



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Ecologie Microbienne*

Intitulé :

---

## **Etude de la diversité bactérienne entre deux points de prélèvement dans une zone contaminé par l'Antimoine**

---

Présenté et soutenu par : *SEMOUMA Imane*

Le : 20/06/2017

*GHEDABNA Chaima*

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** **Riah. N** (maitre de conférences UFM Constantine).

**Rapporteur :** **Benhizia. Y** (Professeur - UFM Constantine).

**Examineurs :** **Chabbi. R** (maitre- assistant « B » -UFM Constantine).

*Année universitaire 2016/2017*

## **Remerciements**

*Avant nous remercions Dieu tout puissant qui nous a donné suffisamment de courage et surtout patience pour réaliser ce modeste travail avec réussite*

*Nous remercions en premier lieu le professeur YACINE BENHIZIA pour avoir accepté de nous encadrer et de nous faire bénéficier de ses précieux conseil, son expérience et pour les facilités qu'il nous offertes pour le bon déroulement du stage dans son laboratoire*

*Nos profonds remerciements Mlle Sabra Khouni leur conseil et son aide continue au long de notre stage*

*Nos derniers remerciement et ne sont pas les moindres vont aux membres du jury, les membres de laboratoire de biotechnologie et a tous ceux qui ont participé de près ou de loin pour l'aboutissement de ce travail*

## *Dédicace*

*Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à*

*A mes parents :*

*Ma chère mère ZENATI RAZIKA, qui a œuvré pour ma réussite, de par ton amour, ton soutien, tes sacrifices consentis et tes précieux conseils, pour toute ton assistance et ta présence dans ma vie. Reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et mon éternelle gratitude.*

*A mon cher père RACHID, qui peut être fier de moi et il trouve dans cet ouvrage le résultat de longues années de sacrifices et de privation. Je te remercie de m'avoir aidé et encouragé. Puisse Allah faire en sorte que ce travail porte son fruit. Je te remercie encore pour ton éducation et ton soutien permanent.*

*A mes chers frères et sœurs :*

*Moufida, Berrahal Qays son époux et surtout la merveilleuse Layane. Sara et Cherouat Imade son époux, Ahmed, Abir et Zaki qui n'ont pas cessé d'être, pour moi, des exemples de persévérance, de courage et de générosité.*

*A ma grand-mère Aldjia qui ne m'a pas oublié dans ses prières. Qu'Allah te protège !*

*A mes chères Amies :*

*Imen et Souhayla, Sara, Sawssan, Maissa, Amina, Chahinez, Romaiassa, Oumnia, Zineb et chaima je vous remercie pour votre soutien*

*A tous ceux qui me sont chers, A toutes les personnes qui m'ont encouragée et qui m'ont aimée.*

*Imane*

## *Dédicace*

*Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, je dédie mon travail*

*A ma chère mère Chahrazed ma raison d'être ma raison de vivre la lanterne qui  
éclaire mon chemin*

*A mon cher père Salouh en signe d'amour, de reconnaissance et de gratitude pour  
les sacrifices dont il a fait pour moi*

*A mon cher mari Mohamed qui ma aidé par leur soutien me pousse toujours à  
faire mieux*

*A mes chers frères Seifeddine, Abd al Moize, Adibe Tadjeddine*

*A mes beaux frère Radouane et Seifeddine*

*A mes belles sœurs Sara et Raouia*

*A ma nièce Rana Khadija*

*A toute la grande famille, à mes amies et à tous ceux qui ont cru en moi, et lui me  
donne envie d'aller en l'avant, je vous remercie tous*

*Cheima*

## Résumé

La pollution et la contamination de notre planète met en évidence l'intervention de l'écologie microbienne afin de contrôler l'impact de ce phénomène et les déséquilibres qu'il résulte.

Notre travail repose sur l'impact de l'antimoine sur la communauté bactérienne provenant du déblai de mine d'antimoine de la région d'Ain Babouche wilaya d'Oum El Bouaghi.

Les résultats obtenus ont montré que le premier échantillon est un sable grossier et le deuxième échantillon est une argile. Nos échantillons de sols étudiés sont aussi caractérisés par une humidité relative de 0.11% pour le premier échantillon et 0.18% pour le deuxième.

Les mesures de pH des deux sols montrent que le sol du premier échantillon est un sol neutre (pH=6,74) et le deuxième sol est un sol légèrement alcalin (pH=7,18).

Une stratégie d'isolement et d'identification a été mise en œuvre. Elle repose sur la caractérisation phénotypique des souches en utilisant un milieu de culture simple (GN), ce qui nous a permis d'isoler cinq souches. Une souche a une coloration Gram positive, et une souche à coloration Gram négatif.

Des tests de croissance à différentes températures sont réalisés afin d'optimiser la croissance des bactéries *in vitro*. Certaines bactéries à Gram négatif et à Gram positif se développent à différentes températures.

Des tests nutritionnelles et biochimiques sont réalisés afin d'obtenir une caractérisation phénotypique préliminaire des isolats.

Selon 9<sup>ème</sup> édition «Bergey's Of Determinative Bacteriology» et nos résultats, on a supposé que nos souches font partie aux genres *Bacillus* et *Escherichia*.

**Mots clés :** Identification, Diversité, Sol, Contamination, Métal Lourd, Antimoine.

## Abstract

The pollution and contamination of our planet highlights the intervention of microbial ecology in order to control the impact of this phenomenon and the imbalances it results.

Our work is based on the impact of antimony on the bacterial community from antimony mine cuttings in the Ain Babouche wilaya region of Oum El Bouaghi.

The results obtained showed that the first sample is a coarse sand and the second sample is a clay. Our soil samples are also characterized by a relative humidity of 0.11% for the first sample and 0.18% for the second sample.

The pH of the two soils shows that the soil of the first sample is a neutral soil (pH = 6.74) and the second soil is a slightly alkaline soil (pH = 7.18).

A strategy of isolation and identification has been implemented. It is based on the phenotypic characterization of the strains using a simple culture medium (GN), which allows us to isolate five strain Gram-positive staining, And a Gram-negative strain.

Growth tests at different temperatures are carried out to optimize the growth of bacteria in vitro. Some Gram-negative and Gram-positive bacteria develop at different temperatures.

Nutritional and biochemical tests are carried out in order to obtain a preliminary phenotypic characterization of the isolates.

According to the 9<sup>th</sup> edition of «Bergey's Determinative Bacteriology» and our results it has been assumed that our strains belong to the genera *Bacillus* and *Escherichia*.

**Key words:** Identification, Diversity, Soil, Contamination, Heavy Metal, Antimony.

## الملخص

إن التلوث الذي يهدد كوكبنا يجعلنا نضع بعين الاعتبار تدخل علم البيئة الجرثومية من أجل مراقبة تأثير هذه الظاهرة والاختلالات الناتجة عنها.

وعلما يستند على تأثير معدن الاثمد على المجتمع البكتيري حيث ان مصدره عمل المناجم المتواجد بعين ببوش ولاية ام البواقي.

النتائج التي تحصلنا عليها تبين أن العينة الأولى هي عبارة عن طين ، وعينات الرمل التي قمنا بدراستها تتميز برطوبة بنسبة 0,11% بالمئة للعينة الأولى و 0,18% بالنسبة للعينة الثانية.

إن قياس نسبة الحموضة للعينتين بينت أن العينة الأولى هي عبارة عن تربة متعادلة (pH 6,74)، وتربة العينة الثانية هي تربة قلوية (pH 7,18) .

وتم تطبيق استراتيجية العزل والتحديد. والتي تركز على الوصف الظاهري للسلاسل باستعمال وسط مغذي بسيط

والذي يسمح لنا بعزل 5 سلاسل ذات تلوين ال (Gram positif) وسلالة واحدة ذات تلوين (Gram négatif).

وتم انجاز اختبارات نمو في درجات حرارة مختلفة من أجل تحسين نمو البكتيريا في المخبر، وبعض البكتيريا ذات

ال Gram négatif وال Gram positif يتطورون في درجات حرارة مختلفة.

اختبارات غذائية وبيوكيماوية تم إنجازها للحصول على أوصاف ظاهرية مبدئية للسلاسل التي عزلت

وبحسب الطبعة التاسعة ل «Bergey's Of Determinative Bacteriology» مقارنة بنتائج اختباراتها، نحن

نفترض ان السلاسل التي تحصلنا عليها هي جزئ من النوع *Bacillus* و *Escherichia*.

**الكلمات الرئيسية:** التحديد، التنوع، التربة، التلوث، والمعادن الثقيلة.

## **List des tableaux**

<b>Tableau 01: l'étude physicochimique des deux échantillons</b>	<b>(P: 22)</b>
<b>Tableau 02: Aspect macroscopique des colonies isolées</b>	<b>(P: 23)</b>
<b>Tableau 03: Aspects microscopiques des souches isolées</b>	<b>(P: 23)</b>
<b>Tableau 04 : Températures de croissance testées</b>	<b>(P: 26)</b>
<b>Tableau 05 : tolérance de pH après 48h</b>	<b>(P: 27)</b>
<b>Tableau 06 : croissance des isolats en présence des différents acides aminés</b>	<b>(P: 30)</b>
<b>Tableau 07 : Résultats des tests biochimiques pour la souche 4</b>	<b>(P: 31)</b>
<b>Tableau 08 : Résultats du type respiratoire et la catalase</b>	<b>(P: 32)</b>



## **Listes des figures et des planches :**

### **Les figures :**

**Figure 01 :** Quelques Ordres, Familles et Genres représentatifs des bactéries du sol. (P : 04)

**Figure 02 :** Antimoine (P : 09)

**Figure 03 :** Stratégie de prélèvement des 04 échantillons de sol contaminés (P : 13)

**Figure 04 :** Localisation géographique de la zone d'étude. (P : 13)

**Figure 05 :** Résultat des tests biochimique sur la galerie api 20E pour la souche 4 après incubation. (P : 32)

### **Les Planches :**

**Planche 01 :** l'aspect colonial des isolats (P : 24)

**Planche 02 :** L'aspect microscopique des isolats. (P : 25)

**Planche 03 :** croissance des souches à 20°C, pH 10 et 06. (P : 27)

**Planche 04 :** Résultats de tolérance de NaCl après 24h ,48h et 72h. (P : 29)

# Table des matières

Liste des tableaux	i
Liste des figures	ii
<b>I. Introduction</b>	<b>1</b>
<b>II. Premier partie : synthèse bibliographiques</b>	
<b>1 Définition et description d'un sol</b>	<b>2</b>
1.1 Le sol	2
1.2 La formation du sol	2
1.3 Les constituants du sol	2
1.3.1 La phase solide du sol	2
1.3.2 La phase liquide du sol	3
1.3.3 La phase gazeuse du sol	3
<b>2 La diversité bactérienne du sol</b>	<b>3</b>
2.1 les bactéries du sol	3
<b>3 Pollution et contamination du sol</b>	<b>4</b>
3.1 Forme de pollution	4
3.2 Les micropolluants du sol	4
3.2.1 Micropolluants inorganique	4
3.2.2 Micropolluants organique	4
<b>4 Les éléments trace métallique</b>	<b>5</b>
4.1 Définition	5
4.2 Les origines des éléments trace métallique	5
4.3 Le comportement des ETM dans le sol	5
4.3.1 La mobilité	5
4.3.2 La biodisponibilité	6
4.4 L'effet des ETM dans l'environnement	6

4.4.1	Effet sur la communauté bactérienne du sol	6
4.4.2	Effet sur la santé humaine	7
4.4.3	Effet sur les plantes	8
<b>5</b>	<b>L'antimoine</b>	<b>9</b>
5.1	Définition	9
5.2	Les propriétés physiques de l'antimoine	9
5.3	Les propriétés chimiques de l'antimoine	9
5.4	Origine et usage de l'antimoine	10
5.5	Comportement de l'antimoine dans le sol	10
5.6	Toxicité de l'antimoine	11
5.6.1	Effet sur la santé humaine	11
<b>III.</b>	<b>Deuxième partie : Matériels et Méthodes</b>	<b>13</b>
1	Echantillonnage	13
1.1	Stratégie d'échantillonnage	13
1.2	Matérielle biologique	13
1.3	Description de la zone	13
1.4	Localisation d'échantillonnage	14
2	Caractérisation des échantillons	14
3	Analyse microbiologique	16
3.1	Isolement	16
3.1.1	Préparation de la solution mère	16
3.1.2	Préparation des dilutions	16
3.1.3	Isolement des bactéries	16
3.1.4	Purification	16
3.1.5	La conservation	16
4	Caractérisation phénotypique	17
4.1	Caractérisation morphologique	17
4.1.1	Observation macroscopique	17

4.1.2	Observation microscopique	17
4.2	Test physiologique	18
4.2.1	Effet de la température	18
4.2.2	Effet du PH	18
4.2.3	Tolérance au NaCl	18
4.3	Test nutritionnelle	18
4.3.1	Utilisation des acides aminés comme source d'azote	18
4.4	Analyse biochimique	18
4.4.1	Etude de métabolisme respiratoire	18
4.4.2	La galerie api20e	20
IV.	Discussion et résultat	22
V.	Conclusion	34
	Référence bibliographique	
	Annexe	

## I. Introduction

La contamination et la pollution des sols par les éléments traces métalliques (ETM) constituent un des problèmes majeurs de notre époque. Les éléments trace métallique sont présents naturellement à des concentrations variables dans les sols. Ce pendant les activités anthropiques conduisent à une augmentation de leur concentration dans les sols, formant ainsi des stocks des polluants potentiellement toxique pour l'environnement. De plus ces stocks peuvent évaluer en fonction des conditions physico-chimiques.

Cette pollution entraîne des perturbations au niveau de l'écosystème, de la diversité et l'activité bactériennes peuvent être influencées et varier en fonction de leur disponibilité des métaux, la présence des métaux peut affecter la croissance, la morphologie et l'activité de tous les microorganismes (Giller et *al.*, 1997).

Ce travail a pour l'objectif de déterminer quel est l'impact de l'antimoine sur la population bactérienne ? Quelle sont les genres bactérien résistantes à ce métal ?

Pour répondre à ces interrogations, une expérimentation a été menée sur le terrain dans la zone minière d'Ain Babouche dans la région d'Oum el Bouaghi. La division de ce travaille et l'articulation des chapitres en suivants les différentes échelles d'études :

Le premier chapitre présente une synthèse bibliographique et quelque définition des notions scientifiques sur les ETM, l'antimoine et les sols contaminées par les métaux lourds et plus particulièrement l'antimoine et leurs impacts sur les organismes vivants en générale et sur les bactéries spécifiquement.

Le deuxième chapitre présent matériel et méthode où sont décrits le matériel biologique, le protocole expérimentale utilisée.

Le troisième chapitre présente les résultats obtenu et leurs interprétations.

## II. Synthèse bibliographique

### 1 Définition et description d'un sol

#### 1.1 Le sol

Le terme sols s'applique aux matériaux externes de la surface terrestre, une couche distincte des roches sous-jacentes. La formation du sol implique des interactions complexes entre le matériel d'origine (roches, sable, moraines, glaciaires), la topographie, le climat et les organismes vivants. Deux principaux groupes de sol peuvent être distingués : les sols minéraux et les sols organiques (Michael, John 2007).

#### 1.2 La formation du sol

Le sol est une formation naturelle, il résulte de l'action conjuguée sous l'influence de processus physique, chimique, biologique, et humains qui comprennent l'altération initiale des roches mères. Le sol résulte de l'union de la matière organique fraîche provenant des débris organique décomposée en humus (Bousboua, 2005).

#### 1.3 Les constituants du sol

Le sol est constitué de trois phases : solide, liquide, et gazeuse

##### 1.3.1 La phase solide du sol

Elle est constituée par des minéraux et des matières organiques en proportions variables. On pourrait considérer les organismes vivants du sol comme une partie de la phase solide, puisqu'ils ne sont ni gazeux ni liquides (Calvet, 2000). On distingue deux fractions dans le sol :

##### 1.3.1.1 Fraction minérale

Les minéraux constituent, en général, de 95% à 99% du sol. La composition minérale dépend de la nature de la roche-mère. La nature des minéraux peut être extrêmement diverse avec des tailles granulométriques différentes (Sable, limon, argile granulométrique) (Quénéa, 2004).

##### 1.3.2.2 fraction organique

La fraction organique d'un sol est constituée à plus de 80% de matière organique morte (résidus de plantes et d'animaux en état de décomposition naturelle) (Paul et Clark, 1996). On trouve aussi des organismes vivants : des bactéries dont beaucoup d'actinomycètes, des champignons et une microfaune formée de protozoaires, nématodes, insectes, vers de terre (Quénéa, 2004). Le sol est un habitat généralement favorable à la prolifération des microorganismes, leur nombre est supérieur à celui trouvé dans les eaux douces ou marines : la population microbienne s'élève à des valeurs comprises entre  $10^6$  et  $10^9$  bactéries par gramme

de sol (Artiola et Fuller, 1982). Leur abondance et leur nature dépendent du type de sol, de la végétation, du climat et des diverses actions anthropiques et de leurs variations (Calvet, 2000).

### **1.3.2 la phase liquide du sol**

La phase liquide du sol n'est pas de l'eau pure mais une solution dont la composition est complexe et très variable. Elle contient de très nombreuses substances dissoutes organiques et inorganiques, ionisées et non. D'une façon générale, la solution du sol est difficile à décrire et à étudier en raison de sa très grande variabilité spatiale et temporelle, de sorte qu'il n'existe pas de composition type (Calvet, 2000).

### **1.3.3 La phase gazeuse du sol**

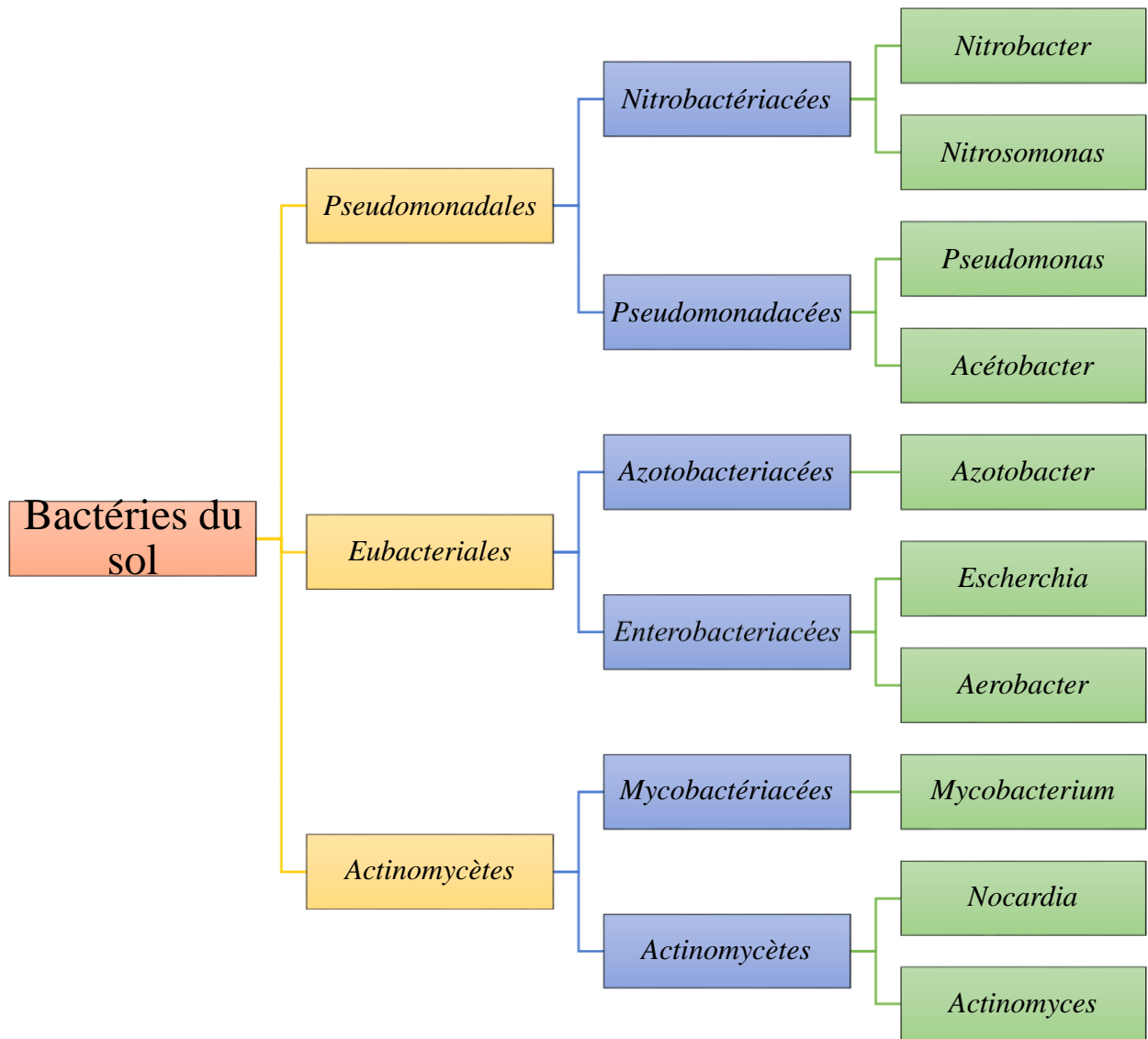
La phase gazeuse du sol est souvent appelée l'atmosphère du sol. Sa composition est souvent voisine de celle de l'air mais elle peut être très variable dans l'espace et dans le temps. Elle dépend principalement de deux facteurs, la proximité de l'atmosphère, c'est-à-dire la profondeur dans le sol et l'activité biologique (Calvet, 2000).

## **2 La diversité bactérienne du sol**

Le sol est considéré comme l'un des environnements les plus complexes de la biosphère et est à ce titre un réservoir majeur de la diversité microbienne. Dans le sol les bactéries sont soumises en permanence à des perturbations qui en modifient la structure des communautés. (Faugier, 2010).

### **2.1 Les bactéries du sol**

Les bactéries sont les microorganismes les plus abondants et métaboliquement les plus actifs du sol. En fonction des propriétés du sol, tous les types physiologiques bactériens sont représentés : autotrophes et hétérotrophes, mésophiles, thermophiles et psychrophiles, aérobies et anaérobies. Le sol est le réceptacle d'apport continu de microorganismes exogènes qui disparaissent ou survivent en situation de dormance, en raison des conditions défavorables d'un milieu qui n'est pas le leur. Mais certains d'entre eux peuvent ponctuellement s'implanter. Les bactéries du sol sont à dominante Gram positif, avec comme groupes principaux : les Corynébactéries, les Actinomycètes, les Mycobactéries et les Nocardiformes. Les genres les plus communément isolés sont *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* et *Bacillus*, dans les couches aérobies alors que les bactéries du genre *Clostridium* sont dominantes dans les conditions anaérobies. Les variations du potentiel nutritionnel du sol favorisent l'apparition de bactéries autotrophes du cycle de l'azote : *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* et du soufre : *Thiobacillus* (Bousseboua, 2005).



**Figure 1** : Quelques Ordres, Familles et Genres représentatifs des bactéries du sol (Dommergue et Mangenot, 1993).



### **3 Pollution et contamination des sols**

La pollution et la contamination sont deux expressions couramment employées pour désigner l'accumulation anormale et exogène, généralement due à une activité humaine, d'éléments ou de composés minéraux, organiques ou d'agents pathogènes dans un milieu donné dont la qualité se trouve affectée (Chassin et *al.*, 1996).

Une substance toxique désigne une substance naturelle ou de synthèse, minérale ou organique, présentant une nocivité pour les organismes vivants, pouvant être absorbée par voie foliaire ou racinaire chez les plantes, par inhalation, ingestion ou contact chez les animaux, elle provoque une intoxication des organismes affectés en perturbant une fonction vitale pouvant entraîner la mort (Ramade, 2000).

#### **3.1 Forme de pollution**

On distingue deux types de pollution des sols (Jeannot, 2000) :

- La pollution localisée : Elle se distingue par la présence ponctuelle dans les sols de substances dangereuses : déversements, fuites ou dépôt de déchets.
- La pollution diffuse : Elle implique des polluants à faible concentration sur de grandes surfaces, ils proviennent généralement d'épandages de produits : engrais ou pesticides, retombées atmosphériques.

Pour chacun de ces types, on distingue deux origines de pollution :

- La pollution accidentelle : déversement ponctuel et momentané de substance polluante.
- La pollution chronique : survenant sur de longues durées, telles que les fuites sur des conduites enterrées.

#### **3.2 Les micropolluants des sols**

##### **3.2.1 Micropolluants inorganiques**

Il s'agit d'un ensemble d'éléments ou de composés dont l'accumulation est responsable d'une pollution du sol (Chassin et *al.*, 1996). Généralement ils sont non biodégradables, accumulatifs et toxiques quand ils sont présents en grande quantité (Boucheseiche, 2002).

Les micropolluants minéraux métalliques et non métalliques les plus rencontrés sont le cadmium, le chrome, le cuivre, le mercure, le nickel, le plomb, le sélénium, le zinc, l'arsenic, le molybdène, le cobalt, le bore et le thallium (Mérian, 1991). Les micropolluants minéraux sont présents naturellement à des concentrations généralement basses dans les sols. Ils proviennent en grande partie de l'altération de la roche mère du sous-sol (Jeannot et *al.*, 2000). Les activités anthropiques peuvent conduire à une augmentation de ces concentrations naturelles.

L'accumulation des métaux lourds dans l'environnement est liée à leur utilisation comme matières premières pour de nombreux produits industriels ou comme catalyseurs chimiques (Crosnier, 2000). On les trouve également dans des produits tels que les pesticides ou les engrais qui sont distribués sur une large surface. Ils sont aussi apportés sous forme de déchets urbains ou industriels, solides, liquides ou gazeux (Eshighi, 1995).

### **3.2.2 Micropolluants organiques**

Ce sont en grande majorité des produits de synthèse issus de l'activité anthropique (Boucheseiche et *al.*, 2002). Ils proviennent principalement de trois ensembles d'activités industrielles (production d'énergie, métallurgie, industries chimiques...), urbains (transport, traitement des déchets,...) et agricoles (utilisation de produits phytosanitaires).

## **4 Les éléments trace métalliques (ETM)**

### **4.1 Définition**

Les éléments trace métalliques (ETM) sont des éléments chimiques omniprésents sur la surface terrestre (Doelsch, 2004). Conventionnellement en science du sol, les éléments traces métalliques sont les 68 éléments minéraux constituant de la croûte terrestre, dont le pourcentage massique est inférieur à 01% (Baize, 1997). Ils représentent ensemble seulement 0,6% du totale de croûte terrestre alors que les 12 éléments majeurs (Si, Al, Fe, Ca, Na, Mg, K, Ti, P, Mn, S, et Ba) interviennent pour 99,4% (Alloway, 1995). En générale, sont appelés métaux lourds les éléments ayant un numéro atomique élevé et de densité supérieur à 5g /cm<sup>3</sup> (Lemière et *al.*, 2001).

### **4.2 Les origines des éléments trace métalliques dans le sol**

Les ETM présents de façon naturelle dans les sols. Ils proviennent en grande partie de l'altération de la roche mère du sous-sol. Toutes fois, les concentrations les plus importants de métaux lourds dans les sols sont liées à l'activité humaine : stockage de déchet industriels et urbains (mines et fonderie de métaux non ferreux, décharges publiques) ; pratique agricoles (pratique de la fertilisation à l'aide de composte urbain, de déjections animales ou de boues de station d'épuration) ; pollution dues à des retombes atmosphériques ( essence au plomb, poussières des industries métallurgique, incinération des ordures ménagers) (Lumière et *al.*,2001).

### **4.3 Le comportement des ETM dans le sol (mobilité et biodisponibilité)**

Les ETM sont liées à différents constituants du sol et sont présents sous différentes formes chimiques. Ils peuvent changer de formes (plus ou moins solubles ou migrer vers d'autres constituants du sol ou vers la phase liquide selon les conditions physico-chimiques. Ces changements rendent les ETM plus ou moins mobiles dans les sols et plus ou moins disponibles pour la biosphère (Qasim, 2015).

#### **4.3.1 La mobilité**

La mobilité d'un élément est caractérisée par son aptitude à passer dans les compartiments du sol (juste 1988). Les ETM sont associés aux constituants du sol qui contrôlent leur mobilité, ils peuvent être inclus dans les réseaux cristallins des minéraux primaires et des constituants secondaires, adsorbés sur les matières organiques, adsorbés sur les phases hydroxyde du fer (Baize, 1997).

Les variations des conditions physico-chimiques (pH, Température, force ionique, microorganismes ...etc.) peuvent jouer directement sur la mobilité des éléments en faisant passer les métaux présents dans un sol d'une forme à une autre. Ce changement met donc en jeu des mécanismes biogéochimiques de mobilisation, d'immobilisation et de transport. Ces mécanismes dépendent de processus intervenant dans des réactions biologiques, chimiques et physico-chimiques (Broulier et Berthelin, 1998).

#### **➤ Rôles des microorganismes dans la mobilité des métaux lourds**

Les microorganismes peuvent également modifier indirectement la mobilité des métaux via leur incidence sur le pH, ou le potentiel redox du milieu. En plus de facteurs biologiques (diversité, résistance, tolérance, etc.), les facteurs physico-chimiques comme le pH ou la composition ionique de la solution du sol jouent un rôle important dans la fixation des métaux. Leur distribution dans la cellule (extracellulaire ou intracellulaire) et les caractéristiques de l'accumulation, ainsi que la concentration en métal peuvent également conditionner la rétention de ces polluants par la biomasse (Chen *et al.*, 1995).

#### **4.3.2 La disponibilité**

La biodisponibilité désigne la capacité d'une quantité d'un élément présent dans le sol à être absorbé par un organisme vivant (Newman, Jagoe, 1994). La biodisponibilité est un outil d'évaluation de la toxicité et le risque de pollution. Le changement de la biodisponibilité d'un polluant correspond à un changement de toxicité. La quantité phytodisponible d'un élément dans un sol correspond aux ETM capables de passer en solution et d'être absorbés par la plante (Qasim, 2015).

En effet, la mobilité et la biodisponibilité des ETM dépendent fortement de leur spéciation chimique dans les sols. (Quevauviller, 1997).

#### **4.4 L'effet des éléments trace métalliques dans l'environnement**

##### **4.4.1 Effet sur la communauté bactériennes et leur activité**

Les besoins énergétiques des microorganismes requièrent des concentrations très basses en métaux lourds essentiels. Ils sont directement et ou indirectement impliqués dans les différents aspects de la vie des microorganismes (croissance, métabolisme). Les métaux non essentiels peuvent être extrêmement toxiques à des concentrations extrêmement faibles. (Guine, 2006).

La diversité et l'activité bactériennes peuvent être variées en fonction de la disponibilité des métaux. La présence des métaux peut affecter la croissance (développement et sporulation), la morphologique et les activités biochimiques (photosynthèse, respiration, et synthèse d'ATP, de l'ARN...etc.) de tous les microorganismes. Pour faire face à la toxicité des métaux et atténuer leurs effets, les microorganismes et les bactéries en particulier doivent utiliser des mécanismes intrinsèques ou induits qui imposent une plus grande demande énergétique (Gadd, 1992, Leita et *al.*, 1995).

##### **➤ Résistance des bactéries aux métaux lourds**

La tolérance correspond à la capacité à faire face à la toxicité des métaux grâce à des propriétés intrinsèque des microorganismes, tandis que la résistance correspond à la mise en place des mécanismes de détoxification en réponse à la toxicité des métaux (Gadd, 1992). Des bactéries utilisent des mécanismes de résistance spécifique ou de tolérance à certain métaux ainsi que certain détermination génétique (mécanisme de défense) tels que la modification ou la suppression des systèmes de transporteurs membranaire des métaux toxique concernés ou la mise en place de système d'efflux (pompe moléculaire) qui rejettent les métaux toxiques de l'intérieur de la cellule. Ainsi, la concentration intracellulaire des métaux est très contrôlée, on parle d'hémostasie des métaux (Guine, 2006).

##### **4.4.2 Effet sur l'être humain**

En générale, les humains sont exposés aux ETM par l'ingestion (boisson, ou nourriture), par inhalation (voie respiratoire) ou par voie cutané (Martin et Griswold 2009). Plus généralement, les métaux vont s'insérer à différents niveaux de l'organisme et créer des perturbations dans le bon déroulement des processus physiologiques. Etant donné la complexité du vivant et la multiplicité des cofacteurs associés, les conséquences seront très variables d'un individu ou

d'une espèce à l'autre (Sousou, 2013). Une exposition à des fortes doses de métaux lourds et donc impliquée dans de nombreuses pathologies sévères (Levy, 2015).

Certains métaux lourds sont définis comme des substances cancérogènes pour l'homme. Ils peuvent affecter tous les organes et systèmes du corps. L'exposition à long terme des adultes peut se traduire par une baisse des performances du fonctionnement du système nerveux, une faiblesse dans les doigts, une légère augmentation de la pression artérielle, et l'anémie (Martin et Griswold, 2009).

Le cadmium par exemple est cancérigène. Ses effets sont principalement localisés au niveau des reins, des os, du foie où il endommage les mécanismes de filtration (LENNTECH, 1998-2017).

#### **4.4.3 Effet sur les plantes**

Chez les plantes, la phytotoxicité des métaux peut s'exprimer par des altérations de nombreux processus physiologiques au niveau cellulaire et/ou moléculaire. La dénaturation et l'inactivation des enzymes, le blocage des groupes fonctionnels de molécules métaboliquement importantes, le déplacement ou le remplacement d'éléments essentiels perturbent l'intégrité des membranes et des cellules. Chez les plantes supérieures, les cellules racinaires sont les premières à être exposées aux ETM. (Rascio et Navari-Izzo, 2011).

Comme un exemple, une concentration excessive en zinc provoque des symptômes de toxicité chez les plantes non tolérantes. Ceci se traduit par une inhibition de l'élongation des racines et la chlorose des jeunes feuilles. Le Zn inhibe également la photosynthèse à diverses étapes, et à travers différents mécanismes (Marschner, 2008). En ce qui concerne la toxicité du cadmium, de nombreux symptômes se manifestent chez les plantes sensibles, telles que la réduction de la croissance des parties aériennes et plus particulièrement celle des racines, des troubles de la nutrition minérale et du métabolisme des glucides (Dong *et al.*, 2005).

Mon travail s'inscrivant dans le cadre d'une zone contaminée par l'antimoine résulte de l'activité humaine.

## **5 L'antimoine**

### **5.1 Définition**

L'antimoine est un élément chimique de métalloïde appartenant au groupe 15 du tableau périodique des éléments (Mendeleïev). Il est de symbole atomique "Sb" (ce symbole vient de stibium car son principal minéral est la stibine ( $\text{Sb}_2\text{S}_3$ ) qui est le sulfure d'antimoine), de numéro atomique  $Z = 51$  et de poids atomique 121,75. Il est considéré comme très dangereux pour l'homme (Alloway, 1995), est un semi-métal de couleurs gris argenté. Il est connu depuis l'antiquité où il était notamment utilisé comme produit cosmétique chez Egyptiens. Le Sb et la plupart de ses composés sont toxiques et provoquent des troubles semblables (Audion, 2012).



**Figure 2 :** Antimoine.

### **5.2 Les propriétés physiques de l'antimoine**

L'antimoine est stable à température ambiante où il se présente sous la forme d'un solide gris argenté brillant. Son abondance moyenne dans la croûte terrestre. Sous forme métallique, il est cassant, résistant aux attaques acides et s'oxyde en  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  lorsqu'il est chauffé sous atmosphère oxydante. Il est mauvais conducteur de chaleur et d'électricité, finement dispersée dans l'air, la poudre d'antimoine peut être explosive (ICSC, 2006) citez dans (Audion, 2012).

### **5.3 Les propriétés chimiques de l'antimoine**

L'antimoine est rarement sous sa forme native (Sb) (Audion, 2012). Il possède deux isotopes stables de nombre de 121 et 123 et d'abondance moyenne respective 57,4 % et 42,6% (Beaugelin-Seiller et Garnier-laplace, 2002).

## **5.4 Origines et usage de l'antimoine**

### **➤ Origine**

L'antimoine est présent naturellement dans la croûte terrestre et les rejets dans l'atmosphère, proviennent aussi bien des sources naturelles que des sources anthropiques (Bisson et al., 2007).

Il provient essentiellement de la roche mère. Il se concentre préférentiellement dans les sédiments argileux et schisteux (Kobata-Pendis et Pendis, 2001). La majorité de la pollution par le Sb semble provenir d'émissions minières et industrielles (Adriano, 1986).

### **➤ Usage**

L'antimoine est utilisé dans la fabrication d'alliage avec le plomb, l'étain et le cuivre. Avec l'étain, il est utilisé dans la fabrication du «métal anglais». Avec le plomb et l'étain, il est utilisé dans la fabrication d'alliage antifriction. Il est également employé dans la fabrication des plaques de plomb des batteries, des plombs de chasse, des semi-conducteurs, des piles thermoélectriques, pour le traitement de surface des métaux et pour le noircissement du Fer (Bisson et al., 2007).

## **5.5 Comportement de l'antimoine dans le sol**

Le comportement de l'antimoine dans les sols est encore mal connu. Il est susceptible d'être présent sous forme de sulfures très peu solubles ainsi que sous forme d'anions inorganique et sous diverses formes organiques méthylées (Hammel et al., 2000). Comme la plupart des éléments anionique l'antimoine est relativement mobile et sa mobilité varie selon la nature des sols (Askbrant et al., 1996).

La concentration de l'antimoine stable dans les sols est en moyenne de l'ordre de la ppm (Li et Thornton, 1993). Un sol est considéré comme contaminé à partir d'une concentration supérieur à 30 ppm, la valeur supérieur usuelle pour une pollution forte de l'ordre de 500ppm (Filella et al., 2002-a).

Les plus fortes concentrations en antimoine sont trouvées dans les gisements hydrothermaux de métaux lourds et les dépôts sulfurés des sources chaudes modernes. Le Sb peut également être immobilisé par absorption dans les racines et les parties aériennes des plantes, les données disponibles suggèrent que l'adsorption et les précipitations sont généralement les principaux mécanismes de rétention de Sb dans les sols (Alloway, 2013).

## **5.6 Toxicité de l'antimoine**

### **5.6.1 Effet sur la santé humaine**

#### **➤ Toxicité aiguë**

La toxicité de l'antimoine dépend de son état d'oxydation ; Sb (III) est environ dix fois plus toxique que Sb (V) (Thron, 1991). Les voies respiratoires, le tractus gastro-intestinal, le cœur et la peau sont les principales cibles de la toxicité du Sb. Les symptômes d'intoxication aiguë sont l'irritation violente du nez, de la bouche, de l'estomac et de l'intestin avec des douleurs abdominales, des vomissements et des diarrhées (Mosbah, 2012). L'ingestion accidentelle par voie orale de trioxyde d'antimoine entraîne des sensations de brûlures dans l'estomac, des coliques, des nausées, des vomissements et parfois des collapsus (IARC, 1989). Des effets gastro-intestinaux ont été signalés chez des travailleurs exposés à des poussières d'antimoine. Ces effets résultent certainement du transport des poussières des poumons au niveau digestif par une action mucilagineuse (ATSDR, 1992).

#### **➤ Toxicité chronique**

La pneumoconiose, des modifications cutanées et des dommages cardiaques ont été observés après une exposition à long terme au Sb (Schneider et Kalberlah, 2000). Des travailleurs exposés à des doses comprises entre 0.58 et 5.5 mg Sb m<sup>-3</sup> sous forme de trisulfure d'antimoine pendant 8 mois à deux ans ont présenté une augmentation de la pression sanguine (10 %) et des altérations cardiaques chez 5 % des sujets (Brieger *et al.*, 1954).

Des travailleurs exposés, moins de cinq mois, à des fumées d'oxyde d'antimoine à des concentrations de 4.69 à 11.82 mg m<sup>-3</sup> ont présenté des rhinites, des dermatites, des bronchites, des pneumonies et des conjonctivites (Renes, 1953).



### III. Matériel et méthode

#### 1 Echantillonnage

##### 1.1.1 Stratégie de l'échantillonnage

Deux échantillons du sol ont été prélevés le premier à partir de la sortie de la mine et le deuxième est un échantillon témoin non contaminé prélevés à l'autre côté, Les prélèvements ont été réalisés à l'aide d'une spatule stérile à une profondeur de 10 à 15 cm. Pour chaque échantillon, la quantité de sol prélevé est mise dans des flacons en verre stériles.



**Figure 04 :** Stratégie du prélèvement des échantillons de sol contaminés.

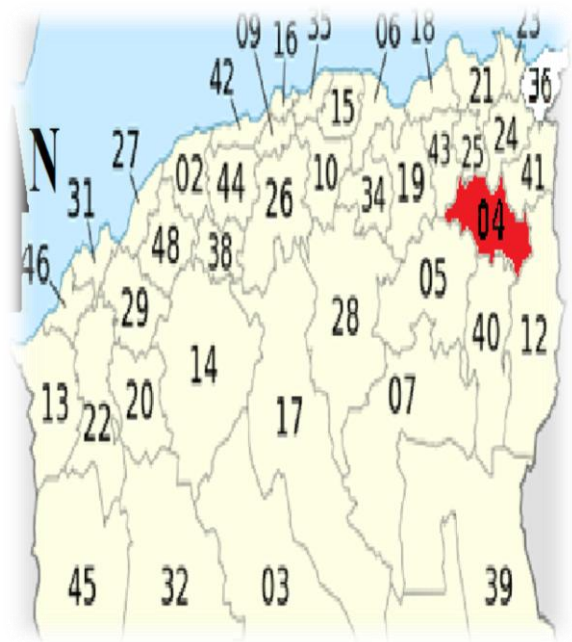
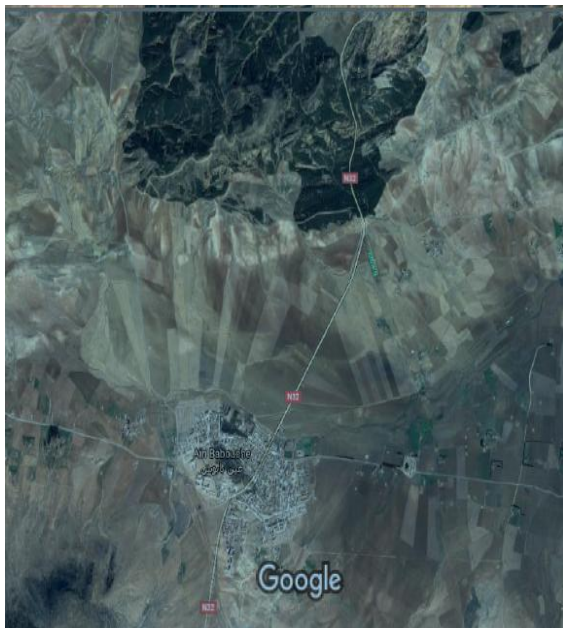
##### 1.2 Matériel biologique

La source des échantillons pour notre étude est un sol anciennement contaminé par l'antimoine « métal lourd » suite à l'exploitation d'une mine d'antimoine mise à l'arrêt depuis plusieurs années provenant d'un site localisé à Ain babouche (Wilaya de Oum El Bouaghi).

##### 1.3 Description de la zone

Notre travail porte essentiellement sur la région d'Ain Babouche, Wilaya de Oum El Bouaghi, (711'15 E ; 35 56'31 N) en DMS, et plus précisément sur Djbel Hammimet gîte d'antimoine très considérable et très riche se trouvant à 3 Km de Ain Babouche (photo N01). Cette région semi-aride du Nord Est Algérien située à 90 Km de Constantine est réputée par ses escargots d'où elle tire d'ailleurs son nom (babouche=escargot) mais surtout par la caractéristique spécifique de ses sols qui est leur forte teneur en métaux lourds et plus précisément en antimoine ; ce métal est considéré comme très peu soluble dans l'eau (Rached, 1993).

## 1.4 Localisation géographique



**Figure 05 :** Localisation géographique de la zone d'étude

## 2 Caractérisation des échantillons

Pour caractériser nos échantillons, nous avons utilisé des protocoles normalisés par AFNOR (pH, humidité, conductivité,...) et des protocoles issus de la littérature (AFNOR, 1994).

L'analyse au laboratoire des éléments métalliques dans les sols nécessite une phase de préparation de l'échantillon (séchage, tamisage, etc.).

### 2.2 Analyse physique

#### 2.2.1 Granulométrie

L'analyse granulométrique permet de déterminer la distribution de taille des particules du sol. En effet, la taille des particules a une influence sur les caractéristiques du sol (surface spécifique, perméabilité...) et donc sur le comportement des polluants par les phénomènes d'infiltration et de rétention des éléments traces métalliques.

##### 2.2.1.1 Préparations des échantillons

L'objectif de la préparation de l'échantillon avant analyse est d'obtenir un échantillon représentatif dans lequel la concentration en polluants est aussi proche que celle présente dans le sol. C'est souvent l'étape la plus longue et celle qui génère le plus de sources d'erreur dans la chaîne analytique. Elle comprend :

➤ **Le séchage** : à une température compatible avec les caractéristiques des composants recherchés. Pour les métaux, le séchage des échantillons de sol est le plus souvent réalisé à l'air libre.

➤ **le tamisage** : Pour éventuellement éliminer les gros fragments solides qui ne sont habituellement pas considérés comme faisant partie du sol. La fraction conservée pour analyser est généralement celle inférieure à 2 mm.

### **2.1.2 Humidité résiduelle**

L'humidité résiduelle est définie comme la masse perdue après séchage à 105 °C d'un échantillon dont la masse est constante à 40°C. Sa mesure permet de déterminer la masse sèche d'un échantillon du sol. La méthode de détermination est normalisée par AFNOR.

L'humidité résiduelle H est exprimée en pourcentage massique et elle est calculée par la relation suivante :

$$H = 100 * (m1/m0)$$

**m0** : étant la masse initiale d'échantillon séché à 40 °C

**m1** : sa masse finale, après séchage à 105°C et refroidissement.

## **2.2 Analyse chimique**

### **2.2.1 L'acidité du sol**

Le pH fait partie d'une des plus importantes caractéristiques physico-chimiques de sol, car la spéciation, et donc la mobilité et la biodisponibilité des éléments traces métalliques sont liées à sa valeur.

**pH eau** : La mesure du pH eau est effectuée selon les normes AFNOR X 31-103 (AFNOR, 1994).

#### **➤ Principe**

La mesure du pH s'effectue sur une suspension de terre fine.

Le pH eau mesure l'acidité réelle et prend en compte les ions H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> libres dans la solution du sol.

#### **➤ Mode opératoire**

Les 10 g de sol sont mis en suspension dans 25ml d'eau distillée, agités pendant 1 heure sur un agitateur puis laissés au repos pendant 2 heures.

Le pH est ensuite mesuré à l'aide d'un pH-mètre.

**pH KCl** : 0,4 g de KCl est ajouté au mélange précédant, agité puis laissés au repos pendant une heure.

Le pH est ensuite mesuré à l'aide d'un pH-mètre.

### **3 Analyse microbiologique**

#### **3.1 Isolement**

##### **3.1.1 Préparation de la solution mère**

On ajoute 10g de sol séché dans un erlenmeyer contenant 90ml d'eau distillée stérile, agité dans une étuve à 30 C pendant 24h, le contenu représente la solution mère.

##### **3.1.2 Préparation des dilutions**

Dans un tube à essai contenant 9ml d'eau distillée stérile, 1 ml de la solution mère est ajouté ce qui représente la dilution  $10^{-1}$ . 1ml de cette dilution est mélangé à 9 ml d'eau distillé stérile donnant la dilution  $10^{-2}$  on continue ainsi jusqu'à l'obtention de la dilution  $10^{-4}$

##### **3.1.3 Isolement des bactéries**

Isolement des bactéries La gélose nutritive GN est un milieu d'isolement non sélectif .L'isolement permet de séparer des microorganismes différents dans un mélange qui pourront être ainsi étudiés individuellement. L'ensemencement se fait par strie en surface par la méthode de trois quadrants et les boites sont incubées pendant 24 .48h et 72h à 30C.

##### **3.1.4 Purification**

Après 24 h d'incubation, nous passons à l'étape de purification des cultures. Celle-ci nous permet d'obtenir des cultures pures à partir des différentes colonies isolées. La sélection des colonies est basée sur l'aspect macroscopique des colonies à savoir la couleur, la forme, le diamètre, l'opacité. Un échantillon de chaque type de colonie est prélevé et ensuite purifié par repiquages successifs selon la méthode de stries.

##### **3.1.5 Conservation**

Les souches isolées sont conservées dans des tubes à essai contenant de la gélose nutritive (GN) inclinée. Les souches sont ensemencées sur la pente des tubes par la méthode des stries, puis incubées à 30°C pendant 24 heures. Les tubes dans lesquels il y a eu une croissance seront bouchés et conservés à 4°C pour une durée de 4 à 6 semaines. Afin de pouvoir toujours disposer de souches viables.

## **4 Caractérisation phénotypique**

### **4.1 Caractère morphologique**

#### **4.1.1 Observation macroscopique**

L'examen macroscopique des colonies est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation. Les éléments d'identification macroscopique sont :

- La taille des colonies.
- La forme des colonies.
- La couleur des colonies.
- L'élévation : concave, convexe, plate.
- L'opacité : opaque, translucide, transparent.
- Structure de la surface : lisse, rugueuse, sèche.

L'aspect macroscopique est déterminé sur milieu GN solide après 24h jusqu'à 48h d'incubation à 30C.

#### **4.1.2 Observation microscopique**

##### **4.1.2.1 L'état frais**

Il s'agit de déterminer si la bactérie est mobile ou non. Ce test permet également de déterminer la forme, l'arrangement et la mobilité des bactéries. Il consiste en l'observation d'une goutte de suspension bactérienne, préparée avec de l'eau physiologique et placée entre lame et lamelle. L'observation se fait au microscope optique grossissement x40.

##### **4.1.2.2 Coloration de Gram**

C'est une double coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées. Cette coloration est réalisée systématiquement sur les différentes colonies purifiées pour préciser le caractère Gram+ ou Gram-.

Avec cette coloration double, les bactéries Gram positive apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries Gram négatives sont colorées en rose ou en rouge.

##### **4.1.2.3 Recherche des spores**

La coloration au vert de malachite permet d'observer la morphologie cellulaire et la présence ou l'absence des spores (les souches sont exposées à un stress nutritif durant 14jours).

## **4.2 Test physiologique**

### **4.2.1 Effet de la température**

Un test de croissance à différentes températures : 4°C, 20°C, 30°C, 37°C et 45°C est réalisé sur le milieu GN dans le but de déterminer les températures optimales pour chaque isolat et voir à quel groupe appartiennent ces bactéries ; psychrophiles, mésophiles ou thermophiles.

### **4.2.2 Effet de pH**

Les isolats sont cultivés sur milieu GN solide aux différents pH : 6, 8, 9 et 10.

### **4.2.3 Tolérance au NaCl**

Pour étudier la capacité des isolats à l'osmotolérance, les souches sont cultivées sur

Le bouillon nutritif à différentes concentrations de NaCl : 0.01%, 0.1%, 0.5%, 1%, 10%

- Incubation à 30°C avec agitation pendant 24h à 48h.
- Mesure de la DO à 600 nm.

## **4.3 Test nutritionnelle**

### **4.3.1 Utilisation des acides aminés comme source d'azote**

Les isolats ont été mis en culture sur milieu GN contenant 1% l'un des acides aminés suivants : Leucine, Tryptophane, Arginine, Asparagine, Acide glutamique, Histidine, Méthionine, Glycine, Proline, Cystéine, Isoleucine, Thréonine, Phénylalanine.

- Incubation des boîtes à 30°C pendant 48h.

## **4.4 Analyse biochimique**

Les épreuves biochimiques permettent en général de distinguer les espèces, même étroitement apparentées entre elles.

Cette approche nous oriente sur le métabolisme suivi par les bactéries et les enzymes qu'elles possèdent. Certains tests ont été réalisés en utilisant la galerie API 20E.

### **4.4.1 L'étude de métabolismes respiratoires**

#### **4.4.1.1 Type respiratoire**

-Utiliser des géloses profondes telle que la gélose VF (viande foie), coulées dans des tubes longs et étroits.

-Régénérée le milieu VF au bain marie bouillant pendant 30 minutes.

- Maintenir les milieux en surfusion dans un bain marie.
- Ensemencer à l'aide d'une pipette pasteur chargée au fond du tube et on remonte en spirale.
- Refroidir à l'eau courante.
- Incuber à 37C durant 24 à 48h.

➤ **Lecture**

Après incubation, on peut reconnaître quatre types respiratoires

- Bactérie aérobie stricts : croissance uniquement dans la zone superficielle de la gélose
- Bactérie anaérobie stricte : croissance uniquement dans la zone profonde de la gélose
- Bactérie aéro-anaérobies facultatives : croissance sur toute la hauteur de la gélose
- Bactérie micro-aérophile : croissance dans un cylindre de la gélose d'environ 0,5cm de hauteur et situé à environ 1 à 2 cm de la surface

- **Recherche de catalase**

Sur une lame et à l'aide d'une pipette Pasteur, on dépose une colonie bactérienne à laquelle on ajoute de l'eau oxygénée (à 10 volumes). La présence d'une catalase est révélée immédiatement par des bulles de gaz qui correspondent à l'oxygène dégagé.

- **Recherche de l'oxydase**

Ce test détecte un type de chaîne respiratoire, qui comporte en fin de la chaîne cytochrome C et une oxydase associée. Les bactéries qui possèdent une telle chaîne peuvent oxyder les composés chimiques comme la réactive oxydase. Les électrons sont transférés des réactifs au cytochrome C et de là, via l'oxydase, à l'oxygène. Ainsi oxydé, le réactif développe une coloration violette sur le disque d'oxydase imbibé par la suspension bactérienne, cela indique que le test est positif.

#### 4.4.2 La galerie api20e

L'ensemencement de la galerie API 20 permettant de réaliser 23 test biochimique afin d'identifier des bacilles a coloration de Gram négatif appartenant à la famille des *ENTEROBACTERIACEAE*

##### ➤ Principe

- Avec l'ance, une colonie comparé avec le MC .Fr est déposé dans un tube contient 10ml d'eau distillée puis on agite.

-On verse une quantité d'eau distille dans la boite pour maintenir l'humidité à la galerie qui contient des tubes en cupules.

-Le nom de tube encadré : Remplir le tube et cupule.

-Le nom de tube souligné : remplir juste le tube et dans la cupule on met l'huile de paraffine stérile.



























-Le nom de tube ni souligné ni encadré : remplir juste le tube.

-Incubation pendant 24h à 37C.

-Après 24h d'incubation à 37C, on doit rajouter le perchlore de fer dans la cupule de TDA, réactif de KOVAKS (ou JAMES) dans la recherche de la production d'indole, NaOH ou KOH et Alpha naphthol dans la cupule VP et l'acide sulfanilique et Alpha naphthylamine la poudre de zinc si nécessaire dans la cupule GLU pour la recherche de la nitrate réductase.



**TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISÉE API 20E**

Microtube	Substrat :	Caractère recherché	Révéléateur	Lecture directe ou indirecte Test (si nécessaire)	Résultat -	Résultat +
ONPG	ONPG = Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	Béta galactosidase		Lecture directe		
ADH LDC ODC	Arginine Lysine Ornithine	Arginine Dihydrolase Lysine Décarboxylase Ornithine Décarboxylase	Rouge de phénol	Lecture directe		
[CIT <sub>1</sub> ]	Citrate	Utilisation du citrate	BBT	Lecture directe		
H <sub>2</sub> S	Thiosulfate de sodium	Production d'H <sub>2</sub> S	Fe III	Lecture directe		
URÉ	Urée	Uréase	Rouge de Phénol	Lecture directe		 
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase		Lecture indirecte		
IND	Tryptophane	Tryptophanase ou production d'indole		Lecture indirecte	 	 
[VP <sub>1</sub> ]	Pyruvate de sodium	production d'acétoïne (3-hydroxybutanone)		Lecture indirecte		 
[GEL <sub>1</sub> ]	Gélatine	gélatinase	Particules de charbon	Lecture directe		
GLU à ARA = zymogramme	Substrat carboné (glucide)	Utilisation de substrats carbonés (glucides)	BBT	Lecture directe		
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /N <sub>2</sub>	Nitrates (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	Nitrate réductase		Lecture indirecte		

## IV. Résultat et discussion

### 1 Caractéristique des sols étudiés

#### 1.1 Analyse physique

Les résultats de l'analyse granulométrique et d'humidité des deux échantillons de sols Étudiés sont consignés dans le tableau 1

D'après le tableau 1, l'analyse granulométrique montre selon Delaunois (2006) que le premier échantillon est un sable grossier et le deuxième échantillon est une argile.

Les échantillons de sols étudiés sont aussi caractérisés par une humidité relative Variant de 0.11 pour le premier échantillon et 0.18 pour le deuxième

#### 1.2 Analyse physico-chimique

Les valeurs du pH des deux échantillons sont mentionnées dans le tableau 1.

Selon les valeurs préconisés par Baize et al (1998), les mesures de pH des deux sols montrent que le sol du premier échantillon est un sol neutre (pH=6,74) et le deuxième sol est un sol légèrement alcalin (pH=7,18)

Selon Sigee (2005), les ions hydrogène influencent la toxicité des métaux lourds, soit en affectant leur valence (état) chimique dans l'eau ou par compétition avec les métaux essentiels pour les sites sur les membranes biologiques.

La croissance de *Chlorella pyrenoidosa* en présence de cadmium semble plus prononcée à pH 7 qu'à pH 8.

Hart and Scaife (1977) ont suggéré que l'élimination du cadmium du milieu de culture et sa précipitation simultanée à l'intérieur de la cellule pourrait être un processus dépendant du pH.

**Tableau 01 : l'étude physicochimique des deux échantillons**

Sols	Texture granulométrie	couleur	pH eau	pH KCl	Taux d'humidité H(%)
P1	Sable grossier	Noir	6,74	6.31	0.11
P2	Argileux	marron	7.25	7,18	0.18

## 2 Caractérisation phénotypiques des isolats

### 2.2 Caractéristique morphologique

#### 2.2.1 Etude macroscopique

L'ensemencement sur milieu GN additionné d'un antifongique pour inhiber la croissance des champignons nous a permis d'isoler 06 colonies distinctes par leur aspect, leur taille et leur couleur. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 2.

Les colonies des bactéries sont généralement lisses et ont un diamètre de plus de 1mm.

**Tableau 02 : Aspect macroscopique des colonies isolées**

Critère souches	Diamètre mm	Chromogénèse	Forme	Elévation	Contour	Opacité	Surface	Consistance
2	3mm	Beige	Ronde	Convexe	Régulière	Translucide	Lisse	crémeuse
3	4mm	Blanchâtre	Ronde	Convexe	Régulière	Translucide	Lisse	crémeuse
4	2mm	Jaune	Ronde	Convexe	Régulière	Translucide	Lisse	visqueuse
A	4mm	Blanchâtre	Ronde	Convexe	Régulière	Translucide	Lisse	crémeuse
B	2mm	Beige	Ronde	Convexe	Régulière	Translucide	Lisse	crémeuse
C	1mm	Beige	Ronde	Convexe	Régulière	Translucide	Lisse	crémeuse

(2,3,4) : Isolats à partir du premier échantillon ; (A,B,C) : Isolats à partir du deuxième échantillon

### 2 L'étude microscopique

L'observation microscopique a été réalisée suivant deux étapes : après une observation à l'état frais et après une coloration de Gram. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3

**Tableau 03 : Aspects microscopiques des souches isolées.**

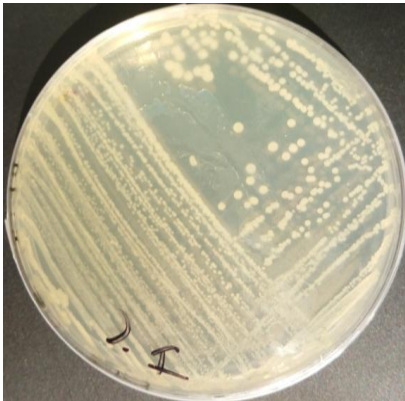
Critère Souche	Etat frais	Gram	Forme des cellules	Arrangement	Présence des spores
	mobilité				
2	+	+	Gros bacille	En chaînette	+
3	+	+	Gros bacille	En chaînette	+
4	+	-	Bacille	En chaînette	-
A	+	+	Gros bacille	En chaînette	+
B	+	+	Gros bacille	En chaînette	+
C	+	+	Gros bacille	En chaînette	+



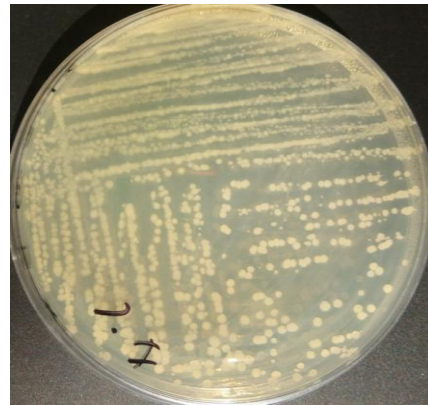
4



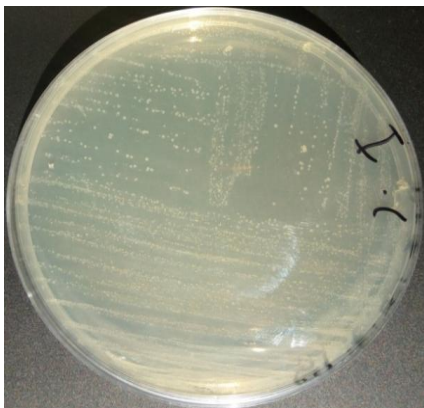
B



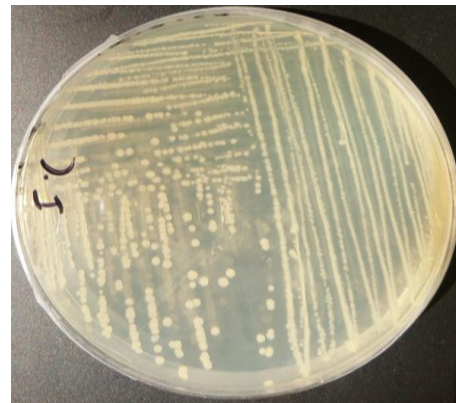
B



A



C

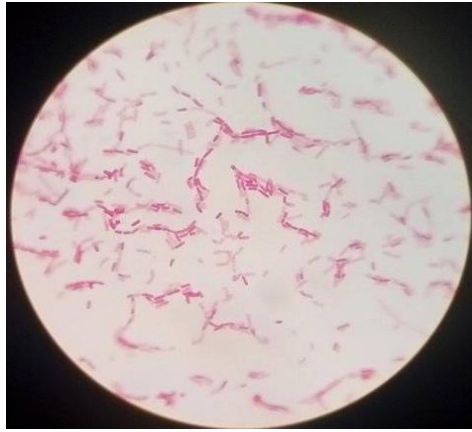


3

**Planche 1** : l'aspect colonial des isolats



A



4



B



2



C



3

## Planche 02 : L'aspect microscopique des isolats

### 3 Test physiologique

#### 3.1 Température de croissance

Les souches présentent une croissance optimale dans l'intervalle de 20°C à 37°C.

Aucune croissance observé pour les souches (B, C, 2, 4, 24, 25) à 45°C et même pour les souches (C, 2, 3 4, 24, 25) à 4°C (Tableau4).

**Tableau 4** : Températures de croissance testées

	A	B	C	2	3	4	24	25
4°C	+(9jrs)	+(9jrs)	-	-	-	-	+(9jrs)	+
20°C	+	+	+	+	+	+	-	+
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+
45°C	+(24h)	+	-	-	+(24h)	-	-	+(6jrs)

(+) : présence de croissance, (-) : absence de croissance

24 : (*Bacillus*) et 25 :(*Rhizobium*) considérer comme souches de référence

#### 3.2 Effet du pH :

Pour la grande valeur de pH (10) on observe une pousse optimale pour les isolats (A, 4) ; une croissance moyenne pour (B, 2 ,25 ,24) ; faible pour (C, 3) alors qu'on constate après 48h d'incubation une augmentation de tolérance pour tous les isolats sauf la souche C.

-pH (9) la majorité des isolats présentent une croissance optimale a 24 et à 48h et l'exception des de la souche C

-pH (8) absence de croissance de la souche 4 après 24h et 48h avec une croissance optimale pour tous les isolats

-pH (6) croissance optimale presque pour toute les souches sauf la souche C et la souche 3

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 5.

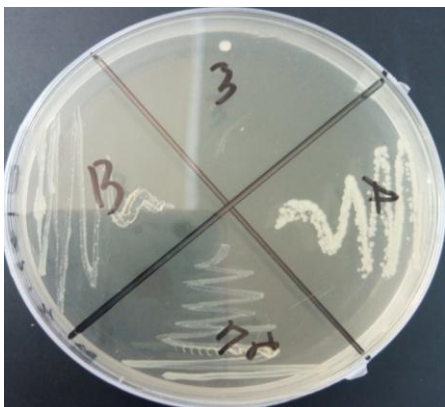
**Tableau 5** : tolérance de pH après 48h

souche pH	A	B	C	2	3	4	24	25
<b>pH=10</b>	+++	++	+	++	+	+++	+++	+++
<b>pH=9</b>	+++	+++	+	+++	++	+++	+++	++
<b>pH=8</b>	+++	+++	+	+++	++	-	+++	+++
<b>pH=6</b>	+++	++	+	+++	+	++	+++	++

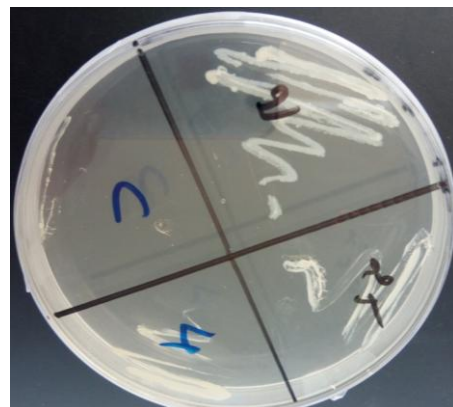
(+++): une bonne croissance (++) : croissance moyenne (+) : croissance faible (-) : absence de croissance



A- Croissance des différents isolats a 20C après 48h



B-croissance des différents isolats a pH 10



C-croissance des différentes souches à pH 06

**Planche 3** : croissance des souches à 20°C, pH 10 et 06

### **3.2 Tolérance au NaCl**

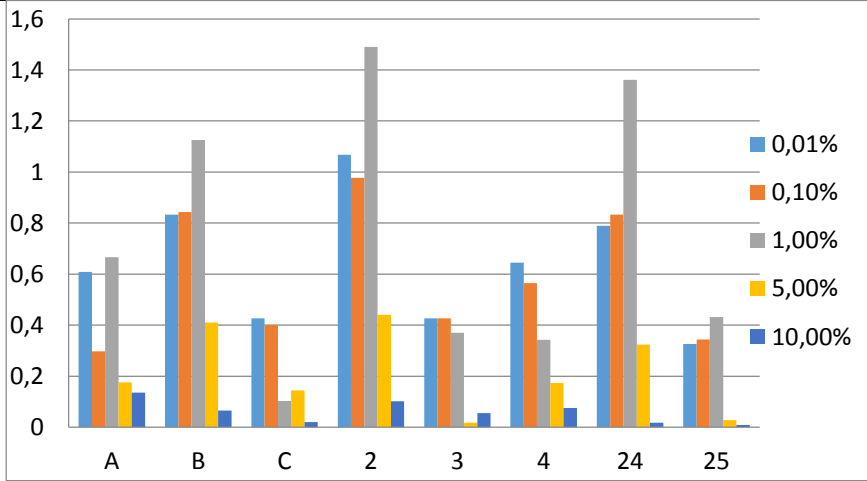
La croissance des souches de toute les souches en présence de NaCl varie après l'incubation de 24h à 72h d'incubation on observe une croissance optimale a une concentration d 1% de NaCl pour toute les souches sauf la souche 3 à 0.1 %.

A partir de la concentration 5% de NaCl la croissance s'est révélée variable à l'exception de la souche C, et la souche 2 qui montre une sensibilité a cette concentration

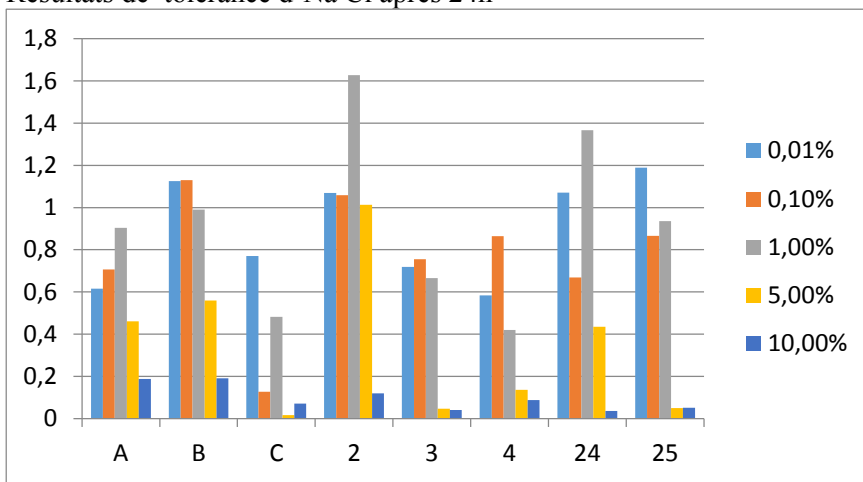
A une concentration de 10% de NaCl aucune croissance n'est observée pour la majorité des souches.

Et observe que l'isolat B est plus halotolérants que les souches de référence (24et 25).

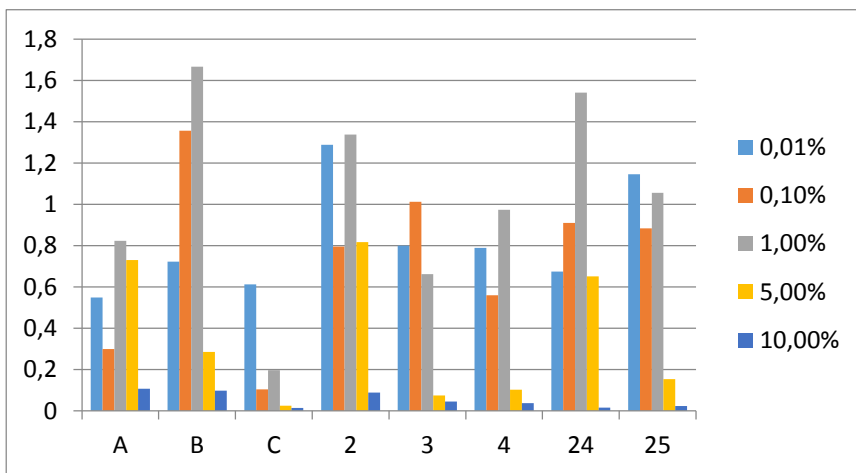




Résultats de tolérance d'Na Cl après 24h



Résultats de tolérance d'Na Cl après 48h



Résultats de tolérance de Na Cl après 72h

**Planche4 : Résultats de tolérance de NaCl après 24h ,72h, 48h**

## 4.2 Test nutritionnel

### 4.1 Source d'azote

On observe que tous les isolats sauf la souche C sont capables de pousser en présence de la majorité des acides aminés à l'exception du tryptophane et la Glycine, et croissance unique pour la souche 2 en présence de la méthionine.

**Tableau 6** : croissance des isolats en présence des différents acides aminés

	A	B	C	2	3	4	24	25
Leucine	+	++	-	++	+++	+	+++	-
tryptophane	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine	+	++	-	+++	+++	+++	+++	+++
Asparagine	+	+++	-	++	+++	+++	+++	+++
Acide glutamique	-	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++
Histidine	-	++	-	+++	+++	+++	+++	+++
Méthionine	-	-	-	+	-	-	-	-
Glycine	-	-	-	-	-	-	-	-
Proline	-	++	-	+++	+++	+++	+++	+++
Cystéine	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Isoleucine	-	+	-	+	++	-	-	+
Thréonine	-	++	-	+	++	-	+++	+++
Phénylalanine	-	-	-	-	+	-	-	-

(+) : Une bonne croissance.

(++) : Croissance moyenne.

(+) : Croissance.

Faible.

(-) : Absence de croissance

## 5 résultats des tests biochimiques

### 5.1 résultat pour l'isolat a coloration de Gram négatif

Tableau7 : Résultats des tests biochimiques pour la souche 4.

Test	4
Type respiratoire	AAF
Oxydase	-
Nitrate réductase	-
ONPG	+
ADH	-
LDC	-
ODC	-
Citrate	-
H <sub>2</sub> S	-
URE	-
TDA	+
Indol	-
VP	+
Gelatinase	+
GLU	+
Mannitol	-
INO	-
Sorbitol	-
RHA	-
SAC	-
MEL	+
Amylase	-
Arabinose	-
Mobilité	+

AAF : aérobies anaérobies facultatives, (+) : résultat positif , (-) : résultat négatif.



**Figure 07 :** Résultat des tests biochimique sur la galerie api 20E pour la souche 4 après incubation.

## 5.2 Résultats pour les souches à coloration de Gram positif

**Tableau :** Résultats du type respiratoire et la catalase.

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Le type respiratoire</b>	AAF	AAF	AAF	AAF	AAF
<b>Catalase</b>	+	+	+	+	+

AAF : aérobies –anaérobies facultatives ; (+) : résultat positif.

## 6 Identification des isolats selon leur caractère phénotypique

Les nombreux caractères réunis sur l'isolat en question nous permettent de l'identifier en faisant appel à la dichotomie en se basant sur les informations que donne la 9<sup>ème</sup> édition «bergey's manual of determinative bacteriology» 1994, sur les caractères phénotypiques des groupes bactérien l'identification reste cependant, présomptif et non confirmative.

La caractérisation macroscopique, microscopique et biochimique des différents isolats permet de les placer dans le domaine *Bacteria* en se basant sur le métabolisme cellulaire, les conditions de croissance qui ne sont pas extrême la forme des cellules leur organisation structurale leur taille ainsi leur réponse à la coloration de Gram qui renseigne sur la structure pariétale bactérienne nettement différente de celle des *Archaea* et des *Eucarya*.

La coloration de Gram nous a permis de différencier un seul groupe appartenant aux Gram positif pour le deuxième échantillon les isolats ayant la forme bacille (A, B, C), pour le premier échantillon deux isolats Gram positif (2,3) et une souche Gram négatif(4) ayant tous la forme bacillaire.

Les bacilles Gram positif sont tous des aérobie anaérobie facultatives, capable de produire des endospores leurs permet de résister aux conditions environnementales défavorables, nous

permettant de suggérer les classer dans le genre *Bacillus*, (LEYRAL et JOSEF, 1998) ;(Davet, P .1996) résultats confronté par (Boudjera N., Dernoune N., 2013).

Pour l'isolat Gram négatif est un bacille aérobie anaérobie facultatif mobile oxydase positif Galactose positif avec dégradation du citrate comme seule source de carbone donc on peut dire quelle appartient au genre *Escherichia*, (Leyrale et Josef ,1998) résultats confronté par (Allagi, Abbabsi, 2012).

Cette diversité bactérienne retrouvé dans le sol laisse supposer que les bactéries se comportent en fonction des conditions intrinsèque de leurs microenvironnements respectifs et en fonction des périodes d'isolement, certains auteurs ont exprimé eux aussi des résultats tout à fait différents d'un environnement à un autre et d'une saison à une autre, Lavelle et Spain (2001).

Ces résultats ne reflètent pas complètement la forte diversité bactérienne tellurique des deux régions mais indiquent une richesse microbiologique car la nature et les méthodes des isolements vont dicter la qualité des résultats bactériologiques estompés Guezlane (2010), Eahlers (2008).

## V. Conclusion

Ce travail est axé principalement sur l'isolement et la caractérisation des bactéries qui se développent dans un écosystème contaminé par l'antimoine et un écosystème normalement non contaminé dans l'objectif d'évaluer la biodiversité dans ce type d'environnement.

Six bactéries sont isolées, trois dans le premier échantillon qui est contaminé et trois souches dans le deuxième échantillon.

Le pré-identification a pu être réalisé à l'échelle du genre ou de la famille. En effet, selon la clé de BERGEY'S, parmi les 06 bactéries isolées, nous avons pu affilier les souches appartenant aux genres *Bacillus* et *Escherichia*. L'identification reste cependant, présomptive est non confirmative.

Notre démarche est assez limitée, puisqu' 'il s'agit d'une approche phénotypique classique, basée sur l'isolement des bactéries sur milieux non spécifiques qui ne donnent que moins de 5 % des espèces bactériennes.

Cette étude constitue une première approche qui laisse le champ libre à d'autres investigations beaucoup plus poussées ainsi il serait intéressant d'élargir l'étude d'une part à l'impact d'autres métaux lourds.

De plus il serait souhaitable de connaître, à partir des souches résistantes isolées, le pourcentage de métal résiduel dans le milieu de culture afin de déterminer les souches résistantes ayant une aptitude certaine les sols pollués ainsi les utiliser pour la bioremédiation.

## Référence bibliographique

**Adriano, D.C. (1986).** Trace éléments in territorial environment. New York : Springer science and Business Media. 550p.

**AFNOR .**Qualité des sols .Receuil de Normes Française, (1994) [en ligne].

«<https://www.boutique.afnor.org/norme/nf-iso-10390/qualite-du-sol-determination-du-ph/article/702762/fa117123>»

**Alloway, B.J. (1995).** Heavy Metals in Soils. London : Springer Science & Business Media. 390p

**Alloway, B.J. (2013).** Heavy metals in soils : source of heavy metals and metaloids in soils. University of Roding, Whiteknights : Springer netherlands. 11-50 p.

**Artiola-Fortuny J. & Fuller W.H., (1982).** Adsorption of some mono-hydroxybenzene derivatives by soils: *Soil Science*, 133: 218-227.

Askbrant, S., Melin, J., Sandalls, S., Rauret, G., Vallejo, R., Hinton, T., Cremers, A., Vandecastelle, C., Lewyckyj, N., Ivanov, YA., Firsakova, SK., Arkhipov, NP., et Alexakhin, RM. (1996). Mobility of Radionuclides in Undisturbed and Cultivated Soils in Ukraine, Belarus and Russia Six Years After the Chernobyl Fallout. *Journal of Environmental Radioactivity (United Kingdom)*, 31, (3) : 287-312.

**ATSDR (Agency for Toxic substances and Disease Registry), (1992).** Toxicological Prrofile for Antimony and Compounds [en ligne]. (Page consulté le 05.06.2017).

« <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp23.pdf> »

**Audion, A.S. (2012).** Panorama mondiale 2011 du marché de l'antimoine. Rapport public BRGM/RP-61342-FR, 82p.

**Baiz, D. (1997).** Teneurs totale en éléments traces métalliques dans les sols. Paris, INRA, 408p.

**Baize D .,Jabiol B.(1998).**Guide pour la description des sols.Doin.France.373p.ISBN 2-7380-0532-2.

**Beauglelin-Seiller, K., Granier- Laplas, J. (2002).** Antimoine 125 et environnement. Fiche radionucléide [en ligne]. (Page consulté le 08.06.2017)

biological relevance. Wiley-VCH, Weinheim (Allemagne).

**Bisson, M., Bonnomet, V., Migne-Fouillen, V., Jolibois, V., Gay, G., Lefèvre., J.P., Tack, K. (2007).** Antimoine et ses dérivés. INERIS, 54p.

**Boucheseiche, C., Cremille, E., Pelte, T., Pojer, K. (2002).** Pollution toxique et écotoxicologique : notion de base guide technique n°7. Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse. Montpellier (France).

**BOUDJERA .N., DERNOUNE .N. (2013).** Caractérisation phénotypique des bactéries poussant dans une zone contaminée par l'Antimoine. Mémoire Master Recherche : Ecologie Microbienne. Constantine : université Constantine .1

**Bousboua, H. (2005).** Eléments de microbiologie : Programme de graduation : biologie, médecine, pharmacie, chirurgie dentaire, sciences vétérinaires, sciences alimentaires, agronomie. Constantine (Algérie) : Campus-club. 304p.

**Brieger, H., Semisch, C.W., Stasney, J. et Piatnek, D.A. (1954).** Industrial antimony poisoning. *Industrial Medicine and Surgery*, **23**, 512-523. Citer par **Mosbah, A.** Eude écologique de la végétation des bordures d'un oued en région semi-aride : cas de l'oued Dahimine (Wilaya de Oum EL Bouaghi). Thèse de doctorat : Pollution et Ecotoxicologir : université constantine, 116p.

Britain. 362 p.

**Broulier, P.H., Berthelin, J. (1998).** Contamination des sols par les éléments en trace : les risques et leurs gestions. Rapport n°42 a l'académie des sciences. Paris, France 440p. Citer par Qassim, B.H., (1998). Détermination spéciation et biodisponibilité des éléments traces métalliques dans les sols contaminées et technosols. Thèse de doctorat : Chimie analytique. Institut des sciences de la terre d'orléans : université d'orléans, 253p.

**Calvet, R. (2000).**le sol propriétés et fonction, constitution et structure, phénomènes aux interfaces. Paris (France) : France Agricole.83-90.

**Chassin, P., Baize, D., Cambier, Ph., et Sherckemn, T. (1996).** Les éléments traces métalliques et laqualité des sols : impact à moyen et à long terme. Forum « le sol un patrimoine menacé ?». Paris (France), 297-303.

**Chen, J-H., Lion, L.W., Shuler, W.C. (1995).** Mobilization of adsorbed cadmium and lead in aquifer material by bacterial extracellular polymers. *Water Research*, 29(2), 421-430.

**Crosinier J. (1999).** Devenir de la pollution métallique drainée par les eaux pluviales, influence du compartiment microbien et des alternances de dessiccation/réhumectation sur le transfert du zinc dans la zone non saturée du sol. Thèse de Doctorat. Université de Claude Bernard – Lyon I (France).

**Davet P. (1996).**Vie microbienne du sol et production végétale.INRA .France .384p.ISBN 98782738006486.



- Doelsch, E. (2004).** Elements Traces Metalliques-Inventaire pour 'ile de la Reunion (sols, Dechets et Vegetaux). CIRAD-Chambre d'Agriculture. 125p
- Dommergues., Mangenot. (1993).** Les grands groupes de microorganismes du sol et leur rôle. Université de provence Aix-Marseille. France. P : 23-24. Citer par **Allag, I., Abbassi, Z. (2012).** Etude de la fiversité bactérienne de deux sols forestiers par une approche phénétique : cas de Chelia (Khanchela) et de sidi r'ghiss (Oum el Bouaghi).Mémoire Master recherche : Ecologie Microbienne. Université constantine 1, 23 p.
- Dong, J., Wu, F.B., Zhang, G.P. (2005).**Effect of cadmium on growth and photosynthesis of tomato seedlings. Journals of Zhejiang University. Science.B, 6.(10), 974-980.
- Ehlers K., Bunemann E .K.,Oberson A .,Fssard E . (2008).**Extraction of soil bacteria from a ferasol.Soil biology and biochemistry .40.p :1940-1960.
- Eshighi Malayri B., (1995).** Décontamination des sols contenant des métaux lourds à l'aide de **Faugier,A. (2010).** Diversité bactérienne des sols : accès aux populations à effectifs moniritaires " the rare biosphere". Thèse de doctorat : science du vivant [q-bio]. Ecole centrale de Lyon, 157p.
- Feilella, M., Belzile, N., Chen, Y.W. (2002).** Antimony in the environment : a review focused on natural waters I. Occurrence. Earth-Science Reviews, 57(2002) 125-176 p.
- Gadd, G.M. (1992).** Metals and microorganisms : A problem of definition. FEMS Microbiology letters, 100 (), 197-204.
- Guezlane N.,Khahlouche B .,Athmani –Guemouri S. (2010).** Microbiologie Travaux pratique. 3 eme éd : Office des Publications Universitaires. 139p.ISBN :978-99610-01181-2.
- Guiné, V. (2006).** Approche expérimentale et théorique de la colloides bactériens en milieu poreux : impacte sur le transfert accéléré de métaux lourds et intérêt pour la biodépollution des sols. Thèse doctorat : Océan, Atmosphère, Hydrologie. Dans le cadre de l'Ecole Doctorale « terre, univers, environnement ».Institut National Pollythechnique de GRENOBLE. 231p
- Hamel, W., Debus, R., Steubing, L. (2000).** Mobility of antimony in soil and its availability to plants. Chemosphere, 41(11), 1791-1798.
- Hart B.A.,and B.D.Scaife. (1977).Toxcity and Bioccumulationof Cadmium in *Chorella pyrenoidosa*.Environ .Res.14 :401-413.
- Jeannot, R., Lemièrre B., Chiron S. Augustin F. & Darmendrail D. (2000).** Guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués. Rap.BRGM R 50128, 110p, 44 fig, 30ann
- Joffin J, N., Leryal G. (2006).** Microbiologie tecgnique .4 éme éd.Bordeaux : CRDP d4aquitaine.368p.

**Just, C. (1988).** Appréciation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments en trace du sol. *Science du sol*, 26(2), 103-102.

Kabata-Pendias, A., Pendias, H., (2001). *Trace elements in soils and plants*. CRC Press [en ligne]. (Page consulté le 09.06.2017).

**Lavelle P ., Spain A. V. (2001).**Soil ecology.Kluwer Academic Publishers.Springer. 688p.ISBN 1402004907.

**Lemière, B., Seguin, J.J., Le Guern, C., Guyonnet, D., Baranger, Ph., Darmendrail, D et Conil, P. (2001).**Guide sur le comportement des polluants dans les sols et les nappes. Application des un contexte d'Evaluation Détaillée des Risques pour les ressources en eau. BRGMP/RP-50662-FR, 103p. 20fig. 9 tab., 5 ann.

**Lenntech.** Propriété chimique. Effet du cadmium sur la santé- effet du cadmium sur l'environnement [en ligne]. (Page consulté le 09.06.2017).

«<http://www.lenntech.fr/data-perio/cd.htm> »

**Levy, L. (2015).** Intoxication aux métaux lourds : une pollution invisible [en ligne]. (Page consulté le 09.06.2017).

«<https://www.topsante.com/medecine/environnement-et-sante/pollution/metaux-lourds-607390>»

**Li, X.D., Thornton, I. (1993).** Arsenic, antimony and bismuth in soil and pasture herbage in some old metalliferous mining areas in England. *Environmental Geochemistry and Health* [en ligne]. (Page consulté le 01.05.2017).

« <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB19960103726> »

**Marschner A. (2008).** Mineral nutrition of higher plants. 2ème Edition. Ed Academic press,

**Martin, S., Griswold, W. (2009).** Human health. Effect of heavy métaux. *Environmental science and technology briefs for citizens*, 6 (1) 1-6.

**Mérian E. (1991).** Metals and their compounds in the environment: occurrence, analysis and

**Michael, M et John, M. (2007).** Brock, *Biologie des micro-organismes*. Paris : Pearson éducation France. 1047p.

**Mosbah, A.** Eude écologique de la végétation des bordures d'un oued en région semi-aride : cas de l'oued Dahimine (Wilaya de Oum EL Bouaghi). Thèse de doctorat : Pollution et Ecotoxicologir : université constantine, 116p.

**Newman, M.C., & Jagoe, C.H., (1994).** Ligands and the bioavailability of metals in aquatic environments. *Bioavailability: physical, chemical and biological interactions*. J. M. Heamelink, P. F. Landrum, H. L. Bergman and W. H. Benson. Boca Raton, USA, Lewis Publishers. Citer

dans : **Qassim, B.H. (1998)**. Détermination spéciation et biodisponibilité des éléments traces métalliques dans les sols contaminées et technosols. Thèse de doctorat : Chimie analytique. Institut des sciences de la terre d'orléans : université d'orléans, 253p.

**Paul, E. et Clark, E.E. (1996)**. Soil microbiology and biochemistry. San Diego, Californie : Academic Press. 340p.

Plantes et de microorganismes. Thèse de Doctorat. Université de Nancy1 (France).

**Qassim, B.H. (1998)**. Détermination spéciation et biodisponibilité des éléments traces métalliques dans les sols contaminées et technosols. Thèse de doctorat : Chimie analytique. Institut des sciences de la terre d'orléans : université d'orléans, 253p.

**Quénéa K., (2004)**. Etude structurale et dynamique des fractions lipidiques et organiques réfractaires de sols d'une chronoséquence forêt/maïs (CESTAS, Sud-ouest de la France). Thèse de Doctorat : fonctionnement physique, chimique et biologique de la biosphère continentale : Université de Paris 6 (France). 202p.

**Quevauviller, P.H., Rauret, G., Lopez-Sanchez, J.F., Rubio, R., Ure, A., Muntau, H. (1997)** Certification of trace metal extractable contents in a sediment reference material (CRM 601) follow a three-step sequential extraction procedure, The Science of the Total Environment, 205, 223-234.

**Ramade R. (2000)**. Dictionnaire encyclopédique des pollutions. Ediscience international. Paris (France), 58-365.

**Rascio, N., Navari-izzo, F. (2011)**. Heavy métal hyper accumulating plants : how and why do they do it? and what makes them or interesting ? Plant science 180 : 169-181 citer par

**Reyes, L.E. (1953)**. Antimony poisoning in industry. A.M.A. archives of industrial hygiene and occupational medicine. 7 ( ) 99-108p.

«<http://base.dnsgb.com.ua/files/book/Agriculture/Soil/Trace-Elements-in-Soils-and-Plants.pdf>»

**Schneider, K. et Kalberlah, F. (2000)**. Antimon und Verbindungen. In : Gefährdungsabschätzung von Umweltschadstoffen (Eikmann et al., eds), 3.Erg-Lfg.11/00, Erich Schmidt Verlag, Berlin. Citer par **Mosbah, A.** Eude écologique de la végétation des bordures d'un oued en région semi-aride : cas de l'oued Dahimine (Wilaya de Oum EL Bouaghi). Thèse de doctorat : Pollution et Ecotoxicologie : université constantine, 116p.

**Sigee D.C. (2005)**. Freshwater Microbiology : Biodiversity and Dynamic Interactions of Microorganismes in the Aquatic Environment .John Wileys and Sons Ltd, England.

**Sousou, S. (2013)**. Adaptation de la symbiose fabacées-rhizobium aux sites miniers : Absorption du zinc par *Anthyllis vulneraria* et analyse de la diversité des bactéries symbiotique

hedysarum coronarium. Thèse de doctorat : microbiologie, parasitologie, Agriculture durable. Institut supérieur agronomique de Chott Merian : université de souss, 219p.

**Sousou, S. (2013).** Adaptation de la symbiose fabacées-rhizobium aux sites miniers : Absorption du zinc par Anthyllis vulneraria et analyse de la diversité des bactéries symbiotique hedysarum coronarium. Thèse de doctorat : microbiologie, parasitologie, Agriculture durable. Institut supérieur agronomique de Chott Merian : université de souss, 219p.

**Thron, H.L. (1991).** Vorkommen, Bedeutung und Nachweis von Antimoin In: Aurand et al.: Die Trinkwasserverordnung, Erich Schmidt, Velag, Berlin, pp :318-324. Citer dans **Mosbah, A.** Eude écologique de la végétation des bordures d'un oued en région semi-aride : cas de l'oued Dahimine (Wilaya de Oum EL Bouaghi). Thèse de doctorat : Pollution et Ecotoxicologir : université constantine, 116p.

### **Les figures :**

**Scaler, Michka, B.** Tableau périodique des éléments. (15-10-2010). [photo]. Wikipédia, (29-05-2010).

Wikipédia. Antimony. (26.01.2010) [photo] in : wikipédia-disponible sur :

« <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/5c/Antimony-4.jpg/220px-Antimony-4.jpg> » (page consulté le 11/05/2017).

# Annexes

## Annexe 1

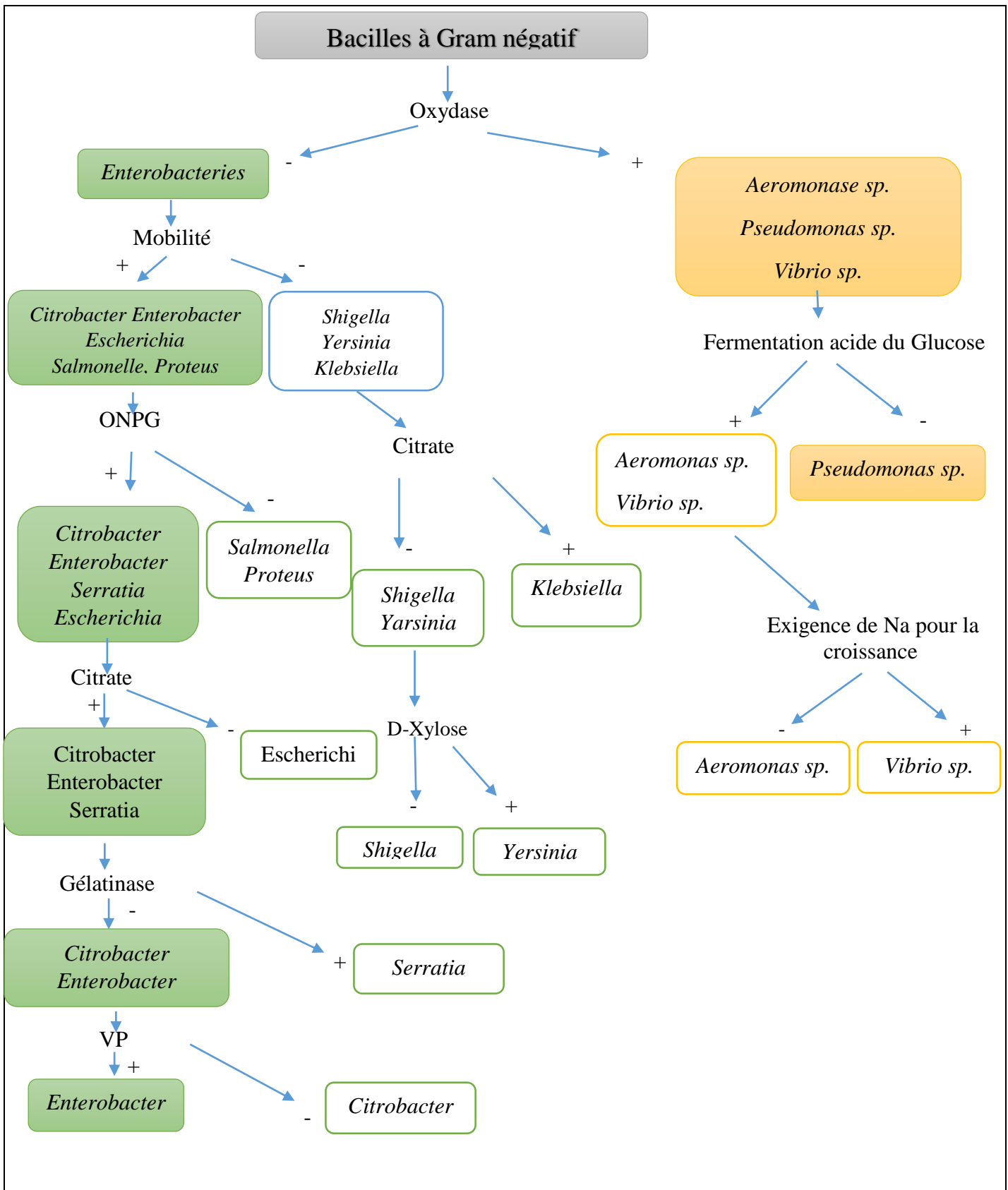


Planche 01 : Clés pour la différenciation des bacilles à Gram négatif.

Annexe 2

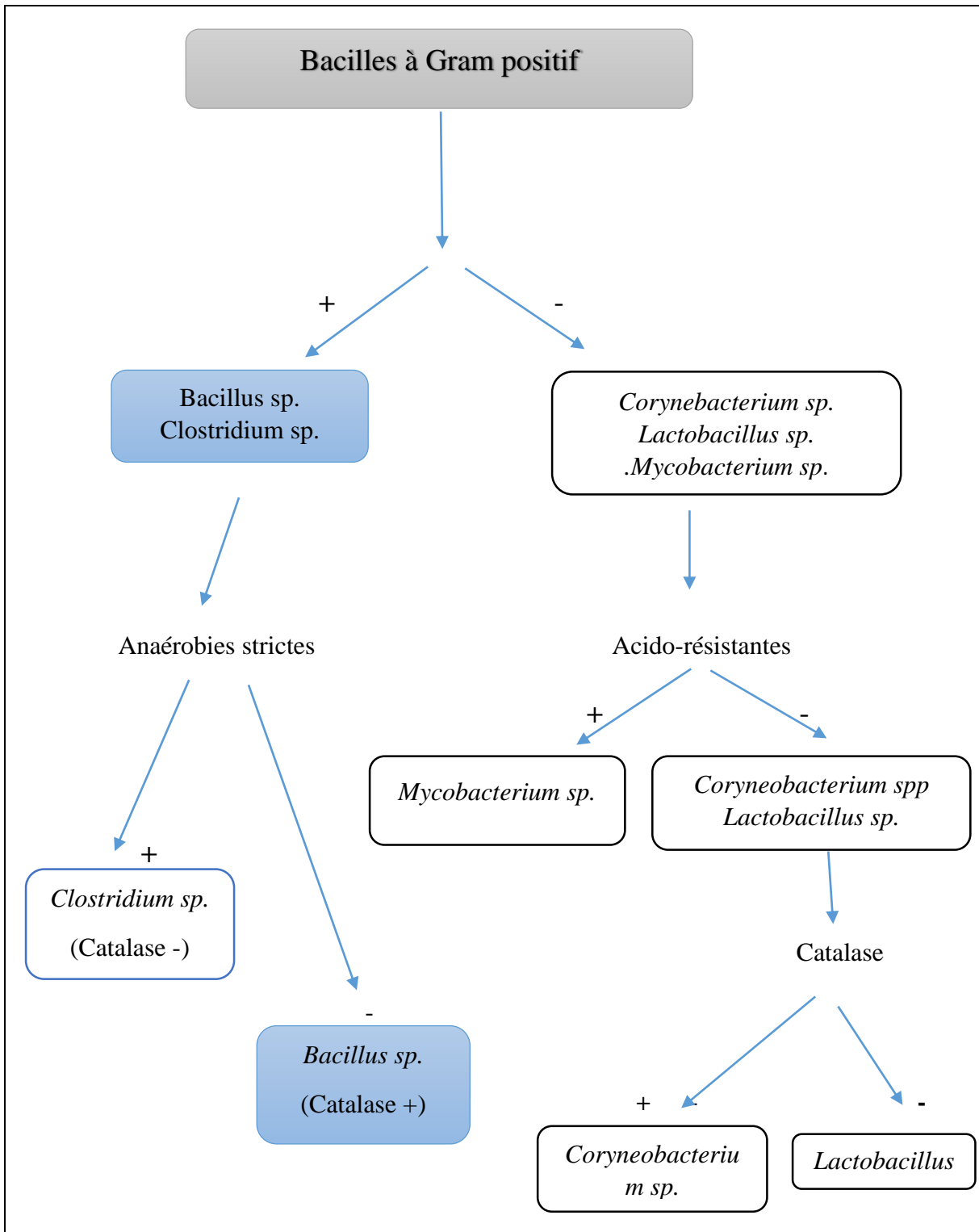


Planche 02 : Clés de différenciation des bacilles à Gram positif.

## ETUDE DE LA DIVERSITÉ BACTÉRIENNE ENTRE DEUX POINTS DE PRÉLÈVEMENT DANS UNE ZONE CONTAMINÉE PAR L'ANTIMOINE

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en  
Ecologie Microbienne

La pollution et la contamination de notre planète met en évidence l'intervention de l'écologie microbienne afin de contrôler l'impact de ce phénomène et les déséquilibres qu'il résulte.

Notre travail repose sur l'impact de l'antimoine sur la communauté bactérienne provenant du déblai de mine d'antimoine de la région d'Ain Babouche wilaya d'Oum El Bouaghi.

Les résultats obtenus ont montré que le premier échantillon est un sable grossier et le deuxième échantillon est une argile. Nos échantillons de sols étudiés sont aussi caractérisés par une humidité relative de 0.11% pour le premier échantillon et 0.18% pour le deuxième.

Les mesures de pH des deux sols montrent que le sol du premier échantillon est un sol neutre (pH=6,74) et le deuxième sol est un sol légèrement alcalin (pH=7,18).

Une stratégie d'isolement et d'identification a été mise en œuvre. Elle repose sur la caractérisation phénotypique des souches en utilisant un milieu de culture simple (GN), ce qui nous a permis d'isoler cinq souches ont une coloration Gram positif, et une souche à coloration Gram négatif.

Des tests de croissance à différentes températures sont réalisés afin d'optimiser la croissance des bactéries in vitro. Certaines bactéries à Gram négatif et à Gram positif se développent à différentes températures.

Des tests nutritionnelles et biochimiques sont réalisés afin d'obtenir une caractérisation phénotypique préliminaire des isolats.

Selon 9<sup>ème</sup> édition «Bergey's Of Determinative Bacteriology» et nos résultats, on a supposé que nos souches font partie aux genres *Bacillus* et *Escherichia*.

**Mots clés :** Identification, diversité, sol, contamination, métal lourd, Antimoine.

**Laboratoire de recherche :** Microbiologie

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** Riah. N (maitre de conférence -UFM Constantine),

**Rapporteur :** (Benhizia. Y (Professeur- UFM Constantine),

**Examineur :** Chabbi. R (maitre-assistant - UFM Constantine).

**Date de soutenance :** 20/06/2017