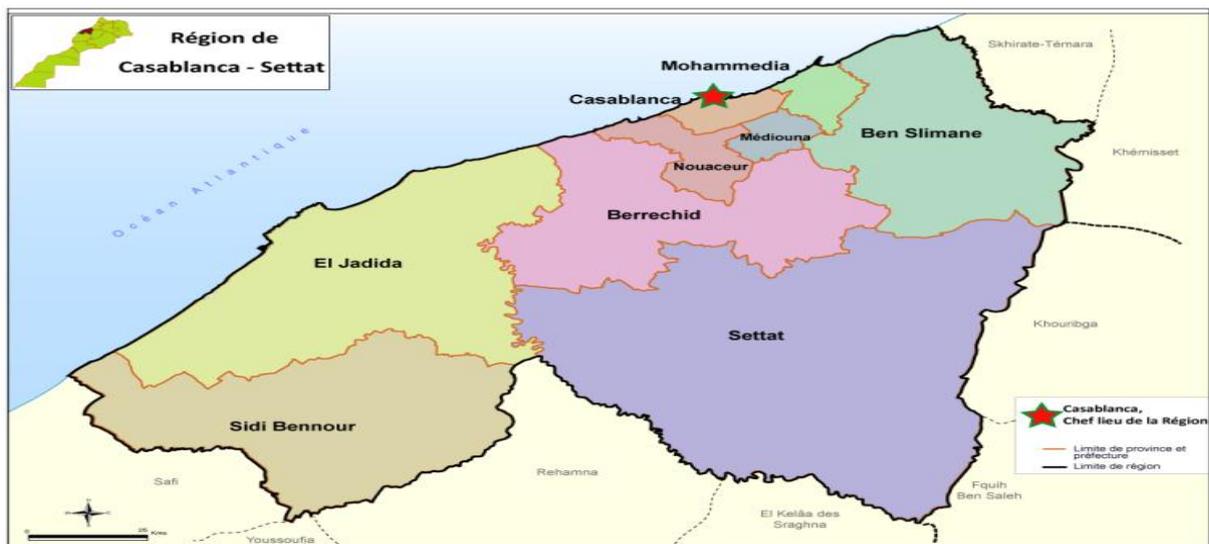


Figure 5. Provinces et préfectures de la région Casablanca-Settat (Ministère de l'Urbanisme et de l'Aménagement du Territoire).

2- Cadre géographique général

La région de Casablanca-Settat fait partie du domaine atlantique, caractérisé par un cadre géographique très varié composé de 3 zones naturelles (Recensement Général de la Population et de l'Habitat, 2014):

- La mer avec le littoral, qui s'étend sur 235 km environ.
- Le relief se compose de plaines et de plateaux avec de petites collines éparpillées dans le territoire limitrophe aux villes de Casablanca et d'El Jadida
- Le Sahel, constitué d'une alternance de dépression et de dunes consolidées. Il fait partie du domaine semi-aride.

Le sol de la région est diversifié (Figure 6), il est de type tirs dans la majeure partie de l'espace rural et sableux dans la zone littorale. Il s'agit de sols de haute capacité de rétention d'eau et d'humidité apportée par la masse océanique.

Les cours d'eau de la région sont composés de l'Oued Oum Rbia qui traverse la zone Sud-Est et Nord-Ouest, des rivières de faible importance dont les principales sont Oued El Maleh qui se déverse près de la ville de Mohammedia et Oued Hassar qui traverse la Commune d'Echallalate. Trois barrages y ont été installés au niveau de l'Oued Oum Rbia (Imfout, Daouart et sidi Mâachou) pour produire l'électricité et alimenter en eau les terres irriguées des plaines des Doukkala et des Abda.

La région dispose également, de ressources en eau souterraines à différentes profondeurs qui lui permettent de subvenir aux besoins de l'irrigation et qui constituent potentiellement un atout important pour son développement socio-économique.

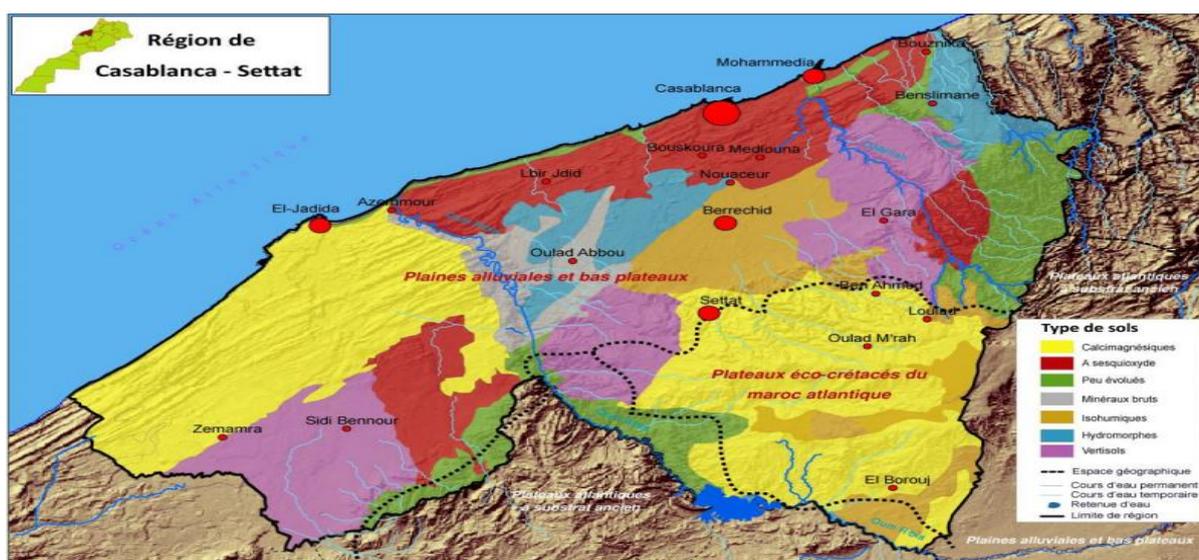


Figure 6. Types de sols de la région (Haut-Commissariat aux Eaux et Forêts et à la Lutte contre la Désertification, 2013)

Atlantique Casablanca et Côtier Atlantique Safi-El Jadida ; formés par plusieurs sous bassins versants avec des apports d'origine pluvionivale. Cette région dispose, également, de 7 grands et moyens barrages. Il s'agit des retenues d'El Massira (2,8 milliards m³), d'Imfout (18 millions m³), de Daourat (9,5 millions m³), d'EI Malleh (5 millions m³), de Kwacem Aval (3 millions m³) de Sidi Sâid Ben Maâchou (2 millions m³) et d'Oued Aricha (1,8 millions m³). L'eau de ces ouvrages est utilisée pour l'alimentation en eau potable des populations urbaines et rurales, ainsi que pour l'irrigation. En plus de ces infrastructures hydrauliques, la région dispose de 20 petits barrages, dont l'apport global est de l'ordre de 16 millions de m³ (Figure 8).

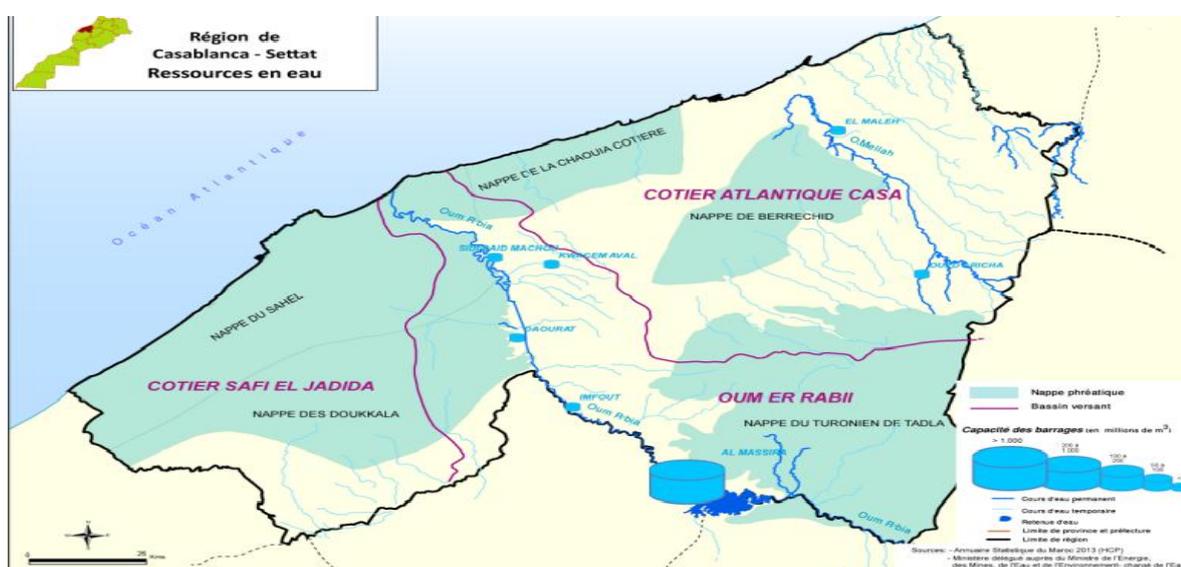


Figure 8. Ressources en eaux de la région (Office National de l'Electricité et de l'Eau Potable, 2013)

4-2- Les eaux souterraines

Les réservoirs d'eau souterraine dans lesquels s'accumulent ou transitent les eaux pluviales infiltrées sont d'extension inégale. Les plus importants sont :

- La nappe de Berrechid d'une superficie totale de 1 500 km², se caractérise par de faibles profondeurs, variant entre 10 et 20 m et des débits continus, allant jusqu'à 30 L/s. Cette nappe est fortement exploitée (puits et forages) pour l'alimentation en eau potable, pour l'irrigation des terres agricoles et pour la satisfaction des besoins industriels,

- La nappe des Doukkalas s'étendant sur 3 250 km² sous la plaine des Doukkala au pied du massif de Rhamna. Cette nappe présente des potentialités très limitées en raison de la discontinuité et de l'hétérogénéité des formations aquifères,
- La nappe du Sahel s'étendant sur une bande étroite de 3 100 km² longeant l'océan atlantique. Cette nappe est rechargée à partir des infiltrations directes des eaux de pluie et l'écoulement de l'eau souterraine se fait en direction de l'océan. La qualité de l'eau de cette nappe est globalement moyenne à mauvaise dans certains secteurs,
- La nappe de la Chaouia côtière s'étendant sur 1 200 km² de la bande littorale et large de 20 km, cette nappe est comprise entre Casablanca et Azemmour. Elle se caractérise par de très faibles niveaux piézométriques, variant entre 8 et 20 m, des perméabilités moyennes à faibles sur l'ensemble de son étendue et des débits par ouvrage ne dépassant généralement pas 4 L/s présentant un potentiel de 52 millions de m³. La nappe de la Chaouia s'étend à l'Ouest de l'oued Bouskoura sur 65 km le long de la côte sur une profondeur d'un peu plus de 15 km,
- La nappe du toronien de Tadla, d'une superficie totale d'environ 10 000 km², s'étend sur le plateau des Phosphates, la plaine du Tadla et la plaine de la Tassaout Avale. La région ne bénéficie que de la partie inférieure de cette nappe (20%). Sa productivité croît du Nord vers le Sud, avec des profondeurs des niveaux d'eau variables entre 180 et 400m.

II. Présentation du milieu d'étude : Ville de Settat

1- Situation géographique

La ville de Settat se situe au centre du Maroc, à une distance de 70 Km au sud de Casablanca, sur un axe routier très important formant le carrefour entre le nord-sud et l'Est-Ouest. Sa superficie occupe 10000 Km², elle est limitée à l'Ouest par Oued Oum Er Rbia, au nord-ouest par Benslimane et Casablanca et au sud-est par la ville de Khouribga et l'est l'océan atlantique (El Aslouj *et al.*, 2007).

2- Situation géologique

La ville de Settat est implantée sur le *Plateau de Settat*, formé par des roches sédimentaires sur lesquelles vient se superposer la couverture quaternaire récente. La plaine de Berrechid se caractérise par des affleurements de limons argileux quaternaires ou de grès calcaires pliocènes. Le plateau de Settat se situe dans une cuvette d'âge cénomanien. Les formations marno-calcaires du cénomanien qui affleurent largement sur le plateau de Settat, disposent d'une nappe de faible extension participant en partie à l'alimentation de la nappe plioquaternaire de Berrechid (El Aslouj *et al.*, 2007).

Les limons forment la quasi-totalité du recouvrement de la région. Leur rôle hydrogéologique est donc très important, du fait qu'ils mettent en charge localement la nappe de formations sablo-gréseuses du plioquaternaire. Cependant, l'existence d'une nappe libre dans la grande partie de la plaine de Berrechid implique une alimentation de celle-ci à partir des infiltrations du réseau de surface, voire localement une perméabilité verticale non négligeable des limons de recouvrement (El Aslouj *et al.*, 2007).

3- Stratigraphie

Les terrains qui affleurent largement dans la région s'étagent du crétacé au pliocène et sont surmontés par une couverture du quaternaire récente. Selon El Aslouj *et al.*, 2007 et l'Office National de l'Eau Potable (2005), le plateau de Settat est formé par les formations suivantes (Figure 9):

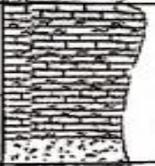
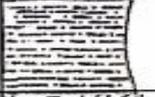
Age		Epaisseur (m)	Description des faciès	Perméabilité
Quaternaire		5 à 50	Limons noirs recouvrent des argiles limoneux rouges à galets et garviers	Bonne
Tertiaire		0 à 50	conglomérats et lumachelles, rcouverts de calcaires détritiques dunaires	Bonne à moyenne
Cénomanien		50 à 100	Sables, gès et argiles sableuses, surmontées par des calcaires dolomitiques interstratifiés de marnes	Moyenne
Infracénomanien		50	Argiles rougeâtres riches en gypse	Mauvaise
Primaire		milliers	Prédominance de schistes, mais aussi grès et quartzites	Faible

Figure 9. Colonne stratigraphique des formations géologiques du plateau de Settat (O.N.E.P,2005)

Le primaire, visible en bordure, est de nature à prédominance schisteuse, mais il est présent aussi sous forme de grès et de quartzites. Il constitue le socle du bassin et se situe souvent à forte profondeur,

Le secondaire, cet étage est représenté par le trias et le crétacé, qui forment le substratum quasi continu de l'aquifère phréatique, ce dernier se forme essentiellement par le :

- Trais, formation qui se distingue par une accumulation des dépôts effectués au cours des mouvements de nature détritique et argilo-salifère,
- Infra-cénomaniens, formation qui se trouve au nord de la ville de Settat, elle est caractérisée par l'existence des roches calcaires et marno-calcaires,
- Cénomaniens, ces roches se distinguent facilement sur le plateau de Settat-Ben Ahmed où elles forment parfois des reliefs de calcaire durs,

Le tertiaire : Le pliocène est transgressif et n'apparaît que là où la mer s'est avancée vers le sud jusqu'à la falaise du plateau de Settat-Ben Ahmed. A bas des dépôts se trouve un conglomérat des sables calcaires et des calcaires détritiques,

Le quaternaire, formé par du limon, d'argiles, des alluvions et de lentilles des agglomérats, a une épaisseur très variable de quelques cm à 50 m. Ces terrains ont une bonne perméabilité permettant ainsi l'alimentation des nappes sous-jacentes.

4- Climatologie

4-1- Précipitation

La valeur moyenne de la pluviométrie de la province de Settat durant ces 30 dernières années est de 326 mm, avec un maximum de 602 mm et un minimum de 146.9 mm (DPA Settat, 2005). Ces précipitations sont inégalement distribuées suivant les mois de l'année, environ 90% des pluies tombent entre novembre et avril. La période sèche s'étale sur six mois allant de mai à octobre.

4-2- Température

Contrairement à la pluviométrie, la température ne présente pas une grande variabilité, la valeur moyenne est de l'ordre de 20°C. La ville de Settat est caractérisée par un été chaud ayant une température maximale de l'ordre de 38°C enregistré au mois d'août, et un hiver froid avec une température minimale de l'ordre de 5°C enregistrée au mois de janvier.

4-3- Evapotranspiration

Les fortes températures dans la région occasionnent une évaporation et une évapotranspiration importante pendant l'été, ce qui entraîne des déficits hydriques considérables. L'évapotranspiration est élevée dans la région et ne varie pas beaucoup d'une année à l'autre (DPA de Settat, 2005). Les valeurs les plus élevées sont enregistrées en mois d'août et les plus faibles au mois de janvier.

5- Pédologie

Les sols qui constituent le plateau de Settat sont essentiellement des dépôts de quaternaire. Ces dépôts montrent une grande hétérogénéité en fonction de leur texture et de leur teneur en calcaire (ONEP, 2005).

Selon la direction provinciale d'Agriculture (2005), les types de sols qui existent dans la région sont :

- Les terres argileuses noires (Tirs), sont dispersées et représentent la majorité des sols de la région, où l'argile domine,
- Les terres sablonneuses (Hamri), il s'agit de terres silico-argileuses de couleur rouge due à la présence de silicate de fer, elles sont très fertiles.
- Les Dehs sont des terres d'alluvions de couleur souvent grisâtre, elles sont également profondes.

D'après l'étude de Barrani *et al.* (2015), qui s'intéresse à la caractérisation des sols de la région de Settat, il a été démontré que la conductivité électrique (CE) est comprise entre 1.1 et 1.5 mmhos/cm, la valeur de la matière organique (MO) est entre 2 et 3.5 %, la capacité d'échange cationique (CEC) est supérieure à 25 meq/100g de sol, le calcaire actif est de l'ordre de 9% avec un taux de Potassium (K), de Calcium (Ca) et de Magnésium (Mg) de 389.9 ppm, 2990 ppm et 3000 ppm respectivement.

6- Hydrologie

L'hydrologie de la ville de Settat est caractérisée par l'existence d'un cours d'eau superficiel : Oued Boumoussa et un plateau qui représente la seule nappe de la région (IRATE, 2004).

6-1- Les eaux de surface

Représentées principalement par :

L'Oued Boumoussa, à caractère intermittent et à faible débit, il prend sa naissance en amont dans le plateau de Settat et vient se dessécher à son aval dans la plaine de Berrechid. Il a une taille relativement modeste, il s'écoule sur un trajet de 25 Km environ du sud de la ville de Settat, et constitue le lieu des rejets d'évacuation des eaux pluviales et des eaux usées industrielles prétraitées de la ville de Settat,

Deux sources, Ain Settat avec un débit moyen de 33 L/s et Ain Nezagh avec un débit de 16 L/s, sont exploitées pour l'alimentation en eau potable de la ville de Settat (ONEP, 2005).

6-2- Les eaux souterraines

Le plateau de Settat représente la source en eau la plus importante dans la région. Il est essentiellement constitué par des formations calcaires et marno-calcaires de faible extension, et alimente en partie la nappe plio-quadernaire de Berrechid (El Aslouj, 2007). Cette nappe se caractérise au fond de la cuvette de Settat par un faible niveau hydrostatique qui est à l'origine d'une pollution permanente. Les apports de cet aquifère proviennent des infiltrations d'une partie des eaux pluviales, des infiltrations partielles des eaux crues de l'Oued Boumoussa et des retours des eaux d'irrigation à la nappe.

L'alimentation de la nappe ainsi que le sens d'écoulement, se font généralement du Sud vers le Nord. La profondeur décroît du sud (30 à 50 m au pied du plateau de Settat) vers le nord (10 à 15 m à Berrechid et 5 à 10 m au Nord de Berrechid à Médiouna).

7- Activité agricole

Dénommée le grenier du Maroc, Settat est réputée par ses vastes plaines agricoles. La superficie utile en agriculture dans la région de Settat est de l'ordre de 944.562 hectares dont les deux tiers de cette superficie se localisent dans la province de Settat. Parallèlement à l'agriculture, la majorité des riverains pratiquent l'élevage intensif des ovins (1 950 354 espèces), des bovins (219 405 espèces) et des caprins (100 859 espèces) (DPA de Settat, 2005).

8- Activité industrielle

L'industrialisation de la ville de Settat a débuté à partir des années 90. Elle a représenté 3% de l'effectif des unités industrielles à l'échelle nationale en 2001 (IRATE, 2004). Cette industrialisation a permis à la ville un nouvel essor socio-économique. Néanmoins, les effets négatifs se sont faits sur le plan environnemental (RADEEC, 2009). La zone industrielle a vu son expansion au cours des années (Tableau VI)

Tableau VI. Caractéristiques de la Zone Industrielle de Settat (RADEEC, 2009)

Zone Industrielle de Settat (1 ^{ère} tranche)	
Date de création	1983
Localisation	Ville de Settat
Aménagement	C.D.G
Zone Industrielle de Settat (2 ^{ème} tranche)	
Date de création	1995
Localisation	Ville de Settat
Superficie totale brute	20 Ha
Aménageur	Municipalité de Settat

La régie autonome de distribution de l'eau et d'électricité de la Chaouia a indiqué qu'il existait dans la ville, des industries générant des effluents liquides contenant des métaux lourds tels que les industries de teintures et de délavage de jeans, de fabrication de verre cristal, de tanneries, d'électronique, de fabrication de cous en fer, de plastique, de cassettes audios, de panneaux solaires et de sanitaire et émaillage. (RADEEC, Rapport Annuel de Gestion de l'année 2005).

Elle a mené une enquête en 2018 pour l'identification du potentiel polluant des industries existant actuellement dans la ville de Settat. L'enquête a révélé que les rejets et leurs constituants sont nuisibles pour l'environnement (Tableau VII) (RADEEC, Rapport Annuel de Gestion de l'année 2018).

**Tableau VII. Etat d'avancement du projet de dépollution industrielle
dans la Zone Industrielle de Settât au 31/12/2018**

Société	Procédés Industriels	Protocole de partenariat	Ouvrage de prétraitement
BELDINDE	Abattage des volailles	Signé le 23/04/2011	Actuellement : Dégrillage et Déplumeuse (Tamisage et récupération des refus), séparateur de graisses Rejets non conformes
INDUSALIM	Margarine	Signé le 07/05/2011	Actuellement : Séparation d'huiles et graisses par décantation (à améliorer pour traiter les matières en suspension) Rejets non conformes
SOFADEX	Margarine	Signé le 27/12/2010	Actuellement : Compartiment de refroidissement et dégrillage des graisses (à améliorer et diminuer la conductivité). Rejets non conformes
BOYAUDERIE ATLANTIQUE	Peaux pour saucisson	Signé le 22/12/2010	Actuellement : Décantation et tamisage (Traitement des Boyaux à sec) Restant : Conductivité élevée, à installer un système de prétraitement adéquat Rejets non conformes
SETTAVEX	Lavage et teinture de coton	En cours	Actuellement : Analyses Physico-chimiques sont mises en service depuis 2007 (abattement DBO conforme), Réhabilitation de la STEP en cours avec installation de récupérateurs de soude. Rejets non conformes
SANITAIRE ROCA	Sanitaire en céramique et porcelaine	Signé le 20/06/2014	Actuellement : Station de prétraitement complète (dégrillage, tamisage, décantation et récupération des matières en suspension) + bassins tampon.
BOYAUDERIE CHAOUIA	Peaux pour saucisson	Signé le 13/07/2012	Actuellement : Décantation et tamisage Restant : Installation d'un système de prétraitement adéquat. Rejets non conformes
OJO INDUSTRIE	Production de boissons gazeuses	Signé le 30/03/2017	Actuellement : Bassin d'homogénéisation Restant : Vérification de la qualité des rejets par analyses durant la saison d'activité.

Matériel et Méthodes

I. Matériel d'étude

1- Localisation des points de prélèvement

Dans le cadre de cette étude, les quatre points choisis sont tous irrigués par les eaux de l'Oued Boumoussa, mais à différentes distances par rapport à la zone industrielle (Tableau VIII, Figure 10). En raison de l'aménagement de la régie des eaux, qui a actuellement couvert une partie de l'Oued au centre de la ville, des points A, B, C et D à distance accessible sont choisis.

- Le point **A**, localisé en amont de la zone industrielle (ZI), ou aucun rejet n'est déversé à ce niveau
- Les deux points **B** et **D** sont retrouvés en aval de la ZI, directement en contact avec les eaux de l'Oued,
- Le point **C**, situé au niveau d'un champ agricole, en aval de la ZI et irrigué par les eaux de l'oued.

Tableau VIII. Localisation des points étudiés

Points	Latitude (N)	Longitude (W)	Altitude (m)	Distance (Km) / Zone industrielle
A	33°0.857'N	7°36.974'W	386	2.1 en amont
B	33°0.857'N	7°37.412'W	344	4.6 en aval
C	33°0.234'N	7° 37.485'W	339	6.1 en aval
D	33°3.828'N	7°37.548'W	284	10 en aval

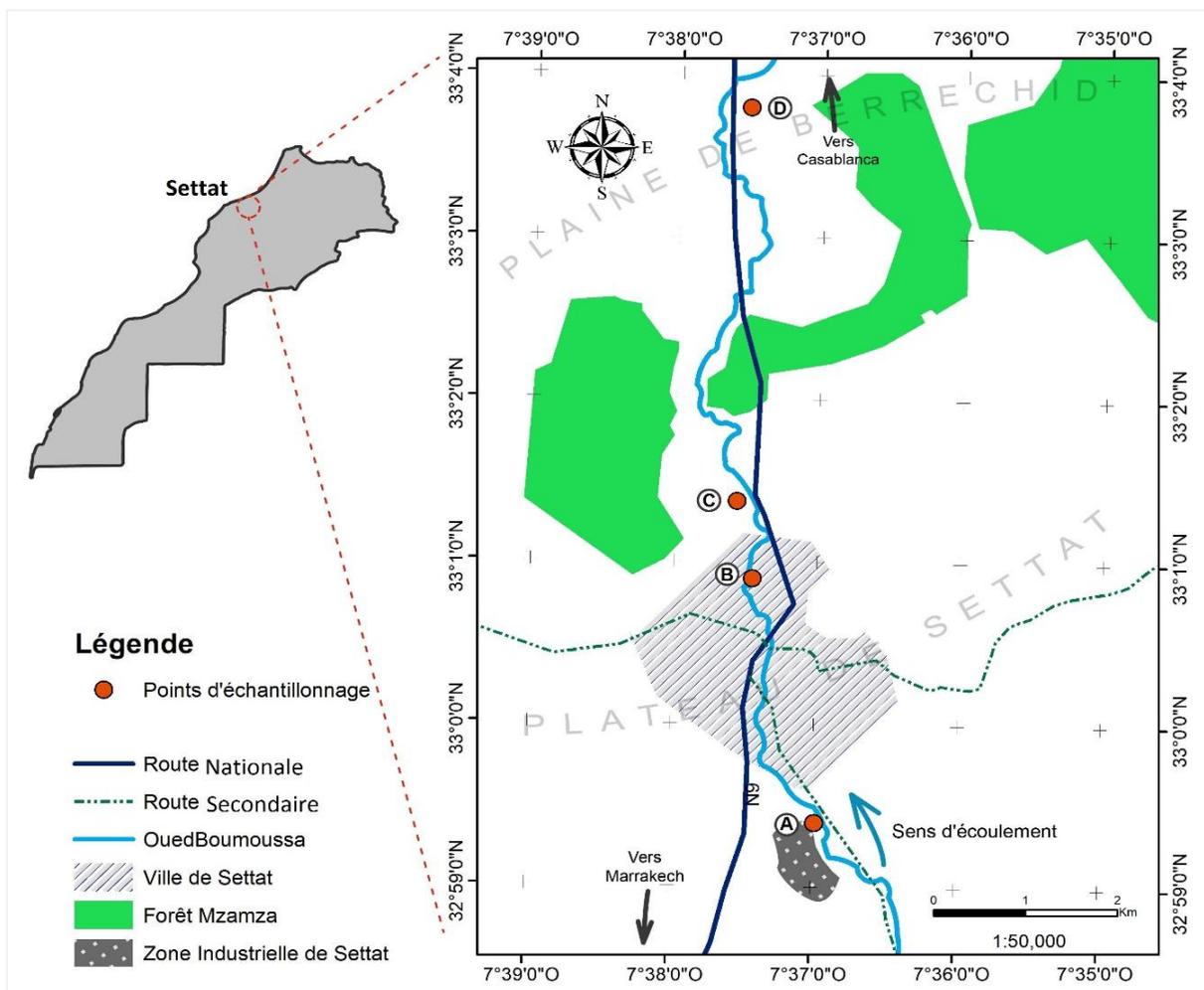


Figure 10. Localisation géographique des points de prélèvement



Point A



Point B



Point C



Point D

Figure 11. Iconographies des lieux relatifs aux points de prélèvement

2- Echantillons des sols

L'étude sur le sol rentre dans la thématique du laboratoire (environnement), la région de Settat est une région que se repose principalement sur l'activité agricole, il a été nécessaire de s'intéresser à la pollution des sols et aux alternatives inoffensifs pour le dépolluer.

L'échantillonnage de sols est réalisé pendant la saison hivernale, en Janvier 2015. Chaque point de prélèvement a été subdivisé en deux petites zones perpendiculaires au sens d'irrigation des eaux de l'Oued. Un échantillon composite d'une quantité significative (3 à 5 Kg) de chaque point a été prélevé en zigzag à une profondeur de 5 cm, la charge et la capacité des microorganismes change en fonction de la profondeur (Barsoti, 2011), à l'aide d'une tarière hélicoïdale et mis dans des sachets. Les échantillons de sols sont acheminés directement au laboratoire et conservés à 5°C (Iskandar *et al.*, 2011).

Au niveau de la région, la majorité des surfaces sont irriguées par les eaux de l'Oued, il a été nécessaire de choisir un sol provenant de l'extérieur de la région, non irrigué par ces eaux et non contaminé au Pb et Cu.

Un échantillon de sol Témoin indemne de toute contamination métallique est prélevé au niveau d'un champ agricole de la région de Marrakech. Les sols sont de nature argileuse à raison de 47% pour les sols de la région (Kao *et al.* 2007) et 51% pour le sol témoin (Mrabet *et al.* 2008).

3- Métaux étudiés

Les travaux d'El Aslouj *et al.* (2007) et de Matech *et al.* (2014) ont montré que le Plomb (Pb) et le Cuivre (Cu) représentent respectivement des concentrations de 341.50 ppm et 712.05 ppm, comparativement aux autres métaux retrouvés dans les sols de la région de Settat. Le Pb et le Cu sont utilisés sous forme de nitrate de Plomb [Pb (NO₃)₂] et de nitrate de Cuivre [Cu (NO₃)₂. H₂O] pour leurs capacités d'homogénéisation, de solubilisation et de gélification dans les milieux de culture solides utilisés (El Baz, 2017).

4- Milieux de culture

Différents milieux de culture sont utilisés pour l'isolement, la purification et la conservation des isolats fongiques présents dans les échantillons de sols prélevés :

Le milieu gélosé Rose Bengal Chloramphénicol (RBA) favorise la croissance des levures et des champignons filamenteux à croissance lente (Smith *et al.*, 2000).

Sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA), les souches isolées sont purifiées (Mouria *et al.*, 2013).

Les milieux spécifiques Malt Agar (MA) et Malt Yeast Glucose Peptone (MYGP) permettent de solubiliser les nitrates de Plomb et de Cuivre utilisés (Zapotoczny *et al.*, 2007).

II. Méthodes d'étude

1- Mesure de certains paramètres physico-chimiques des sols

1-1- PH

La mesure du PH des échantillons de sol est effectuée selon la norme NF X31-103 et celle de l'humidité est évaluée selon la norme NF X31-101. Une quantité de 10g de chaque échantillon de sol est mise en solution dans 25 mL d'eau distillée. Après agitation magnétique pendant 60 min à $20 \pm 2^\circ\text{C}$, pour un équilibre entre la phase solide et la phase liquide, suivie d'un repos de 2h à l'abri de la lumière, ainsi le PH de la suspension est mesuré.

1-2- Température

L'échantillonnage des sols est réalisé pendant la saison hivernale, en Janvier 2015. La température externe est mesurée.

1-3- Humidité

Les échantillons de sol sont séchés dans une enceinte climatique à 40°C pendant une période au-delà de laquelle la masse reste constante. La teneur en humidité (%) notée H_{40} est exprimée par la relation suivante :

$$H_{40} = \left[\frac{(m_0 - m_1)}{m_0} \right] 100$$

m : Masse (g) de l'échantillon de sol.
m₀ : Avant séchage.
m₁ : Après séchage.

2- Analyse des teneurs en Pb et en Cu au niveau des sols

2-1- Prétraitement des échantillons de sol

Les échantillons de sol prélevés au niveau des points A, B, C, D ainsi que l'échantillon Témoin sont séchés à 40°C pendant trois jours, écrasés au mortier en porcelaine, puis passés à travers un tamiseur mécanique composé d'une colonne de 6 tamis de porosité décroissante, afin d'obtenir un échantillon homogène composé de particules de 2 mm de diamètre (Norme NF X31-101).

2-2- Dosage par ICP-AES (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry)

Les échantillons de sol sont minéralisés par digestion acide à l'eau régale. Chaque échantillon a fait l'objet de 3 prises d'essai de $0,5 \pm 0,005$ g. Chaque prise est placée dans un erlenmeyer en verre où sont ajoutés 7,5 mL d'acide chlorhydrique (37% (m/m), de densité 1,19 g/mL) et 2,5 mL d'acide nitrique (65% (m/m), de densité 1,38 g/mL). Le mélange est fermé hermétiquement et laissé à température ambiante pendant 12h. Le minéralisat est ensuite concentré par ébullition pendant 2h. Après refroidissement, le concentré est filtré sur papier filtre et le volume obtenu est ajusté à 25 mL avec l'eau distillée (Norme NF X31-101). Les teneurs en Pb et en Cu sont dosées par ICP-AES (Annexe 9).

3- Isolement et Purification des isolats fongiques

A partir de chaque échantillon de sol, une solution mère est préparée à raison de 10g/100mL d'eau distillée stérile. Des dilutions décimales de 10^{-1} à 10^{-10} sont préparées. Un volume d'ensemencement de 1 ml de chaque dilution est mis en culture sur milieu RBA et incubé à $28 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 5 jours (Yazdani *et al.*, 2009 ; Iskandar *et al.*, 2011).

Après culture sur milieu gélosé RBA, chaque colonie est mise en culture sur milieu PDA à 28°C pendant 48h pour l'obtention de colonies de levures et après 7 jours d'incubation pour observer des colonies cotonneuses, caractéristiques des champignons filamenteux et où les spores sont produites (García-Delgado *et al.*, 2015).

Des suspensions de spores d'isolat filamenteux de 5 jours sont préparées par addition de 10mL d'eau tweenée (0.1%) puis stockées à 4°C jusqu'à leur utilisation (Botton *et al.*, 1990). Les colonies de levures

âgées de 48h, sont aseptiquement transférées sur gélose inclinée de Malt agar (MYGP) et incubées pendant 3 à 5 jours pour permettre une croissance maximale. Les cultures pures sont alors stockées à 4°C (Ul-Haq *et al.*, 2002). Pour une conservation à -20°C, les spores de filamenteux sont conservés dans du Glycérol (20%) additionné de Tween 80 (0.1%) (Botton *et al.*, 1990) et les levures sont conservées dans le milieu Glucose Yeast extract Peptone (GYP) additionné de Glycérol (20%) (Lehembre, 2012).

4- Identification et conservation des isolats

L'identification repose sur la description de critères morphologiques macroscopiques et microscopiques des isolats. Les colonies crémeuses de levures sont identifiées après 48h d'incubation tandis que l'identification de filamenteux est effectuée après 7 jours avec le développement de colonies cotonneuses.

Les critères physiologiques et biochimiques complètent l'identification des levures, telle la fermentation de 6 polyhydrates, l'assimilation de 25 composés carbonés et de 3 composés azotés (Pereira-Dias *et al.*, 2000). Des tests complémentaires telle l'hydrolyse de l'urée, l'acide acétique, le Diazoniumblue B et la croissance à différentes températures sont également effectués (Boudallaa *et al.*, 2018). L'exploitation de l'ensemble des tests effectués par le programme "Yeast Identification PC" permet une identification complète de la levure (Barnett *et al.*, 1998).

L'observation macroscopique des colonies des champignons filamenteux et la description microscopique de leur appareil reproducteur permettent de déterminer l'espèce fongique en question selon la clé d'identification de Botton *et al.* (1990).

5- Tolérance au Pb et au Cu

5-1- Mise en culture des isolats conservés

Les isolats conservés de filamenteux sont repiqués sur milieu MA et mis en incubation à 28 °C pendant 5 jours. Les souches de levures conservées sont mises en culture sur milieu MYGP à 28 °C pendant 2 jours.

5-2- Evaluation de la tolérance

Afin d'évaluer la tolérance des isolats vis-à-vis des deux métaux, des concentrations croissantes allant de 200 ppm à 1000 ppm de $[Pb (NO_3)_2]$ et de $[Cu (NO_3)_2 \cdot H_2O]$ sont préparées et incorporées chacune successivement dans les milieux gélosés MA et MYGP. Des cultures témoins (sans addition de métaux) sont préparées en parallèle (Valix et Loon, 2002 ; Chen *et al.*, 2017).

Les milieux sontensemencés avec un fragment de colonies âgé de 7 jours pour les filamenteux et 2 jours pour les levures puis mis en incubation à 28°C pendant 5 jours. Chaque culture a été réalisé en triplicata.

5-3- Calcul de l'indice de tolérance

La tolérance des levures est évaluée par la croissance ou l'absence de développement, tandis que la tolérance des filamenteux est évaluée par mesure du diamètre (cm) de croissance des colonies fongiques obtenues. Ainsi, le degré de tolérance a été exprimé en tant qu'Indice de Tolérance (IT) (Valix et Loon, 2002 ; Chen *et al.*, 2017) :

$$\text{Indice de Tolérance (IT)} = [\text{Diamètre de la souche} / \text{Diamètre du Témoin}]$$

Tableau IX. Evaluation de la Tolérance
(Valix et Loon, 2002)

Valeur de l'Indice de Tolérance	Evaluation de la croissance fongique en présence du métal
IT = 0	Croissance nulle, Intolérance fongique vis-à-vis du métal
IT < 1	Croissance réduite à cause de la présence du métal
IT = 1	Croissance similaire au témoin
IT > 1	Croissance fongique supérieure à celle du témoin

Un indice élevé révèle une bonne tolérance au métal ou une capacité de croissance importante à une concentration spécifique (Valix et Loon, 2002). L'absence de développement fongique révèle soit que l'isolat ne tolère pas le métal, soit qu'il le tolère mais à certaines concentrations.

6- Capacité de bioaccumulation

6-1- Evaluation qualitative de l'accumulation

Les cultures tolérants le Pb et/ou le Cu sont mises dans une jarre anaérobie en présence de Na₂S (1g) et de HCl (10mL) (El baz *et al.*, 2015). Le contact de ces deux composés chimiques permet le dégagement du gaz H₂S, qui, en réaction avec le métal, révèle une coloration noirâtre dans le milieu.

Le potentiel accumulateur de l'isolat est mis en évidence par la formation d'un halo clair autour de la colonie. En parallèle, une culture témoin de chaque isolat, en absence de métal est mise dans les mêmes conditions expérimentales (El baz *et al.*, 2015).

6-2- Evaluation quantitative de l'accumulation

Les isolats qui ont montré un potentiel d'accumulation suite à l'évaluation qualitative, ont fait l'objet d'une évaluation quantitative par ICP. Ces isolats sont mis en culture sur bouillon à base de pomme de terre après incubation à 27 ± 2 ° C pendant 3 jours pour les levures et après 7 jours pour les champignons filamenteux (Vadkertiová *et al.*, 2006 ; Al-Garni *et al.*, 2009).

La biomasse formée est filtrée puis lavée avec de l'eau distillée stérile. Une quantité de 0.1g de cette biomasse vivante est mise en contact avec 50ml de milieu de culture additionné de concentration métallique (50, 100, 200ppm) pendant 3h, 24h et 72h (Chen *et al.*, 2017). La suspension ainsi obtenue est incubée sous agitation (150 tr/min) (El baz *et al.*, 2015). Le surnageant obtenu après centrifugation (3500 tr / min / 10 min) est analysé par ICP.

La biomasse récupérée est séchée à 80°C jusqu'à poids constant (Dönmez et Aksu, 2001). Des solutions métalliques témoins sans inoculum sont préparées dans les mêmes conditions. La capacité de bioaccumulation q (exprimée en mg / g) est calculée selon l'équation suivante (Simonescu *et al.*, 2012) :

$$q = \frac{[(C_0 - C_f) \times V]}{M}$$

C₀ (mg/L) : concentration métallique initiale,

C_f (mg/L) : concentration métallique finale,

V (L) : volume de la solution,

M (g) : poids sec de la biomasse

7- Test de Biosorption

7-1- Préparation de la biomasse sèche

Les isolats présentant une accumulation qualitative et quantitative au métal sont inoculés dans le bouillon de pomme de terre et mises en incubation pendant 7 jours à 28 °C. La biomasse fongique obtenue est récupérée par centrifugation à 6000 tr / min /15 min. Les cellules récoltées sont lavées deux fois à l'eau distillée désionisée et séchées à 80 °C pendant 24 h (Dönmez et Aksu, 2001). L'échantillon séché est broyé à l'aide d'un mélangeur et passé à travers un tamis à mailles de 250 µm afin d'obtenir une taille de particule uniforme (Al-Garni *et al.*, 2009).

7-2- Biosorption

La biosorption de Pb (II) et de Cu (II) à partir d'une solution aqueuse a été étudiée à différentes concentrations (50, 100, 200 ppm) pendant un temps de contact avec le métal de 3h, 24h et 72h (El baz *et al.*, 2015). Les solutions de Pb (II) et de Cu (II) sont préparées dans de l'eau distillée. 0,1 g de la biomasse séchée est ajoutée à 50 mL de solution métallique et agitée sur un agitateur orbital à 125 tr / min à 25 °C ± 0,1. L'efficacité de la biomasse est étudiée dans les conditions optimales (cultures dans des erlenmeyers de 250 mL à 27 ± 1 ° C, PH = 7 ; vitesse d'agitation : 125 tr / min) (Al-Garni *et al.*, 2009 ; Bhainsa *et al.*, 2009).

Après centrifugation à 3600 tr / min / 10 min, le surnageant est analysé pour déterminer la concentration en ions métalliques résiduels. Toutes les expériences ont été effectuées en triple. La quantité d'ions métalliques adsorbés par gramme de biomasse est obtenue en utilisant l'équation suivante (Fan *et al.*, 2008) :

$$q_e = \frac{[(C_i - C_e) \times V]}{M}$$

q_e (mg/g) : Quantité d'ions métalliques biosorbés,
 C_i (mg/L) : Concentration initiale,
 C_e (mg/l) : concentration finale,
 V (L) : volume du milieu,
 M (g) : Quantité de biomasse utilisée

8- Test de Bioremédiation

L'expérimentation a porté sur six lots, codés R1 à R5, contenant 1.5 Kg du sol témoin indemne de toute pollution métallique, mis dans chacun cristallisoir en verre de 2.0 L. Une quantité de 1L d'une solution métallique préalablement préparée, composée de 200 ppm Pb (II) et de 200 ppm de Cu (II) est homogénéisée avec chaque lot. Les sols ainsi préparés sont recouverts d'un film alimentaire et incubés à température ambiante pendant 20 jours pour atteindre l'équilibre d'adsorption (Peng *et al.*, 2017). Les lots de sol sont remués quotidiennement.

Chaque lot est ensuiteensemencé avec 300 mL de suspensions fongiques (Fan *et al.*, 2012), contenant simultanément 10^5 UFC/mL de levures et 2.10^7 spores/mL de champignons filamenteux. Chaque suspension fongique est préparée à partir de levures et de spores des isolats d'un même point de prélèvement, qui montrent la meilleure capacité d'accumulation du Pb (II) et/ou du Cu (II) à une concentration donnée du métal et pendant le meilleur temps de contact déduit des expérimentations précédentes. Après ensemencement des lots de sol, un volume de 700 mL d'eau distillée stérile a est ajouté pour humidifier le sol (Fan *et al.*, 2012).

Ainsi, le lot R1 reçoit les isolats du point A ; le lot R₂, ceux du point B ; R₃, point C ; R₄, point D et le lot R₅ estensemencé avec la suspension fongique de tous les isolats (tous points confondus), montrant une bonne capacité d'accumulation. R₀ est le lot témoin, où aucun isolat n'est ajouté (Peng *et al.*, 2017). Les différents lots sont incubés dans un incubateur à 30 °C pendant une période de 50 jours (Chen *et al.*, 2017). Chaque expérimentation est répétée en triplicata.

Des échantillons de sol de chaque lot sont prélevés au temps T₀, après 14 jours d'incubation et au 50^{ème} jour et analysés par ICP-AES, pour doser la quantité des deux métaux restant dans le sol (Peng *et al.*, 2017).

9- Analyse statistique

Les essais sont effectués en triplicata. Les données obtenues sont analysées avec Analysis of Variance (ANOVA) en utilisant le logiciel de statistique pour les sciences sociales (SPSS) version 22.0. Les moyennes sont comparées par le test de différence honnêtement significative de Tukey (P <0,05).

Résultats et Discussion

Analyse des teneurs en Plomb et en Cuivre au niveau des sols

Mesure de certains paramètres physico-chimiques

Biodiversité fongique des sols

Screening des isolats

Evaluation de la Tolérance

Evaluation quantitative de l'accumulation

Test de Biosorption

Test de bioremédiation

I. Analyse des teneurs en Plomb et en Cuivre au niveau des sols

Les teneurs en Pb retrouvées dans tous les échantillons de sol étudiés (Figure 12) sont supérieures aux limites autorisées (27 ppm) (Kabata-Pendias, 2011). Contrairement au Pb, seule la teneur en Cu retrouvée au niveau du point B (126,5 ppm) a largement dépassé le seuil préconisé (38,90 ppm).

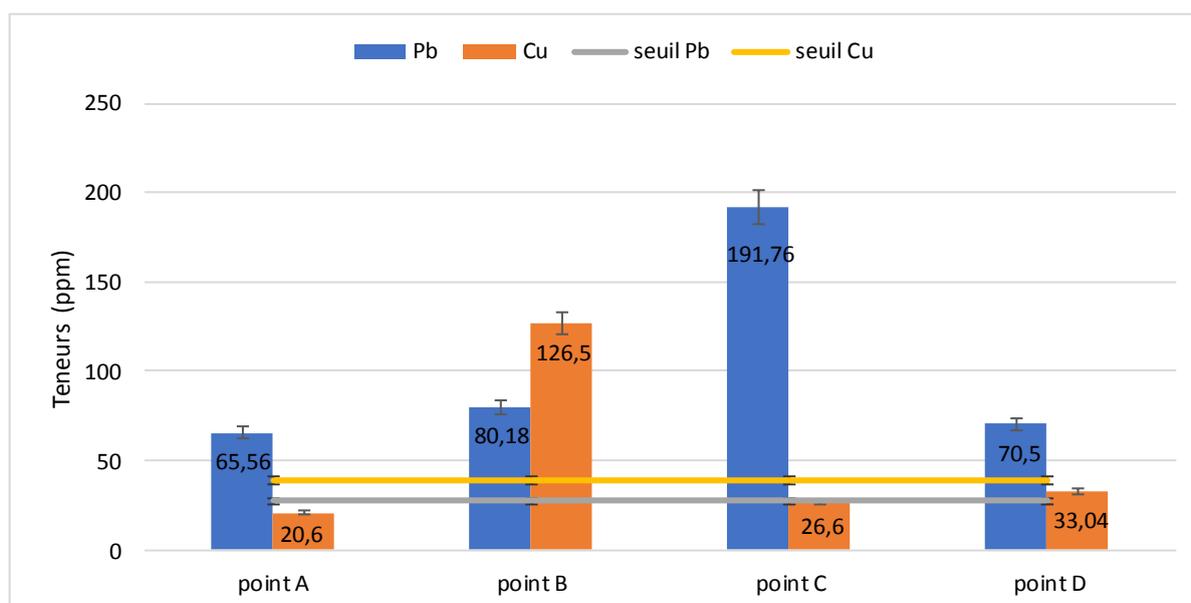


Figure 12. Teneurs en ppm du Pb et du Cu retrouvées dans les sols étudiés

Les teneurs de ces deux métaux varient de l'amont vers l'aval de l'Oued, du point A vers le point D. Les teneurs en Pb et en Cu retrouvées au niveau des points B et C sont les plus élevées. La teneur en Pb enregistrée au niveau du point C, soit une valeur de 191,768 ppm, dépasse largement les limites autorisées (27 ppm). Situé au niveau d'un champ agricole (point C), cette forte teneur en Pb s'expliquerait par une irrigation continue par l'eau de l'oued chargée en Pb (El Aslouj, 2008) ce qui aurait entraîné probablement une accumulation de ce métal au niveau de ce sol, additionné des retombées atmosphériques et de la quantité de Pb initiale retrouvée dans roche-mère. Au niveau du point B, les teneurs en métaux dépassant les seuils préconisés, reflèteraient le rejet d'effluents de la zone industrielle dans le milieu naturel au niveau de ce site.

L'analyse statistique effectuée a montré une différence significative ($p < 0,001$) des teneurs en Pb et en Cu entre les différents points d'échantillonnage.

II. Mesure de certains paramètres physico-chimiques

Le PH est considéré comme le principal paramètre chimique contrôlant la biodisponibilité des métaux lourds dans le sol (Gadd, 2000). Il est influencé par divers facteurs dont l'apport des engrais. Le pH des sols étudiés enregistre des valeurs comprises entre $7.9 < \text{PH} < 8,60$, caractéristique des sols de nature fortement basiques /calcaires, avec une réduction de la disponibilité des cations métalliques dans les sols (Tableau X).

Les valeurs de PH obtenues sont similaires à celles retrouvées par Kao *et al.* (2007) et Barrani (2016) qui ont enregistré des valeurs de PH ne dépassant pas 8.85 et 8.20 respectivement. Sylvie *et al.* (2003) ont montré que le PH est un facteur important dans l'adsorption et l'immobilisation des métaux lourds dans les sols. La diminution du PH favorise la mobilité des métaux lourds et son augmentation provoque l'immobilisation par formation de composés insolubles ou l'accroissement de la capacité d'échange cationique.

Tableau X .Paramètres physico-chimiques des sols étudiés : Moyennes des valeurs mesurées

Points	PH	Humidité (%)	Température (°C)
A	8.22	10.84	15
B	7.90	29.94	
C	8.60	13.30	
D	8.01	14.13	

La Température et l'Humidité jouent un rôle indirect, en favorisant l'activité biologique du sol, et donc la production de substances acides ou complexantes issues de la biodégradation de la matière organique (Lovley, 2000 ; Bhainsa *et al.*, 2009). La température limite les distributions de certaines espèces, une chaleur ou un froid extrême peuvent défavorablement affecter le métabolisme des espèces fongiques (Cooper *et al.*, 2001).

La température enregistrée au niveau des différents sols est de 15 °C en période de janvier (Tableau X). Cette température serait donc idéale pour une bonne activité biologique (Cooper *et al.*, 2001).

L'humidité enregistrée est comprise entre 10% et 29% (Tableau X). Ce paramètre joue un rôle important dans l'abondance ou la carence en microorganismes telluriques (Lovley, 2000) et agit directement dans les processus de précipitation et de solubilisation. En condition d'aération limitante,

les composés du Fer et du Manganèse sont réduits et solubilisés, et ils libèrent donc les métaux qui leur étaient associés (Joubert, 2008).

Cooper *et al.*, (2001) ont montré qu'à une température comprise entre 10°C et 30°C, l'effet de la température sur la capacité d'adsorption n'est pas très significatif. Par contre, une diminution de l'adsorption entre 30°C et 40°C, est remarquée surtout dans le cas du Cu. Pourtant, l'influence de la température entre 10 à 40°C n'est pas significative pour le Pb.

III. Biodiversité fongique des sols

Après 5 jours d'incubation sur milieu RBA à $28 \pm 2^\circ\text{C}$, les colonies fongiques obtenues sont identifiées, purifiées et conservées (Figure 13).

Les espèces identifiées montrent une diversité fongique variable selon les sols analysés. Elles appartiennent principalement aux Genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Rhizomucor*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Cryptococcus*, et *Trichosporon* (Tableau XI).

Aspergillus, *Penicillium* et *Candida* sont les genres les plus fréquemment rencontrés au niveau des sols étudiés ; ce qui est en accord avec les travaux d'Iram *et al.* (2015), Doillon (2010), Bellion *et al.* (2006) et Dursun *et al.* (2003).

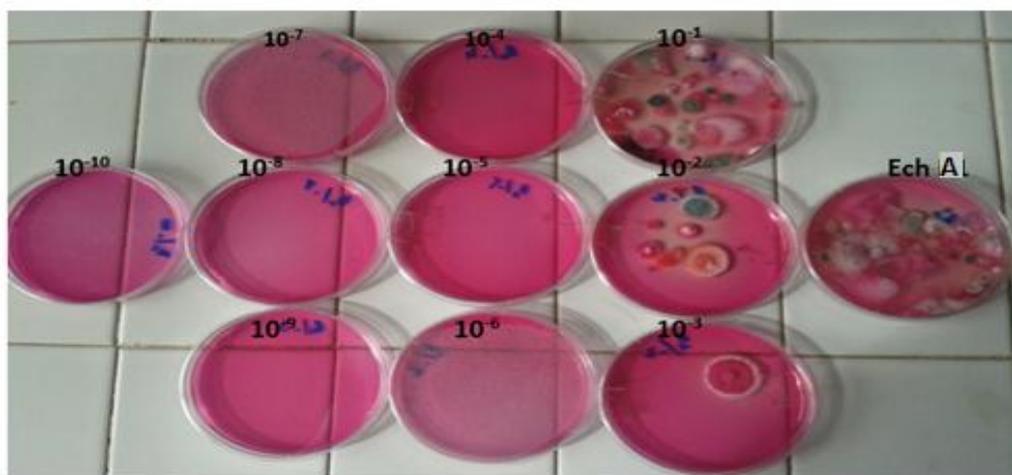


Figure 13. Colonies fongiques obtenues à différentes dilutions du sol du point A sur milieu RBA

En total, 102 isolats sont identifiés au niveau des 4 échantillons de sol étudiés dont des 68 isolats de champignons filamenteux et 34 isolats de levures (Tableau XI).

Tableau XI. Nombre d'isolats par Genre fongiques et par point de prélèvement

Genre de Champignons filamenteux	Points				Nombre d'isolats
	A	B	C	D	
<i>Aspergillus</i>	4	12	1	5	22
<i>Penicillium</i>	6	7	4	4	21
<i>Acremonium</i>	1	1	-	0	2
<i>Rhizomucor</i>	0	1	-	0	1
Non identifiés	6	4	8	4	22
Total	17	25	13	13	68
Genre de Levures					
<i>Rhodotorula</i>	1	2	-	2	5
<i>Candida</i>	3	6	4	5	18
<i>Cryptococcus</i>	3	-	1	-	4
<i>Trichosporon</i>	-	-	1	-	1
Non identifiés	-	-	5	1	6
Total	7	8	11	8	34
Effectif total par point	24	33	24	21	102

- : aucune souche retrouvée

Au point B, qui enregistre 80.18 ppm de Pb, 126.5 ppm de Cu, un PH de 7.90 et une humidité de 29.94%, 33 isolats sont retrouvés ; suivi du point A à 65.56 ppm de Pb, 20.6 ppm de Cu, 8.22 de PH et 10.84 d'humidité puis le point C à 191.7 ppm de Pb, 26.6 ppm de Cu, 8.60 de PH et 13.30% d'humidité avec 24 isolats chacun.

Le point D regroupe 21 isolats, à raison de 13 filamenteux et 8 levures pour une concentration de 70.5ppm de Pb, 33.04 ppm de Cu, 8.01 de pH et 14.13% d'humidité.

Le PH joue un rôle important dans l'adsorption et l'immobilisation des métaux et dans l'abondance de la biodiversité biologique (Cooper *et al.*, 2001). Dans le point B où le PH est neutre, et malgré la forte teneur en Cu dans le sol, la biodiversité fongique a augmenté comparé aux points A, C et D où le PH est de nature alcaline.

La diversité de la communauté fongique est influencée par le taux de métaux dans le sol, ce qui est en accord avec Bellion *et al.* (2006) et Oladipo *et al.* (2017), qui ont montré que la croissance de certains champignons telluriques *extrêmophiles* était favorisée dans des conditions où les teneurs en métaux lourds sont élevées.

Les métaux lourds sont toxiques sur la plupart des microorganismes telluriques (Huynh, 2009). Ils ont un effet sur la dénaturation des protéines et la destruction de l'intégrité de la membrane cellulaire affectant ainsi la croissance, la morphologie et le métabolisme de ces microorganismes, ce qui conduit

à des réductions de biomasse. Ekelund *et al.* (2003) et Fomina *et al.* (2005) ont montré que la biomasse bactérienne d'un sol a tendance à diminuer suite à une importante contamination par le Pb et le Cu. Fomina *et al.* (2005) estiment que, même à long terme et pour de faibles teneurs en métaux lourds, les microorganismes ne sont pas capables de maintenir une biomasse équivalente à celle d'un sol non pollué.

IV. Screening des isolats

Un screening des isolats retrouvés au niveau des différents points a été effectué selon une évaluation qualitative du potentiel de bioaccumulation de ces isolats vis-à-vis du Pb et du Cu. Sur milieu de culture contenant 1 000 ppm de Pb ou de Cu, les cultures des souches fongiques montrant un potentiel de bioaccumulation au Pb et/ou au Cu révèlent l'apparition d'une zone claire autour des colonies (Figure 14). Quel que soit le point d'échantillonnage du sol, les espèces les plus fréquemment retrouvées appartiennent au genre *Aspergillus* et *Candida* (Tableau XII).

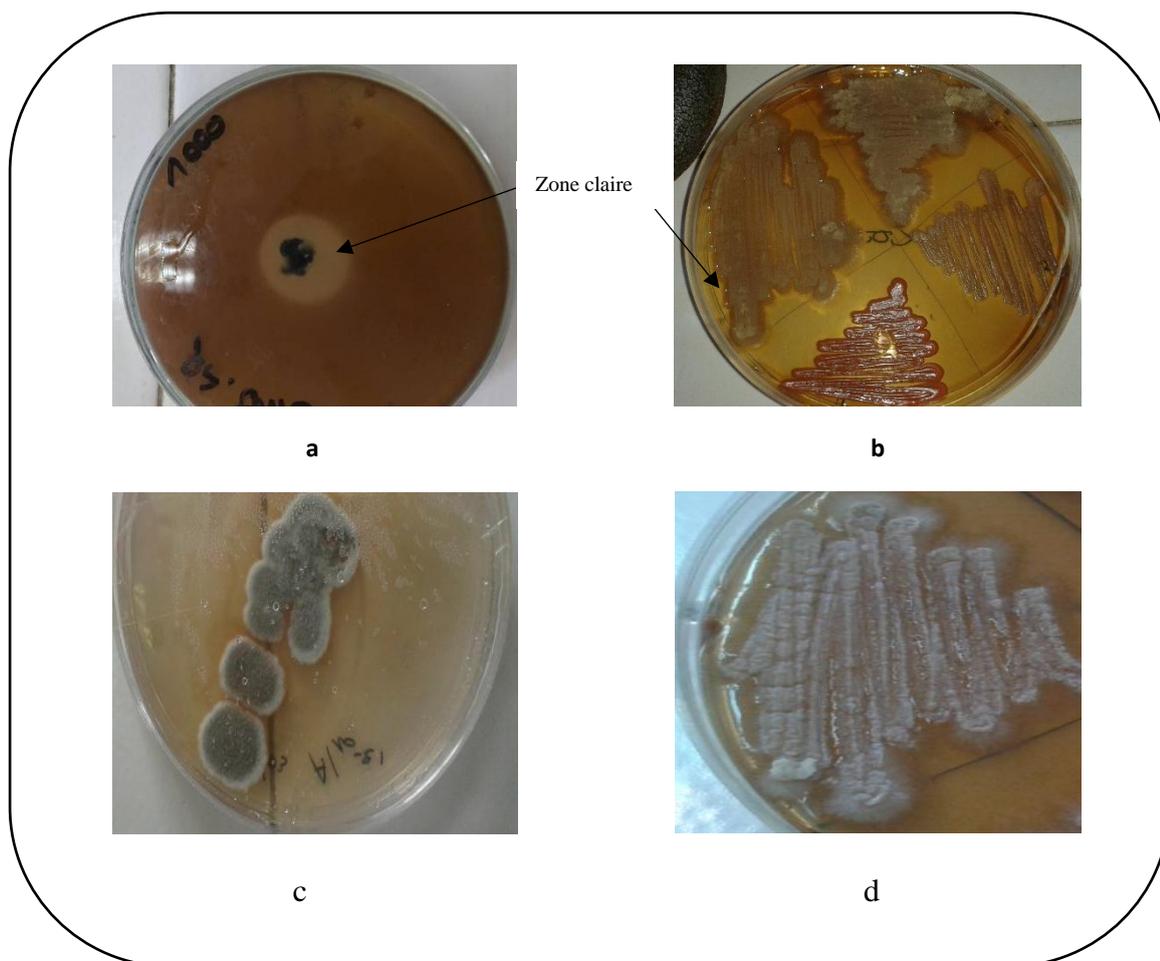


Figure 14. (a et c : filamenteux, b et d : levure) : Zone claire montrant l'absence de métal autour de la colonie, les figures c et d des figures témoin avec aucune zone claire apparente

Tableau XII. Espèces fongiques identifiées et potentiellement bioaccumulatrices du Pb et/ou du Cu

Point	Isolats			
	Espèces de champignons filamenteux		Espèces de levures	
	Pb	Cu	Pb	Cu
A	<i>Aspergillus niger</i> _(A) <i>Aspergillus carbonarius</i> _(A)	<i>Acremonium sp.</i> _(A)	<i>Candida bertae</i> _(A) <i>Cryptococcus albidus</i> _(A) <i>Rhodotorula glutinis</i> _(A)	
B	<i>Aspergillus niger</i> _(B) <i>Aspergillus carbonarius</i> _(B) <i>Penicillium simplicissimum</i> _(B) <i>Penicillium sp.</i> _(B) <i>Rhizomucor sp.</i> _(B)	<i>Acremonium sp.</i> _(B)	<i>Candida versatilis</i> _(B) <i>Candida bertae</i> _(B) <i>Rhodotorula glutinis</i> _(B)	
C	<i>Aspergillus niger</i> _(C)	*n	<i>Candida versatilis</i> _(C) <i>Candida bertae</i> _(C) <i>Cryptococcus albidus</i> _(C) <i>Trichosporon ovoides</i> _(C)	
D	<i>Aspergillus niger</i> _(D) <i>Aspergillus carbonarius</i> _(D)	*n	<i>Candida bertae</i> _(D) <i>Rhodotorula glutinis</i> _(D)	

*n : aucun isolat retrouvé / *A : point A, B : point B, C : point C, D : point D

Sur 68 isolats de champignons filamenteux identifiées, seuls 10 ont révélé un potentiel d'accumulation au Pb ; soit 14.7%, dont 5 au point B, 2 au point A et D et 1 seul au point C. Le genre *Aspergillus* est le plus dominant parmi les champignons filamenteux isolés, représenté par deux espèces, *Aspergillus niger* et *Aspergillus carbonarius* (Tableau XII). Au niveau de chaque point, les isolats de chacune de ces espèces sont codifiés tels *Aspergillus niger*_(A) *Aspergillus niger*_(B) *Aspergillus niger*_(C) et *Aspergillus niger*_(D). Ainsi, 4 isolats sont représentés par *Aspergillus niger*, 3 isolats d'*Aspergillus carbonarius*, 1 isolat de *Penicillium simplicissimum*, 1 isolat de *Penicillium sp.* et 1 isolat de *Rhizomucor sp.* (Tableau XII).

Les travaux de Dursun *et al.* (2003), Iram *et al.* (2015) et Mohammadian *et al.* (2017) ont montré que les genres *Aspergillus* et *Penicillium* possèdent des mécanismes d'adaptation qui leur permettent d'accumuler les métaux lourds des sols, dont la précipitation extra et intracellulaire, la transformation des métaux et la biosorption à travers la paroi cellulaire. Chen *et al.* (2017) et Oladipo *et al.* (2017) ont montré que *Rhizomucor* sp. et *Penicillium simplicissimum* présentent un potentiel important de bioaccumulation pour le Pb, ce qui permet son élimination de l'environnement.

Seuls deux isolats appartenant au genre *Acremonium* retrouvés au niveau des points A et B, ont montré un potentiel accumulateur au Cu. Ceci est en accord avec les travaux de Zapotoczny *et al.* (2007) qui ont montré que le genre *Acremonium* possède des mécanismes pour accumuler le Cu à des niveaux élevés, ce qui prouve son fort potentiel à dépolluer les sols contaminés.

Sur 34 isolats de levures identifiées, seuls 12 ont révélé un potentiel d'accumulation du Pb et du Cu simultanément, soit 35.2 %. Ces isolats appartiennent majoritairement aux Genres *Candida* et *Rhodotorula*. Au niveau du point C, qui enregistre 191.76 ppm de Pb et 26.6 ppm de Cu, 4 isolats accumulateurs sont retrouvés, suivi du point A (65.56 ppm de Pb et 20.6 ppm de Cu) et B (80.18 ppm de Pb et 126.5 ppm de Cu) avec 3 isolats chacun, puis du point D avec 2 isolats (70.5 ppm de Pb et 33.04 ppm de Cu) (Tableau XII).

Donmez et Aksu (2001) et Vadkertiova *et al.* (2006) ont montré que les genres *Candida*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, et *Trichosporon* sont dotés d'un potentiel important de bioaccumulation pour le Pb et pour le Cu, ce qui permettrait son élimination de l'environnement à travers des mécanismes d'adaptation qui leur permettent d'accumuler les métaux lourds des sols.

V. Evaluation de la Tolérance

La tolérance à un métal est évaluée par la capacité des champignons à croître sur milieu de culture contenant 1 000 ppm de ce métal. Le calcul de l'Indice de tolérance en est déduit.

1- Tolérance des champignons filamenteux

Tous les isolats de champignons filamenteux montrant un potentiel de bioaccumulation ont pu croître sur milieu de culture contenant 1000 ppm de Pb et de Cu (Tableau XIII).

Les isolats fongiques ayant la capacité de croître en présence de concentrations élevées en Pb et en Cu sont capables de tolérer des niveaux importants de métaux lourds dans le milieu environnant (Saba *et al.*, 2017). Cette caractéristique exceptionnelle peut être due aux mécanismes de tolérance de chaque isolat, telles que la liaison du métal aux parois cellulaires, la production d'enzymes

intracellulaires/extracellulaires, la séquestration intracellulaire, la précipitation extracellulaires et la complexation (Formina *et al.*, 2005). Il est également démontré par l'étude d'Akhtar *et al.* (2013) que l'exposition aux métaux conduit à la formation d'une population microbienne tolérante. La présence de métaux lourds, tel le Pb et le Cu, affecte les micro-organismes en milieu naturel en réduisant leur nombre et leur diversité, provoquant ainsi l'accroissement d'une population tolérante aux métaux (Saba *et al.*, 2017).

Tableau XIII. Tolérance des isolats fongiques à 1000 ppm de Pb et de Cu

Pb (ppm)	Cu (ppm)
<i>Aspergillus niger</i> _(A)	<i>Acremonium sp.</i> _(A)
<i>Aspergillus carbonarius</i> _(A)	
<i>Aspergillus niger</i> _(B)	<i>Acremonium sp.</i> _(B)
<i>Aspergillus carbonarius</i> _(B)	
<i>Penicillium simplicissimum</i> _(B)	
<i>Rhizomucor</i> _{sp.(B)}	
<i>Penicillium sp.</i> _(B)	
<i>Aspergillus niger</i> _(C)	
<i>Aspergillus niger</i> _(D)	
<i>Aspergillus carbonarius</i> _(D)	

a) *Indice de tolérance calculé (IT)*

Afin d'évaluer l'effet du métal sur la croissance de chaque isolat, le degré de tolérance des champignons filamenteux est exprimé en fonction de l'indice de tolérance. La tolérance est classée donc en 5 degrés selon l'IT (Valix et loon, 2003):

- ✓ Très faible : $0,00 \leq IT \leq 0,39$;
- ✓ Faible : $0,40 \leq IT \leq 0,59$;
- ✓ Modérée : $0,60 \leq IT \leq 0,79$;
- ✓ Haute : $0,80 \leq IT \leq 0,99$;
- ✓ Très haute : $IT \geq 1,00$

Le comportement des isolats en présence du métal diffère d'un point de prélèvement à un autre. Les isolats ont une tolérance élevée à modérée à 200 ppm. Cette tolérance diminue avec l'augmentation des concentrations métalliques.

Les souches appartenant à la même espèce présentent des degrés de tolérance différents. C'est le cas pour *A. niger*, *A. carbonarius*, *Penicillium sp.* et *Acremonium sp.*

a1. Tolérance intraspécifique

Les quatre isolats de l'espèce *A.niger*, retrouvés au niveau des sols des 4 points de prélèvement, montrent une tolérance variable au Pb selon leur provenance. *A.niger* (C) présente une tolérance haute à modérée avec un IT de 0.9 à 200 ppm et de 0.68 à 1000ppm. Suivi d'*A.niger* (A) et *A.niger* (B) avec une tolérance haute à 200 ppm et faible à 1000 ppm puis *A.niger* (D) avec une tolérance faible à 200 ppm et très faible à 1000ppm (Figure 15).

Dans le cas de l'espèce *A.carbonarius*, l'isolat *A.carbonarius* (D) présente une tolérance haute à 200 ppm avec un IT de 0.87 et modérée à 1000ppm avec un IT de 0.61. Suivi d'*A.carbonarius* (A) et *A.carbonarius* (B) avec une tolérance modérée à faible (Figure 16).

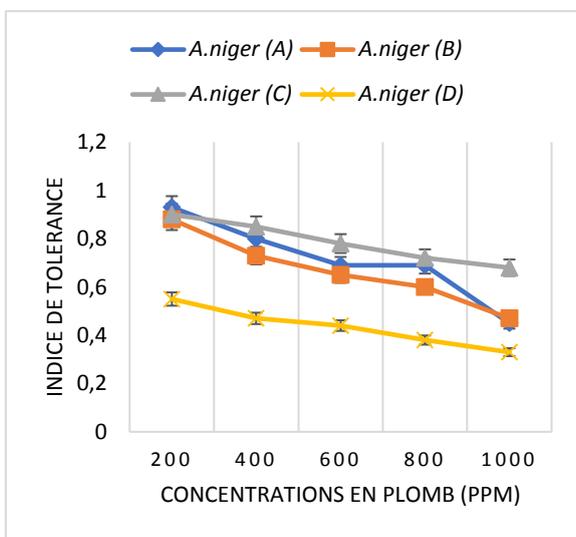


Figure 15. Variation de l'IT des 4 isolats d'*A.niger* en fonction des concentrations de Pb

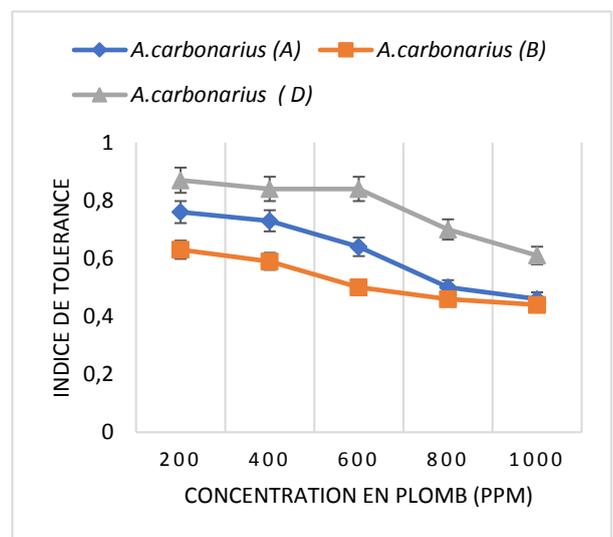


Figure 16. Indice de tolérance des trois isolats d'*A.carbonarius* en fonction des concentrations de Pb testées

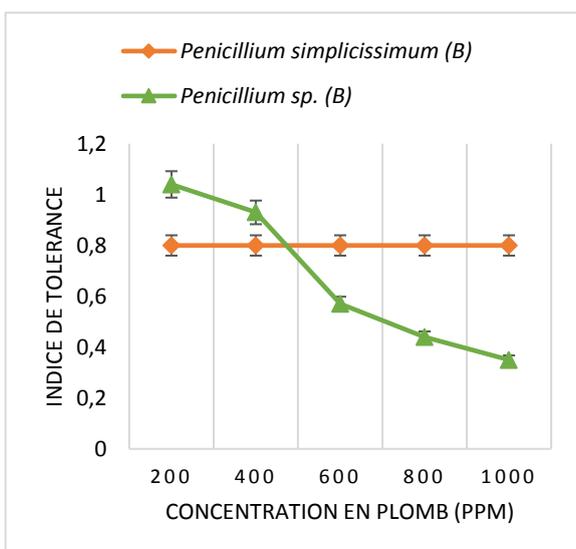


Figure 17. Variation de l'IT des deux isolats de *Penicillium sp.* en fonction des concentrations de Pb

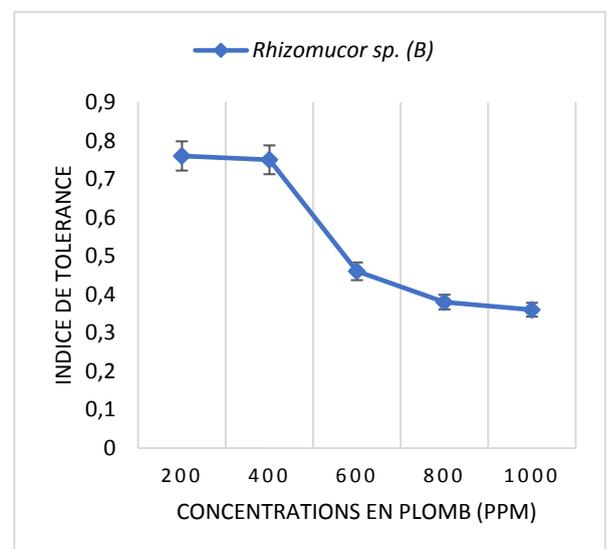


Figure 18. Variation de l'IT de *Rhizomucor sp.* en fonction des concentrations de Pb

Quel que soit la concentration du Pb, l'IT de *Penicillium simplicissimum* (B) est resté stable à 0,8, montrant une haute tolérance de cette espèce au Pb (Figure 17), suivi de *Penicillium sp.*(B) avec une très haute tolérance au Pb à 200ppm avec un IT de 1.04 et une très faible tolérance à 1000 ppm avec un IT de 0.35.

Rhizomucor sp. (B) est classé modéré à 200 ppm avec un IT de 0.76 et très faible à 1000 ppm de Pb, avec un IT de 0.36 (Figure 18).

a2. Tolérance interspécifique

Au sein du même sol, la capacité de tolérance au Pb, varie selon les espèces isolées. Ainsi, l'isolat *A.niger*(A) présente une tolérance haute à faible avec un IT de 0.93 à 200 ppm et de 0.45 à 1000 ppm, comparativement à l'isolat *A.carbonarius*(A) qui présente une tolérance modérée à faible avec un IT de 0.76 à 200 ppm et 0.46 à 1000 ppm.

A.niger(B) présente une tolérance haute à faible avec un IT de 0.88 à 200 ppm et de 0.47 à 1000 ppm comparé à *A.carbonarius*(B) qui présente une tolérance modérée à faible avec un IT de 0.63 à 200 ppm et 0.44 à 1000 ppm.

A.niger(D) présente une tolérance faible à très faible avec un IT de 0.55 à 200 ppm et de 0.33 à 1000 ppm comparé à *A.carbonarius*(D) qui présente une tolérance haute à modérée avec un IT de 0.87 à 200 ppm et 0.61 à 1000 ppm.

Penicillium sp.(B) est classé très tolérant à 200 ppm de Pb, suivi par ordre décroissant par *A.niger*(A), *A.niger*(C), *A.niger*(B), *A.carbonarius*(D), *Penicillium simplicissimum*(B), *A.carbonarius*(A), *Rhizomucor*(B), *A.carbonarius*(B) et *A.niger*(D).

Tous les isolats ont révélé un indice de tolérance faible à très faible à 1000 ppm de Pb sauf pour *A. niger*(C) et *A. carbonarius* (D) qui y ont révélé un indice de tolérance modéré.

Certains isolats fongiques étudiés dans ce travail présentent une tolérance élevée au Pb, ce qui envisagerait probablement leur utilité dans le processus de dépollution du Pb, ce qui est en accord avec les travaux de Ezzouhri *et al.* (2009).

Saba *et al.* (2017) ont montré que les métaux lourds affectent les micro-organismes telluriques en milieu naturel en réduisant leurs nombres et leurs diversités, et que la différence morphologique et physiologique entre les genres, espèces et souches fongiques, induit une réponse différente à la tolérance

aux concentrations métalliques. Les espèces d'un même genre pourraient montrer une différence au niveau de la tolérance aux métaux.

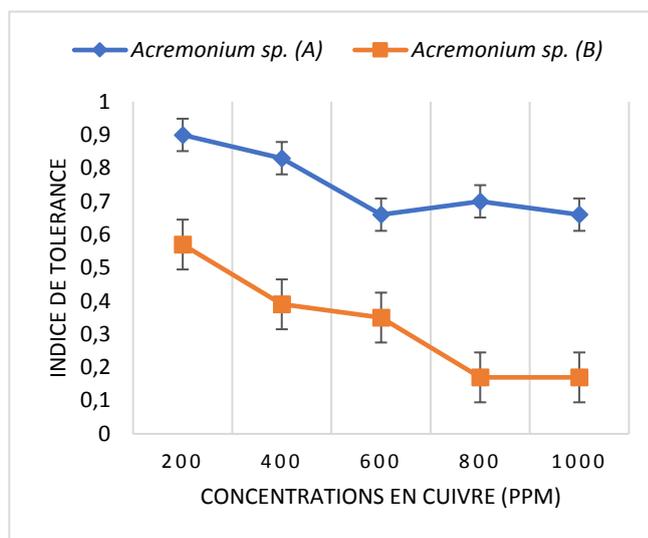


Figure 19. IT d'*Acremonium sp.* au Cu

En comparant les deux isolats d'*Acremonium sp.*, le meilleur IT au Cu est observé chez l'isolat *Acremonium sp.*(A), avec une tolérance haute à 200 ppm de Cu et un IT de 0.9 et une tolérance modérée à 1000 ppm de Cu avec un IT de 0,66 (Figure 8). L'isolat *Acremonium sp.*(B) a une tolérance faible à 200 ppm de Cu avec un IT de 0.57 et une tolérance très faible à 1000 ppm de Cu avec un IT de 0.17 (Figure 19).

Une différence significative ($p < 0,05$) a été observée entre les indices de tolérance des différents isolats de champignons filamenteux par rapport au Pb et au Cu.

Il est à noter que dans les conditions extrêmes telle qu'une forte teneur en métal dans le milieu, les souches fongiques développent une tolérance spéciale aux niveaux élevés de métaux lourds, ce qui est en accord avec l'étude de Anahid *et al.* (2011).

2- Tolérance des levures

Les isolats de levures montrant un potentiel de bioaccumulation au Pb révèlent également un potentiel de bioaccumulation au Cu. La tolérance est évaluée par la croissance à différentes concentrations (Tableau XIV).

Tableau XIV. Tolérance des isolats de levures à différentes concentrations de Pb et de Cu

Isolats de levure	Pb (ppm)	Cu (ppm)
<i>Candida bertae</i> _(A)	1000	1000
<i>Cryptococcus albidus</i> _(A)		
<i>Rhodotorula glutinis</i> _(A)		
<i>Candida versatilis</i> _(B)	1000	800
<i>Candida bertae</i> _(B)		600
<i>Rhodotorula glutinis</i> _(B)		1000
<i>Candida versatilis</i> _(C)	1000	1000
<i>Candida bertae</i> _(C)		
<i>Cryptococcus albidus</i> _(C)		
<i>Trichosporon ovoides</i> _(C)		
<i>Candida bertae</i> _(D)	1000	1000
<i>Rhodotorula glutinis</i> _(D)		

Tous les isolats de levures montrant un potentiel de bioaccumulation ont pu croître en présence de 1000 ppm de Pb et Cu à l'exception des isolats *Candida versatilis*_(B) et *Candida bertae*_(B) dont la croissance est inhibée à des concentrations de Cu supérieures respectivement à 800 ppm et 600 ppm.

Donmez et Aksu (2001) et Vadkertiova *et al.* (2006) ont montré que les genres *Candida*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* et *Trichosporon* sont dotés d'un potentiel important de bioaccumulation pour le Pb et pour le Cu, ce qui pourrait permettre l'élimination de ces deux métaux de l'environnement à travers des mécanismes d'adaptation qui leur permettent d'accumuler les métaux lourds des sols.

VI. Evaluation quantitative de l'accumulation

Les isolats fongiques qui ont montré un potentiel qualitatif d'accumulation sur milieu de culture, ont fait l'objet d'une évaluation de leur capacité quantitative d'accumulation, par dosage ICP.

1- Bioaccumulation des champignons filamenteux

1-1- Effet de la bioaccumulation du Pb à différentes concentrations par les isolats filamenteux

1-1-1- Bioaccumulation du Pb par les quatre isolats d'*Aspergillus niger* :

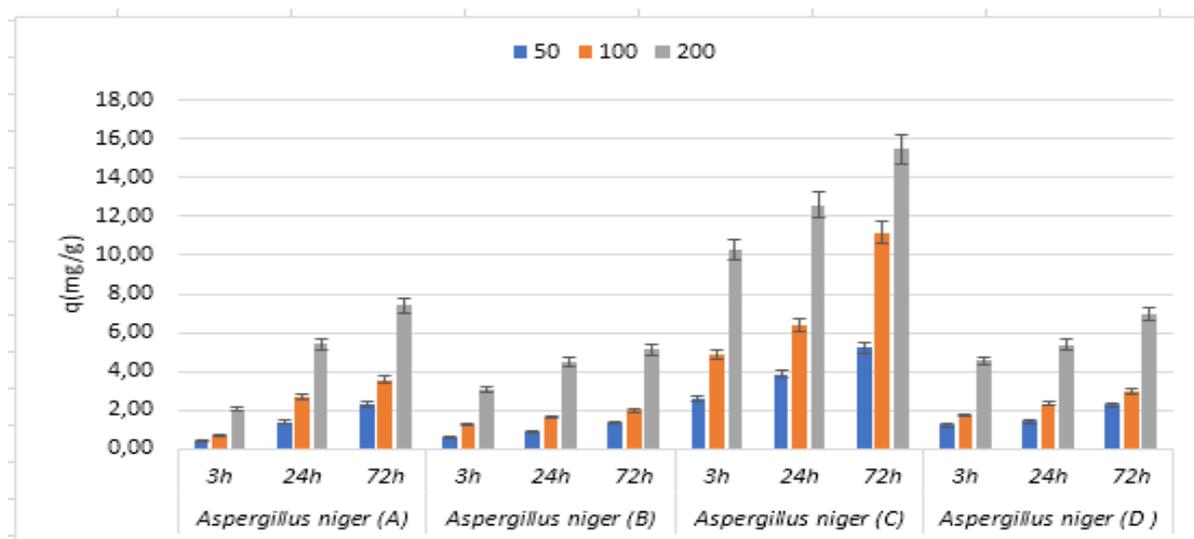


Figure 20. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de bioaccumulation des quatre isolats d'*Aspergillus niger*

La capacité des isolats à l'accumulation commence dès 3h et augmente avec l'augmentation de la concentration initiale en ions métalliques.

La capacité d'accumulation du Pb par l'espèce *Aspergillus niger* diffère en fonction de l'isolat.

L'accumulation débute à partir de 3h de contact du Pb pour les quatre isolats d'*Aspergillus niger* et progresse jusqu'à 24h, voire même un important taux est enregistré à 72h de contact.

Cette bioaccumulation est proportionnelle à la concentration croissante du Pb et du temps de contact (Figure 20).

Les isolats d'*Aspergillus niger* qui ont enregistré un IT élevé au Pb, ont enregistré un taux d'accumulation élevé. L'isolat *Aspergillus niger*_(C) a montré le meilleur potentiel d'accumulation au Pb (Figure 20) avec une capacité de 15.46 mg de Pb par g fongique à 200 ppm pendant 72h de contact, suivi de l'isolat *Aspergillus niger*_(A) (7.39), *Aspergillus niger*_(D) (6.94) et *Aspergillus niger*_(B) (5.13).

1-1-2- Bioaccumulation du Pb par les trois isolats d'*Aspergillus carbonarius* :

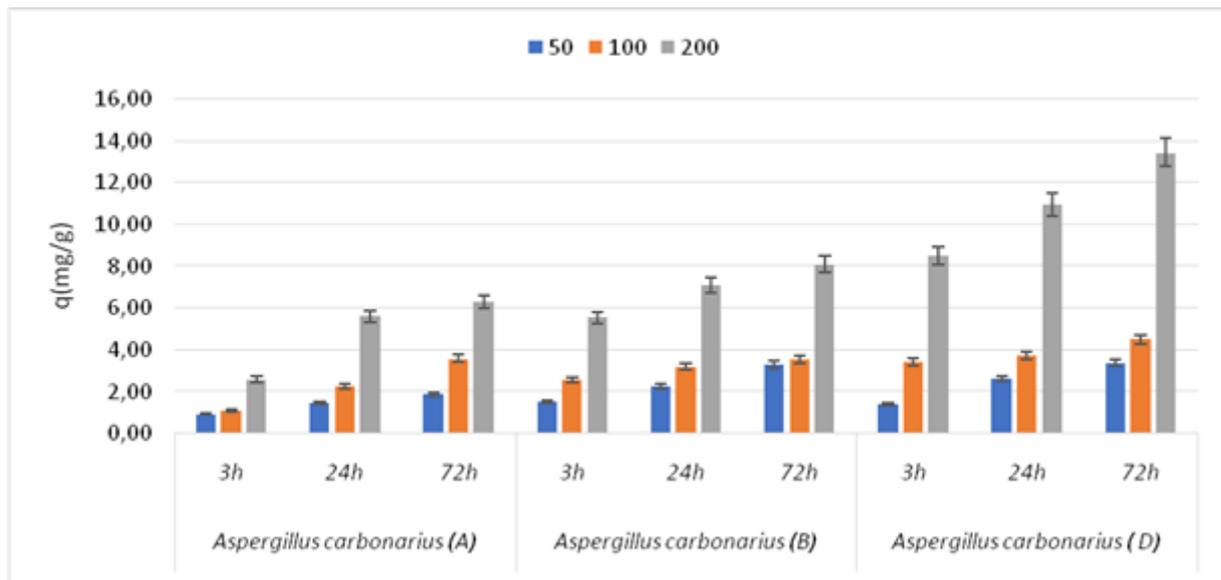


Figure 21. Effet du temps de contact et de sa concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de bioaccumulation des trois isolats d'*Aspergillus carbonarius*

*Aspergillus carbonarius*_(D) a enregistré une capacité maximale de 13.44 mg/g à 200 ppm de Pb à 72h de contact suivi d'*Aspergillus carbonarius*_(B) puis *Aspergillus carbonarius*_(A) avec une valeur maximale de 8.10 et 6.29 mg/g respectivement. Ceci est en accord avec l'étude de Dursun *et al*, (2003) qui ont démontré que la capacité d'accumulation du genre *Aspergillus* variait de 5.3 à 34.4 mg/g à 250 ppm de Pb.

1-1-3- Bioaccumulation du Pb par les deux isolats de *Penicillium sp.* :

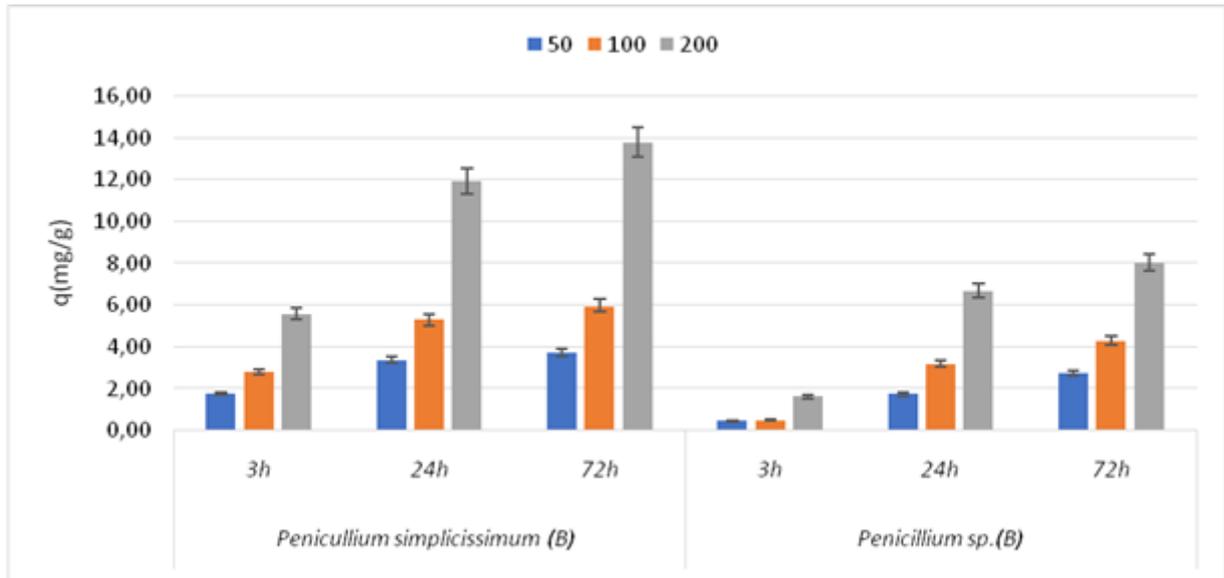


Figure 22. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de bioaccumulation des deux isolats de *Penicillium sp.*

Dans le cas des souches de *Penicillium sp.*, l'isolat *Penicillium simplicissimum*_(B) est l'isolat le plus accumulant avec une capacité de 5.58 mg/g à 3h, 11.93 mg/g à 24h et 13.81 mg/g à 72h pour 200 ppm de concentration. *Penicillium sp.*_(B) a enregistré une accumulation moins faible avec un taux de 8.05 mg/g à 200 ppm pendant 72h de contact. Anahid *et al.*, (2011), ont reporté que l'espèce *Penicillium simplicissimum* est doté d'un potentiel d'accumulation important allant à 24 mg/g à des concentrations élevées de Pb.

1-1-4- Bioaccumulation du Pb par l'isolat *Rhizomucor sp.* :

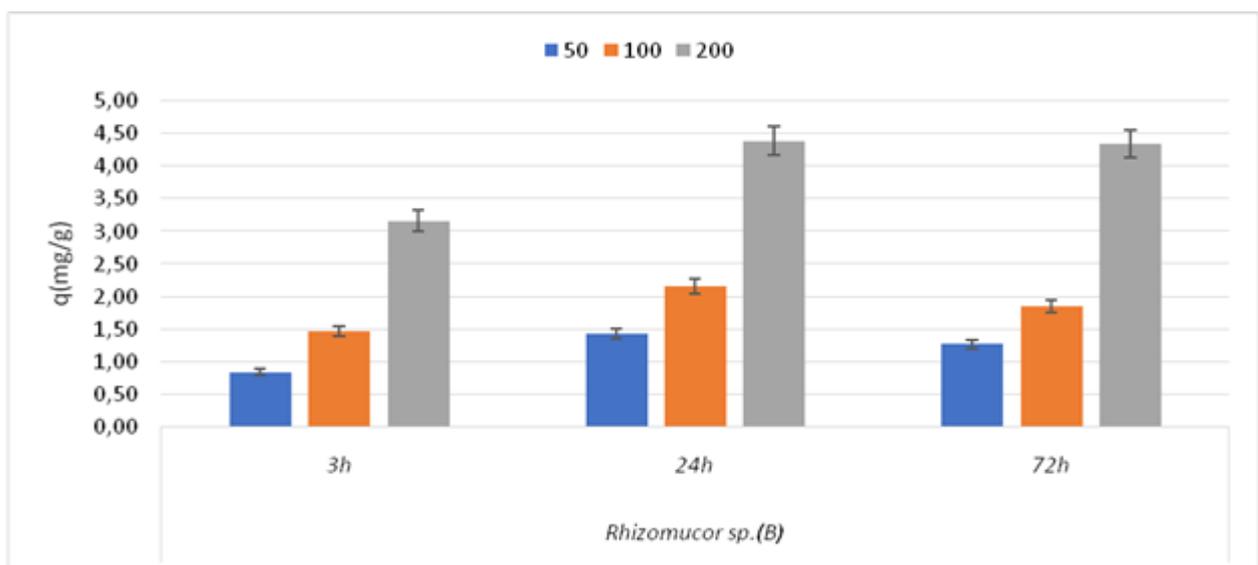


Figure 23. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de bioaccumulation de *Rhizomucor sp.*

Rhizomucor sp. (B) enregistre le taux le plus bas avec une capacité maximal d'accumulation égale à 4.34 mg/g à 200 ppm pendant 72h. Iqbal *et al*, (2005) ont indiqué que le genre *Rhizomucor* est doté d'une capacité d'accumulation importante pour le Cr et le Cd mais pas pour l'accumulation du pb.

Penicillium sp.(B) et *Rhizomucorsp.* (B) sont les isolats les moins tolérants et les moins accumulants pour le Pb.

1-2- Effet de la bioaccumulation du Cu à différentes concentrations par les isolats filamenteux

Parmi les différents champignons filamenteux isolés et identifiés, seuls deux isolats de l'espèce *Acremonium sp.* ont bioaccumulé le Cu (Figure 24).

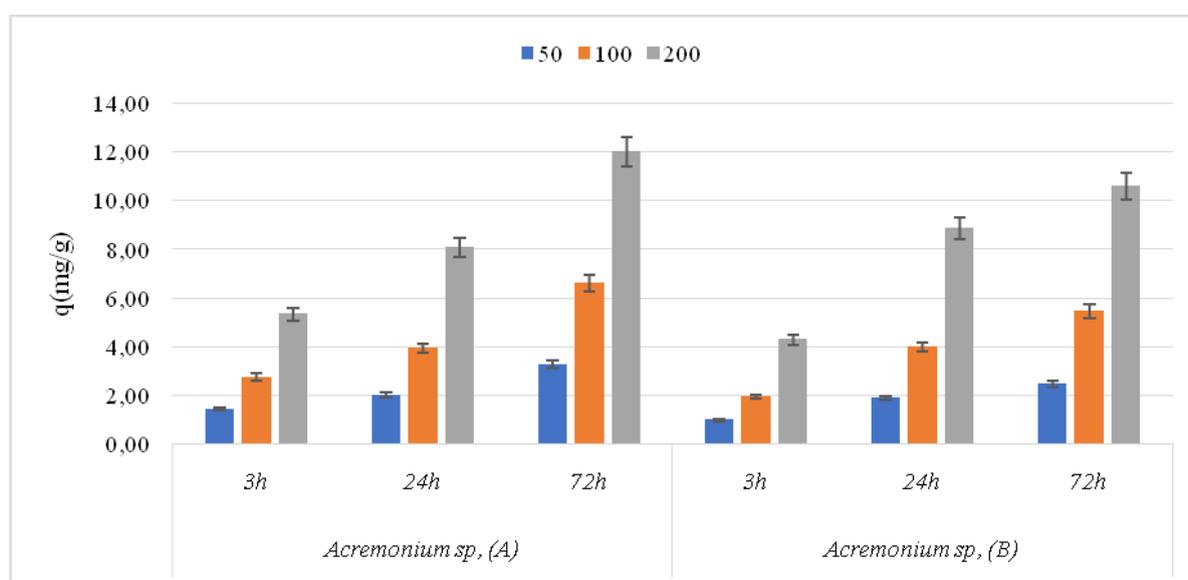


Figure 24. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Cu (II) sur la capacité de bioaccumulation d'*Acremonium sp.*

L'isolat *Acremonium sp.*(A) a montré une haute tolérance au Cu et une capacité maximal d'accumulation de 12 mg/g à 200 ppm pendant 72h de contact, comparativement à l'isolat *Acremonium sp.*(B), qui a enregistré une valeur de 10.59 mg/g à la même concentration de Pb et pendant le même temps de contact (Figure 24).

Mishra *et al.*, (2012) ont montré qu'à faible concentration initiale de Cu, un échange d'ions entre les sites de liaison cellulaire et les ions métalliques est directement produit. L'augmentation de la concentration initiale en métal (200 ppm) a facilité la résistance au transfert de masse entre la solution métallique et la paroi cellulaire fongique, permettant ainsi, la collision entre les deux et une meilleure absorption du Cu.

Les trois Genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Acremonium*, champignons les plus tolérants au Cu (II) et au Pb (II) par rapport aux autres espèces, ont montré une bonne accumulation au Pb et/ou au Cu ; ce qui est en accord avec les travaux de Zapotoczny *et al.* (2007), Iskandar *et al.* (2011) et Mohammadian *et al.* (2017).

L'exposition aux métaux étudiés conduit à l'établissement d'une population fongique tolérante, et que les différences morphologiques et physiologiques entre les genres, espèces et souches fongiques jouent un rôle dans leur réponse et par la suite dans l'accumulation des concentrations des ions métalliques, ce qui a été démontré également par Akhtar *et al.* (2013).

Iqbal *et al.* (2005) ont montré que les champignons telluriques, issus des sols pollués par des métaux, développent une tolérance aux métaux toxiques ce qui augmente leur capacité de bioaccumulation de ces métaux.

D'après Iskandar *et al.* (2011), *A.niger* peut accumuler jusqu'à 54.04 mg/g de Pb (II) et *Penicillium simplicissimum* jusqu'à 38.9 mg/g. Ce qui est en accord avec les travaux réalisés dans le cadre de cette étude où des valeurs de 15.45 mg/g et 13.81 mg/g sont enregistrées pour les deux isolats respectivement.

2- Bioaccumulation des isolats de levure

2-1- Effet de la bioaccumulation du Pb à différentes concentrations par les isolats de levure

2-1-1- Variation de la Bioaccumulation du Pb par les deux isolats de *Cryptococcus albidus* :

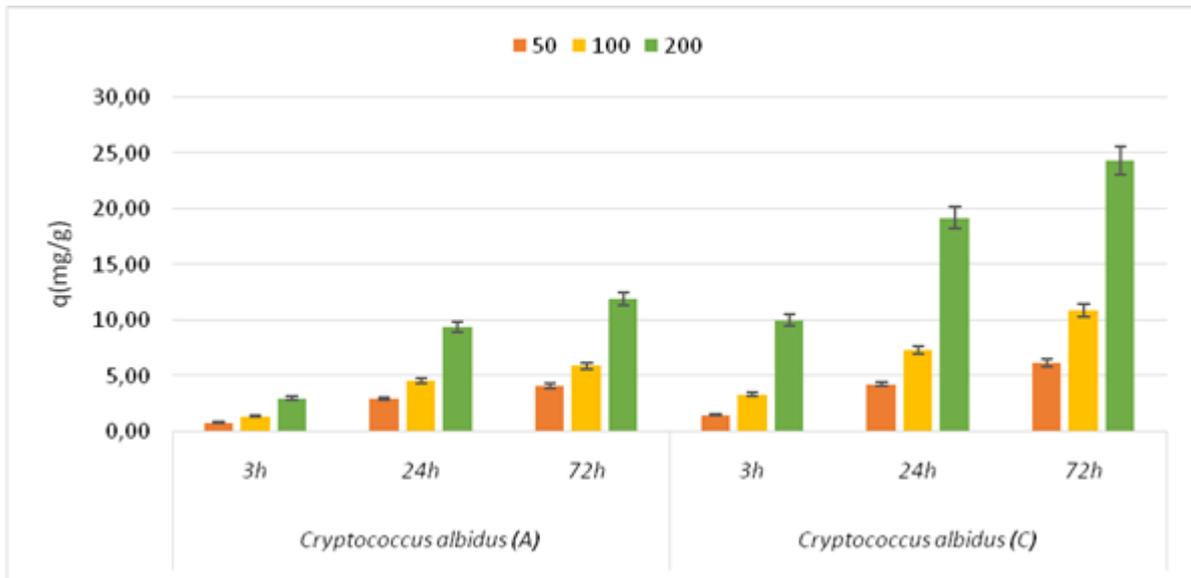


Figure 25. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de bioaccumulation des deux isolats de *Cryptococcus albidus*.

Dans le cas des isolats de *Cryptococcus albidus* retrouvés dans les points A et C, *Cryptococcus albidus*(C) est l'isolat le plus accumulant dans le genre *Cryptococcus* (figure 25) avec une capacité maximale d'accumulation égale à 24.34 mg/g à 200ppm pendant 72h de contact avec Pb, Comparativement à *Cryptococcus albidus*(A) avec 11.93 mg/g à 200ppm, 5.93 à 100 et 4.11 à 50ppm.

2-1-2- Variation de la Bioaccumulation du Pb par les quatre isolats de *Candida bertae* :

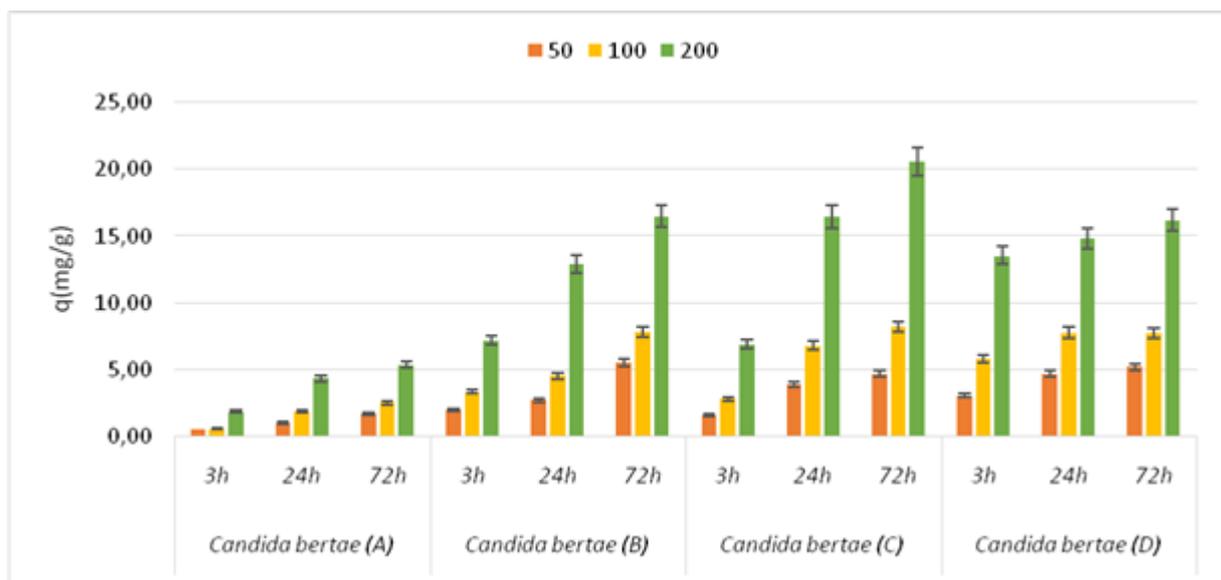


Figure 26. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de bioaccumulation des quatre isolats de *Candida bertae*

Pour les isolats de *Candida bertae* retrouvés dans les points A, B, C et D, *Candida bertae*(C) est l'isolat le plus accumulant (figure 26) avec une capacité maximale de 20.55 mg/g à 200 ppm pendant 72h de contact avec le Plomb suivi de *Candida bertae*(B), *Candida bertae*(D) puis *Candida bertae*(A) avec 16.48 mg/g, 16.21 mg/g et 5.40 mg/g respectivement. Ceci est en accord avec Donmez et Aksu. (2001), qui ont enregistré une capacité de 23.1 mg/g pour l'espèce *Candida sp.*

2-1-3- Variation de la Bioaccumulation du Pb par les trois isolats de *Rhodotorula glutinis* :

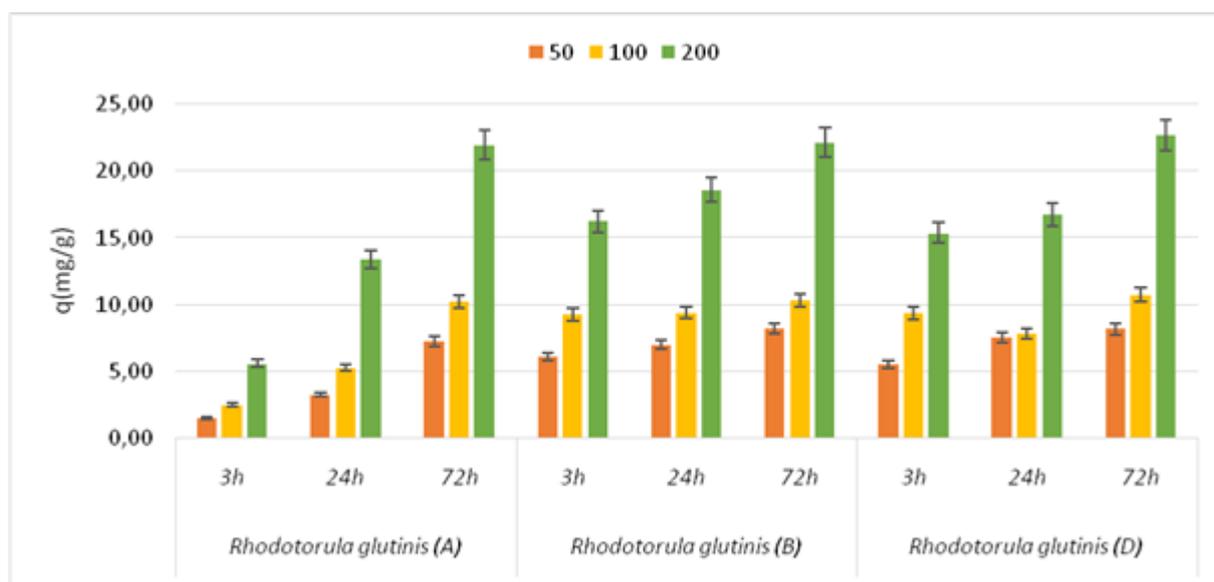


Figure 27. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de bioaccumulation de *Rhodotorula glutinis*

Le genre *Rhodotorula* est le genre le plus accumulant de toutes les espèces de levure testées pour leurs accumulations au Pb (figure 27). L'isolat appartenant au point D est le plus accumulant dans toutes les concentrations dès 3h de contact avec une capacité maximale égale à 22.66 mg/g à 200 ppm pendant 72h suivi de l'isolat retrouvé au point B avec une capacité de 22.11 mg/g puis celui retrouvé au point A avec 21.98 mg/g. Dae Hoeng *et al.* (2003) ont démontré que l'espèce *Rhodotorula glutinis* pouvait avoir une capacité de bioaccumulation allant jusqu'à 73.5 mg/g.

2-1-4- Variation de la Bioaccumulation du Pb par les deux isolats de *Candida versatilis* :

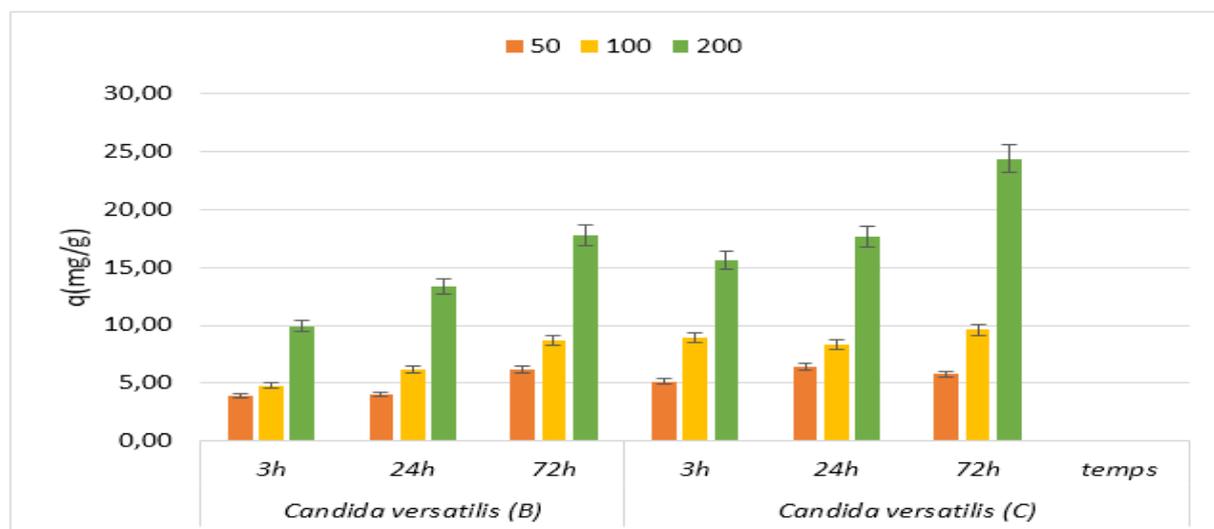


Figure 28. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de bioaccumulation des deux isolats de *Candida versatilis*

L'isolat *Candida versatilis* retrouvé au point C, s'est révélé l'isolat le plus accumulant à toutes les concentrations avec une capacité d'accumulation maximale de 5.76 mg/g, 9.63 mg/g et 24.38 mg/g à 50,100,200 pendant 3h, 24h et 72h respectivement. Comparativement à *Candida versatilis*(B) avec 6.13, 8.64 et 17.81 mg/g à 50, 100 et 200 ppm pendant le même temps de contact.

2-1-5- Variation de la Bioaccumulation du Pb par l'isolat de *Trichosporon ovoides* :

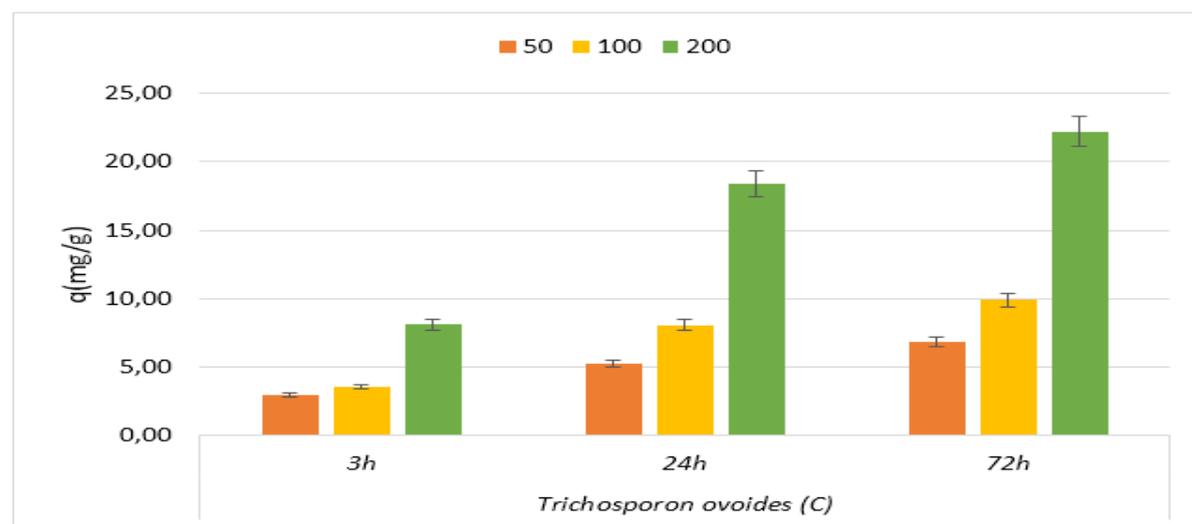


Figure 29. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de bioaccumulation de *Trichosporon ovoides*

L'isolat *Trichosporon ovoides*(C) est le seul de son genre à être retrouvé dans les 4 échantillons de sol étudiés. Il tolère le Pb et accumule à un taux maximal égale à 6.84, 9.93 et 22.23 mg/g à 50, 100 et 200 ppm

pendant 72h de contact. Sidra *et al.* (2018) ont démontré que le genre *Trichosporon* pouvait accumuler le Pb à une capacité égale à 72 mg/g pendant 12 jours de contact.

2-2- Effet de la bioaccumulation du Cu à différentes concentrations par les isolats de levure :

2-2-1- Variation de la Bioaccumulation du Cu par les deux isolats de *Cryptococcus albidus* :

L'accumulation d'ions Cu (II) commence dès 3h et augmente avec l'augmentation de la concentration initiale en ions métalliques. La capacité d'accumulation diffère en fonction de l'isolat.

L'accumulation débute dès 3h et continue d'augmenter à 24h et 72h. celle-ci augmente avec l'augmentation de la concentration et du temps de contact. Les isolats ont montré un taux d'accumulation important à 72h de contact avec le métal.

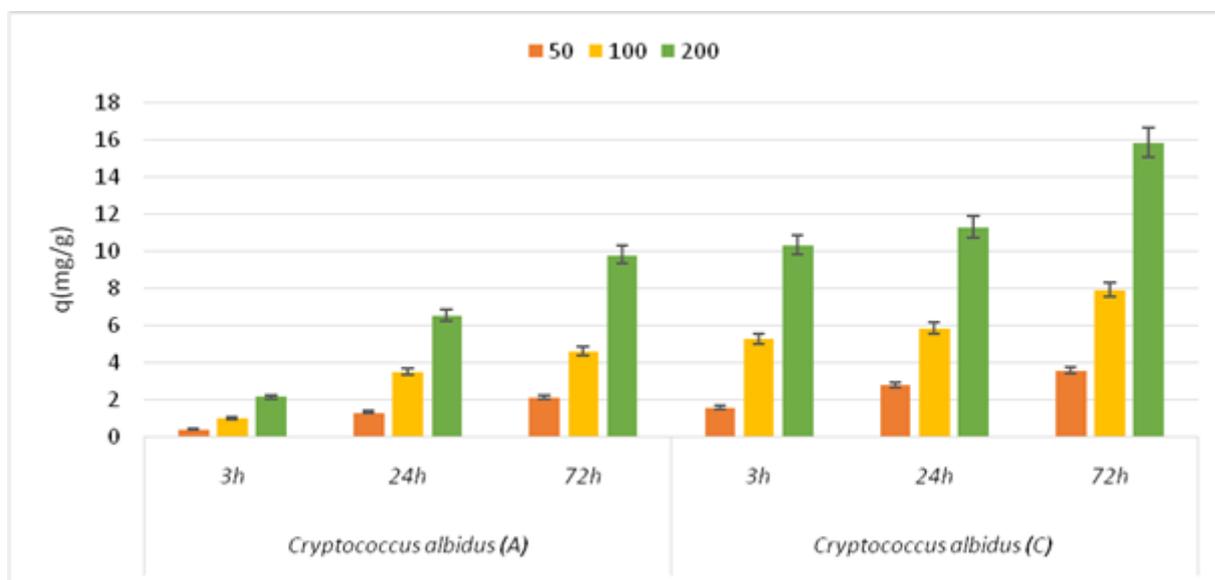


Figure 30. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Cu (II) sur la capacité de bioaccumulation de Cu (II) pour les deux isolats de *Cryptococcus albidus*.

L'isolat *Cryptococcus albidus* retrouvé au point C, est l'isolat le plus accumulant au Cu (II) comparé à celui retrouvé dans le point A (Figure 30) avec une capacité d'accumulation maximale égal à 15.89 mg/g à 200 ppm pendant 72h de contact, comparé à *Cryptococcus albidus*(A) avec une capacité d'accumulation maximale de 9.82 mg/g à 200 ppm pendant 72h de contact. Ceci est en accord avec

Balsalobre *et al.* (2003) qui ont signalé la capacité de *Cryptococcus sp.*, isolé des sols pollués, à tolérer 150 ppm de Cu avec une capacité d'accumulation pouvant aller jusqu'à 12.3 mg/g.

2-2-2- Variation de la Bioaccumulation du Cu par les quatre isolats de *Candida bertae* :

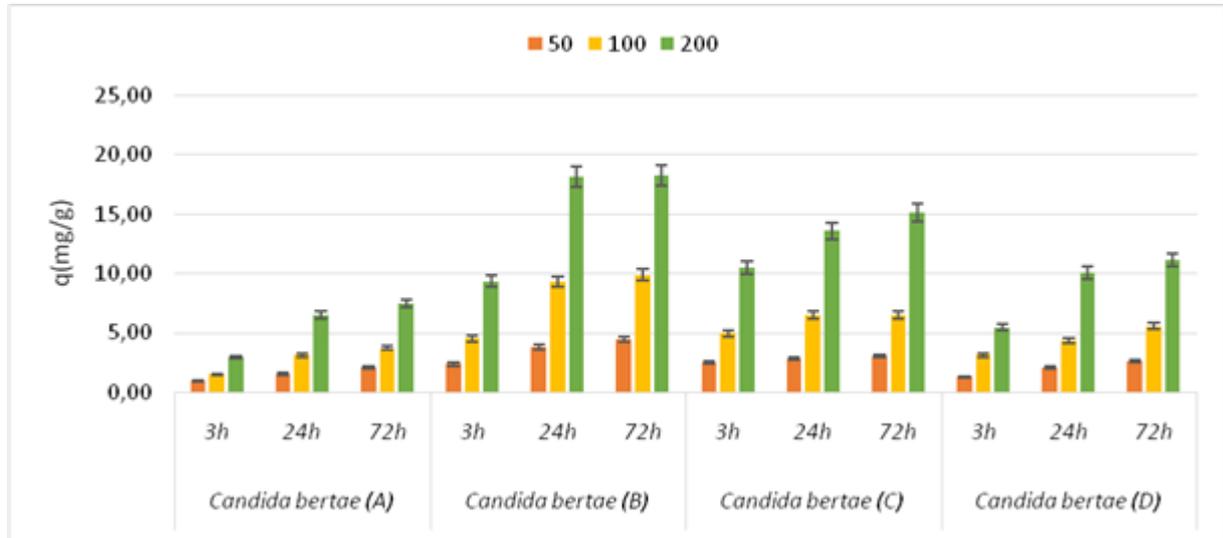


Figure 31. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Cu (II) sur la capacité de bioaccumulation pour les quatre isolats de *Candida bertae*

L'isolat *Candida bertae*_(B) est l'isolat le plus accumulant au Cu (II) comparé à ceux retrouvés dans les points A, C et D (Figure 31) avec une capacité d'accumulation maximale égal à 18.26 mg/g suivi de *Candida bertae*_(C), *Candida bertae*_(D) et *Candida bertae*_(A) avec 15.16 mg/g, 11.13 mg/g et 7.47 mg/g respectivement à 200 ppm pendant 72h de contact. Ceci est en accord avec l'étude de Donmez et Aksu (2001), qui ont indiqué que l'espèce *Candida sp.* accumule à une capacité allant de 4.7 à 23 mg/g.

2-2-3- Variation de la Bioaccumulation du Cu par les trois isolats de *Rhodotorula glutinis* :

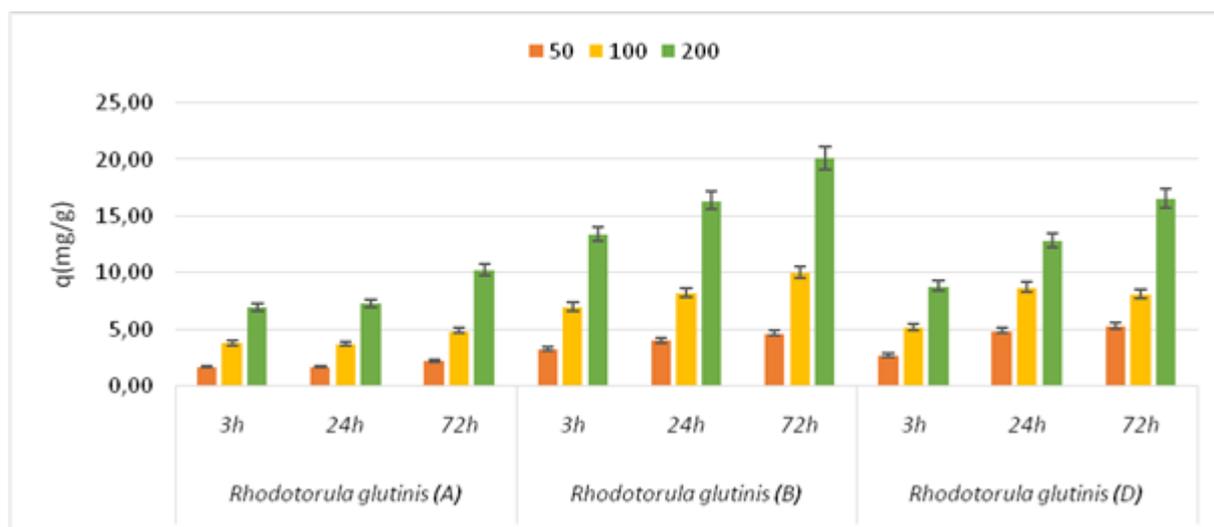


Figure 32. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Cu (II) sur la capacité de bioaccumulation des trois isolats de *Rhodotorula glutinis*

Rhodotorula glutinis issue du point B, est l'isolat de levure le plus accumulant du genre *Rhodotorula* dans toutes les concentrations (Figure 32) avec une capacité maximale de 20.11 mg/g à 200 ppm pendant 72h de contact suivi de *Rhodotorula glutinis*_(D) puis *Rhodotorula glutinis*_(A) avec 16.54 mg/g et 10.24 mg/g respectivement.

2-2-4- Variation de la Bioaccumulation du Cu par les deux isolats de *Candida versatilis* :

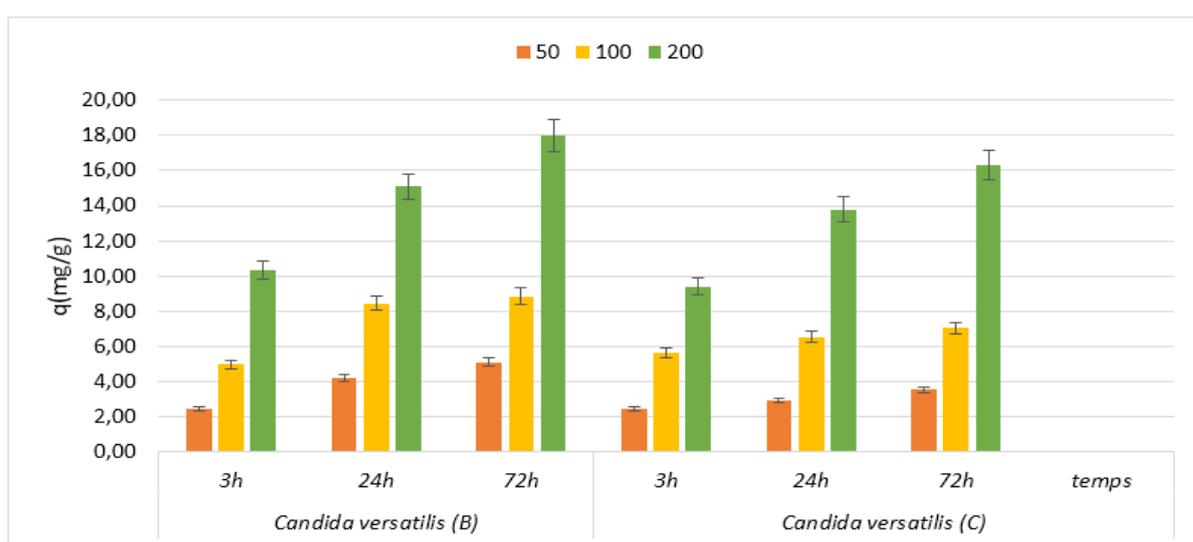


Figure 33. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Cu (II) sur la capacité de bioaccumulation des deux isolats de *Candida versatilis*

L'isolat *Candida versatilis* retrouvé au point B, s'est démontré plus accumulant avec une capacité maximale de 17.99 mg/g comparé à *Candida versatilis* retrouvé au point C avec une valeur égale à 16.31 mg/g à 72h dans 200 ppm de concentration. Basil *et al.* (2015), ont noté que l'espèce *Candida sp.* est doté d'un grand pouvoir d'accumulation des métaux notamment le Cu avec une valeur égale à 16 mg/g, ce qui se concorde avec les résultats retrouvés.

2-2-5- Variation de la Bioaccumulation du Cu par l'isolat *Trichosporon ovoides* :

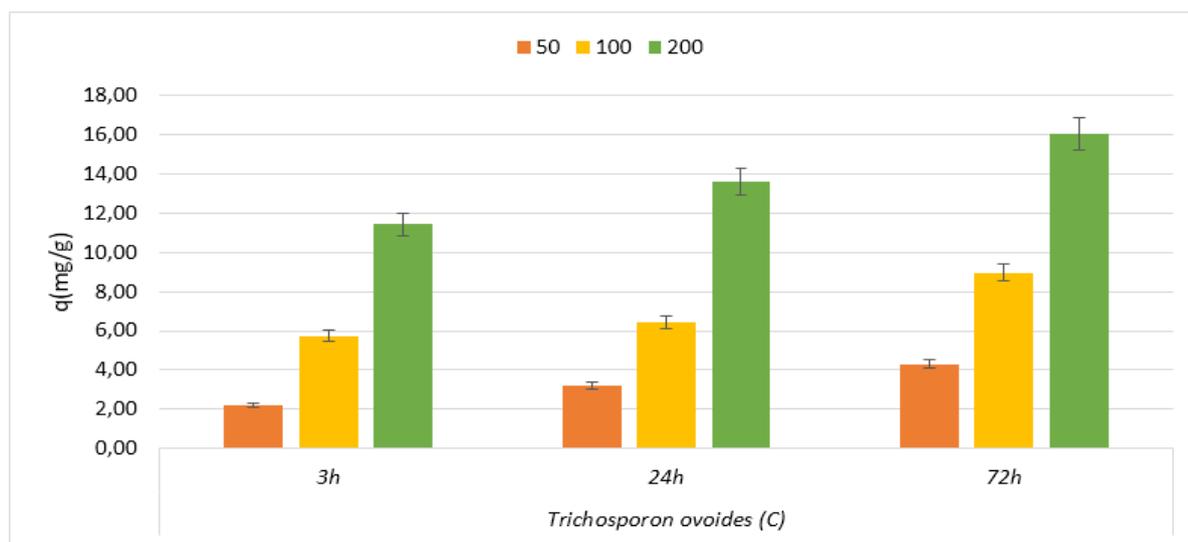


Figure 34. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Cu (II) sur la capacité de bioaccumulation de *Trichosporon ovoides*

Le seul isolat de *Trichosporon ovoides*_(C) retrouvé, accumule à une capacité maximale de 4.29 mg/g, 8.98 mg/g et 16.05 mg/g à 50, 100 et 200 ppm pendant 72h de contact avec le métal. L'étude de Sidra *et al.* (2018) ont signalé que le genre *Trichosporon* pouvait accumuler le Cu à une valeur égale à 36 mg/g dans 12 jours de contact.

Tableau XV. Classification des isolats en fonction de la meilleure capacité d'accumulation

Points	Plomb		Cuivre	
	Filamenteux	Levures	Filamenteux	Levures
A	<i>A.niger</i> _(A)	<i>Rhodotorula glutinis</i> _(A)	<i>Acremonium sp.</i> _(A)	<i>Rhodotorula glutinis</i> _(A)
B	<i>Penicillium simplicissimum</i> _(B)	<i>Rhodotorula glutinis</i> _(B)	<i>Acremonium sp.</i> _(B)	<i>Rhodotorula glutinis</i> _(B)
C	<i>A.niger</i> _(C)	<i>Candida versatilis</i> _(C)	-	<i>Candida versatilis</i> _(C)
D	<i>A.carbonarius</i> _(D)	<i>Rhodotorula glutinis</i> _(D)	-	<i>Rhodotorula glutinis</i> _(D)

L'analyse statistique (Tableau XVI) montre qu'il existe une différence significative entre les isolats fongiques, le temps de contact ainsi que les concentrations retrouvées pour les deux métaux testés.

Tableau XVI. Résultats des tests ANOVA pour les filamenteux et levure en contact avec le Pb et Cu en fonction de la concentration initiale et du temps de contact

Isolats	Métal	Variables	Somme des carrés	Degré de liberté	Rapport F	Signification
Filamenteux	Pb	Concentration	132647,850	2	326,497	0.0001***
		Temps de contact	21628,116	2	17,472	0.0001***
	Cu	Concentration	27902,085	2	86,052	0.0001***
		Temps de contact	5917,045	2	4,987	0,011**
Levures	Pb	Concentration	149729,273	2	543,194	0.0001***
		Temps de contact	19953,113	2	18,403	0.0001***
	Cu	Concentration	202341,485	2	2232,813	0.0001***
		Temps de contact	6291,702	2	4,795	0,009***

Légende : *** très hautement significatif, ** significatif

La concentration initiale de Pb (II) et Cu (II) ainsi que le temps de contact semblent avoir un effet très hautement significatif sur l'accumulation des isolats de champignons filamenteux et des levures.

D'après Remon, (2006), les différences entre les espèces de levures dans la capacité d'absorption des ions métalliques peuvent être dues aux propriétés de la levure (physiologie cellulaire, structure, surface spécifique, perméabilité de la membrane cellulaire en fonction de la division, des genres et des espèces de levure).

D'après Donmez et Aksu, (2001), une tolérance élevée aux métaux pourrait être attribuée à une protéine dite : métallothionéine car ces études ont montré que des niveaux élevés de tolérance aux métaux lourds chez *Candida sp.*, *Rhodotorula sp.* ou *Cryptococcus sp.*, sont dues à la synthèse constitutive de la métallothionéine et d'autres protéines de liaison aux métaux tel le Cuivre et le Plomb. Ces levures pourraient également avoir des réserves d'énergie suffisantes pour le transport actif du métal éventuellement déposé dans les vacuoles qui s'agrandissent avec l'augmentation du temps d'exposition à la solution métallique.

L'adaptation des levures telle *Candida sp.* à des concentrations élevées de métal peut également être le résultat d'un processus génétique, les cellules hautement métaboliquement actives de la phase de croissance exponentielle contiennent probablement des enzymes très actives, dont certaines peuvent être actives dans la complexation et la liaison des ions métalliques (Donmez et Aksu., 2001).

VII. Test de Biosorption

Les isolats fongiques qui ont montré un potentiel qualitatif d'accumulation sur milieu de culture, ont fait l'objet d'une évaluation de leur capacité de biosorption, par dosage ICP. L'effet du temps de contact et de la concentration initiale sur la biosorption du Pb (II) et du Cu (II) sur les isolats a été étudié.

1- Biosorption des champignons filamenteux

1-1- Effet de la biosorption du Pb à différentes concentrations par les isolats filamenteux

1-1-1- Biosorption du Pb par les quatre isolats d'*Aspergillus niger* :

La biosorption des ions Pb (II) sur *A. niger* augmente avec l'augmentation de la concentration initiale d'ions métalliques (Figure 35).

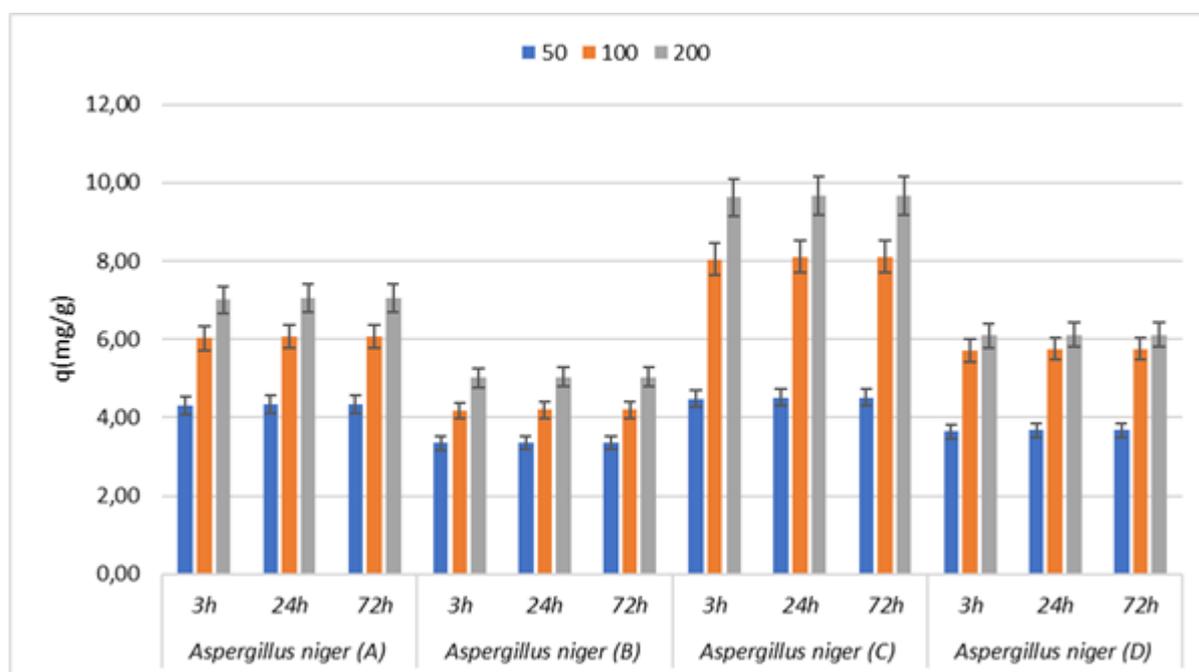


Figure 35. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de biosorption des quatre isolats d'*Aspergillus niger*

Une biosorption rapide des ions Pb (II) a été observée dès 3h de contact. Après cette période, la quantité d'ions métalliques biosorbé n'a pas changé de manière significative malgré l'augmentation du temps de contact.

Après 3h, les teneurs sont stables malgré l'augmentation du temps de contact à 24h et 72h.

A.niger (C) est l'isolat qui a montré une teneur de biosorption importante par rapport aux isolats retrouvés, avec 9.62 mg/g à 200 ppm, 8.05 mg/g à 100 ppm et 4.49 mg/g à 50 ppm. Suivi d'*A.niger* (A) avec une valeur de 7.01 mg/g à 200 ppm, 6.03 mg/g à 100 et 4.31 mg/g à 50 ppm. Puis *A.niger* (D) avec 6.09 mg/g à 200 ppm, 5.72 mg/g à 100 et 3.65 mg/g à 50 ppm. Et enfin *A.niger* (B) avec 5.01 mg/g à 200 ppm, 4.18 mg/g à 100 et 3.35 mg/g à 50 ppm.

Ces résultats sont en accord avec ceux retrouvés dans l'étude de Akar *et al*, (2006), qui ont démontré que la biosorption des ions Pb (II) est observée dès 30 min de contact et que l'élimination maximale se produite en 2 h seulement. Après ce temps, la biosorption des ions métalliques devient très lente jusqu'à devenir constante.

D'après cette même étude, il a été démontré que la capacité de biosorption du genre *Aspergillus* peut atteindre jusqu'à 24,46 mg / g pour 100 ppm et 52 mg /g pour 200 ppm de Pb (II).

1-1-2- Biosorption du Pb par les trois isolats d'*Aspergillus carbonarius* :

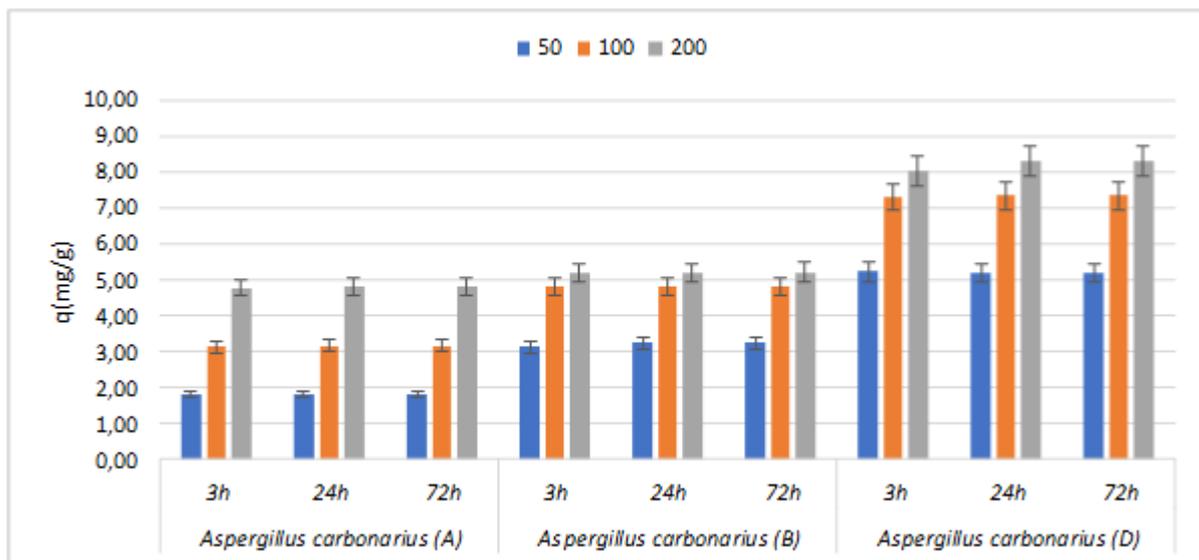


Figure 36. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de biosorption d'*Aspergillus carbonarius*

A.carbonarius (D) est l'isolat qui a montré une teneur de biosorption la plus élevée par rapport aux isolats retrouvés, avec 8.01 mg/g à 200 ppm, 7.28 mg/g à 100 ppm et 5.23 mg/g à 50 ppm. Suivi d'*A.carbonarius* (B) avec une valeur de 5.19 mg/g à 200 ppm, 4.79 mg/g à 100 et 3.14 mg/g à 50 ppm. Puis *A.carbonarius* (A) avec 4.78 mg/g à 200 ppm, 3.12 mg/g à 100 et 1.82 mg/g à 50 ppm.

Ces résultats sont en accord avec Dursun *et al*, (2003) qui ont démontré que la biosorption d'*A.carbonarius* en contact avec le Pb (II) peut dépasser 25.8 mg/g dès 30 min de contact.

1-1-3- Biosorption du Pb par les deux isolats de *Penicillium* :

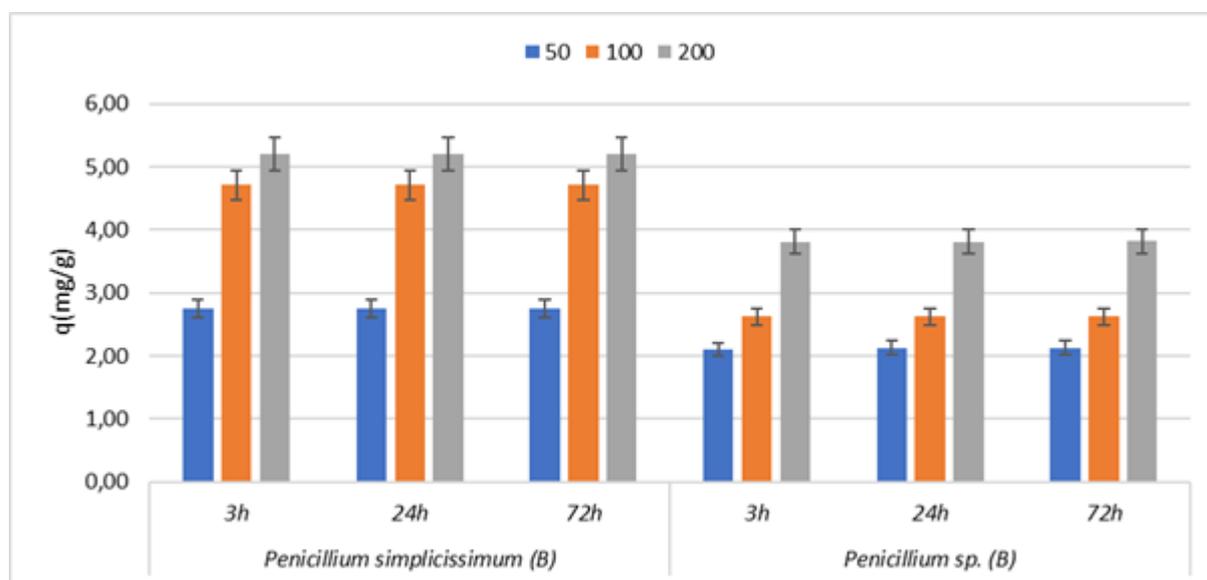


Figure 37. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de biosorption de *Penicillium sp.*

Penicillium simplicissimum (B) a révélé une capacité de biosorption importante avec 5.20 mg/g à 200 ppm à 3h de contact puis 4.71 mg/g à 100 ppm et 2.75 mg/g à 50 ppm. *Penicillium sp.* (B) a démontré moins de capacité avec 3.81 mg/g à 200 ppm, 2.62 mg/g à 100 ppm et 2.11 mg/g à 50 ppm.

Ces résultats sont en accord avec Ting fan *et al*, (2008) qui ont démontré que la capacité de biosorption de *Penicillium simplicissimum* peut dépasser 15.9 mg/g à 250 ppm de Pb (II).

1-1-4- Biosorption du Pb par l'isolat *Rhizomucor sp.* :

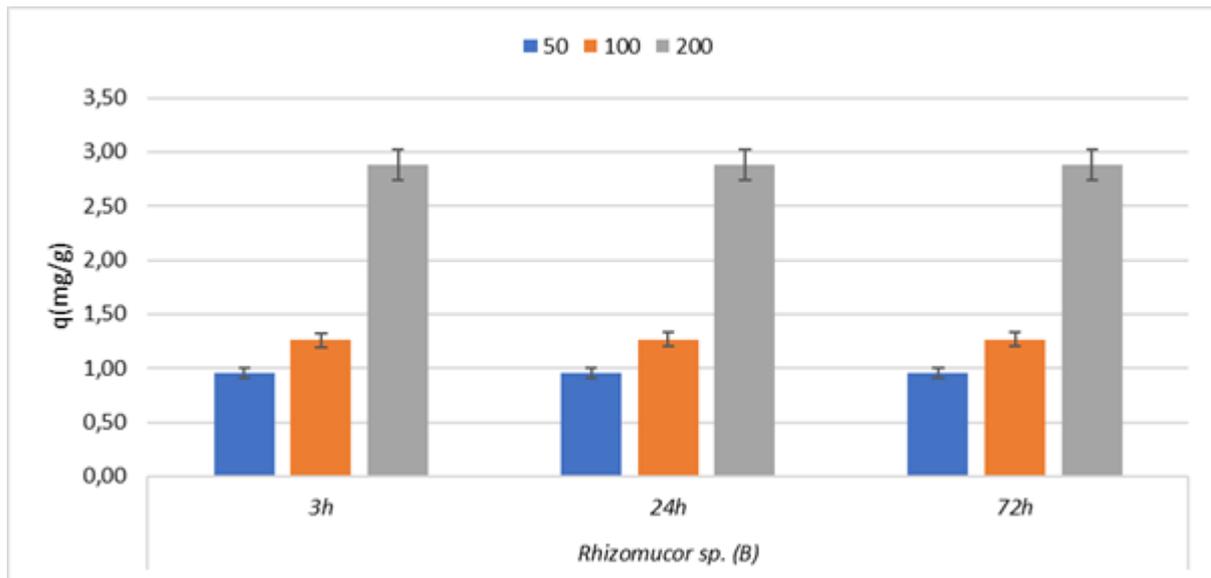


Figure 38. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de biosorption de *Rhizomucor sp.*

Rhizomucor sp. (B) est l'isolat qui a révélé la capacité de biosorption la plus faible comparé aux isolats retrouvés, avec une valeur de 2.88 mg/g à 200 ppm, 1.26 mg/g à 100 ppm et 0.95 mg/g à 50 ppm. Ceci est en accord avec Dursun *et al.*, (2003) qui ont démontré que ce genre de filamenteux ne dépasse pas 2.4 mg/g à 150 ppm de Pb (II).

1-2- Effet de la biosorption du Cu à différentes concentrations par les isolats filamenteux

Parmi les différents champignons filamenteux isolés et identifiés, seuls deux isolats de l'espèce *Acremonium sp.* ont biosorbé le Cu (Figure 39).

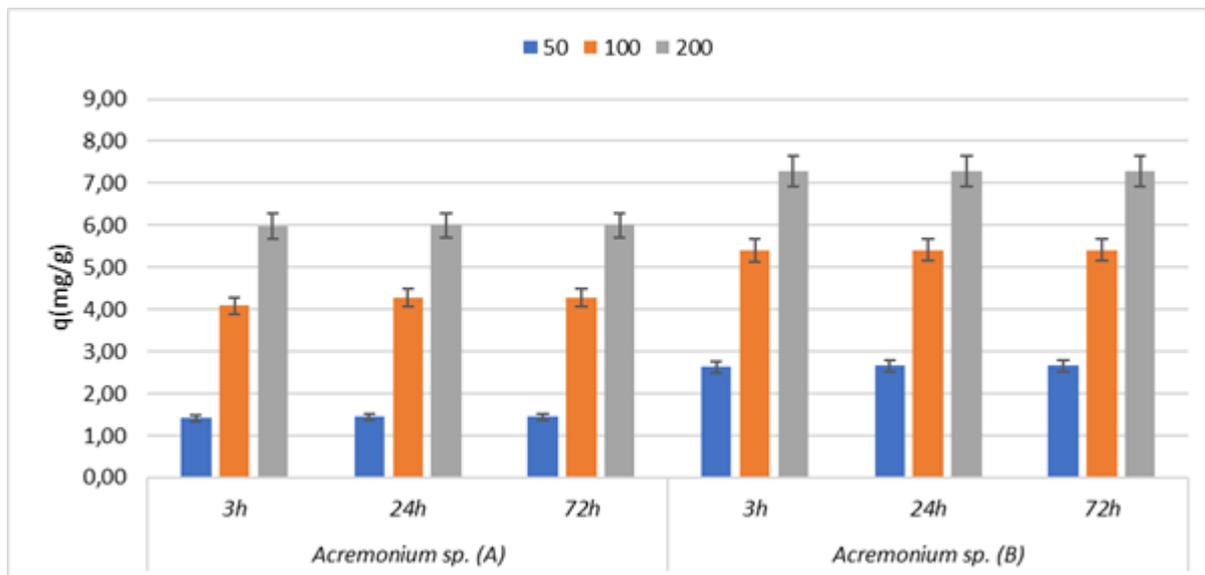


Figure 39. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Cu (II) sur la capacité de biosorption de *Acremonium sp.*

Acremonium sp. (B) a enregistré une valeur de 7.27 mg/g de biosorption à 200 ppm, 5.41 mg/g à 100 ppm et 2.63 mg/g à 50 ppm comparé à *Acremonium sp. (A)* avec 5.99 mg/g à 200 ppm, 4.08 mg/g à 100 ppm et 1.42 mg/g à 50 ppm.

Il a été démontré par Iskandar *et al.*, (2011) que la capacité de biosorption de Pb (II) par *A. niger* est élevée par rapport à *P. simplicissimum*. D'après Akar et Tunali (2006), l'élimination du Cu (II) et du Pb (II) par *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* et *Acremonium sp.* augmentait avec l'augmentation de la concentration initiale. Yalcin *et al.* (2010) ont suggéré qu'une concentration initiale plus élevée fournissait une force motrice importante pour surmonter toutes les résistances de transfert de masse entre la solution métallique et la paroi cellulaire du champignon.

2- Biosorption des isolats de levure

2-1- Effet de la biosorption du Pb à différentes concentrations par les isolats de levure

2-1-1- Variation de la Biosorption du Pb par les deux isolats de *Cryptococcus albidus* :

La biosorption des ions Pb (II) sur *Cryptococcus albidus* augmente avec l'augmentation de la concentration initiale d'ions métalliques (Figure 40).

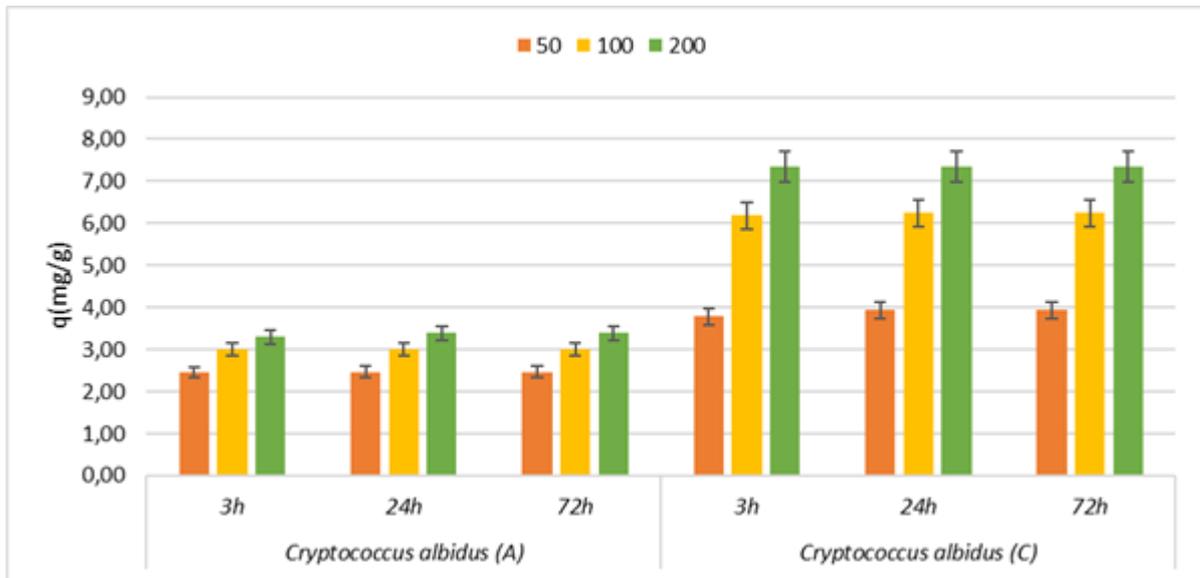


Figure 40. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de biosorption de *Cryptococcus albidus*.

Cryptococcus albidus (C) a révélé une capacité de biosorption égale à 7.34 mg/g à 200 ppm à 3h de contact avec Pb(II), 6.18 mg/g à 100 ppm et 3.78 mg/g à 50 ppm. *Cryptococcus albidus* (A) a indiqué une capacité de biosorption moins élevée, avec 3.30 mg/g à 200 ppm à 3h de contact avec le métal, 2.99 mg/g à 100 ppm et 2.45 mg/g à 50 ppm.

Ceci est en accord avec l'étude de Rusinova *et al*, (2019) qui ont indiqué que l'espèce *cryptococcus albidus* a une capacité de biosorption au Plomb égale à 6.8 mg/g à 100 ppm.

2-1-2- Variation de la Biosorption du Pb par les quatre isolats de *Candida bertae* :

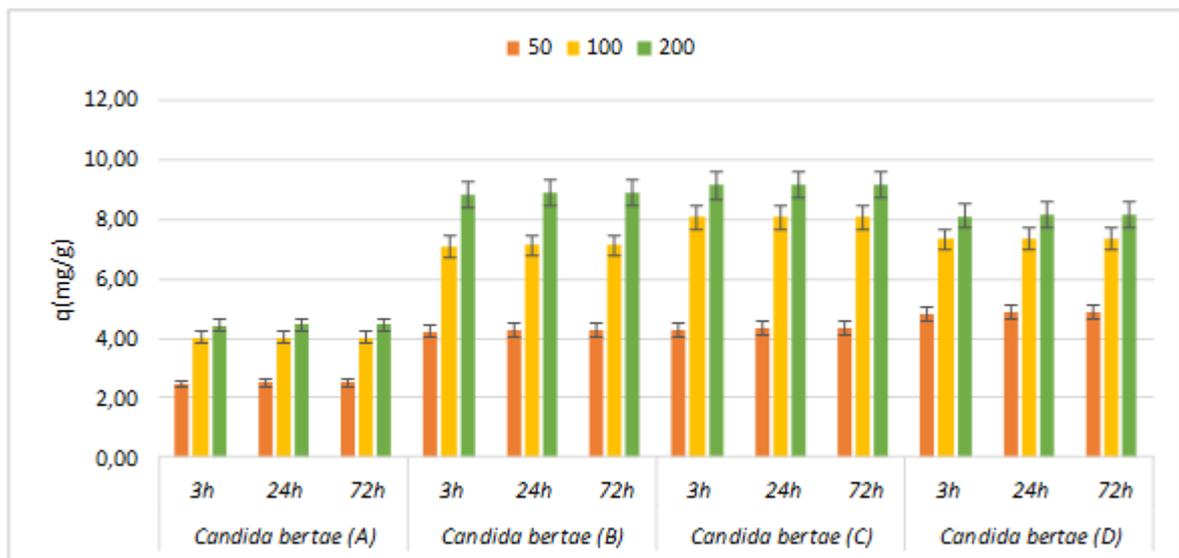


Figure 41. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de biosorption de *Candida bertae*

Parmi les quatre isolats de *Candida bertae* retrouvés dans les 4 points étudiés, *Candida bertae* (C) a marqué une capacité de biosorption égale à 9.11 mg/g à 200 ppm à 3h puis 8.07 mg/g à 100 ppm et 4.28 mg/g à 50 ppm. Suivi de *Candida bertae* (B) et *Candida bertae* (D) avec une capacité de 8.83 mg/g et 8.10 mg/g à 200 ppm, 7.06 mg/g et 7.31 mg/g à 100 ppm et 4.22 mg/g, 4.82 mg/g à 50 ppm respectivement pendant 3h de contact. *Candida bertae* (A) a dévoilé une capacité de 4.43 mg/g à 200 ppm, 4.03 mg/g à 100 et 2.47 mg/g à 50 ppm à 3 de contact avec le métal. D’après l’étude de Donmez et Aksu (2001), l’espèce *Candida bertae* peut avoir une capacité de biosorption supérieure à 4.7 mg/g de Pb (II) ce qui est en accord avec les résultats retrouvés.

2-1-3- Variation de la Biosorption du Pb par les trois isolats de *Rhodotorula glutinis* :

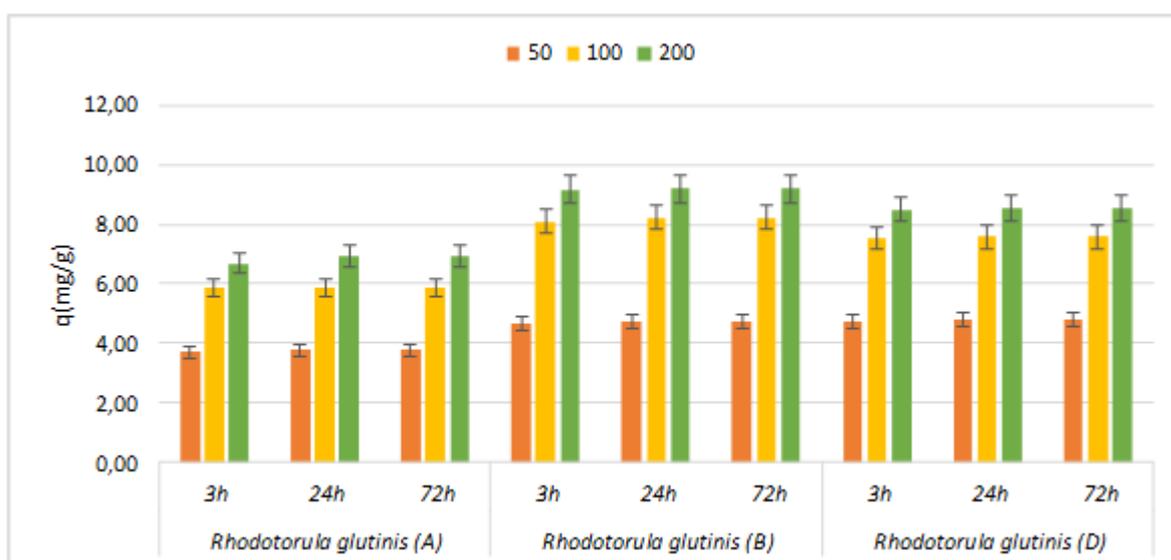


Figure 42. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de biosorption de *Rhodotorula glutinis*

Rhodotorula glutinis retrouvée au point B a indiqué une capacité de biosorption égale à 9.15 mg/g à 200 ppm, 8.09 mg/g à 100 ppm et 4.68 mg/g à 50 ppm à 3h de contact. Suivi de *Rhodotorula glutinis* (D) et *Rhodotorula glutinis* (A) avec 8.50 mg/g et 6.68 mg/g à 200 ppm, 7.52 mg/g et 5.88 mg/g à 100 ppm, 4.70 mg/g et 3.71 mg/g à 50 ppm à 3h de contact. Ceci est en accord avec Salinas *et al*, (2000), qui ont démontré que la capacité de biosorption de cette espèce est égale à 12.5 mg/g à 200 ppm de Pb (II).

2-1-4- Variation de la Biosorption du Pb par les deux isolats de *Candida versatilis* :

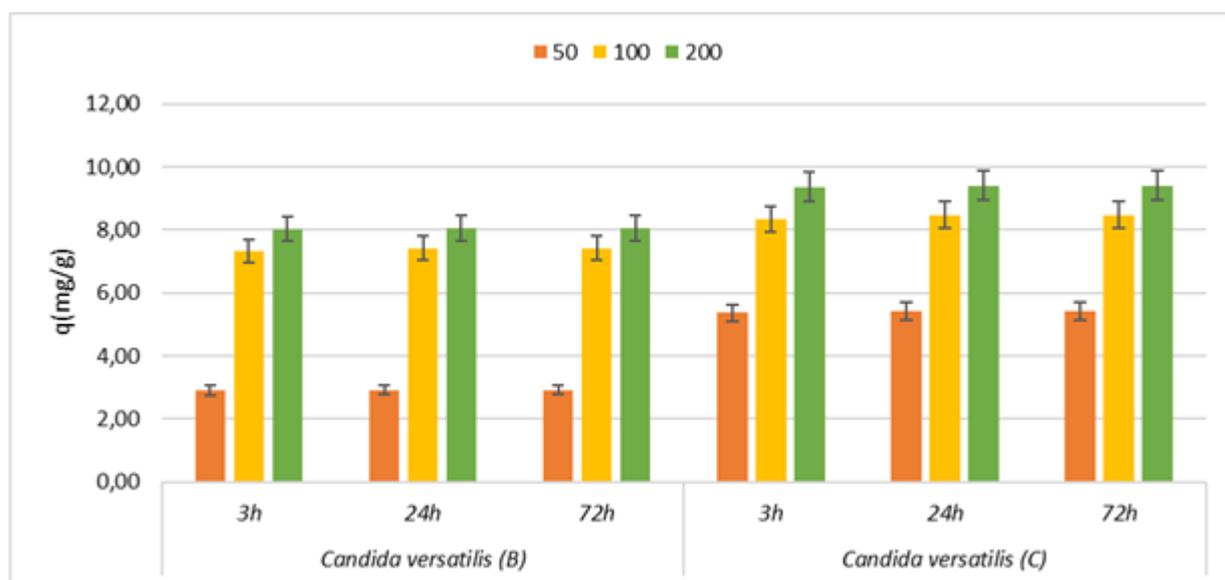


Figure 43. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de biosorption de *Candida versatilis*

Candida versatilis (C) a révélée la capacité de biosorption la plus élevée de toutes les espèces retrouvées dans les points étudiés avec une valeur égale à 9.36 mg/g à 200 ppm, 8.33 mg/g à 100 ppm et 5.38 mg/g à 50 ppm à 3h de contact comparé avec celle retrouvé dans le point (B) avec une valeur de 8.03 mg/g à 200 ppm, 7.32 mg/g à 100 ppm et 2.91 mg/g à 50 ppm.

Zhang *et al.*, (2016), ont démontré que l'espèce *Candida versatilis* est doté d'un potentiel important pour la biosorption du Pb (II) qui pourrait dépasser 17 mg/g pour 200 ppm.

2-1-5- Variation de la Biosorption du Pb par l'isolat *Trichosporon ovoides* :

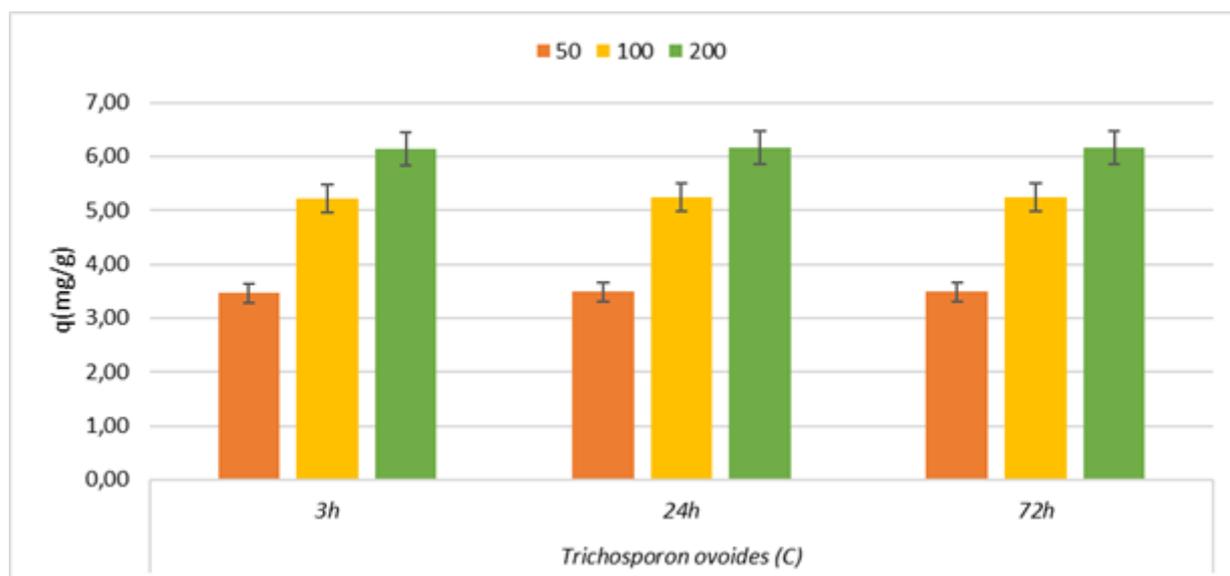


Figure 44. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Pb (II) sur la capacité de biosorption de *Trichosporon ovoides*

L'isolat *Trichosporon ovoides* retrouvé au point C a marqué une capacité de biosorption égale à 6.14 mg/g à 200ppm, 5.21 mg/g à 100 ppm et 3.46 mg/g à 50 ppm de Pb (II) à 3h de contact. Ceci est en accord avec les résultats de Munoz *et al*, (2012), qui ont indiqué que l'espèce *Trichosporon ovoides* a une capacité de 6 à 6.5 mg/g de biosorption à seulement 30 min de contact.

2-2- Effet de la biosorption du Cu à différentes concentrations par les isolats levure

2-2-1- Variation de la biosorption du Cu par les deux isolats de *Cryptococcus albidus* :

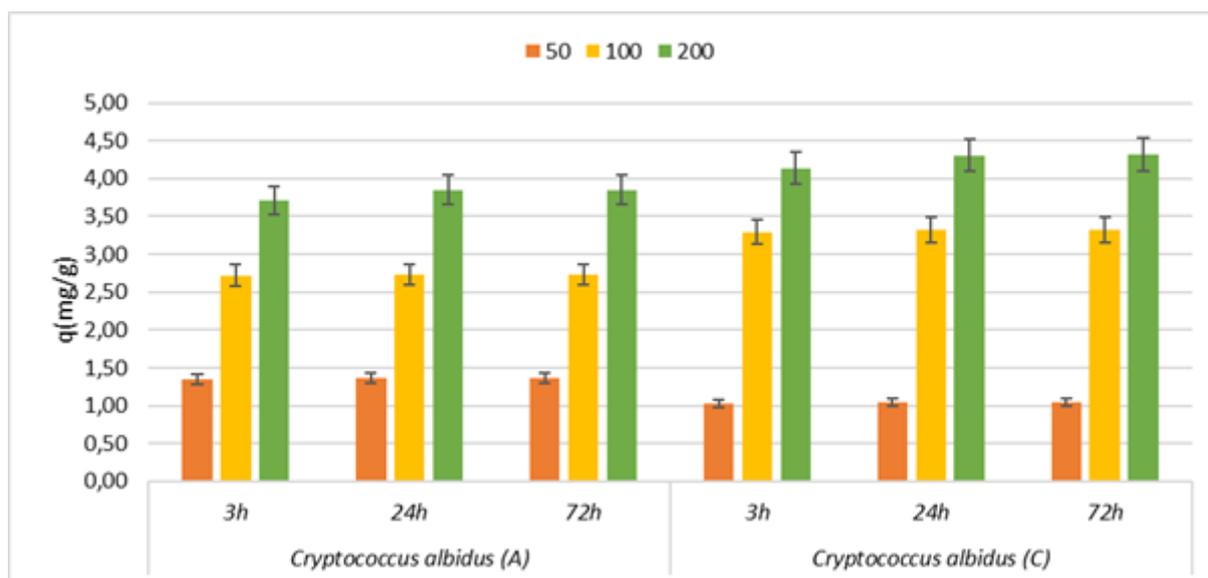


Figure 45. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Cu (II) sur la capacité de biosorption de *Cryptococcus albidus*.

Tous les isolats de levure ont indiqué une capacité de biosorption réduite par rapport au Pb (II).

Les isolats de *Cryptococcus albidus* (A) et (C) ont révélé une capacité de biosorption égale à 3.71 mg/g et 4.14 mg/g à 200 ppm, 2.72 mg/g et 3.30 mg/g à 100 ppm et 1.35 mg/g et 1.03 mg/g à 50 ppm à 3h de contact avec Cu(II). Abe *et al.* (2001) ont noté la haute sensibilité de la souche *Cryptococcus albidus* vers le cuivre, ce qui réduit sa capacité de biosorption à 2.22 mg/g à 200ppm.

2-2-2- Variation de la biosorption du Cu par les quatre isolats de *Candida bertae* :

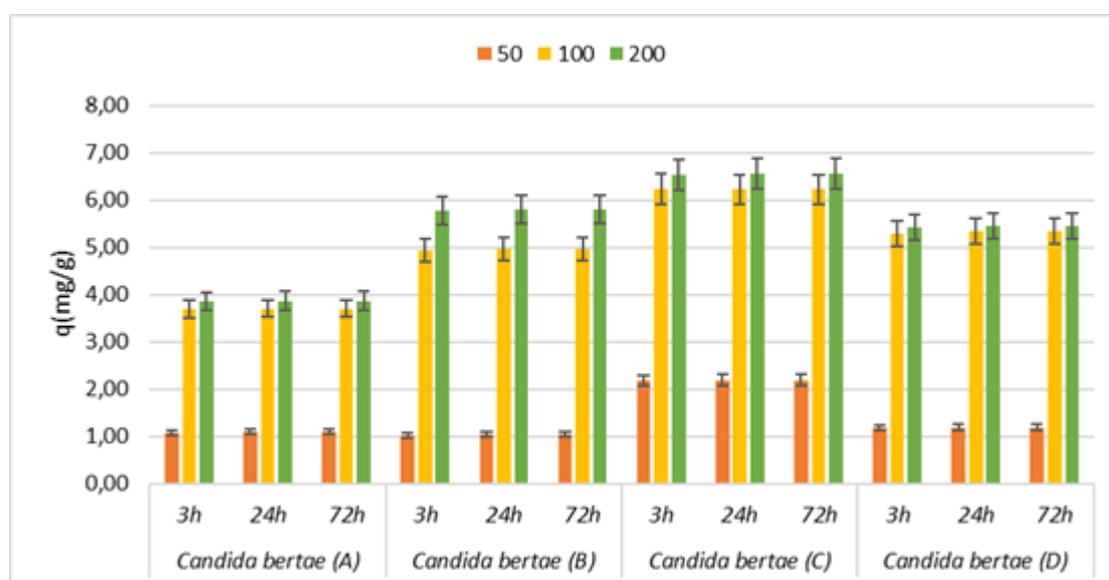


Figure 46. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Cu (II) sur la capacité de biosorption de *Candida bertae*

Candida bertae (C), a démontré une capacité de biosorption importante à 3h qui est égale à 6.52 mg/g, 6.23 mg/g et 2.18 mg/g à 200 ppm, 100 ppm et 50 ppm respectivement. Suivi de *Candida bertae* (B) et *Candida bertae* (D) avec une biosorption égale à 5.77 mg/g ; 5.43 mg/g à 200 ppm, 5.93 mg/g ; 5.29 mg/g à 100 ppm et 1.18 mg/g ; 1.02 mg/g à 50ppm.

Candida bertae (A) a enregistré une biosorption à 3h égale à 3.85 mg/g à 200ppm, 3.70 mg/g à 100 ppm et 1.09 mg/g à 50 ppm.

Ces résultats sont en accord avec Cornelissen *et al.*, (2003) qui ont démontré que *Candida bertae* pouvait avoir une capacité de biosorption au Cu égale à 7.11 mg/g à 100ppm de concentration.

2-2-3- Variation de la biosorption du Cu par les trois isolats de *Rhodotorula glutinis* :

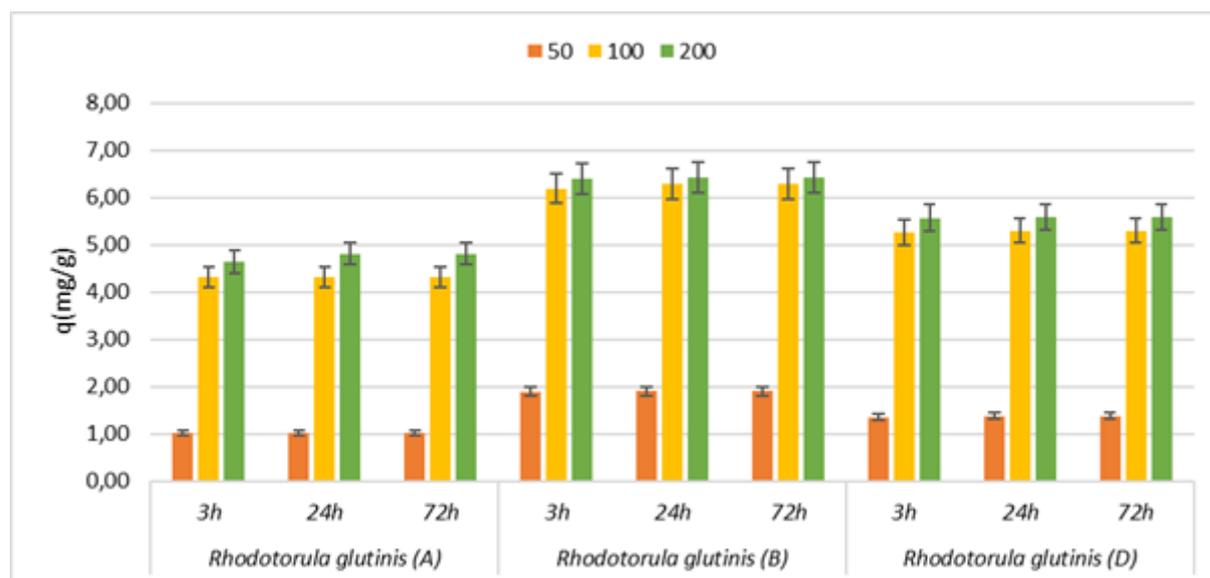


Figure 47. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Cu (II) sur la capacité de biosorption de Cu (II) pour *Rhodotorula glutinis*

Rhodotorula glutinis (B) a dévoilé un potentiel de biosorption élevé par rapport aux isolats étudiés, avec une valeur de 6.39 mg/g à 200 ppm, 6.19 mg/g à 100 ppm et 1.89 mg/g à 50 ppm à 3h de contact avec Cu. Suivi de l'isolat *Rhodotorula glutinis* (D) et *Rhodotorula glutinis* (A) avec une valeur égale à 5.57 mg/g et 4.64 mg/g à 200 ppm, 5.26 mg/g et 4.32 mg/g à 100 ppm et 1.36 mg/g et 1.01 mg/g à 50 ppm.

Cornelissen *et al*, (2003) ont souligné que les levures urédiniomycètes des genres *Rhodotorula* biosorbent mieux le cuivre que les levures hyménomycètes des genres *Cryptococcus* et que la capacité de biosorption de l'espèce *Rhodotorula glutinis* variait de 3.6 à 28.5 mg/g.

2-2-4- Variation de la biosorption du Cu par les deux isolats de *Candida versatilis* :

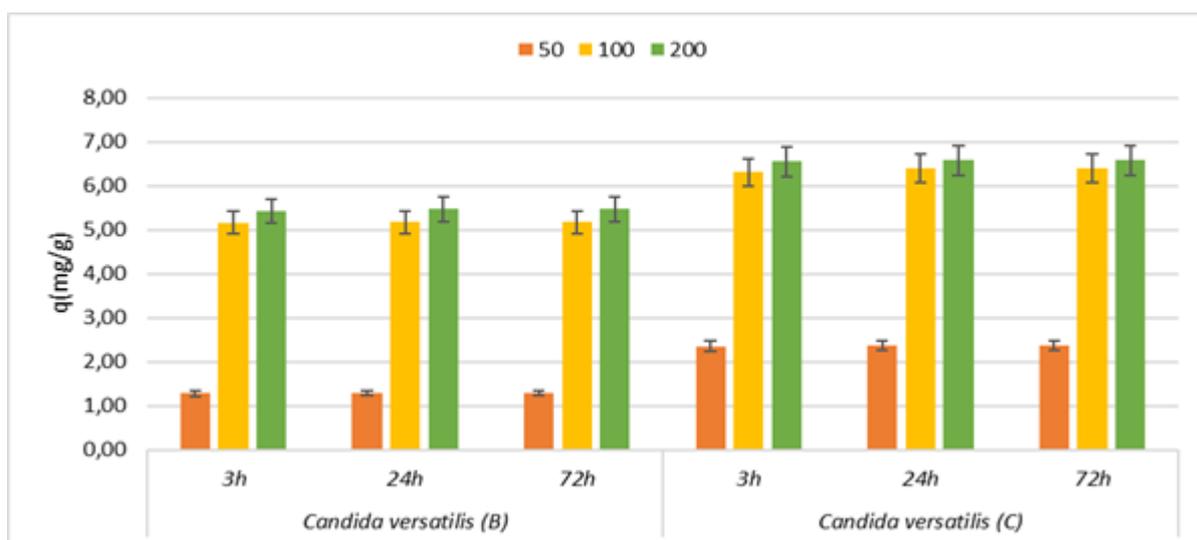


Figure 48. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Cu (II) sur la capacité de biosorption de *Candida versatilis*

Candida versatilis (C) a dévoilé un potentiel de biosorption élevé par rapport à *Candida versatilis* (B), avec une valeur égale à 6.55 mg/g à 200 ppm, 6.30 mg/g à 100 ppm et 2.35 mg/g à 50 ppm.

2-2-5- Variation de la biosorption du Cu par l'isolat *Trichosporon ovoides* :

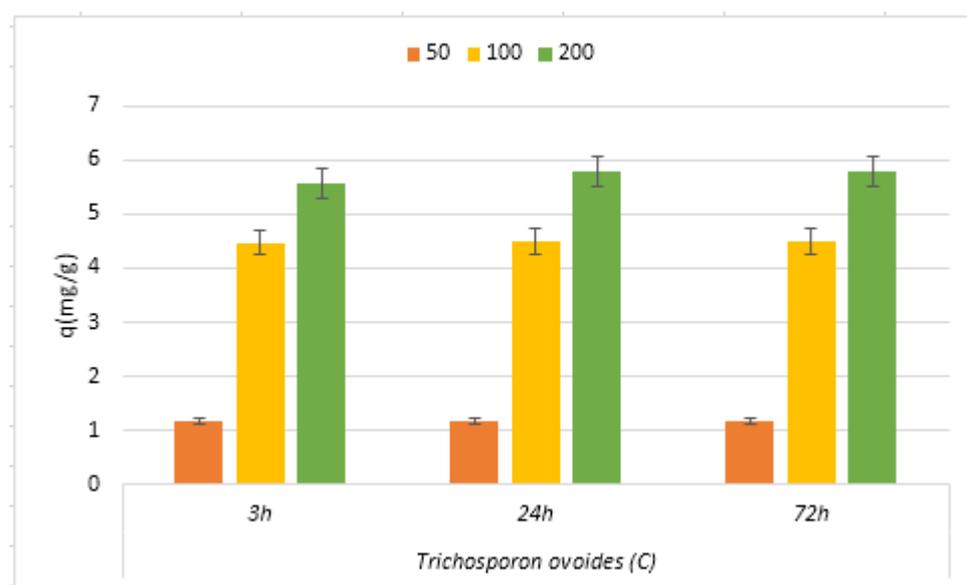


Figure 49. Effet du temps de contact et de la concentration initiale du Cu (II) sur la capacité de biosorption de *Trichosporon ovoides*

Trichosporon ovoides provenant du point C, a marqué une biosorption égale à 5.58 mg/g à 200 ppm, 4.47 mg/g à 100 ppm et 1.16 mg/g à 50 ppm à 3h de contact. Ceci est en accord avec Bryaskova *et al.*, (2010) qui ont noté que l'espèce *Trichosporon ovoides* pouvait biosorber le Cu à une valeur allant de 4.5 à 10 mg/g à 250 ppm à 2h de contact.

La capacité de biosorption augmente avec l'augmentation de la concentration en ions métallique jusqu'à 200 ppm de concentration (Say *et al.*, 2001). Au-delà de cette concentration, la capacité de biosorption reste constante (Awwad *et al.*, 2014). Cette augmentation pourrait être due à une augmentation des interactions électrostatiques (adsorption physique par rapport à des interactions covalentes) (Bektas *et al.*, 2014). L'absorption des métaux peut être attribuée à différents mécanismes d'échange d'ions et d'adsorption. (Buasri *et al.*, 2007).

Dans l'étude d'Akar *et al.*, (2006), l'effet de la concentration initiale en ions métalliques sur la capacité de biosorption d'*Aspergillus sp.* a été étudié. La biosorption des ions Pb (II) a augmenté avec l'augmentation de la concentration initiale d'ions métalliques, devenant saturée à 200 ppm. Ces résultats peuvent s'expliquer par une augmentation du nombre d'ions métalliques en compétition pour les sites de liaison disponibles dans la biomasse. Dans la même étude, il a été prouvé qu'à des niveaux de concentration plus élevés, les ions Pb (II) ou Cu (II) ne sont pas adsorbés en solution en raison de la saturation des sites de liaison.

Madala *et al.*, (2017), ont révélé que la biosorption augmente rapidement dans les 0 à 30 min de contact à raison de la disponibilité abondante des liaisons actives puis une occupation progressive se produit.

Aksu et Tezer (2005) ont également signalé qu'à 200 ppm à 20,910 mg / g de biosorption et 250 ppm à 54,046 mg / g de Cu (II) et Pb (II) respectivement, la solution devient saturée ce qui permet aux précipitations de se produire. Le nombre d'ions métalliques en compétition et le manque de sites de liaison font passer la solution à un stade saturé.

Tableau XVII. Classification des isolats avec la meilleure capacité de biosorption en fonction des points

Points	Plomb		Cuivre	
	Filamenteux	Levures	Filamenteux	Levures
A	<i>A.niger</i> _(A)	<i>Rhodotorula glutinis</i> _(A)	<i>Acremonium sp.</i> _(A)	<i>Rhodotorula glutinis</i> _(A)
B	<i>Penicillium simplicissimum</i> _(B)	<i>Rhodotorula glutinis</i> _(B)	<i>Acremonium sp.</i> _(B)	<i>Rhodotorula glutinis</i> _(B)
C	<i>A.niger</i> _(C)	<i>Candida versatilis</i> _(C)	-	<i>Candida versatilis</i> _(C)
D	<i>A.carbonarius</i> _(D)	<i>Rhodotorula glutinis</i> _(D)	-	<i>Rhodotorula glutinis</i> _(D)

Les mêmes isolats qui ont révélé un meilleur potentiel d'accumulation pour Pb (II) et Cu (II) précédemment, ont également dévoilé le meilleur potentiel de biosorption.

L'analyse statistique montre qu'il existe une différence significative entre les isolats fongiques et les concentrations retrouvées, par contre il n'y a pas une différence significative entre les isolats fongiques et le temps de contact pour les deux métaux testés (Tableau XVIII).

Tableau XVIII. Analyse de la variance (ANOVA)

Isolats	Métal	Variabes	Somme des carrés	Degré de liberté	Rapport F	Signification
Filamenteux	Pb	Concentration	127800.326	2	897.060	0.0001***
		Temps de contact	0.375	2	0.000	1.000 ^{NS}
	Cu	Concentration	20667.322	2	1389.261	0.0001***
		Temps de contact	0.175	2	0.000	1.000 ^{NS}
Levures	Pb	Concentration	147052,967	2	2212.811	0.0001***
		Temps de contact	6.748	2	0.007	0.993 ^{NS}
	Cu	Concentration	173102.995	2	9052.534	0.0001***
		Temps de contact	0.796	2	0.001	0.999 ^{NS}

Légende : *** Très hautement significatif, NS : non significatif

La concentration initiale de Pb (II) et Cu (II) semble avoir un effet significatif sur la biosorption des isolats de champignons filamenteux et des levures, tandis que le temps de contact n'a aucun effet sur les isolats étudiés.

VIII. Test de bioremédiation

Le lot R1 reçoit les isolats du point A ; le lot R₂, ceux du point B ; R₃, point C ; R₄, point D et le lot R₅ estensemencé avec la suspension fongique de tous les isolats (tous points confondus), R₀ est le lot témoin, où aucun isolat n'est ajouté. Des échantillons de sol de chaque lot sont prélevés au temps T₀, après 14 jours d'incubation et au 50^{ème} jour et analysés par ICP-AES.

Dans le cas de la bioaccumulation, les isolats ont montré les meilleures capacités à 72h/200 ppm, et dans le cas de la biosorption, les isolats ont montré les meilleures capacités à 3h/200 ppm. Les isolats qui ont montré une meilleure capacité en bioaccumulation sont les mêmes qui ont démontré la meilleure capacité en biosorption (Tableau XIX).

Tableau XIX. Isolats choisis pour la bioremédiation des sols pollués par Pb et Cu

Lots		Filamenteux		Levures	
		Pb	Cu	Pb	Cu
R0	Témoin	-	-	-	-
R1	Point A	<i>A.niger</i> _(A)	<i>Acremonium sp.</i> _(A)	<i>Rhodotorula glutinis</i> _(A)	
R2	Point B	<i>Penicillium simplicissimum</i> _(B)	<i>Acremonium sp.</i> _(B)	<i>Rhodotorula glutinis</i> _(B)	
R3	Point C	<i>A.niger</i> _(C)	-	<i>Candida versatilis</i> _(C)	
R4	Point D	<i>A.carbonarius</i> _(D)	-	<i>Rhodotorula glutinis</i> _(D)	
R5	Combinaison	<i>A.niger</i> _(A) <i>Penicillium simplicissimum</i> _(B) <i>A.niger</i> _(C) <i>A.carbonarius</i> _(D)	<i>Acremonium sp.</i> _(A) <i>Acremonium sp.</i> _(B)	<i>Rhodotorula glutinis</i> _(A) <i>Rhodotorula glutinis</i> _(B) <i>Candida versatilis</i> _(D) <i>Rhodotorula glutinis</i> _(D)	

Légende : - aucun isolat n'a été ajouté.

Après 50 jours de bioremédiation, la teneur totale en Pb et en Cu dans les lots de 14 jours à 50 jours était significativement modifiée, tandis qu'aucune différence significative n'a été observée de 0 jours à 14 jours (Figure 50).

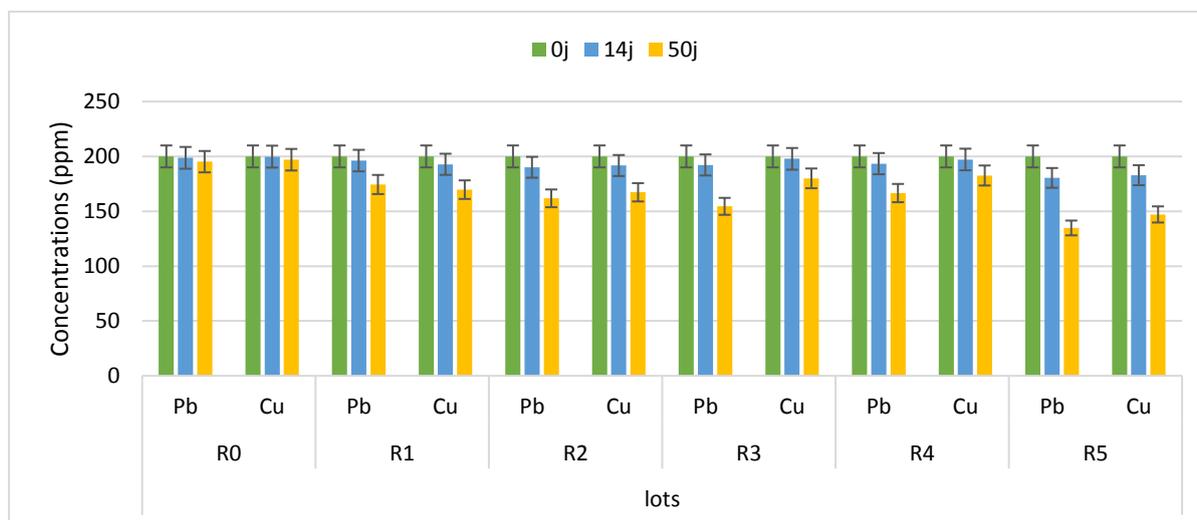


Figure 50. Valeurs de Pb et Cu retrouvées dans le sol avant et après la bioremédiation

Le lot R5 regroupe les valeurs de Pb et Cu les moins élevées avec 134.8 ppm pour Pb et 147.1 ppm pour Cu à raison de 32% et 26.4 % de diminution, ce qui signifie une bioremédiation importante de ce lot par les isolats utilisés. Suivi du lot R3 et R2 avec 154.5 ppm et 161.8 ppm pour Pb et 169.7 ppm et 167.3 ppm pour Cu respectivement. Ceci est probablement due aux capacités importantes des isolats utilisés qui proviennent de sol contaminé à des concentrations dépassant les seuils préconisés.

Les travaux de Donmez et Aksu (2001), Dursun *et al.*, (2003), Fan *et al.*, (2012) et li *et al.*, (2016) ont montré que les souches de *Rhodotorula sp.*, *Candida sp.* et *Aspergillus sp.* éliminent les métaux lourds (Pb et Cu) dans le sol en utilisant la biosorption (adsorption d'ions métalliques sur la surface cellulaire sans besoin d'énergie) et la bioaccumulation (absorption d'ions métalliques dans les cellules avec un besoin énergétique). La présence d'ions Ca et Mg dans le sol augmente la compétition pour les sites de liaison à la surface des cellules (Panwichian *et al.*, 2010a, 2012).

Bai *et al.* (2008) ont révélé que le mécanisme d'élimination des ions métalliques (Pb et Cu) par l'utilisation de certaines bactéries du sol, était principalement régi par la bioprécipitation sous forme de sulfure (PbS et CuS). Ce qui mène à la diminution de la teneur en SO_4^{2-} dans l'eau pendant la bioremédiation, et à la conversion du sulfate en sulfure et ainsi la formation de précipité de sulfure métallique (Fan *et al.*, 2012).

L'étude de li *et al.*, (2016), a démontré que les valeurs retrouvées de bioremédiation du Pb dans les lots témoins étaient plus élevées que celles retrouvées dans l'ensemble des lots testés dues à la présence de la biomasse dans le sol étudié.

Il a été constaté que, bien qu'aucun isolat n'ait été ajoutée dans les lots témoins, les valeurs ont légèrement diminués ; ceci est due d'après Peng *et al.*, (2017) à la présence de SO_4^{2-} dans le sol, qui induit à la formation de PbSO_4 à la place. Cette même étude a révélé qu'à l'exclusion du PbSO_4 formé à la suite du SO_4^{2-} dans le sol, d'autres phases plus inertes ont également été produites. Ce composé inerte peut être déduit sous forme de sulfure de plomb (PbS) ou de sulfure de cuivre (CuS).

Il a été démontré que l'élimination et la transformation des ions Pb et Cu d'une solution aqueuse se produisent principalement dans le cytoplasme et sur la paroi cellulaire (Bai *et al.*, 2008).

L'étude de Zhang *et al.*, (2020) a montré que plusieurs mécanismes peuvent entrer en jeux lors de la bioremédiation par biosorption telle la chélation par les protéines Métallothionéines, l'échange d'ions, l'adsorption physique et chimique, la complexation et la précipitation, effectuée par les microorganismes mis en jeux et les métaux retrouvés dans le sol. Les liaisons de surface sont les principaux phénomènes de la biosorption, ceci est causé par le mécanisme d'échange d'ions. Cet échange implique une compétition entre les protons et les liaisons métalliques aux sites de liaison. Les groupes carboxyle, amines, hydroxyles et phosphates sont les principaux sites de liaison dans la paroi cellulaire et sont disponibles en abondance. Sağ, (2001) a démontré que le groupement amine et carboxyle jouent un rôle dans la biosorption de Pb et Cu dans le cas d'*Aspergillus sp.* Et que ce dernier libère les ions Calcium, Potassium et Magnésium afin de libérer l'espace pour les ions métalliques (échange d'ions).

L'étude d'Ayangbenro *et al.*, (2017), a révélé que lors de la bioremédiation par bioaccumulation, les métaux entrent au cytoplasme de la cellule fongique par adsorption physique ou par échange d'ions puis entrent dans le cycle métabolique de la cellule et interfèrent dans l'expression et l'activité catalytique des enzymes.

L'étude de Li *et al.*, (2013) et Emenike *et al.*, (2018) a montré que la bioremédiation par biotransformation se repose sur la transformation du métal à une forme faiblement soluble dans l'eau et moins toxique à travers les enzymes cellulaires et les métabolites des organismes. Et la biominéralisation transforme les métaux en minéraux solides par formation de vésicules à l'intérieur de la cellule puis transporté à l'extérieur pour se décomposer dans la matrice organique et libérer des cations et ainsi former des minéraux.

L'étude de Sağ, (2001) a révélé que la présence simultanée de deux métaux, entraîne deux effets une synergie et un antagonisme. A PH acide, l'effet antagoniste a eu lieu en raison de la compétition avec les sites de liaison. A PH neutre, l'effet de synergie apparaît.

Ainsi, d'après les résultats obtenus dans ce travail, il a été montré que pour avoir une efficacité d'élimination très élevée des métaux Pb et Cu, il est recommandé de choisir les 10 isolats appartenant

au lot R5. Pour une efficacité importante et avec moins d'isolats, il est recommandé d'opter sur les 2 isolats du lot R3. De plus, dans le cadre de cette étude et en accord avec les travaux de Donmez et Aksu (2001), de Dursun *et al*, (2003), de Fan *et al*, (2012) et de Li *et al*, (2016), les isolats choisis éliminent les ions Pb et Cu par bioaccumulation et biosorption par mécanisme d'échange ionique.

Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour identifier et comprendre les mécanismes internes de bioremédiation qui se produisent lorsque les champignons telluriques sont utilisés pour le traitement par bioremédiation de sols contaminés par le Pb et le Cu.

Conclusion et Perspectives

Conscient du besoin de proposer des alternatives à la réhabilitation durable des sols pollués en métaux lourds de la région de Settat, grenier agricole du Maroc, une étude sur la contribution des champignons telluriques saprotrophes à la bioremédiation des sols pollués a été réalisée. Des sols de la région fortement touchés par des pollutions multi métalliques ont servi de scénario pour la mise en place des expériences.

Cette présente étude s'est focalisée sur différents points irrigués par les eaux de l'Oued Boumoussa, localisés à différentes distances de la zone industrielle de Settat. L'objectif était donc d'isoler du sol de la région, des champignons telluriques saprotrophes, reconnus pour leurs pouvoir à tolérer certains métaux lourds, tel le Plomb et le Cuivre et tester leurs capacités de tolérance, de bioaccumulation, de biosorption et de bioremédiation.

Une analyse des sols est réalisée afin de déterminer les conditions physico-chimiques auxquelles les souches fongiques sont confrontées dans leur milieu naturel. Cette analyse a révélé un taux élevé de Pb et Cu dans certains sols irrigués dépassant parfois les seuils préconisés par l'OMS (27 ppm pour Pb et 38.9 pour Cu). Un isolement suivi d'une identification des souches issues de ces sols, a permis d'évaluer la biodiversité fongique. En total, 102 isolats sont identifiés au niveau des 4 échantillons de sol étudiés dont 68 isolats de champignons filamenteux et 34 isolats de levures appartenant principalement aux Genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Rhizomucor*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Cryptococcus*, et *Trichosporon*.

Un criblage à travers différents tests de bioaccumulation et de biosorption sur milieu solide et liquide à différentes concentrations de Pb et de Cu est effectué pour évaluer la performance épuratoire des isolats fongiques autochtones à l'égard de ces deux métaux, le Plomb et le Cuivre.

Les résultats de l'accumulation qualitative sur milieu solide ont révélé que sur 68 isolats de champignons filamenteux identifiées, seuls 10 ont révélé un potentiel d'accumulation au Pb ; soit 14.7%. Le genre *Aspergillus* est le plus dominant parmi les champignons filamenteux isolés, représenté par deux espèces, *Aspergillus niger* et *Aspergillus carbonarius*, suivi de deux espèces de *Penicillium sp.* et une espèce de *Rhizomucor sp.* Seuls deux isolats appartenant au genre *Acremonium*, ont montré un potentiel accumulateur au Cu. Sur 34 isolats de levures identifiées, seuls 12 ont révélé un potentiel d'accumulation du Pb et du Cu simultanément, soit 35.2 %, représentés par 4 espèces de *Candida bertae*, 3 espèces de *Rhodotorula glutinis*, 2 espèces de *Cryptococcus albidus*, 2 espèces de *Candida versatilis* et 1 espèce de *Trichosporon ovoides*. Ces mêmes isolats ont fait l'objet des tests de bioaccumulation, de biosorption et de bioremédiation.

L'évaluation de la tolérance pour les filamenteux a été démontré par le calcul de l'indice de tolérance, celle des levures a été démontré par la croissance à différentes concentrations. Le comportement des isolats en présence du métal diffère d'un point de prélèvement à un autre. Les isolats de filamenteux ont une tolérance élevée à modérée à 200 ppm et faible à très faible avec l'augmentation des concentrations métalliques jusqu'à 1000 ppm de Pb et Cu. Les isolats de levures ont pu croître en présence de 1000 ppm de Pb et Cu, à l'exception des isolats *Candida versatilis*_(B) et *Candida bertae*_(B) dont la croissance est inhibée à des concentrations de Cu supérieures respectivement à 800 ppm et 600 ppm.

L'accumulation quantitative a montré que les meilleurs taux sont enregistrés après 72h de contact à 200ppm et le test de la biosorption à 3h de contact à 200 ppm de concentration de Pb et Cu.

Pour les points A, B, C et D, la meilleure capacité d'accumulation et de biosorption pour Pb chez les filamenteux est enregistré chez *Aspergillus niger* _(A), *Penicillium simplicissimum* _(B), *Aspergillus niger* _(C) et *Aspergillus carbonarius* _(D) et chez *Acremonium sp.* _(A) et *Acremonium sp.* _(B) pour le cas de Cu. Les meilleurs taux de bioaccumulation et de biosorption pour Pb et Cu simultanément chez les levures sont révélés chez *Rhodotorula glutinis* _(A), *Rhodotorula glutinis* _(B), *Candida versatilis* _(C) et *Rhodotorula glutinis* _(D).

Le test de bioremédiation a révélé que la teneur totale en Pb et en Cu dans les lots de 14 jours à 50 jours était significativement modifiée, tandis qu'aucune différence significative n'a été observée de 0 jours à 14 jours.

Le meilleur taux de bioremédiation enregistré après 50 jours, est égale à 32% pour Pb et 26.45 % pour Cu grâce aux capacités importantes des isolats utilisés.

A la base des résultats obtenus précédemment, nous pouvons à la fois tirer quelques recommandations et mesures prioritaires à mettre en avant, et souligner un nombre de perspectives pour la suite de notre étude, tel que faire davantage de test au niveau génétique afin d'évaluer les changements internes que subit chaque isolat au contact avec les deux métaux, identifier les activités enzymatiques responsable des mécanismes de bioremédiation et analyser les activités métaboliques des cellules pour pouvoir ainsi proposer des mesures pratiques pour contrôler ou atténuer les effets de cette pollution, et valider les possibilités de leur utilisation dans la dépollution des métaux des sites contaminés au Pb et Cu à grande échelle. Ou même d'élargir l'étude à l'échelle national, afin d'avoir plus d'isolats prometteurs à la bioremédiation, et pourquoi pas mettre en place un dispositif de traitement industrielle qu'on pourra utiliser dans les systèmes d'assainissement.

Références bibliographiques

- Abe, F., Miura, T., Nagahama, T., Inoue, A., Usami, R., Horikoshi, K., (2001). Isolation of a highly copper-tolerant yeast, *Cryptococcus* sp., from the Japan Trench and the induction of super-oxide dismutase activity by Cu^{2+} . *Biotechnology Letters*, 23, 2027–2034.
- Ademe (Agence de l'Environnement et de la Maitrise de l'Energie), (2004). Ecotoxicité des sols et des déchets. Résultats des tests biologiques. Données et références. Edition ADEME, 96p.
- Adriano, D.C., Wenzel, W.W., Vangronsveld, J., Bolan, N.S., (2004). Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. *Geoderma* 122, 121-142.
- Afnor NF X 31-101. (1996). Qualité des sols environnement. Association française de normalisation (AFNOR), Paris.
- Akar, T., Tunali, S., (2006). Biosorption characteristic of *Aspergillus flavus* biomass for removal of Pb (II) and Cu (II) ions from an aqueous solution. *Bioresouce Technology*, 97(15), 1780–1787.
- Akhtar, S., Mahmood-ul-Hassan, M., Ahmad, R., Suthor, V., Yasin, M. (2013). Metal tolerance potential of filamentous fungi isolated from soils irrigated with untreated municipal effluent. *Soil and Environment*, 32(1), 55–62.
- Al-Garni, S. M., Ghanem, K. M., Bahobail, A. S. (2009). Biosorption characteristics of *Aspergillus fumigatus* in removal of cadmium from an aqueous solution. *African Journal of Biotechnology*, 8(17), 4163–4172.
- Amini M., Younesi H., Bahramifar N., Lorestani A., Ghorbani F., Daneshi A., Sharifzadeh M. (2008). Application of response surface methodology for optimization of lead biosorption in an aqueous solution by *Aspergillus niger*. *Journal of Hazardous Materials*. 154, 694–702.
- Anahid, S., Yaghmaei, S. Ghobadinejad, Z., (2011). Heavy metal tolerance of fungi. Biosorption of lead, copper and zinc ions on loofa sponge immobilized biomass of *Phanerochaete chrysosporium*. *Science Iran* 18(3), 502–508.
- Anonyme, (2007). *Britannica Encyclopedia*. Sociedad Comercial y Editorial santiago Ltda., Lima, 2800 p.
- Aranguren Salvarredy, M. M. (2008). Contamination en métaux lourds des eaux de surface et des sédiments du Val de Milluni (Andes Boliviennes) par des déchets miniers Approches géochimique, minéralogique et hydrochimique. *Planète et Univers*. Université Paul Sabatier - Toulouse III., 12-35.
- Arshadi M., Amiri M.J., Mousavi S. (2014). Kinetic, equilibrium and thermodynamic investigations of Ni(II), Cd(II), Cu (II) and Co (II) adsorption on barley straw ash *Water Resources and Industry* 6, 1– 17.
- Audet, P., Charest, C., (2007a). Heavy metal phytoremediation from a meta-analytical perspective. *Environmental Pollution* 147, 231-237.
- Awwad, A.M., Salem, N. M. (2014). Kinetics and thermodynamics of Cd (II) biosorption onto loquat (*Eriobotrya japonica*) leaves, *Journal of Saudi Chemical Society*. 18, 486–493.

- Ayangbenro, A.S., Babalola, O.O., (2017). A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14, 94.
- Baize, D. (2004). *Guide des analyses en Pédologie*. INRA, France
- Ballayan, D., (2000). Soil degradation - Chapter Biodiversity & Land degradation. In: ESCAP environment statistics course, FAO, Rome.
- Balsalobre, L., De Sioniz, M.-I., Valderrama, M.-J., Benito, T., Larrea, M.-T. and Peinado, J.-M., (2003). Occurrence of yeasts in municipal wastes and their behavior in presence of cadmium, copper and zinc. *J. Basic Microbiol.*, 43, 185–193.
- Barnett, J.A., Payne, R.W., (1994). *Yarrow D. Yeast Identification PC Program*.
- Barrani, D., (2016). Evaluation de la contamination métallique des sols irrigués par les eaux usées rejetées par la ville de Settat. Etude de transfert de contaminants métalliques Sol_ver de terre. Thèse de Doctorat, Université Hassan premier. Maroc, 49p.
- Barsotti, V. (2011). Recherche et caractérisation de microorganismes dans les compartiments géologiques profonds. *Chimie analytique*. Université de Bordeaux. France, 25-45.
- Bektas, N., Kara, S. (2004). Removal of lead from aqueous solutions by natural clinoptilolite: Equilibrium and kinetics studies. *Sep. Purif. Technol.*, 39, 189–200.
- Bellion, M., Courbot, M., Jacob, C., Blaudez, D., Chalot, M. (2006). Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 254(2), 173–181.
- Beylich, A., Oberholzer, H.-R., Schrader, S., Höper, H., Wilke, B.-M., (2010). Evaluation of soil Bioresour. *Technol.* 99, 7716-7722.
- Bhainsa, K. C., D'Souza, S. F. (2009). Thorium biosorption by *Aspergillus fumigatus*, a filamentous fungal biomass. *Journal of Hazardous Materials*, 165(1–3), 670–676.
- Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, P.H., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y. Veau, P. (1990). *Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle*. Ed. Masson, 2ème édition, Paris, 442p.
- Boudallaa, Y., El Antari, A., Ababou, B., Boukachabine, Kh. (2016). Characterization of yeast diversity colonizing various olive habitats associated to Moroccan Picholine olive variety (orchards and crushing units). *Journal of Materials and Environmental Science*. Vol 9, 2, 497-502.
- Breure, A.M., Mulder, C., Römbke, J., Ruf, A., (2005). Ecological classification and assessment concepts in soil protection. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62, 211-229.
- Buasri A, Chaiyut N, Ponpatcharasakul N, Artsalee P, Potisook S. (2007). Factors affecting the removal of copper (II) and zinc (II) from aqueous solutions with clinoptilolite. *J. Res. Eng. Technol.* 4, 1–17.
- Calvet R., Mariotti A. (2003). *Le sol : propriétés et fonctions*. Tome 1, Constitution, structure, phénomènes aux interfaces, France Agricole, Ed. Dunod, 458 p.

- García-Delgado, C., Yunta, F., Eymar, E. (2015). Bioremediation of multi-polluted soil by spent mushroom (*Agaricus bisporus*) substrate: Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation and Pb availability. *Journal of Hazardous Materials*. Vol 300, 281–288.
- Chaignon, V. (2001). Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées. Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides. Thèse Sciences de l'Environnement : Système Terre, Ecole doctorale, Université d'Aix-Marseille, 102-107
- Chakraborty, J., Das, S. (2014). Biosurfactant-Based Bioremediation of Toxic Metals. *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. 23(5), 168-201.
- Chen, S. H., Ng, S. L., Cheow, Y. L., Ting, A. S. Y. (2017). A novel study based on adaptive metal tolerance behavior in fungi and SEM-EDX analysis. *Journal of Hazardous Materials*, 334, 132–141.
- Chiaverini, N., De Ley, M. (2010). Protective effect of metallothionein on oxidative stress-induced DNA damage. *Free Radical Research*, 44(6), 605-613.
- Chrestensen, CA., Starke, DW., Mieyal, JJ., (2000). Acute cadmium exposure inactivates thioltransferase (glutaredoxin), inhibits intracellular reduction of protein-glutathionyl-mixed disulfides, and initiates apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 26556-26565. *Chromatography A* 983, 1-18.
- Clemens, S., (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88, 1707-1719.
- Cobbett, CS., (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology* 123, 825-832.
- Cooper, E.M., Sims, J.T., Cunnigham, S.D., Huang, J.W., Berti, W.R. (2001). Chelate- assisted phytoextraction of lead from contaminated soil. *Journal of Environmental Quality* 28, 1709-1719.
- Cornelissen, S., Botha, A., Conradie, W. J. Wolfaardt, G. M., (2003). Shifts in community composition provide a mechanism for maintenance of activity of soil yeasts in the presence of elevated copper levels. *Can. J. Microbiol.*, 49, 425–432.
- D.P.A (Direction provincial de l'agriculture de settat) (2005). Service de l'information.
- Davranche, L., Van Haluwyn, C., Cuny, D. (2013). Approche du risque sanitaire lié à la consommation de champignons contaminés par les Éléments Traces Métalliques – Documents Mycologiques, 35, 311-323.
- Deneux-Mustin, S., Roussel-Debet, S., Mustin, C., Henner, P., Munier-Lamy, C., Colle, C., Berthelin, J., Garnier-Laplace, J., Leyval, C. (2003). Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces : influence des micro-organismes du sol. Tec & Doc. - Lavoisier, Paris, 282 p.
- Deshmogh, S.K., Rai MK, (2005). Biodiversity of Fungi: Their Role in Human Life. Science Publisher Inc., Enfield., 185–198.
- Desjardin, V., Bayard, R., Huck, N., Manceau, A., Gourdon, R., (2002). Effect of microbial activity on the mobility of chromium in soils, *Waste Manag.* 22, 195–200.
- Doillon, D. (2010). Déterminants moléculaires de la tolérance au zinc des microorganismes eucaryotes. Thèse de doctorat , Université Henri Poincaré. France, 14-32.

- Donmez, G. Aksu, Z. (2001). Bioaccumulation of copper (II) and Nickel (II) by the non-adapted and adapted growing *Candida* sp. *Water resources*, Vol.35, No 6, 1425-1434.
- Dubourguier, H C. (2000). From the laboratory to industrial scale: composting of polluted soils from former coal industry and gas plant: future research.
- Dursun, A. Y., Uslu, G., Tepe, O., Cuci, Y., Ekiz, H. (2003). A comparative investigation on the bioaccumulation of heavy metal ions by growing *Rhizopus arrhizus* and *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, 15(2), 87–92.
- El Aslouj J., Kholtei S., El Amrani N., Hilali A. (2007). Etude de la contamination métallique des sédiments et des eaux de l'oued Boummoussa soumis aux rejets liquides de la ville de Settat. *Revue. Catalyse et Environnement*. Vol. VII, 109-122.
- El Baz, S., Baz, M., Barakate, M., Hassani, L., El Gharmali, A., Imzilin, B. (2015). Resistance to and accumulation of heavy metals by actinobacteria isolated from abandoned mining areas. *Scientific World Journal*, 761-834.
- Emenike, C.U., Jayanthi, B., Agamuthu, P., Fauziah, S.H. (2018). Biotransformation and removal of heavy metals: a review of phytoremediation and microbial remediation assessment on contaminated soil, *Environ. Rev.* 26, 156–168.
- Emsley, J. (2003). *Nature's building blocks*, Oxford University Press Inc., New York.
- Entry, JA., Rygiewicz, PT., Watrud, LS., Donnelly, PK., (2002). Influence of adverse soil conditions on the formation and function of Arbuscular mycorrhizas. *Advances in Environmental Research* 7, 123-138.
- Eswaran, H., Lal, R., Reich, P., (2001). Land degradation: an overview. *Responses to Land degradation*, 20–35.
- European Commission (2006). Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council.
- European Commission, (2012). *Soil - Environment - European Commission*.
- Ezzouhri, L., Castro, E., Moya, M., Espinola, F. Lairini, K. (2009). Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. *African J Microbiol Res.* 3(2), 35–48.
- Fagiewicz, K., (2011). Environmental and landscape criteria for development of post-mining sites structure (on example of Adamowskie brown coal basin), Poland.
- Fan, T., Liu, Y., Feng, B., Zeng, G., Yang, C., Zhou, M., Wang, X. (2008). Biosorption of cadmium(II), zinc(II) and lead(II) by *Penicillium simplicissimum*: Isotherms, kinetics and thermodynamics. *Journal of Hazardous Materials*, 160(2–3), 655–661.
- Fang, Y., Yang, H., Wang, T., Liu, B., Zhao, H., and Chen, M. (2010). Metallothionein and superoxide dismutase responses to sublethal cadmium exposure in the clam *Macra veneriformis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Toxicology and Pharmacology*, 151(3), 325-333.
- Farooq, U., Janusz, A., Kozinski, Misbahul Ain Kh., Makshoof, A. (2010). Biosorption of heavy metal ions using wheat based biosorbents – A review of the recent literature. *Bioresource Technology.* (101), 5043–5053.

- Figuerola, J.A.L., Wrobel, K., Afton, S., Caruso, J.A., Felix Gutierrez Corona, J., Wrobel, K., (2008). Effect of some heavy metals and soil humic substances on the phytochelatin production in wild plants from silver mine areas of Guanajuato, Mexico. *Chemosphere* 70, 2084-2091.
- Fomina, M A., Alexander, I J., Colpaert, J V. Gadd, G M. (2005). Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. *Soil Biol Biochem.* 37(5), 851–866.
- Frey, B., Zierold, K., Brunner, I. (2000). Extracellular complexation of Cd in the Hartig net and cytosolic Zn sequestration in the fungal mantle of *Picea abies* – *Hebeloma crustuliniforme* ectomycorrhizas. *Plant, Cell and Environment*, 23(11), 1257-1265.
- Gadd, G. M. (2000). Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Current Opinion in Biotechnology.* 11, 271–279.
- Gobat, J.M., Aragno, M. Matthey, W. (2010). *Le sol vivant*, Ed. Bases de pédologie- Biologie des sols ». 3^{ème} édition revue et augmentée 165p.
- Goyer, R.A., Clarkson, T.W., (2001). Toxic effects of metals. In: D.C. Klassen (Ed.), *Casarett and Doull's Toxicology: the Basic Science of Poisons*. McGraw-Hill, New York, 811–868.
- Green Iii, F., Clausen, C.A. (2003). Copper tolerance of brown-rot fungi: Time course of oxalic acid production. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51(2), 145- 149.
- Haferburg, G., Kothe, E. (2007). Microbes and metals: interactions in the environment. *Journal Basic Microbiology*, 47(6), 453-467.
- Hall, JL, (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53, 1-11.
- Hazen, TC., Tabak, HH., (2005). Developments in bioremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides: 2. Field research on bioremediation of metals and radionuclides. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 4, 157-183.
- Hobbelen, P.H.F., Koolhaas, J.E., van Gestel, C.A.M., (2006). Bioaccumulation of heavy metals in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* in relation to total and available metal concentrations in field soils. *Environmental Pollution* 144, 639-646.
- Hund-Rinke, K., Kördel, W., (2003). Underlying issues in bioaccessibility and bioavailability:: experimental methods. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 52-62.
- Huynh, T. (2009). Impacts des métaux lourds sur l'interaction Plante/ Ver de terre/ Microflore tellurique. Thèse de doctorat. Université Paris Est Ecole doctorale, science de la vie et de la santé. France, 85- 92.
- I.R.A.T.E (Inspection Régionale de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement. Settat) (2004). *Elements introductifs de la région Chaouia-Ouardigha*.
- Iqbal, M, Edyvean, R.G.J, (2004). Biosorption of lead, copper and zinc ions on loofa sponge immobilized biomass of *Phanerochaete chrysosporium*. *Minerals Engineering* 17, 217–223.
- Iram, S., Abrar, S. (2015). Biosorption of copper and lead by heavy metal resistant fungal isolates. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 5(1), 1–5.
- Iskandar, N. L., Zainudin, N. A. I. M., & Tan, S. G. (2011). Tolerance and biosorption of copper (Cu)

- and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a freshwater ecosystem. *Journal of Environmental Sciences*, 23(5), 824–830.
- Jonušaitė, A., Štrimaitytė, V., Denafas, G., (2004). Heavy Metals Mobilization from Ash of Biofuel and Burnable Waste. *Environmental Research, Engineering and Management* 3, 29–36.
- Joubert A., (2008), Etude de l'effet de facteurs environnementaux sur les processus biogéochimiques de mobilisation du Pb, Zn, Cd, As et Hg dans les sols - Modélisation empirique de la mobilité et phytodisponibilité des ETM, Thèse de Doctorat, Université Henri Poincaré, Nancy 1, France.
- Kabata-Pendias, A., (2004). Soil-plant transfer of trace elements – an environmental issue. *Geoderma* 122, 143-149.
- Kabata-Pendias. (2011). *Trace Elements in Soils and Plants*. Florida: CRC Press, Taylor & Francis Gp, 4th ed, 534 p.
- Kandeler, E., Tscherko, D., Bruce, KD., Stemmer, M., Hobbs, PJ., Bardgett, RD., Amelung, W., (2000). Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil. *Biology and Fertility of Soils* 32, 390-400.
- Kao, T., Mejahed, K. E. L., Bouzidi, A. (2007). Evaluation de la pollution métallique dans les sols agricoles irrigués par les eaux usées de la ville de Settat (Maroc). *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, Section Sciences de La Vie*, (29), 89–92.
- Kayalto, B. (2009). Contribution à l'évaluation de la contamination par les métaux lourds, de trois espèces de poissons, des sédiments et des eaux du lac Tchad. Mémoire d'études approfondies (DEA) en sciences alimentaires/nutrition. Université de Ngaoundere .
- Kebir, T. (2012). Etude de contamination, d'accumulation et de mobilité de quelques métaux lourds dans des légumes, des fruits et des sols agricoles situés près d'une décharge industrielle de l'usine Alzinc de la ville de Ghazaouet. Thèse de Doctorat. Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen. Faculté des sciences. Algerie. 37p.
- Khan, M.I., Baloch, M.K., Ashfaq, M., Stoter, G., (2006). In vivo toxicological effects and spectral studies of new triorganotin(IV)-N-maleoyltrianxamates. *Journal of Organometallic Chemistry*, 691(11), 2554-2562.
- Klaassen, C.D., Liu, J., Diwan, B.A. (2009). Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3), 215-220.
- Koller, E. (2004). *Traitement des pollutions industrielles (eau, air; déchet, sol, boues)*. Edition Dunod Paris. 347p.
- Koopal, L.K., van Riemsdijk, W.H., Kinniburgh, D.G., (2001). Humic matter and contaminants. General aspects and modeling metal ion binding. *Pure and Applied Chemistry* 73, 2005-2016.
- Kvesitidze, G., Khatisashvili, G., Sadunishvili, T., Ramsden, J.J. (2006). The ecological importance of plants for contaminated environments. Dans: *Biochemical Mechanisms of Detoxification in Higher Plants - Basis of Phytoremediation*. Springer, 167-204.
- Lafuente, A.L., González, C., Quintana, J.R., Vázquez, A., Romero, A., (2008). Mobility of heavy metals in poorly developed carbonate soils in the Mediterranean region. *Geoderma* 145, 238-244.

- Lamy, I. (2002). Réactivité des matières organiques des sols vis-à-vis des métaux. Journées nationales de l'étude des sols. 22p.
- Lanfranco, L., Balsamo, R., Martino, E., Perotto, S., Bonfante, P. (2002). Zinc ions alter morphology and chitin deposition in an ericoid fungus. *Eur J Histochem*, 46(4), 341- 350.
- Legrand, C., Solerieu, M., Goglio, E. (2006). Traitement des sites et des sols pollués. Territorial Editions. Voiron. 85p.
- Lehembre, F, Doillon, D, David, E, (2012). Soil metatranscriptomics for mining eukaryotic heavy metal resistance genes. *Environmental Microbiology*, 15, 2829–2840.
- Li, M., Cheng, X., Guo, H., (2013). Heavy metal removal by biomineralization of urease producing bacteria isolated from soil, *Int. Biodeterior. Biodegrad*, 76, 81–85.
- Li, L.Y., Li, R.S. (2000). The role of clay minerals and effect of H⁺ ions on removal of heavy metal (Pb²⁺) from contaminated soil. *Can. J. Geotech/Rev.* 37, 296-307.
- Liers, C., Ullrich, R., Steffen, K. T., Hatakka, A. Hofrichter, M., (2006). Mineralization of ¹⁴C labelled synthetic lignin and extracellular enzyme activities of the wood colonizing ascomycetes *Xylaria*hyoxyylon* and *Xylaria*polymorpha*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 69, 573-579.
- Lovley, D.R., (2000). Environmental microbe-metal interactions. ASM Press, 395 p.
- Lumley, T. C., Gignac, L.D., Currah R., (2001). Microfungus communities of white spruce and trembling aspen logs at different stages of decay in disturbed and undisturbed sites in the boreal mixedwood region of Alberta. *Canadian Journal of Botany*, 79, 76-92.
- Luo, X.S., Zhou, D.-M., Liu, X.H., Wang, Y.J., (2006). Solid/solution partitioning and speciation of heavy metals in the contaminated agricultural soils around a copper mine in eastern Nanjing city, China. *Journal of Hazardous Materials*, 131, 19-27.
- Madala, S., Kumar Nadavala, S., Vudagandla, S., Boddu, V.M., Abburi, K. (2017). Equilibrium, kinetics and thermodynamics of Cadmium (II) biosorption on to composite chitosan biosorbent, *Arab journal chemosphere*, 10, 1883-1893.
- Majumdar Shrabani, S., Sujoy K. Das, Rajdeep Chakravarty, Tapan Saha, Tara Shankar Bandyopadhyay, Arun K. Guha. (2010). A study on lead adsorption by *Mucor rouxii* biomass. *Desalination*, 251, 96–102.
- Matech, F., Zaakour, F., Moustarhfer, K., Chemsy, Z., Benazzouz, I., Saber, N. (2014). Concentrations en éléments traces métalliques dans les sols irrigués par les eaux usées versées dans l'Oued Merzeg (Casablanca-Maroc). *European Scientific Journal*, 10, 121-138.
- Mathieu, Y. (2012). Diversité écologique et fonctionnelle des champignons décomposeurs du bois : l'influence du substrat de la communauté à l'enzyme. Thèse Université de Lorraine. France, 63p.
- Matos, A.T., Fontes, M.P.F., da Costa, L.M., Martinez, M.A., (2001). Mobility of heavy metals as related to soil chemical and mineralogical characteristics of Brazilian soils. *Environmental Pollution*, 111, 429-435.

- McGrath, SP., Zhao, FJ., Lombi, E., (2001). Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils. *Plant and Soil*, 232, 207-214.
- McKnight, D.M., Duren, S.M., (2004). Biogeochemical processes controlling midday ferrous iron maxima in stream waters affected by acid rock drainage. *Applied Geochemistry*, 19(7), 1075- 1084.
- Meers, E., Samson, R., Tack, F.M.G., Ruttens, A., Vandegheuchte, M., Vangronsveld, J., Verloo, M.G., (2007). Phytoavailability assessment of heavy metals in soils by single extractions and accumulation by *Phaseolus vulgaris*. *Environmental and Experimental Botany* 60, 385-396.
- Mendez, MO, Maier, RM, (2008). Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments - an emerging remediation technology. *Environmental Health Perspectives*, 116, 278-283.
- Menkis, A., Allmer, J., Vasiliauskas, R., Lygis, V., Stenlid J., Finlay, R., (2004). Ecology and molecular characterization of dark septate fungi from roots, living stems, coarse and fine woody debris. *Mycol Res.*, 108, 965-973.
- Mertens, J., Springael, D., De Troyer, I., Cheyns, K., Wattiau, P., Smolders, E. (2006). Long- term exposure to elevated zinc concentrations induced structural changes and zinc tolerance of the nitrifying community in soil. *Environmental microbiology*, 8, 2170- 2178.
- Michalke, B., 2003. Element speciation definitions, analytical methodology, and some examples. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56, 122-139.
- Millenium ecosystem assessment (2005). *Ecosystems and Human Well-being: Current State and Trends*. Washington, Covelo, London, Mylenium Ecosystem Assesment Board, 918 p.
- Mishra, A., Malik, A. (2012). Simultaneous bioaccumulation of multiple metals from electroplating effluent using *Aspergillus lentulus*. *Water Research*, 46(16), 4991–4998.
- Miura, T., Abe, F., Inoue, A., Usami, R. and Horikoshi, K., (2002). Superoxide dismutase is involved in high tolerance to copper in the deep-sea yeast, *Cryptococcus* sp. N6. *Biotechnol. Lett.*, 24, 1069–1074.
- Moffett, B.F., Nicholson, F.A., Uwakwe, N.C., Chambers, B.J., Harris, J.A., Hill, T.C.J. (2003). Zinc contamination decreases the bacterial diversity of agricultural soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 43, 13-19.
- Mohammadian, E., Babai Ahari, A., Arzanlou, M., Oustan, S., Khazaei, S H. (2017). Tolerance to heavy metals in filamentous fungi isolated from contaminated mining soils in the Zanzan Province, Iran. *Chemosphere*, 185, 290–296.
- Moreno-Jiménez, E., Peñalosa, J.M., Manzano, R., Carpena-Ruiz, R.O., Gamarra, R., Esteban, E., (2009). Heavy metals distribution in soils surrounding an abandoned mine in NW Madrid (Spain) and their transference to wild flora. *Journal of Hazardous Materials*, 162, 854-859.
- Mouria, B., Ouazzani-touhami, A., Douira, A. (2013). Isolement et identification de la mycoflore du compost des déchets urbains solides. *Nature & Technologie*, N°9 , 13-28.
- Mrabet, R., Ibno Namr, K. (2008). Influence du système de travail du sol et de la rotation sur le statut organique d'un sol argileux dans le Maroc semi-aride, *Al Awamia* 123-124 Juin / Décembre,60-82.
- Mulligan, CN., Yong, RN., Gibbs, BF., (2001). Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology*, 60, 193-207.
- Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., Sreekanth, T.V.M., (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 8, 199-216.

- Naidu, S., (2008). Soils and composts. International Encyclopaedia of Agricultural Science and Technology: Mittal Publications. N°9 , 13-28.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vianello, A., (2002). Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 1527-1536.
- Nies, DH, (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 27, 313-339.
- Nordén, B., Ryberg, M., Götmark, F., Olausson, B., (2004). Relative importance of coarse and fine woody debris for the diversity of wood-inhabiting fungi in temperate broadleaf forests. *Biological Conservation*, 117, 1-10.
- Nortcliff, S., (2002). Standardisation of soil quality attributes. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 88(2), 161-168.
- O'Connell, D.W., Birkinshaw, C., O'Dwyer, T.F., (2008). Heavy metal adsorbents prepared from the modification of cellulose: A review. *Bioresource Technology*, 99, 6709-6724.
- Office National de l'Eau Potable (2005). Rejets urbains, Normes et standards de rejet liquide. Direction Assainissement et environnement, Rabat. Maroc.
- Oladipo, O G., Awotoye, O., Olayinka, A., Bezuidenhout, C. Maboeta, M S. (2017). Heavy metal tolerance traits of filamentous fungi isolated from gold and gemstone mining sites. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1-9.
- Oste, L.A., Temminghoff, E.J.M., Van Riemsdijk, W.H., (2002). Solid-solution partitioning of organic matter in soils as influenced by an increase in pH or Ca concentration. *Environ. Sci. Technol.*, 36, 208-214.
- Ovaskainen, O., Noksoikoivisto, J., Hottola, J., Rajala, T., Pennanen, T., AliKovero, H., Miettinen, O., Oinonen, P., Auvinen, P., Paulin, L., Larsson, K.IH., Mokipoo, R., (2010). Identifying wood-inhabiting fungi with 454 sequencing: what is the probability that BLAST gives the correct species. *Fungal Ecology*, 3, 274 - 283.
- Pais, I., Benton Jones, I. (2000). *The handbook of Trace Elements*. Boca Raton, FL, St. Lucie Press, 223p.
- Panwichian, S., Kantachote, D., Wittayaweerarak, B., Mallavarapu, M., (2010a). Factors affecting immobilization of heavy metals by purple nonsulfur bacteria isolated from contaminated shrimp ponds. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 2199-2210.
- Panwichian, S., Kantachote, D., Wittayaweerarak, B., Mallavarapu, M., (2012). The use of selected purple nonsulfur bacteria to remove heavy metals and salts from sediment and water collected from contaminated areas to decrease their phytotoxicity. *Afr. J. Biotechnol.*, 11, 7434-7444.
- Parfitt D., Hunt J., Dockrell D., Rogers H. J. et Boddy L., (2010). Do all trees carry the seeds of their own destruction PCR reveals numerous wood decay fungi latently present in sapwood of a wide range of angiosperm trees. *Fungal Ecology*, 3, 338-346.
- Pathak, A., Dastidar, M.G., Sreekrishnan, T.R., (2009). Bioremediation of heavy metals from sewage sludge: A review. *Journal of Environmental Management*, 90, 2343-2353.

- Peijnenburg, W.J.G.M., Zablotzkaja, M., Vijver, M.G., (2007). Monitoring metals in terrestrial environments within a bioavailability framework and a focus on soil extraction. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67, 163-179.
- Peng, W., Li, X., Song, J., Jiang, W., Liu, Y., Fan, W., (2018). Bioremediation of cadmium- and zinc-contaminated soil using *Rhodobacter sphaeroides*, *Chemosphere*, 197, 33-41.
- Pereira-Dias, S., Potes, M.E., Marinho, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., (2000). Characterisation of yeast flora isolated from an artisanal Portuguese ewes' cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 60, 55-63.
- Plumlee, G.S., Ziegler, T.L., (2003). The medical geochemistry of dust, soils and other earth materials. In: B.S. Lollar (Ed.), *Environmental Geochemistry. Treatise on Geochemistry*. Elsevier-Pergamon, Oxford, 264-310.
- Preetha, B., Viruthagiri, T. (2005). Biosorption of zinc (II) by *Rhizopus arrhizus*: equilibrium and kinetic modelling. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 4, 6, 506-508.
- Rajala, T., Peltoniemi, M., Pennanen, T., Makipaa, R., (2012). Fungal community dynamics in relation to substrate quality of decaying Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) logs in boreal forests. *FEMS, Microbiol. Ecol.*, 81, 494-505.
- Ramos, J., Gonzalez-Pérez, M., Caballero, A., Dillewijn, P., (2005). Bioremediation of polynitrated aromatic compounds: plants and microbes put up a fight. *Curr Opin Biotechnol.*, 16, 275-281.
- Raskin, I., Ensley, B.D. (2000) *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean up the Environment*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 53-70.
- Remon, E. (2006). Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques : vers de nouvelles méthodes de biodépollution. Thèse de Doctorat, Université Jean Monnet, Faculté des Sciences et Techniques, France, 167p.
- Renella G., Mench, M., van der Lelie, D., Pietramellara, G., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Nannipieri, P. (2003). Hydrolase activity, microbial biomass and community structure in long-term Cd-contaminated soils. *Soil Biol. Biochem.*, 36, 443-451.
- Ritz, K., Black, H.I.J., Campbell, C.D., Harris, J.A., Wood, C., (2009). Selecting biological indicators for monitoring soils: A framework for balancing scientific and technical opinion to assist policy development. *Ecological Indicators*, 9, 1212-1221.
- Saba, G., Thirumarimurugan M, Sivakumar V. (2017). Heavy Metal Tolerance Potential of Fungus Isolated From Copper Smelting Industry. *International Research Journal of Pharmacy*, 8(6), 120–125.
- Sağ, Y. (2001). Biosorption of heavy metals by fungal biomass and modeling of fungal biosorption: a review, *Separation & Purification Reviews*, 30, 1, 1-48.
- Sanchez, C., (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol. Adv.*, 27, 185-194.
- Sandaa, R.A., Torsvik, V., Enger, O. (2001). Influence of long-term heavy metal contaminations on microbial communities in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 33, 287-295.
- Say, R., Denizli, A., Arica, M.Y., (2001). Biosorption of cadmium (II), lead (II) and copper (II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresour. Technol.*, 76, 67–70.

- Schützendübel, A., Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1351-1365.
- Sharma Groenzin, H., Tomita, A., Mullins, O., (2002). *Energy Fuels*, 16, 490-496.
- Sidra, I. Rehman A., (2018). Metal resistance and uptake by *Trichosporon asahii* and *Pichia kudriavzevii* isolated from industrial effluents. *Archives of Environmental Protection*, 44, 3, 77–84
- Shafiquzzaman, S., Rovina, K., Al Azad S., Naher L., Saallah Suryani, S., Chaikaew, P. (2015). Heavy Metal Contaminants Removal from Wastewater Using the Potential Filamentous Fungi Biomass: A Review. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 7, 384-393.
- Simonescu, C. M., Ferdeş, M. (2012). Fungal biomass for cu(II) uptake from aqueous systems. *Polish Journal of Environmental Studies*, 21, 6, 1831–1839.
- Sipos, P., Németh, T., Kis, V.K., Mohai, I., (2008). Sorption of copper, zinc and lead on soil mineral phases. *Chemosphere*, 73, 461-469.
- Smith, A.H., Lingas, E.O., Rahman, M., (2000). Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. *Bulletin of the World Health Organization*, 78, 9, 1093-1103.
- Snezhana, R.V., Nachkova, S., Adamov, A., Dimitrova-Dyulgerova, I., (2019). Antarctic yeast *Cryptococcus laurentii* (AL65): biomass and exopolysaccharide production and biosorption of metals. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, N°5, 95, 1372-1379.
- Soltner, D., (2000). *Les bases de la production végétale T1: le sol*. 22^{ème} édition Sciences et Techniques agricoles, Maine et Loire, France, 457p.
- Sposito, G. (2000). *The Chemical Composition of Soils. The Chemistry of Soils*. Oxford University Press, New-York, 104.
- Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., Fourrier, H. (2000). Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. *Environmental Pollution*, 107, 377-389.
- Sungeun L. 2020. Virus-host interaction across a soil pH gradient at the community and individual scale. Thèse de doctorat en Ingénierie pour le vivant. Lyon, France, 307p.
- Tankari Dan-Badjo, A., Guero, Y., Dan Lamso, N., Tidjani, A.D., Ambouta, K.J.M., Feidt, C., Sterckeman, T., Echevarria, G. (2013). Evaluation de la contamination des sols par les éléments traces métalliques dans les zones urbaines et périurbaines de la ville de Niamey (Niger). *Revue des BioRessources*, 3, 2, 82-95.
- Thayer, JS, (2002). Biological methylation of less-studied elements. *Applied Organometallic Chemistry*, 16, 677-691.
- Ting, F., Yunguo, L., Baoying, F., Guangming, Z., Chunping, Y., Ming, Z., Haizhou, Z., Zhenfeng, T., Xin,W., (2008). Biosorption of cadmium(II), zinc(II) and lead(II) by *Penicillium simplicissimum*: Isotherms, kinetics and thermodynamics. *Journal of Hazardous Materials*, 160, 655–661.
- Torsvik, V., Oвраas, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5, 240-245.
- Ul-haq, I., Roheena, A., Ashraf, H., Shah, A.H. (2002). Isolation and Screening of Fungi for the Biosynthesis of Alpha Amylase. *Biotechnology*, 1 (2-4), 61-66.

- Vadkertiova, R., Slavikova, E. (2006). Metal tolerance of yeasts isolated from water, soil and plant environments. *J. Basic Microbiol.*, 46, 2, 145–152.
- Valix, M., Loon, L.O., (2003). Adaptive tolerance behaviour of fungi in heavy metals. *Minerals Eng.* 16, 193–198.
- Van Nevel, L., Mertens, J., Oorts, K., Verheyen, K., (2007). Phytoextraction of metals from soils: How far from practice? *Environmental Pollution*, 150, 34-40.
- Wakim, J. (2005). « Influence des solutions aqueuses sur le comportement mécanique des roches argileuses » Thèse de doctorat de l'école nationale supérieure des mines, Paris. France. 189.
- Yalcin, E., Cavusoglu, K., Kinalioglu, K., (2010). Biosorption of Cu²⁺ and Zn²⁺ by raw and autoclaved *Rocella phycopsis*. *Journal of Environmental Sciences*, 22(3), 367–373.
- Yang, X., Feng, Y., He, Z., Stoffella, P.J., (2005). Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18, 339-353.
- Yazdani, M., Yap, C.K., Abdullah, F., Tan, S. G. (2009). *Trichoderma atroviride* as a bioremediator of Cu pollution: An in vitro study. *Toxicology Environment. Chemistry.*, 91(7), 1305–1314.
- Yyun-guo, L., Ting, F., Guang-ming, Z., Xin, L., Qing, T., Zhou, Y., Xu, M., Huang yu, W.H., (2006). Removal of cadmium and zinc ions from aqueous solution by living *Aspergillus niger*, *Trans. Nonferr. M et. Soc. China* 16, 681- 686.
- Zapotoczny, S., Jurkiewicz, A., Tylko, G., Anielska, T., Turnau, K. (2007). Accumulation of copper by *Acremonium pinkertoniae*, a fungus isolated from industrial wastes. *Microbiol. Res.*, 162(3), 219–228.
- Zhang, W., Wang, F., Wang, P., Lin, L., Zhao, Y., Zou, P., Zhao, M., Chen, H., Liu, Y., Zhang, Y., (2016). Facile synthesis of hydroxyapatite/yeast biomass composites and their adsorption behaviors for lead (II), *Journal of Colloid and Interface Science*, 477, 181-190.
- Zhang, H., Xingzhong, Y., Ting, X., Hou, W., Longbo, J., (2020). Bioremediation of Co-Contaminated Soil with Heavy Metals and Pesticides: Influence Factors, Mechanisms and Evaluation Methods. *Chemical Engineering Journal*. N° 398, p 125657.

Annexes

Annexe 1 : Moyennes de l'accumulation du Pb et de Cu par les filamenteux

Isolats		Temps	Concentrations		
			50	100	200
Accumulation du Pb	<i>Aspergillus niger</i> (A)	3h	0,45	0,69	2,03
		24h	1,39	2,65	5,41
		72h	2,30	3,57	7,39
	<i>Aspergillus niger</i> (B)	3h	0,65	1,24	3,05
		24h	0,93	1,65	4,49
		72h	1,37	2,01	5,13
	<i>Asprgillus niger</i> (D)	3h	1,22	1,74	4,55
		24h	1,41	2,34	5,39
		72h	2,27	2,97	6,94
	<i>Asprgillus niger</i> (C)	3h	2,59	4,86	10,28
		24h	3,85	6,41	12,60
		72h	5,21	11,16	15,46
	<i>Aspergillus carbonarius</i> (A)	3h	0,94	1,08	2,60
		24h	1,47	2,25	5,61
		72h	1,88	3,59	6,29
	<i>Aspergillus carbonarius</i> (B)	3h	1,52	2,55	5,56
		24h	2,25	3,19	7,10
		72h	3,29	3,56	8,10
	<i>Aspergillus carbonarius</i> (D)	3h	1,42	3,42	8,51
		24h	2,65	3,75	10,95
		72h	3,38	4,51	13,44
	<i>Penicullium simplicissimum</i> (B)	3h	1,77	2,81	5,58
		24h	3,40	5,30	11,93
		72h	3,74	5,97	13,81
<i>Penicillium sp.</i> (B)	3h	0,47	0,50	1,63	
	24h	1,76	3,21	7,20	
	72h	2,96	4,61	9,90	
<i>Rhizomucor sp.</i> (B)	3h	0,85	1,47	3,16	
	24h	1,44	2,16	5,51	
	72h	1,27	1,86	3,96	
Accumulation du Cu	<i>Acremonium sp.</i> (A)	3h	1,44	2,75	5,33
		24h	2,01	3,92	8,08
		72h	3,27	6,59	12,00
	<i>Acremonium sp.</i> (B)	3h	0,97	1,94	4,28
		24h	1,89	3,98	8,86
		72h	2,47	5,45	10,59

Annexe 2 : Moyennes de l'accumulation du Pb par les levures

Isolats	Temps	Concentrations		
		50	100	200
<i>Cryptococcus albidus</i> (A)	3h	0,86	1,42	3,04
	24h	2,98	4,58	9,39
	72h	4,11	5,93	11,93
<i>Cryptococcus albidus</i> (C)	3h	1,51	3,37	10,04
	24h	4,29	7,36	19,19
	72h	6,17	10,88	24,34
<i>Candida bertae</i> (A)	3h	0,55	0,60	1,86
	24h	1,04	1,92	4,37
	72h	1,69	2,56	5,40
<i>Candida bertae</i> (B)	3h	2,00	3,37	7,20
	24h	2,76	4,57	12,92
	72h	5,56	7,85	16,48
<i>Candida bertae</i> (C)	3h	1,59	2,84	6,89
	24h	3,91	6,82	16,45
	72h	4,73	8,21	20,55
<i>Candida bertae</i> (D)	3h	3,08	5,86	13,55
	24h	4,69	7,78	14,82
	72h	5,22	7,74	16,21
<i>Rhodotorula glutinis</i> (A)	3h	1,53	2,50	5,60
	24h	3,27	5,29	13,40
	72h	7,24	10,23	21,98
<i>Rhodotorula glutinis</i> (B)	3h	6,10	9,28	16,25
	24h	7,01	9,41	18,62
	72h	8,20	10,32	22,11
<i>Rhodotorula glutinis</i> (D)	3h	5,51	9,36	15,35
	24h	7,52	7,81	16,72
	72h	8,19	10,72	22,66
<i>Candida versatilis</i> (B)	3h	3,86	4,75	9,93
	24h	4,03	6,21	13,36
	72h	6,13	8,64	17,81
<i>Candida versatilis</i> (C)	3h	5,14	8,94	15,64
	24h	6,40	8,28	17,63
	72h	5,76	9,63	24,38
<i>Trichosporon ovoides</i> (C)	3h	3,00	3,55	8,10
	24h	5,23	8,04	18,40
	72h	6,84	9,93	22,23

Annexe 3 : Moyennes de l'accumulation du Cu par les levures

Isolats	Temps	Concentrations		
		50	100	200
<i>Cryptococcus albidus</i> (A)	3h	0,43	1,03	2,19
	24h	1,34	3,54	6,57
	72h	2,14	4,63	9,82
<i>Cryptococcus albidus</i> (C)	3h	1,60	5,32	10,37
	24h	2,81	5,88	11,34
	72h	3,61	7,96	15,89
<i>Candida bertae</i> (A)	3h	0,92	1,50	2,94
	24h	1,56	3,12	6,53
	72h	2,08	3,73	7,47
<i>Candida bertae</i> (B)	3h	2,35	4,51	9,35
	24h	3,82	9,32	18,15
	72h	4,46	9,89	18,26
<i>Candida bertae</i> (C)	3h	2,51	4,96	10,49
	24h	2,82	6,49	13,58
	72h	3,04	6,50	15,16
<i>Candida bertae</i> (D)	3h	1,28	3,15	5,45
	24h	2,04	4,33	10,06
	72h	2,64	5,55	11,13
<i>Rhodotorula glutinis</i> (A)	3h	1,74	3,78	6,99
	24h	1,71	3,70	7,31
	72h	2,24	4,90	10,24
<i>Rhodotorula glutinis</i> (B)	3h	3,31	7,00	13,41
	24h	4,02	8,27	16,38
	72h	4,67	10,05	20,11
<i>Rhodotorula glutinis</i> (D)	3h	2,73	5,23	8,82
	24h	4,90	8,72	12,88
	72h	5,32	8,09	16,54
<i>Candida versatilis</i> (B)	3h	2,47	4,95	10,31
	24h	4,19	8,45	15,08
	72h	5,10	8,86	17,99
<i>Candida versatilis</i> (C)	3h	2,41	5,60	9,40
	24h	2,91	6,55	13,80
	72h	3,53	7,03	16,31
<i>Trichosporon ovoides</i> (C)	3h	2,19	5,74	11,43
	24h	3,20	6,46	13,59
	72h	4,29	8,98	16,05

Annexe 4 : Moyennes de la biosorption du Pb et de Cu par les filamenteux

	Isolats	Temps	Concentrations		
			50	100	200
Biosorption du Pb	<i>Aspergillus niger</i> (A)	3h	4,31	6,03	7,01
		24h	4,35	6,07	7,06
		72h	4,35	6,07	7,06
	<i>Aspergillus niger</i> (B)	3h	3,35	4,18	5,02
		24h	3,37	4,20	5,04
		72h	3,37	4,20	5,04
	<i>Aspergillus niger</i> (C)	3h	4,49	8,05	9,62
		24h	4,52	8,11	9,66
		72h	4,52	8,11	9,66
	<i>Aspergillus niger</i> (D)	3h	3,65	5,72	6,09
		24h	3,67	5,76	6,12
		72h	3,67	5,76	6,12
	<i>Aspergillus carbonarius</i> (A)	3h	1,82	3,12	4,78
		24h	1,83	3,16	4,79
		72h	1,83	3,16	4,79
	<i>Aspergillus carbonarius</i> (B)	3h	3,14	4,79	5,19
		24h	3,23	4,82	5,21
		72h	3,23	4,82	5,22
	<i>Aspergillus carbonarius</i> (D)	3h	5,23	7,28	8,01
		24h	5,20	7,33	8,28
		72h	5,20	7,33	8,28
	<i>Penicillium simplicissimum</i> (B)	3h	2,75	4,71	5,20
		24h	2,76	4,71	5,20
		72h	2,76	4,71	5,20
<i>Penicillium sp.</i> (B)	3h	2,11	2,62	3,81	
	24h	2,13	2,63	3,81	
	72h	2,13	2,63	3,82	
<i>Rhizomucor sp.</i> (B)	3h	0,95	1,26	2,88	
	24h	0,96	1,27	2,88	
	72h	0,96	1,27	2,88	
Biosorption du Cu	<i>Acremonium sp.</i> (A)	3h	1,42	4,08	5,99
		24h	1,45	4,28	6,00
		72h	1,45	4,28	6,00
	<i>Acremonium sp.</i> (B)	3h	2,63	5,41	7,28
		24h	2,66	5,42	7,29
		72h	2,66	5,42	7,29

Annexe 5 : Moyennes de la biosorption du Pb par les levures

Isolats	Temps	Concentrations		
		50	100	200
<i>Cryptococcus albidus</i> (A)	3h	2,45	2,99	3,30
	24h	2,47	2,99	3,39
	72h	2,47	3,00	3,39
<i>Cryptococcus albidus</i> (C)	3h	3,78	6,18	7,34
	24h	3,94	6,25	7,34
	72h	3,94	6,25	7,35
<i>Candida bertae</i> (A)	3h	2,47	4,03	4,43
	24h	2,51	4,03	4,44
	72h	2,51	4,03	4,44
<i>Candida bertae</i> (B)	3h	4,22	7,06	8,83
	24h	4,28	7,11	8,87
	72h	4,28	7,11	8,87
<i>Candida bertae</i> (C)	3h	4,28	8,07	9,11
	24h	4,32	8,06	9,15
	72h	4,32	8,06	9,15
<i>Candida bertae</i> (D)	3h	4,82	7,31	8,10
	24h	4,86	7,36	8,14
	72h	4,86	7,36	8,14
<i>Rhodotorula glutinis</i> (A)	3h	3,71	5,88	6,68
	24h	3,76	5,89	6,93
	72h	3,76	5,89	6,93
<i>Rhodotorula glutinis</i> (B)	3h	4,68	8,09	9,15
	24h	4,72	8,21	9,19
	72h	4,72	8,21	9,19
<i>Rhodotorula glutinis</i> (D)	3h	4,70	7,52	8,50
	24h	4,77	7,58	8,53
	72h	4,77	7,58	8,53
<i>Candida versatilis</i> (B)	3h	2,91	7,32	8,03
	24h	2,93	7,43	8,06
	72h	2,93	7,43	8,06
<i>Candida versatilis</i> (C)	3h	5,38	8,33	9,36
	24h	5,42	8,47	9,40
	72h	5,42	8,47	9,40
<i>Trichosporon ovoides</i> (C)	3h	3,46	5,21	6,14
	24h	3,49	5,25	6,16
	72h	3,49	5,25	6,16

Annexe 6 : Moyennes de la biosorption du Cu par les levures

Isolats	Temps	Concentrations		
		50	100	200
<i>Cryptococcus albidus</i> (A)	3h	1,35	2,72	3,71
	24h	1,36	2,73	3,85
	72h	1,36	2,73	3,85
<i>Cryptococcus albidus</i> (C)	3h	1,03	3,30	4,14
	24h	1,05	3,32	4,31
	72h	1,05	3,32	4,31
<i>Candida bertae</i> (A)	3h	1,09	3,70	3,85
	24h	1,11	3,71	3,87
	72h	1,11	3,71	3,87
<i>Candida bertae</i> (B)	3h	1,02	4,93	5,77
	24h	1,04	4,97	5,80
	72h	1,04	4,97	5,80
<i>Candida bertae</i> (C)	3h	2,18	6,23	6,52
	24h	2,20	6,23	6,55
	72h	2,20	6,23	6,55
<i>Candida bertae</i> (D)	3h	1,18	5,29	5,43
	24h	1,19	5,33	5,46
	72h	1,19	5,33	5,46
<i>Rhodotorula glutinis</i> (A)	3h	1,01	4,31	4,64
	24h	1,03	4,32	4,81
	72h	1,03	4,32	4,81
<i>Rhodotorula glutinis</i> (B)	3h	1,89	6,19	6,39
	24h	1,91	6,29	6,42
	72h	1,91	6,29	6,42
<i>Rhodotorula glutinis</i> (D)	3h	1,36	5,26	5,57
	24h	1,38	5,30	5,59
	72h	1,38	5,30	5,59
<i>Candida versatilis</i> (B)	3h	1,28	5,16	5,43
	24h	1,29	5,17	5,47
	72h	1,29	5,17	5,47
<i>Candida versatilis</i> (C)	3h	2,35	6,30	6,55
	24h	2,37	6,40	6,57
	72h	2,37	6,40	6,57
<i>Trichosporon ovoides</i> (C)	3h	1,16	4,47	5,58
	24h	1,17	4,50	5,78
	72h	1,17	4,50	5,78

Annexe 7 : Moyennes de la bioremédiation

	Lots											
	R0		R1		R2		R3		R4		R5	
Temps	Pb	Cu										
0j	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
14j	198,7	199,8	196,2	192,8	190,1	191,7	192,2	197,8	193,4	197,2	180,4	182,9
50j	195,2	197	174,4	169,7	161,8	167,3	154,5	180	166,6	182,6	134,8	147,1

RBA - Rose Bengale Agar

DOMAINE D'UTILISATION

La gélose rose bengale chloramphénicol est recommandée pour les isolement sélectif et dénombrement des levures et des moisissures dans les produits alimentaires, les prélèvements issus de l'environnement et tout autre prélèvement d'origine animale susceptible d'en contenir.

COMPOSITION :

- Peptone	5,0 g
- Glucose.....	10,0 g
- Phosphate monopotassique	1,0 g
- Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O.....	0,5 g
- Rose bengale.....	50,0 mg
- Chloramphénicol	0,1 g
- Agar agar bactériologique.....	13,0 g

PREPARATION

- Mettre en suspension 29,7 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir à raison de 100 mL par flacon.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

PDA- Potato Dextrose Agar

DOMAINE D'UTILISATION

La gélose dextrose de pomme de terre est utilisée pour la détection des levures et moisissures dans les produits laitiers et les aliments préparés. Il peut également être utilisé pour la culture de levures et de moisissures à partir d'échantillons cliniques. La gélose au dextrose de pomme de terre et au chloramphénicol est recommandée pour la culture sélective de champignons à partir d'échantillons mélangés.

COMPOSITION :

- A base de pomme de terre cuites :
 - Pomme de terre200g
 - Dextrose.....20g
 - Agar.....20g
 - Eau distillée.....1 L
- A partir du flacon commercialisé :
 - Poudre de PDA.....39g
 - Eau distillée.....1 L

PREPARATION

Préparation à base de pomme de terre cuites

- Faire bouillir 200 g de pommes de terre en tranches dans 1 litre d'eau distillée pendant 30 min.
- Filtrer puis mélanger avec du dextrose, de l'agar et de l'eau et faire bouillir pour dissoudre.
- Autoclaver 15 min à 121 ° C.
- Répartir des portions de 20 à 25 ml dans des boîtes de Pétri stériles

Préparation à partir du flacon commercialisé

- Ajouter 39 g de poudre PDA commerciale à 1 litre d'eau distillée.
- Faire bouillir en mélangeant pour dissoudre.
- Autoclaver 15 min à 121 ° C.

MA – Malt Agar

DOMAINE D'UTILISATION

Le milieu Malt Agar est utilisé pour le dénombrement des levures et des moisissures dans les produits alimentaires et les produits pharmaceutiques. Il est recommandé pour l'isolement, la purification ainsi que la conservation des levures et des moisissures.

COMPOSITION :

- Extrait de malt.....30g
- Agar15 g
- Eau distillée.....1 L

PREPARATION :

- Ajouter 30g de poudre MA commerciale à 1 litre d'eau distillée.
- Faire bouillir en mélangeant pour dissoudre.
- Autoclaver 15 min à 121 ° C.

MYGP – Malt Yeast Glucose Peptone

DOMAINE D'UTILISATION

Le milieu MYGP est recommandé pour l'isolement et la conservation des levures et moisissures. Il est spécifiquement recommandé pour son utilisation dans l'industrie de brasserie, pour la détection de saccharomyces et de levures sauvages non saccharomyces en présence de levures de culture.

COMPOSITION :

- Extrait de levure.....3g
- Extrait de malt.....3g
- Peptone.....5g
- Dextrose.....10 g
- Agar.....20g
- Eau distillée.....1 L

PREPARATION :

- Verser 41.0 g de poudre dans 1 litre d'eau distillée
- Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète
- Stériliser 15 minutes à 121°C à l'autoclave

Milieu GYP – Glucose Yeast Peptone

DOMAINE D'UTILISATION

Le milieu GYP permet de conserver après purification, les champignons unicellulaires. L'extrait de levure et la peptone fournissent des sources d'azote, d'acides aminés, de vitamines essentielles et de carbone nécessaires à la croissance de la souche.

COMPOSITION :

- Extrait de levure.....5 g
- Peptone.....10 g
- Glucose.....20 g
- Glycérol15%
- Eau distillée.....1 L

PREPARATION :

- Mélanger l'extrait de levure, la peptone et le glucose dans 1 litre d'eau distillée
- Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète
- Stériliser 15 minutes à 121°C à l'autoclave
- Ensemencer avec les souches voulues puis incuber
- Ajouter le glycérol, mélanger puis conserver à -20°C

Annexe 9 : Analyse par ICP- AES

Les échantillons de sol sont minéralisés par digestion acide à l'eau régale. Chaque prise de $0,5 \pm 0,005$ g est placée dans un erlenmeyer en verre où sont ajoutés 7,5 mL d'acide chlorhydrique (37% (m/m), de densité 1,19 g/mL et 2,5 mL d'acide nitrique (65%(m/m), de densité 1,38 g/mL. Le mélange est fermé hermétiquement et laissé à température ambiante pendant 12h.

Le minéralisât est ensuite concentré par ébullition pendant 2h. Après refroidissement, le concentré est filtré sur papier filtre et le volume obtenu est ajusté à 25 mL avec l'eau distillée puis dosé par ICP (Norme NF X31-101).

Au niveau de l'appareil, un générateur haute fréquence est utilisée pour chauffer un courant d'argon et créer un plasma (gaz ionisé) par l'intermédiaire d'une bobine d'induction. La température atteinte est de l'ordre de 6726 °C à 7726 °C. Au contact du plasma, l'échantillon, préalablement minéralisé, est réduit à l'état d'atomes indépendants et d'ions.

Ces atomes, excités par le plasma, réémettent l'énergie qu'ils ont acquise sous forme d'un rayonnement électromagnétique (photons). La lumière émise entre dans un spectromètre qui la disperse et sépare les différentes raies d'émission présentes dans le rayonnement.



Chaque élément chimique possède un spectre optique caractéristique et l'intensité des raies émises par l'échantillon est proportionnelle à la concentration des éléments qu'il contient. (Norme NF X31-101).