

Influence du cadmium et du cuivre sur la croissance de Bacillus licheniformis, la synthèse et l'activité de l' $\alpha$ -amylase dans un milieu synthétique liquide et dans un sol.

par  
Ariane Rudaz  
licenciée ès sciences

Thèse

présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel  
pour obtenir le grade de docteur ès sciences.

FAC, Liebefeld-Berne  
avril 1988

## TABLE DES MATIERES

## RESUME

1.	Problématique	1
2.	Buts du travail	4
3.	Matériel et méthodes	5
3. 1.	Isolément des souches	5
3. 1. 1.	Milieux utilisés	5
3. 1. 2.	Réactifs	6
3. 1. 3.	Pasteurisation du sol	6
3. 1. 4.	Enrichissement des bactéries	7
3. 1. 5.	Conservation des souches	8
3. 2.	Méthodes de détermination des souches isolées	9
3. 2. 1.	Les caractères morphologiques, cytologiques et cytochimiques	9
3. 2. 2.	Les caractères nutritionnels	9
3. 2. 2. 1.	Utilisation du glucose ou du mannitol	9
3. 2. 2. 2.	Hydrolyse des polymères	10
3. 2. 3.	Les caractères physiologiques	10
3. 3.	Milieu de culture pour les bactéries	12
3. 4.	Conditions de croissance en milieu synthé- tique liquide	13
3. 5.	Prise et traitement des échantillons dans le milieu de culture	13
3. 5. 1.	Mesure de la densité optique	13
3. 5. 2.	Détermination du poids sec	14
3. 5. 3.	Détermination de la teneur en protéines	14
3. 5. 4.	Détermination de l'activité $\alpha$ -amylasique	14
3. 5. 5.	Analyse des acides aminés	15
3. 6.	Propriétés du sol	16
3. 6. 1.	Provenance	16
3. 6. 2.	Propriétés physico-chimiques	16
3. 6. 3.	Teneur en métaux lourds	16
3. 7.	Prélèvement et préparation des échantillons	17

## II

3. 7. 1.	Détermination du poids sec	17
3. 7. 2.	Détermination de la capacité maximale en eau	17
3. 8.	Méthodes de stérilisation du sol	17
3. 8. 1.	Autoclavage	18
3. 8. 2.	Tyndallisation	18
3. 8. 3.	Rayonnement gamma	18
3. 9.	Détermination de la population bactérienne dans le sol	18
3. 9. 1.	Méthode sur boîte de Pétri selon Koch	19
3. 9. 2.	Méthode du nombre de germes le plus probable selon McCrady	19
3. 9. 2. 1.	Détermination du nombre total de germes	19
3. 9. 2. 2.	Détermination du nombre total de germes amylolytiques	19
3. 10.	Détermination de l'activité amyliase du sol	20
3. 11.	Analyses du cadmium et du cuivre	20
3. 11. 1.	Teneur totale	20
3. 11. 2.	Teneur soluble	20
4.	<b>Enrichissement, isolement et détermination des souches et choix de la bactérie à étudier</b>	<b>21</b>
4. 1.	Résultats	21
4. 2.	Choix de la bactérie à étudier	32
5.	<b>Etude en milieu synthétique liquide</b>	<b>35</b>
5. 1.	Croissance bactérienne	35
5. 1. 1.	Etude des paramètres de croissance	35
5. 1. 1. 1.	Influence de la température	38
5. 1. 1. 2.	Influence de la source de carbone sur les paramètres de croissance	40
5. 2.	Influence du cadmium sur la croissance	41
5. 2. 1.	Influence du cadmium sur les paramètres de croissance	43
5. 2. 1. 1.	Détermination de CLT, IC <sub>20</sub> et IC <sub>50</sub>	48
5. 2. 2.	Influence de la croissance de <u>8.lichenifor-mis s<sub>4</sub></u> sur la teneur du milieu en cadmium soluble	52
5. 2. 3.	Isolément des souches résistantes au cadmium	56
5. 2. 3. 1.	Mise en évidence des souches résistantes au cadmium	58

### III

5. 2. 3. 2.	Propriétés des souches mutantes au cadmium	60
5. 3.	Influence du cuivre sur la croissance	67
5. 3. 1.	Influence du cuivre sur les paramètres de croissance	69
5. 3. 1. 1.	Détermination de CLT, IC <sub>20</sub> et IC <sub>50</sub>	73
5. 3. 2.	Influence de la croissance de <u>B.licheniformis</u> s <sub>4</sub> sur la solubilité du cuivre	76
5. 4.	Etude de l'activité $\alpha$ -amylasique de <u>B.licheniformis</u> s <sub>4</sub>	79
5. 4. 1.	Etude de l'activité $\alpha$ -amylasique	80
5. 4. 2.	Influence du cadmium sur l'activité $\alpha$ -amylasique	82
5. 4. 3.	Influence du cuivre sur l'activité $\alpha$ -amylasique	82
6.	<b>Etude dans le sol</b>	<b>85</b>
6. 1.	Mise au point d'une nouvelle méthode pour la détermination de l'activité amylasique des sols	85
6. 1. 1.	Choix d'un tampon	87
6. 1. 2.	Recherche du K <sub>m</sub> apparent de l'amylase	89
6. 1. 2. 1.	Mode opératoire	89
6. 1. 2. 2.	Courbe standard	90
6. 1. 2. 3.	Calcul pour déterminer l'activité amylasique	90
6. 1. 2. 4.	Résultats	91
6. 1. 3.	Détermination de l'activité amylasique pour six sols de propriétés physico-chimiques différentes	92
6. 1. 3. 1.	Influence de la concentration de substrat	92
6. 1. 3. 2.	Influence du temps d'incubation	93
6. 2.	Influence du cadmium et du cuivre sur la microflore naturelle et sur l'activité amylasique du sol Steinhof	94
6. 2. 1.	Influence du cadmium	95
6. 2. 1. 1.	Effet sur la microflore des saprophytes aérobies	96
6. 2. 1. 2.	Effet sur l'activité enzymatique	96
6. 2. 2.	Influence du cuivre	99
6. 2. 2. 1.	Effet sur la microflore des saprophytes aérobies	101
6. 2. 2. 2.	Effet sur l'activité amylasique	101
6. 3.	Stérilisation du sol	103

#### IV

6. 3. 1.	Effet sur la microflore des saprophytes aérobies	103
6. 3. 2.	Effet sur l'activité amylasique	104
6. 4.	Recolonisation du sol irradié par <u>B.licheniformis</u> $s_4$	105
6. 4. 1.	Effet sur la population bactérienne et sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase	107
6. 4. 2.	Influence de la L-alanine sur la recolonisation du sol irradié avec 3 Mrad par <u>B.licheniformis</u> $s_4$	110
6. 4. 3.	Influence de la teneur en amidon sur la recolonisation du sol irradié avec 3 Mrad par <u>B.licheniformis</u> $s_4$ et sur l'activité amylasique	113
6. 5.	Influence de l'inoculation par <u>B.licheniformis</u> $s_4$ du sol Steinhof naturel après adjonction d'amidon sur la population bactérienne	115
6. 5. 1.	Influence sur la microflore bactérienne	116
6. 5. 2.	Influence sur l'activité amylasique	117
6. 6.	Influence du cadmium sur la synthèse de l'amylase, la microflore totale et amylolytique du sol Steinhof	119
6. 6. 1.	Effet sur la microflore totale et amylolytique	121
6. 6. 2.	Effet sur la synthèse amylasique	124
6. 7.	Influence du cuivre sur la synthèse de l'amylase, la microflore totale et amylolytique	126
6. 7. 1.	Effet sur la microflore totale et amylolytique	129
6. 7. 2.	Effet sur la synthèse amylasique	129
7.	<b>Discussion</b>	132
7. 1.	Valeurs pour le cadmium et pour le cuivre de CLT; IC <sub>20</sub> et IC <sub>50</sub>	132
7. 2.	Toxicité du cadmium et du cuivre envers la croissance de <u>B.licheniformis</u> , la synthèse et l'activité de son $\alpha$ -amylase	134
7. 3.	Réponse dans un sol au cadmium et au cuivre de la croissance de <u>B.licheniformis</u> , la synthèse et l'activité de l' $\alpha$ -amylase	136
7. 4.	Influence du cadmium et du cuivre sur la croissance des germes saprophytes, des germes amylolytiques, sur la synthèse et l'activité amylasique dans un sol naturel	136

7. 4. 1.	Effet du cadmium et du cuivre sur la population, la croissance des germes saprophytes aérobies et sur la croissance des germes amylolytiques	138
7. 4. 2.	Influence du cadmium et du cuivre sur l'activité amylasique d'un sol	140
7. 4. 3.	Influence du cadmium et du cuivre sur la synthèse amylasique d'un sol	140
7. 5.	Contribution de notre étude à l'élaboration de l'Ordonnance sur les polluants du sol	142
8.	<b>Conclusions</b>	145
<b>REMERCIEMENTS</b>		
9.	<b>Bibliographie</b>	149

## 1. PROBLEMATIQUE

La pollution de la biosphère par les métaux lourds est devenue un problème critique et urgent à résoudre.

Leur présence croissante dans l'environnement provient surtout de l'activité humaine (PAGE et al., 1979, FURRER et al., 1980). Les principales sources anthropogènes d'immission des métaux lourds sont l'industrie (PAGE et al., 1979, SCHACNTSCHABEL et al., 1982, FANAKI, 1985), les stations d'incinération d'ordures ménagères (BIEDERMANN et al. 1984), les décharges et l'agriculture par l'utilisation d'engrais minéraux, d'engrais organiques tels les composts de gadoues, les boues d'épuration, les lièges de porcs et par l'emploi de pesticides (STICHER, 1980, FURRER et al., 1983, NFP-22, 1984).

Les métaux lourds sont des substances nocives très dangereuses car elles ne sont pas biodégradables. Leur accumulation présente surtout un danger pour les sols.

Les métaux lourds parviennent dans les sols soit par voie directe, adjonction de substances contaminées par ces éléments, soit par voie indirecte via l'atmosphère (BRUNNER et al., 1981).

Les sources de la pollution de l'air par les métaux lourds proviennent principalement du brûlage des combustibles fossiles, de l'incinération d'ordures ménagères, des procédés de combustion à haute température de matériaux industriels contenant des métaux lourds (PAGE et al., 1979, NORDGREN et al., 1983, FANAKI, 1985) et des véhicules à moteurs (STOFEN, 1975). Après avoir été relâchés dans l'air, les métaux lourds dit atmosphériques ou leur oxyde sont transportés et diffusés selon le mouvement de l'atmosphère et des conditions météorologiques. Les métaux lourds sont ensuite redéposés contribuant ainsi au problème d'accumulation dans les sols, les végétaux et les eaux.

La toxicité des métaux lourds ne menace pas seulement l'homme, les animaux et les plantes (BREMNER, 1974, UEHLEKE, 1984) mais aussi les microorganismes (CAVALLI, 1946, SINGLETON et al., 1977, GADD et al., 1978, BABICH et al., 1978, DOELMAN et al., 1979, NUGENT et al., 1979, BECK, 1981, BISCHOFF, 1982, KUSTER, 1983, BROOKES et al., 1984, STADELMANN et al., 1984). Ils agissent sélectivement sur les germes microbiens entraînant ainsi une diminution de leur spectre (JORDAN et al. 1975, BABICH et al. 1977, OUXBURY, 1985).

De plus les métaux lourds inhibent l'activité de nombreuses enzymes du sol. SCHINNER et al. (1980) notent une diminution de l'activité de la déshydrogénase, de l'uréase, de la xylanase et de la cellulase pour des sols traités avec du cuivre. TYLER et al. (1974, 1975) observent une inhibition de l'activité de la phosphatase acide, de l'uréase, de l'amylase et de la cellulase dans des sols riches en Cu, Zn, Cd et Ni. BECK (1981) remarque une inhibition des protéases et de la déshydrogénase dans des sols contaminés par du Cd, du Cr et du Zn. La réduction de la diversité des germes microbiens de même que l'inhibition de leurs activités biochimiques peuvent avoir de graves conséquences sur la fertilité des sols. Certains auteurs (TYLER, 1973, JORDAN et al., 1975, COUGHTREY et al., 1979) observent une accumulation de la litière dans des régions polluées par les métaux lourds (Zn, Cu, Ni, Cd, Pb....).

Les microorganismes peuvent à un certain degré modifier les formes des métaux lourds auxquelles ils sont exposés. Ceci peut se passer par transformation en des formes moins toxiques, immobilisation par absorption (FRIEDMANN et al., 1968, DUGAN et al., 1972, NORRIS et al., 1979, KUREK et al., 1982, MACASKIE et al., 1985) et mobilisation à partir de solutions (COLE, 1979, MCKNIGHT et al., 1979, STERRITT et al. 1980).

Les microorganismes développent de nombreux mécanismes vis à vis d'une accumulation ou d'une présence normale de métal lourd. Ils peuvent modifier leur perméabilité cellulaire réduisant ainsi le passage des métaux lourds dans la cellule (KORKEALA, 1979, GADD et al., 1984). Ils peuvent synthétiser des protéines liant les métaux lourds (HORITSU et al., 1980, JOHN et al., 1985) ou des substances organiques telles l'acide citrique, l'acide oxalique, qui les chélatent (VACZI et al., 1980). A la surface des cellules, certains microorganismes peuvent précipiter les métaux lourds (DOYLE et al., 1980, BEVERIDGE et al., 1976, 1981, AIKING et al., 1982, 1985) ou les adsorber dans une matrice gélatineuse à polysaccharides (GRIFFITHS et al., 1975, MURRAY et al., 1975).

Ces mécanismes d'adaptation sont souvent liés à une transformation génétique. Beaucoup de plasmides dans des bactéries soit Gram- soit Gram+ possèdent des gènes qui déterminent la résistance à certains métaux lourds (STERRITT, et al., 1980, SILVER, 1981, TREVORS et al., 1985).

Parmi les recherches réalisées sur les métaux lourds les auteurs travaillent surtout avec des sols naturellement contaminés. Les aspects critiques de ces études sont que les sols utilisés contiennent en général un mélange de métaux lourds et que les concentrations de ces éléments sont souvent très élevées (JORDAN et al., 1975, BALICKA et al., 1977, BISESSAR, 1982, OLSON et al., 1982). De plus, il est pratiquement impossible de comparer ces résultats entre eux car les auteurs considèrent la concentration totale et non la concentration soluble. La concentration totale d'un métal lourd correspond à la quantité liée plus ou moins fortement aux particules minérales et organiques du sol et à la quantité en solution (GUPTA et al., 1980). La toxicité des métaux lourds à l'égard des organismes ne doit pas s'exprimer en fonction de la concentration totale mais en fonction de la concentration disponible. Cette quantité correspond à la teneur en métaux lourds qui se trouve sous forme de ions ou de complexes solubles. La concentration de métal lourd en solution peut être estimée en utilisant dans le sol un extractant qui est une solution saline neutre telle  $\text{NaNO}_3$  (GUPTA et al., 1983). Pour une concentration totale donnée, la concentration disponible d'un métal lourd dépend des propriétés des sols (pH, CEC : capacité d'échange cationique). Du moment qu'un sol est contaminé par un élément la concentration disponible définie de ce métal lourd devrait entraîner toujours le même effet quantitatif relatif soit positif, soit négatif sur un paramètre biologique.

Dans le but de sauvegarder à long terme la fertilité des sols la Confédération a préparé un projet d'Ordonnance sur les polluants du sol (Osol) qui sera mis en vigueur dès le premier septembre 1986. Cette Ordonnance a pour but d'établir pour les sols des normes d'immission maximales admissibles. Ces valeurs doivent être inférieures à celles causant un début d'inhibition des processus biologiques intervenant dans les cycles biogéochimiques qui se déroulent dans les sols.

## 2. BUTS DU TRAVAIL

Les buts de notre étude sont :

- d'établir dans un milieu liquide synthétique les concentrations soit de Cd, soit de Cu pour lesquelles le taux de croissance d'une bactérie du genre Bacillus, la synthèse et l'activité de son  $\alpha$ -amylase présentent un début (CLT), 20 (IC<sub>20</sub>) et 50% d'inhibition (IC<sub>50</sub>). Les concentrations de métaux lourds seront exprimées soit en teneur totale soit en teneur soluble (extraction avec NaNO<sub>3</sub> 0.1 M),

Le cuivre et le cadmium sont retenus pour cette étude car le premier est un élément essentiel à la vie alors que le second ne l'est pas. Il est donc intéressant de comparer leur action sur les paramètres biologiques cités plus haut.

La bactérie choisie appartient au genre Bacillus car ce genre, vu les caractéristiques des espèces, est très répandu dans les sols et peut coloniser des habitats très différents. On préfère l'étude de l' $\alpha$ -amylase à d'autres exoenzymes d'importance écologique plus grande car la structure, le mode d'action de l' $\alpha$ -amylase sont bien connus et son analyse est relativement simple à effectuer. On opte pour l'étude de l' $\alpha$ -amylase car cette dernière est surtout synthétisée par les microorganismes.

- de trouver lequel de ces paramètres est le plus sensible, soit au Cd, soit au Cu.
- de déterminer lequel des deux métaux lourds présente la plus grande toxicité à l'égard des paramètres biologiques cités plus haut.
- de voir dans un sol - second milieu expérimental - comment ces paramètres biologiques réagissent soit au Cd, soit au Cu. Pour le second milieu expérimental on utilise le sol Steinhof dont les propriétés physico-chimiques (CEC, pH) favorisent une bonne mobilité des métaux lourds.
- de contribuer pour le Cd et pour le Cu à l'élaboration de normes d'admission maximales pour le projet d'Ordonnance sur les polluants du sol (Osol).

### 3. MATERIEL ET METHODES

#### 3. 1. Façonnement des souches

##### 3. 1. 1. Milieux utilisés

###### - Gélose nitrate-glucose :

$K_2HPO_4$	0.8 g
$KH_2PO_4$	0.2 g
$CaSO_4 \cdot 2 H_2O$	0.05 g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.5 g
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.01 g
$KNO_3$	1 g
Glucose	10 g
Agar	15 g
Eau dist.	1000 ml

###### - Bouillon selon Difco :

Adjonctions possiblea :	Agar	15 g
	Extrait de terre	10 ml
	$KNO_3$ 1% ou 8%	

###### - Gélose glucose + $(NH_4)_2SO_4$ :

comme gélose nitrate-glucose, mais 1 g  $(NH_4)_2SO_4$  au lieu de  $KNO_3$

###### - Bouillon glucose-extrait de levure :

Extrait de levure	5 g
Glucose	10 g
Eau dist.	1000 ml
Acide lactique ad pH 5.5	

- Milieu peptone-lactose :

Peptone	10 g
Lactose	10 g
Eau dist.	1000 ml

- Agar peptone-amidon + rouge neutre :

Peptone	10 g
Amidon	20 g
Eau dist.	1000 ml
Extrait de levure	5 g
Rouge neutre	50 g
Agar	15 g

3. 1. 2. Réactifs

- solution violet de cristal
- solution au Lugol
- safranine
- noir de Soudan
- réactif d'Ehrlich
- réactif de Griess I
- réactif de Griess II

Ces réactifs ont été préparés selon la description faite par OREWS, (1976).

3. 1. 3. Pasteurisation du sol .

Dans un erlenmeyer de 100 ml stérile, on mélange 4 g de sol, tamisé à 2 mm et séché à l'air, avec 20 ml d'eau distillée stérile. Cette suspension de sol est pasteurisée à 80 °C pendant 5 minutes dans un bain-marie. Ce traitement décrit par CLAUS (1963) permet de sélectionner des bactéries sporulantes à cause de la thermorésistance des spores.

### 3. 1. 4. Enrichissement des bactéries.

La solution pasteurisée sert d'inoculum pour les différents milieux d'enrichissement. La composition de ces milieux est choisie en fonction des particularités des différentes espèces de Bacillus à rechercher. Les particularités permettant l'isolement de 6 espèces sont décrites dans le Bergey's Manual (1971).

Les méthodes d'enrichissement décrites par CLAUS (1963) sont réalisées comme suit :

- B. megaterium est prototrophe et pousse sur nitrate et glucose comme seule source d'azote et de carbone. Son isolement se poursuit comme suit: à l'aide d'une baguette coudée on étale sur une gélose de nitrate-glucose, 1 ml de suspension de sol pasteurisée. Après une période d'incubation de 48 heures à 30°C, B. megaterium forme sur l'agar des colonies blanches, rondes et brillantes.
- B. cereus est anaérobie facultatif. On l'isole comme suit: dans un flacon rodé, on introduit 2 ml de solution de sol pasteurisé auquel on ajoute du bouillon contenant du KNO<sub>3</sub> à 1% jusqu'à ce que le flacon soit rempli complètement. On referme ce dernier sans y laisser de bulles d'air à l'intérieur. On repique une quantité de culture d'enrichissement sur du bouillon gélosé. Après incubation de 24 heures à 37°C B. cereus forme sur l'agar des colonies blanchâtres de forme irrégulière.
- B. licheniformis est une espèce dénitrifiante. Pour obtenir une culture enrichie de cette espèce on procède de la même manière que pour B. cereus en utilisant un bouillon contenant du KNO<sub>3</sub> à 8% et une température d'incubation de 45°C. Après croissance on étale sur une gélose glucosée contenant du sulfate d'ammonium quelques gouttes de cette culture dans laquelle s'est formé du gaz (N<sub>2</sub> et N<sub>2</sub>O). Après une incubation de 48 heures à 37°C B. licheniformis forme sur la gélose des colonies mates, blanches dont le pourtour est lobé avec des excroissances lichéniformes.
- B. circulans est une espèce dont la différentiation d'avec les autres espèces de Bacillus n'est pas satisfaisante. La procédure d'isolement utilisée est identique à celle utilisée pour B. cereus à deux exceptions près : la température d'incubation est de 45°C et le pH de la gélose contenant l'extrait de terre à 1% est ajusté à 6. B. circulans forme sur la gélose des colonies blanches et mates avec un contour présentant des lobes échancrés.

- B. coagulans est une espèce thermophile capable de pousser sur des milieux acides. Son isolement se fait comme suit : dans un erlenmeyer de 100 ml contenant 20 ml de bouillon glucosé et de l'extrait de levure de pH 5.5 on ajoute 1 ml de suspension de terre pasteurisée. Le bouillon se trouble après une incubation de 24 heures à 50<sup>0</sup>C. On prélève 1 ml de ce liquide que l'on transfère dans le même milieu en observant les mêmes conditions d'incubation que précédemment. On étale quelques gouttes de cette culture sur un bouillon gélosé comprenant de l'extrait de terre à 1%. Après incubation de 24 heures à 45<sup>0</sup>C B. coagulans forme sur la gélose des colonies blanches, plates et ridées de forme irrégulière.
- B. polymyxa est anaérobie facultatif produisant par fermentation d'hydrates de carbone du CO<sub>2</sub> et des composés acides. Dans des tubes à essai contenant 10 ml de milieu de peptone-lactose et une cloche de Durham on ajoute 1 ml de suspension de terre pasteurisée. Après incubation de 48 heures à 30<sup>0</sup>C on remarque la formation de gaz dans la cloche de Durham de certaines éprouvettes. On choisit un tube présentant un fort dégagement gazeux, duquel on prélève quelques gouttes de culture que l'on étale sur de l'agar peptone-amidon-rouge neutre. Après incubation de 48 heures à 30<sup>0</sup>C B. polymyxa forme des colonies blanches sur l'agar.

### 3. 1. 5. Conservation des souches.

Après enrichissement, on effectue pour chaque souche 2 à 3 étalements polygonaux successifs sur bouillon gélosé contenant de l'extrait de terre à 1% pour s'assurer de leur pureté. Chacune des souches est ensuite transférée dans des éprouvettes contenant de l'agar incliné additionné d'extrait de terre à 1%. Ces souches sont conservées selon plusieurs manières:

- lyophilisation (NAVEKE et al., 1979)
- conservation à -20<sup>0</sup>C dans de la glycérine (50%) selon la méthode décrite par NAVEKE et al. (1979)
- conservation des souches à 4<sup>0</sup>C sur du nutriment agar incliné contenant de l'extrait de terre à 1%.

### 3. 2. Méthodes de détermination des souches isolées.

On base l'étude taxonomique des bactéries appartenant au genre Bacillus sur l'analyse de trois grands types de caractères :

#### 3. 2. 1. Les caractères morphologiques, cytologiques et cytochimiques.

L'examen de ces caractères implique l'emploi de bactéries à l'état frais (culture de 24 heures) et se pratique à l'aide d'un microscope photonique. Ces observations sont fondées sur les critères suivants :

- la forme et les dimensions des cellules
- la motilité des cellules
- la présence de spores, leur forme et leur position dans le sporange et leur aptitude à déformer celui-ci
- la structure des parois cellulaires est révélée par la coloration de Gram selon la procédure décrite par DREWS (1979)
- la présence d'inclusions de poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, globules cytoplasmiques à caractère lipophile, est mise en évidence par des colorants liposolubles. Nous avons employé la méthode au noir de Soudan (DREWS, 1979).

#### 3. 2. 2. Les caractères nutritionnels

##### 3. 2. 2. 1. Utilisation du glucose ou du mannitol

L'aptitude ou non à fermenter les sucres est un caractère important pour la détermination des bactéries. L'utilisation du glucose et l'utilisation du mannitol sont testées. Dans des tubes à essai munis d'une cloche de Durham, nous répartissons 8 ml d'un bouillon contenant du bleu de bromothymol (indicateur de pH) avec soit du glucose à 0.5% soit du mannitol à 0.5%. Les milieux sont inoculés avec chacune des souches à tester. Après incubation de 7 jours à température ambiante, on observe les produits formés. La présence d'acides organiques est mise en évidence à l'aide de

l'indicateur de pH alors que la formation de gaz est détectée avec la cloche placée dans l'éprouvette. L'acétoïne, produit neutre, formé durant la fermentation 2-3 butane-diol est analysée selon le test de Voges-Proskauer (DREWS, 1979).

### 3. 2. 2. 2. Hydrolyse de polymères

- caséine : avec une anse de platine on inocule, en faisant un trait diamétral, une gélose au lait avec chacune des souches à tester. Après incubation de 7 jours à 30°C l'hydrolyse de la caséine se traduit par un éclaircissement de l'émulsion au voisinage de la zone d'inoculation le long du trait diamétral.
- amidon : on inocule, de la même manière que pour le test à la caséine, une gélose à l'amidon. Après incubation de 7 jours à 30°C on recouvre la surface de l'agar par une solution au Lugol. L'hydrolyse de l'amidon au voisinage de la zone de croissance se traduit par la non formation du complexe bleu que ce polymère forme avec l'iode.

### 3. 2. 3. Les caractères physiologiques

- tolérance des bactéries, à l'azide de sodium (0.002%), au lysozyme (0.001%), au NaCl (5 à 7%) : on ensemence, avec chacune des souches, un tube de bouillon nutritif (Difco) contenant l'une ou l'autre des substances citées ci-dessus. Après incubation de 7 jours à 30°C la croissance est attestée par un trouble dans le milieu. Pour le témoin on effectue un test de croissance sur le même milieu nutritif sans substance inhibitrice.
- croissance anaérobie : la souche à tester est inoculée sur une gélose standard 1 (Merck). Les boîtes de Pétri sont mises à incuber dans une enceinte dépourvue d'oxygène (procédé Brewer, Gaspak BBL) pendant 7 jours à 30°C.
- production d'indole à partir du tryptophane : on inocule un bouillon tryptoné avec chacune des souches à tester. Après incubation de 7 jours à 37°C on ajoute aux cultures 20 gouttes de réactif d'Ehrlich. En présence d'indole le réactif vire au rouge cerise.

- utilisation du citrate de sodium : avec les souches à tester on inocule le milieu "Simmons citrate agar" (Oifco). Après une incubation de 7 jours à 30°C l'utilisation du citrate s'accompagne d'une alcalinisation du milieu (virage du vert au bleu de l'indicateur).
- croissance sur la gélose de Sabouraud au glucose (Merck). Les milieux ensemencés sont incubés pendant 7 jours à 30°C.
- désamination de la phénylalanine : on ensemence une gélose à la phénylalanine. Après incubation de 2 jours à 30°C on fait couler sur la surface de l'agar 4 gouttes de FeCl<sub>3</sub> à 10%. Une coloration verte indique la présence de l'acide phénylpyruvique.
- présence de la catalase : on ensemence de l'AC agar (Difco) incliné. Après incubation de 7 jours à 30°C on introduit dans chaque tube 1 à 2 ml de solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3%. Un dégagement gazeux indique la présence de catalase.
- respiration des nitrates et dénitrification : on ensemence un tube de culture contenant 6 ml de bouillon nitraté et une cloche de Durham avec chaque souche à étudier. Après incubation (7 jours à 30°C) on transfère dans une éprouvette 1 ml de culture auquel on ajoute 2 gouttes de réactif Griess I puis 2 gouttes de réactif Griess II. Une coloration rouge même fugace indique la présence de nitrites. La coloration rouge intervient lorsque la réaction de diazotation entre les nitrites et le réactif a pu avoir lieu. Si le test est négatif on ajoute au mélange précédent une pointe de spatule de zinc métallique. Le zinc réduit les nitrates en nitrites qui, en réagissant avec les réactifs Griess I et II, donnent une coloration rouge au mélange. Cette coloration indique que les nitrates n'ont pas été réduits. Si la réaction est négative et qu'on observe dans la cloche de Durham un dégagement gazeux (N<sub>2</sub>) on est en présence d'un phénomène de dénitrification. Si on ne remarque aucune formation de gaz dans la cloche on a alors une nitrammonification.

### 3. 3. Milieu de culture pour la bactérie.

Les souches de B.licheniformis et de B.megaterium sont cultivées sur le milieu selon White et Adolfi (WA) de composition suivante:

#### - Milieu de base (solution 1)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	5.51 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2.40 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 g
$\text{H}_2\text{O}$	1000 ml

#### - Solution d'éléments (solution 2)

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4 mg
$\text{FeSO}_4$	2.8 mg
$\text{H}_2\text{SO}_4$ 0.05N	60 ml

#### - Source de carbone (solution 3)

glucose à 2.5% ou amidon selon Zukolwsky à 5%

Les trois solutions sont stérilisées séparément pendant 20 minutes à  $120^\circ\text{C}$ . Après refroidissement, on mélange :

- 78% de solution 1
- 2% de solution 2
- 20% de solution 3

Le milieu de culture a un pH de 6.6. Les adjonctions possibles à ce milieu sont soit du cadmium, soit du cuivre sous forme de sels de chlorure. Les solutions de métaux lourds sont stérilisées par filtration (filtre, stérile Acrodial,  $0.2 \mu\text{m}$ , article no. 4192, Gelman).

Les conditions de culture sont les suivantes : l'inoculum est une préculture réalisée dans un erlenmeyer de 500 ml avec chicanes contenant 100 ml de milieu WA. Les cultures sont préparées dans les mêmes conditions que les précultures avec la même source de carbone.

### 3. 4. Conditions de croissance en milieu synthétique liquide.

L'étude sur la croissance est effectuée soit en éprouvettes (5 ml de milieu WA) soit en erlenmeyers de 500 ml (100 ml de milieu WA) sur un agitateur (Lab Shaker de type LSR) à 37°C et avec 300 RPM. On utilise aussi un fermenteur (MBR de type Mini Bioreactor) de volume de travail 1.8 l. On le remplit avec 1.6 l de milieu WA. L'agitation est de 1070 RPM. Avec une pompe à aquarium le milieu de culture est aéré avec un débit d'air de 75 l/h. La température du milieu est maintenue constante grâce à un système de refroidissement comprenant un doigt réfrigérant dans lequel circule l'eau du robinet. A l'aide d'un système de régulation automatique actionnant soit la pompe à NaOH 1N, soit celle à HCl 1N, le pH du milieu est maintenu stable.

### 3. 5. Prise et traitement des échantillons dans le milieu de culture :

Après ensemencement de la culture on prélève, chaque 2 heures, un échantillon servant aux analyses suivantes :

#### 3. 5. 1. Mesure de la densité optique :

On étudie la croissance en suivant le développement de la turbidité de la culture bactérienne en cours d'incubation. On mesure, à 436 nm, la densité optique de la culture en choisissant l'eau comme référence. La relation entre l'extinction à 436 nm et la densité de population des cellules est linéaire jusqu'à 0.3. Dépassé ce seuil on dilue la culture avec de l'eau distillée 2, 10 et 50 fois selon le degré de la croissance.

### 3. 5. 2. Détermination du poids sec :

Sur un filtre METRICEL TM DM-450 (grosseur des pores 0.45  $\mu$ m, diamètre du filtre 47 mm) préalablement rincé avec de l'eau distillée puis aëché, on fait passer 20 ml de culture. On transfère ensuite le filtre dans un flacon pèse-filtre que l'on place dans une étuve à 70<sup>0</sup>C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Après refroidissement dans un dessiccateur on détermine en g/l le poids sec de la culture.

### 3. 5. 3. Détermination de la teneur en protéines :

Pour cette analyse on centrifuge, avec une centrifugeuse de table (MSE Chilspin), 10 ml de culture à 4<sup>0</sup>C et à 4500 g pendant 30 minutes. On conserve le culot bactérien qu'on lave 2 fois avec un tampon phosphate 50 mM, pH 7. Le culot resuspendu dans 10 ml de tampon est conservé à -20<sup>0</sup>C. La teneur en protéines est déterminée selon LOWRY et al. (1951). La BSA (Merck) est choisie comme protéine standard.

### 3. 5. 4. Détermination de l'activité $\alpha$ -amylasique :

Après centrifugation d'un échantillon (cf. 3. 5. 3) on transvase le surnageant de la culture dans une bouteille en plastique de 50 ml que l'on conserve à -20<sup>0</sup>C pour l'analyse enzymatique.

L'activité de l'  $\alpha$ -amylase est mesurée selon la méthode de FUWA (1954) avec quelques légères modifications. Dans un petit tube en plastique on pipette:

- 0.3 ml de tampon acétate 50 mM de pH 6
- 0.5 ml d'amylose (2 mg de substrat / ml de volume réactionnel)
- 1.5 ml d'eau distillée

On laisse reposer pendant 10 minutes à 37<sup>0</sup>C.

- 0.1 ml de surnageant

On incube à 37<sup>0</sup>C pendant 30 minutes.

- 2 ml de CH<sub>3</sub>COOH 2.5 M (stoppe la réaction)

A l'aide d'un petit entonnoir on transvase ce mélange dans un ballon jaugé de 50 ml. On lui ajoute approximativement 10 ml d'eau distillée à 37<sup>0</sup>C et 1 ml de solution au Lugol (mélange de KI 2% et de I 0.2%). Le mélange est ajusté à 20 ml avec le l'eau à 37<sup>0</sup>C. Après agitation on mesure l'extinction de la solution à 700 nm contre de l'eau.

Pour la valeur témoin on procède de la même manière que ci-dessus, en utilisant 0.5 ml d'eau distillée à la place du substrat.

Pour la courbe standard on suit le même mode opératoire en choisissant des quantités d'amylose allant de 0.6 à 3 mg. On exprime l'activité de l' $\alpha$ -amylase en mg d'amylose disparu par ml d'échantillon et par heure.

### 3. 5. 5 Analyse des acides aminés :

Les échantillons sont préparés comme décrit sous 3. 5. 3.

Les acides aminés sont déterminés par chromatographie à phase ionique.

L'alanine et la glycine sont analysés selon la méthode décrite par SPACKMAN et al. (1958) alors que la cystéine, la cystine et la méthionine selon celle de MOORE (1963).

Avec cette méthode, on ne mesure pas directement la cystéine, la cystine et la méthionine mais leurs produits d'oxydation qui sont l'acide cystéique et la sulfone de méthionine.

**3. 6. Propriétés du sol :**

**3. 6. 1. Provenance :**

Steinhof (SO), de coordonnées 619.250/223.650

**3. 6. 2. Propriétés physico-chimiques :**

**Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques du sol Steinhof**

%	%	%	pH	CEC	P	K	%	%	C/N
argile	silt	sable		mM/z/ 100g	µg/g	µg/g	C	N	
17.6	37.2	45.1	5.6	10.77	0.53	4.9	0.72	0.13	5.5

P = teneur soluble en P

K = teneur soluble en K

z = valence de

La capacité au champ est de 41.3%.

**3. 6. 3. Teneur en métaux lourds :**

Les teneurs totales sont données en µg/g.m.s.

Cd : <0.5	Cr : 10
Zn : 41	Pb : 13
Cu : 8.5	Mn : 706
Ni : 14	Hg : 0.04

### 3. 7. Prélèvement et préparation des échantillons de sol :

A l'aide d'une pelle carrée on prélève à plusieurs endroits du terrain, du sol que l'on récolte dans des cageots en plastique. Au laboratoire on écarte, de la terre tamisée à 2 mm, les débris de végétaux qui s'y trouvent. On mélange bien la terre avant de la répartir dans des sacs en plastique que l'on dépose dans un réfrigérateur à 4<sup>0</sup>C.

#### 3. 7. 1. Détermination du poids sec :

Dans un plateau métallique préalablement taré on ajoute environ 100 g de sol frais que l'on met à sécher à 105<sup>0</sup>C jusqu'à poids constant (environ une nuit). Après une nouvelle pesée on détermine la teneur en eau du sol frais. Par cette analyse on fixe la quantité de sol frais à peser équivalente à 10 g de matière sèche (g.m.s.).

#### 3. 7. 2. Détermination de la capacité maximale en eau :

Dans un couvercle de boîte de Pétri on dépose un cylindre en plastique, perforé à la base, qui contient 10 g de terre séchée. Avec une pissette on remplit le couvercle avec de l'eau distillée. On laisse reposer ce système en y rajoutant de temps en temps de l'eau jusqu'à saturation du sol. Puis on détermine la capacité maximale en eau en unité de poids (JAEGGI, 1976).

### 3. 8. Méthode de stérilisation du sol :

Dans des bocaux en verre d'un litre on ajoute aux trois quarts de la terre fraîche. Après les avoir fermés avec un couvercle métallique on divise ces bocaux en trois lots pour les traitements suivants :

### 3. 8. 1. Autoclavage :

Le sol est stérilisé pendant 30 minutes à 120°C dans un autoclavage (FEDE-GARI, type FNR).

### 3. 8. 2. Tyndallisation :

Les échantillons de sol sont traités à 100°C pendant 30 minutes. On répète ce traitement trois fois à intervalle de 24 heures.

### 3. 8. 3. Rayonnement gamma :

Les échantillons de sol à irradier sont amenés avec un lift dans une enceinte GAMMAZELL-220 (Atomic Energy Canada) munie d'une source de Co<sup>60</sup>. Pour une intensité de 3 Mrad le sol est exposé pendant 7 heures aux rayons, pour 5 Mrad 10.9 heures, pour 8 Mrad 17.5 heures et pour 12 Mrad 26 heures.

## 3. 9. Détermination de la population bactérienne dans le sol :

Dans un erlenmeyer stérile de 500 ml avec chicane on pèse une quantité de sol frais correspondant à 10 g de matière sèche. On y ajoute une solution de dispersion stérile (1.8 g de pyrophosphate de sodium 10 fois hydraté) jusqu'à ce que l'on ait 100 g de mélange sol-liquide. Cette suspension-dilution à 10<sup>-1</sup>, est agitée pendant 30 minutes à 175 RPM. A partir de cette solution initiale on fait une série de dilutions allant de 10 en 10. On détermine le nombre de germes par gramme de matière sèche de sol selon les méthodes suivantes :

### 3. 9. 1. Méthode sur boîte de Pétri selon Koch :

De trois suspensions-dilutions choisies on pipette 0.5 ml que l'on étale , avec une baguette coudée, sur boîte de Pétri contenant du Nutrient Agar (Difco). Pour chaque dilution on a 4 répétitions. Après une incubation de 7 jours à 25<sup>0</sup>C on compte le nombre de colonies qui se sont développées sur l'agar. Les résultats sont donnés en nombre de bactéries par gramme de terre sèche. Les bactéries poussant sur ce milieu correspondent aux germes bactériens saprophytes aérobies.

### 3. 9. 2. Méthode du nombre de germes le plus probable selon Mc Crady

#### 3. 9. 2. 1. Détermination du nombre total de germes :

Dans des éprouvettes contenant 5 ml de milieu de culture WA contenant de l'amidon , on ajoute 1 ml des suspension-dilutions allant de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-10</sup>. On a 4 répétitions par suspension-dilution. Après une incubation de 7 jours à 25<sup>0</sup>C on compte, pour chaque suspension-dilution le nombre de répétitions présentant une turbidité du milieu de culture. La suspension-dilution la plus faible ayant les 4 répétitions positives donne le premier chiffre (4) d'un nombre caractéristique. Le nombre de répétitions positives des 2 suspension-dilutions suivantes donnent les 2 derniers chiffres de ce nombre. Avec une table statistique de Mc Crady (POCHON et TARDIEUX, 1962) on cherche pour 4 répétitions en fonction du nombre caractéristique obtenu, le nombre de germes le plus probable (MNP). Le produit de ce nombre par l'inverse de la plus faible dilution pour laquelle tous les tubes étaient positifs indique la quantité de germes par gramme de matière sèche de soi (NAVEKE et al.1979).

#### 3. 9. 2. 2. Détermination du nombre de germes amylolytiques :

Ce nombre est déterminé comme ci-dessus avec l'exception que l'on n'observe pas la turbidité de la culture mais la réaction colorée formée par le complexe amidon-Lugol (KI<sub>3</sub>). Une couleur bleue du milieu indique que le test est négatif alors que si elle est brune ou jaune le test est positif.

### 3. 10. Détermination de l'activité $\alpha$ -amylasique du sol :

Cette nouvelle méthode est développée dans le chapitre 7.

### 3. 11. Analyses du cadmium et du cuivre :

#### 3. 11. 1. Teneur totale dans un sol :

Pour la détermination de la teneur totale d'un métal lourd (ML) on fait une extraction de sol à chaud avec  $\text{HNO}_3$  2M pendant 2 heures selon la méthode d'ANDERSON (1975). Après filtration de cet extrait (filtre Schleicher & Schüll 602 1/2) on détermine la teneur en métaux lourds avec un spectrophotomètre d'absorption atomique (Perkin Elmer 420).

#### 3. 11. 2. Teneur soluble :

Pour déterminer la teneur soluble en métaux lourds, on utilise comme solvant du nitrate de sodium ( $\text{NaNO}_3$ ; 0.1 M). Le rapport de poids entre l'échantillon de terre et le solvant sera de 1:2.5.

Les concentrations en ions cuivre et cadmium sont analysées avec une électrode de référence  $\text{AgCl}$  et d'une électrode spécifique au cuivre ou au cadmium. Ces électrodes sont calibrées en présence de  $\text{NO}_3^-$  avec trois concentrations de métal (0.02, 0.2 et 2 M). On mesure le potentiel de chacune des cellules après addition de petites quantités des solutions soit standard avec  $\text{NO}_3^-$  soit de cuivre ou de cadmium. Cette méthode est décrite par MARINSKY et al. (1982). Pour de très faibles concentrations (quelques ppb) les métaux lourds sont analysés avec un polarographe (PAR Modell 384 Polarographic Analyser).

#### 4. ENRICHISSEMENT, ISOLEMENT ET DETERMINATION DES SOUCHES ET CHOIX DE LA BACTERIE A ETUDIER

Parmi les bactéries telluriques on a choisi d'étudier une bactérie appartenant au genre Bacillus qui soit amylolytique ( $\alpha$ -amylase), prototrophe et de croissance homogène.

Pour isoler les bactéries sporulantes du genre Bacillus on a tout d'abord effectué une pasteurisation. Ce procédé élimine toutes les cellules végétatives et permet aux spores, thermorésistantes, de survivre. La suspension de terre pasteurisée servira d'inoculum pour les différents milieux d'enrichissement.

Les procédures d'isolement ont été adaptées d'après CLAUS (1963). La composition des milieux d'enrichissement est choisie en fonction des propriétés biochimiques et physiologiques des souches à rechercher. L'isolement peut être soit direct sur boîte de Pétri (B.megaterium) soit indirect. Dans ce cas il est précédé d'un enrichissement caractéristique pour chaque espèce à rechercher (cf. Matériel et Méthodes).

##### 4. 1. Réaultata

Les souches obtenues selon ces procédures sont présentées au tableau suivant :

**Tableau 2** : Présentation des souches obtenues après avoir recherché différentes espèces de Bacillus selon les procédures d'isolement proposées par CLAUS (1963).

---

Espèce recherchée	Souches obtenues
<u>B.coagulans</u>	1 à 5
<u>B.megaterium</u>	6 à 10
<u>B.polymyxa</u>	11 à 15
<u>B.licheniformia</u>	16 à 21
<u>B. cereua</u>	22 à 26
<u>B.subtilis</u>	27 à 29

---

Ces 29 souches ont ensuite caractérisées (cf. tableau 3) à l'aide de tests cytologiques, biochimiques et physiologiques (cf. Matériel et Méthodes). On obtient ainsi une matrice des caractères phénotypiques.

Selon les procédés de la taxonomie numérique les souches isolées sont regroupées en fonction de leur ressemblance. Cette taxonomie est basée sur les principes d'Adanson (STANIER, DOUDOROFF, 1971). Parmi ces données, Adanson émet l'hypothèse que tous les caractères phénotypiques ont la même valeur taxonomique. Ce postulat permet d'exprimer numériquement les distances taxonomiques entre les organismes, en rapport au nombre des caractères différents relativement au nombre total des caractères examinés.

Le nombre des souches à étudier de même que le nombre des caractères discriminants rendent cette approche peu pratique sans l'utilisation d'un ordinateur.

Ce travail est réalisé comme suit :

Tableau 3 :

Caractères discriminants.

	Numérotation des bouches																											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	V	V	V	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Spores déformantes	f	f	f	f	f	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spores allongées	+C	+C	+C	+C	+C	+C	+C	+C	+C	+C	-	-	-	-	-	+T	+C	+C	+T	+C	+C	+C	+C	+C	+C	+C	+C	-
Spores spiriques	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+T	+T	+T	+T	+T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+8T
Globules cytoplasmaïques	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentation du glucose	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	A	A	A	A	A	A	A
Fermentation du mannitol	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Acétoïne	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	f	f	f	f	f	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
anaérobie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sabouraud-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
bouillon-azide	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
lysozyme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	-
7% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	+
5% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	+
production d'indole	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NO <sub>2</sub> - --> NO <sub>2</sub> -	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NO <sub>2</sub> - --> N <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hydrolyse de la caséine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hydrolyse de l'amidon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Désamination de la phénylalanine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	-
Utilisation du citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+: positif; -: négatif; v: variable; A: production d'acide et +; production de gaz; f: réaction faible; C: centrale; T: terminale; 8T: sub-terminale.

- on transcrit la matrice des données (cf. tableau 3) en une matrice binaire (cf. tableau 5). A chaque souche on attribue sa liste de caractères discriminants. En fonction des propriétés des souches on exprime ces caractères soit par la variable 0, soit par la variable 1 (tableau 4).

**Tableau 4** : Attribution de la variable soit 0 soit 1 au caractère discriminant.

Caractère discriminant	0	1
Gram	négatif	positif
Spore		
dimension	non déformante	déformante
forme	sphérique	allongée
position	terminale ou sub-terminale	centrale
Globules cytoplasmiques	absence	présence
Fermentation		
glucose	pas de production ni de gaz ni d'acide	production de gaz ou d'acide
Acétoïne	absence	présence
Croissance		
anaérobie	négative	faible ou positive
Sabouraud-glucose	négative	faible ou positive
bouillon plus azide	négative	faible ou positive
lyazyme	négative	faible ou positive
NaCl à 5 ou 7%	négative	faible ou positive
Production d'indole	absence	présence
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	positif	négatif
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> N <sub>2</sub>	positif	négatif
Hydrolyse de la caséine	positive	négative
Hydrolyse de l'amidon	positive	négative
Désamination de la phénylalanine	positive	négative
Utilisation du citrate	positive	négative
Catalase	positive	négative

Tableau 5: Matrice binaire.

Taxonomie Bacillus

29 22 1

gracsdelsallsceacygrfgiafglgfmoofæogvoprcransaginanzlysose17sel5ntricaseacidphed  
citrecta

(A4,1X,22F3.0)

- 1 1111110101111011111011
- 2 1111110101111011111011
- 3 1111110101111011111011
- 4 1111110101111011111011
- 5 1111110101111011111011
- 6 101111010001111011111
- 7 101111010001111011111
- 8 101111010001111011101
- 9 101111010001111011111
- 10 101111010001111011111
- 11 010000000101000000101
- 12 0100000000011000000101
- 13 010000000101000000101
- 14 010000000101000000101
- 15 010000000101000000101
- 16 101101111111011111011
- 17 101001111111011111011
- 18 101101111111011111011
- 19 101101111111011111011
- 20 101101111111011111011
- 21 101001111110011111011
- 22 101111000111011111001
- 23 101111000111111111001
- 24 101111000111011111001
- 25 101111000111011111001
- 26 101111000111011111001
- 27 1000000000010001000101
- 28 0111010001110111011001
- 29 101001010111011111011

- À l'aide de la matrice binaire ainsi obtenue (cf. tableau 5) l'ordinateur calcule la distance pour chaque paire de souches qu'il arrange en une matrice des distances. La distance utilisée choisie arbitrairement est celle de Soergel et correspond à l'équation suivante:

$$1 - \frac{a}{a + b + c} = d_a$$

- avec a = nombre de caractères positifs pour 2 souches considérées
- b = nombre de caractères positifs pour la souche x et négatifs pour la souche y
- c = nombre de caractères négatifs pour la souche x et positifs pour la souche y.

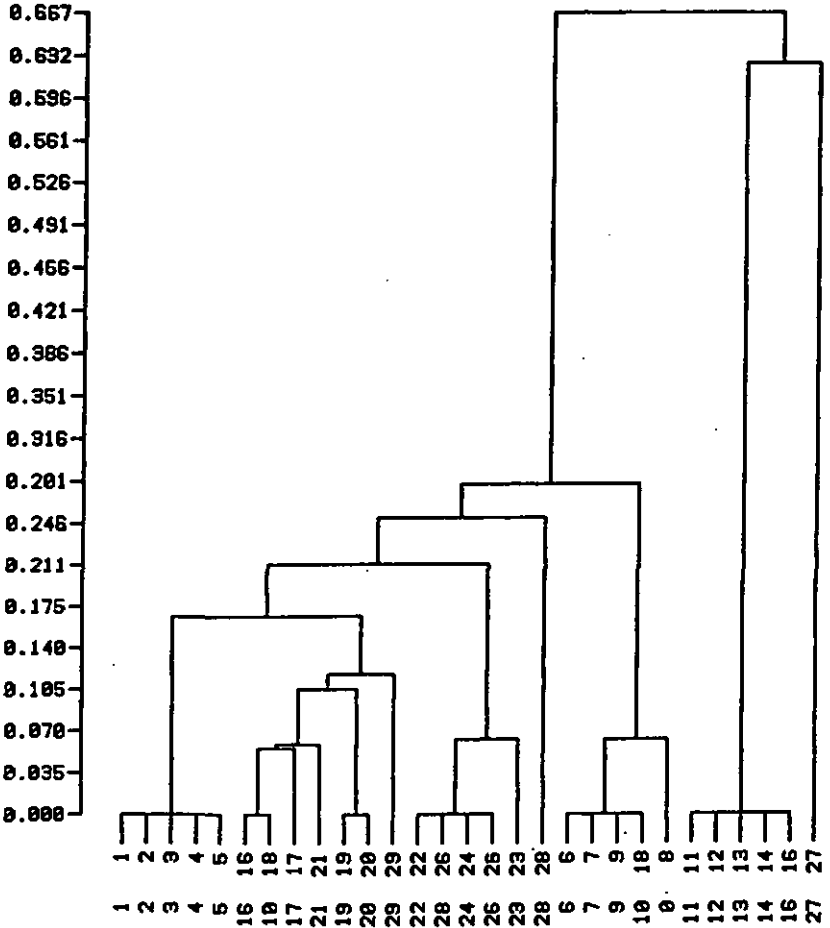
La matrice triangulaire des distances est donnée au tableau 6

- Le programme regroupe ensuite les distances calculées selon trois critères d'agrégation possibles : le chaînage simple, moyen ou complet. On choisit de regrouper les distances selon les 3 critères possibles. On obtient ainsi 3 arbres hiérarchiques ou dendogrammes (cf. figures 1, 2, 3) représentant les souches regroupées d'après leur degré de parenté. Parmi les 29 souches isolées on obtient 5 groupes de bactéries et 3 souches (27 à 29) isolées. Quelle que soit la stratégie d'agrégation utilisée on obtient qualitativement à peu près le même résultat. On remarque cependant que la souche 29 se rapproche de l'espèce B.licheniformis par le chaînage simple mais s'en éloigne par les autres chaînages.
- Pour identifier ces groupes de souches on considère leurs propriétés (cf. tableau 3) que l'on compare avec les groupes d'espèces définis sous la forme de tableaux synoptiques dans la 8ième édition du " Bergey's Manual ".

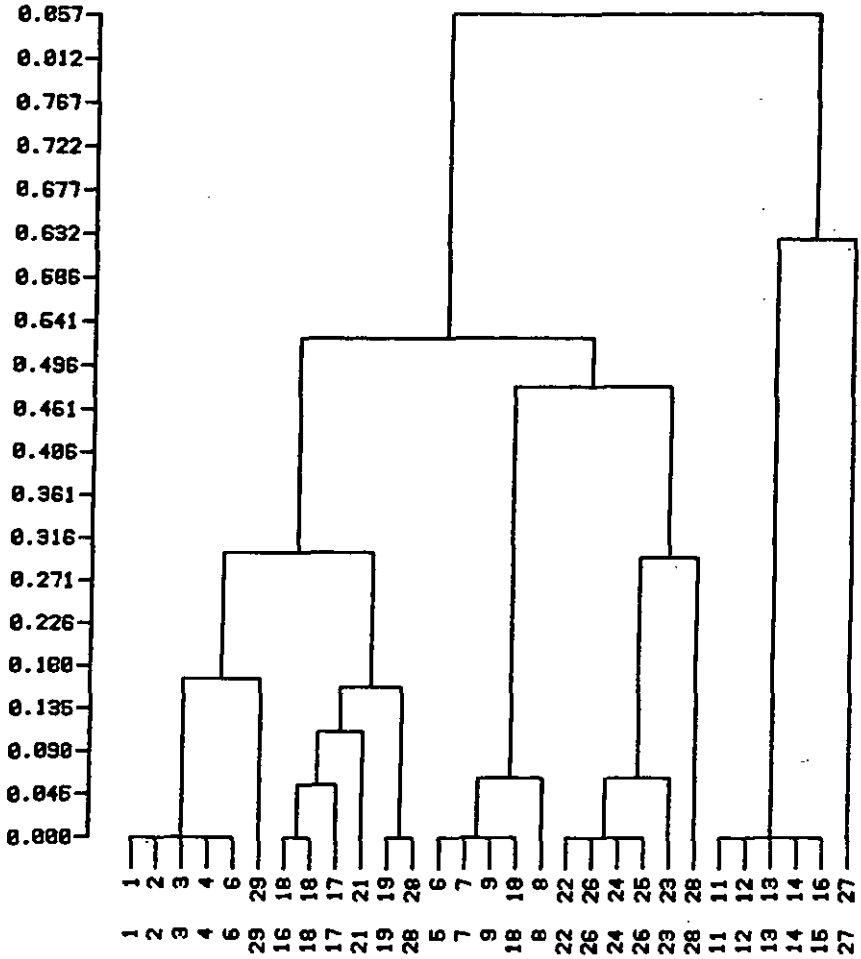
Tableau 6: Matrice triangulaire des distances.

NOMBRE D'OBSERVATIONS		29									
CODE DE LA DISTANCE		7									
MATRICE DES DISTANCES											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	0.000										
2	0.090	0.000									
3	0.000	0.000	0.000								
4	0.000	0.000	0.000	0.000							
5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000						
6	0.360	0.300	0.300	0.300	0.300	0.000					
7	0.300	0.300	0.300	0.300	0.300	0.000	0.000				
8	0.350	0.350	0.350	0.350	0.350	0.053	0.053	0.000			
9	0.300	0.300	0.300	0.300	0.300	0.000	0.000	0.000	0.000		
10	0.300	0.300	0.300	0.300	0.300	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
11	0.737	0.737	0.737	0.737	0.737	0.778	0.778	0.765	0.778	0.778	
12	0.737	0.737	0.737	0.737	0.737	0.778	0.778	0.765	0.778	0.778	
13	0.737	0.737	0.737	0.737	0.737	0.778	0.778	0.765	0.778	0.778	
14	0.737	0.737	0.737	0.737	0.737	0.778	0.778	0.765	0.778	0.778	
15	0.737	0.737	0.737	0.737	0.737	0.778	0.778	0.765	0.778	0.778	
16	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.381	0.381	0.429	0.381	0.381	
17	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.429	0.429	0.476	0.429	0.429	
18	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.381	0.381	0.429	0.381	0.381	
19	0.286	0.286	0.286	0.286	0.286	0.381	0.381	0.429	0.381	0.381	
20	0.286	0.286	0.286	0.286	0.286	0.381	0.381	0.429	0.381	0.381	
21	0.300	0.300	0.300	0.300	0.300	0.476	0.476	0.524	0.476	0.476	
22	0.263	0.263	0.263	0.263	0.263	0.368	0.368	0.333	0.368	0.368	
23	0.211	0.211	0.211	0.211	0.211	0.316	0.316	0.278	0.316	0.316	
24	0.263	0.263	0.263	0.263	0.263	0.368	0.368	0.333	0.368	0.368	
25	0.263	0.263	0.263	0.263	0.263	0.368	0.368	0.333	0.368	0.368	
26	0.263	0.263	0.263	0.263	0.263	0.368	0.368	0.333	0.368	0.368	
27	0.789	0.789	0.789	0.789	0.789	0.688	0.688	0.667	0.688	0.688	
28	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368	0.474	0.474	0.444	0.474	0.474	
29	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167	0.368	0.368	0.421	0.368	0.368	
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
11	0.000										
12	0.000	0.000									
13	0.000	0.000	0.000								
14	0.000	0.000	0.000	0.000							
15	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000						
16	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000					
17	0.789	0.789	0.789	0.789	0.789	0.056	0.000				
18	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.056				
19	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.105	0.158	0.105	0.000		
20	0.057	0.057	0.057	0.057	0.057	0.105	0.158	0.105	0.000	0.000	
21	0.842	0.842	0.842	0.842	0.842	0.811	0.859	0.811	0.811	0.811	
22	0.833	0.833	0.833	0.833	0.833	0.350	0.400	0.350	0.263	0.263	
23	0.778	0.778	0.778	0.778	0.778	0.300	0.350	0.300	0.300	0.300	
24	0.833	0.833	0.833	0.833	0.833	0.350	0.400	0.350	0.263	0.263	
23	0.833	0.833	0.833	0.833	0.833	0.350	0.400	0.350	0.263	0.263	
26	0.833	0.833	0.833	0.833	0.833	0.350	0.400	0.350	0.263	0.263	
27	0.625	0.625	0.625	0.625	0.625	0.789	0.778	0.789	0.789	0.789	
28	0.733	0.733	0.733	0.733	0.733	0.450	0.500	0.450	0.368	0.368	
29	0.765	0.765	0.765	0.765	0.765	0.167	0.118	0.167	0.263	0.263	
	21	22	23	24	25	26	27	28	29		
21	0.000										
22	0.368	0.000									
23	0.430	0.063	0.000								
24	0.368	0.000	0.063	0.000							
23	0.368	0.000	0.063	0.000	0.000						
26	0.368	0.100	0.063	0.000	0.000	0.000					
27	0.765	0.750	0.765	0.750	0.750	0.750	0.000				
28	0.474	0.250	0.294	0.250	0.250	0.250	0.000	0.000			
29	0.176	0.333	0.278	0.333	0.333	0.333	0.250	0.444	0.000		

**figure 1** : Dendogramme obtenu selon la stratégie d'agrégation du chaînage simple (programme Clas, groupe d'étude en méthode quantitative, Université de Neuchâtel).



**figure 2** : Dendogramme obtenu selon la stratégie d'agrégation du chaînage moyen (programme Clas, groupe d'étude en méthode quantitative, Université de Neuchâtel).



**figure 3** : Dendrogramme obtenu selon la stratégie d'agrégation du chaînage complet (programme Clas, groupe d'étude en méthode quantitative, Université de Neuchâtel).

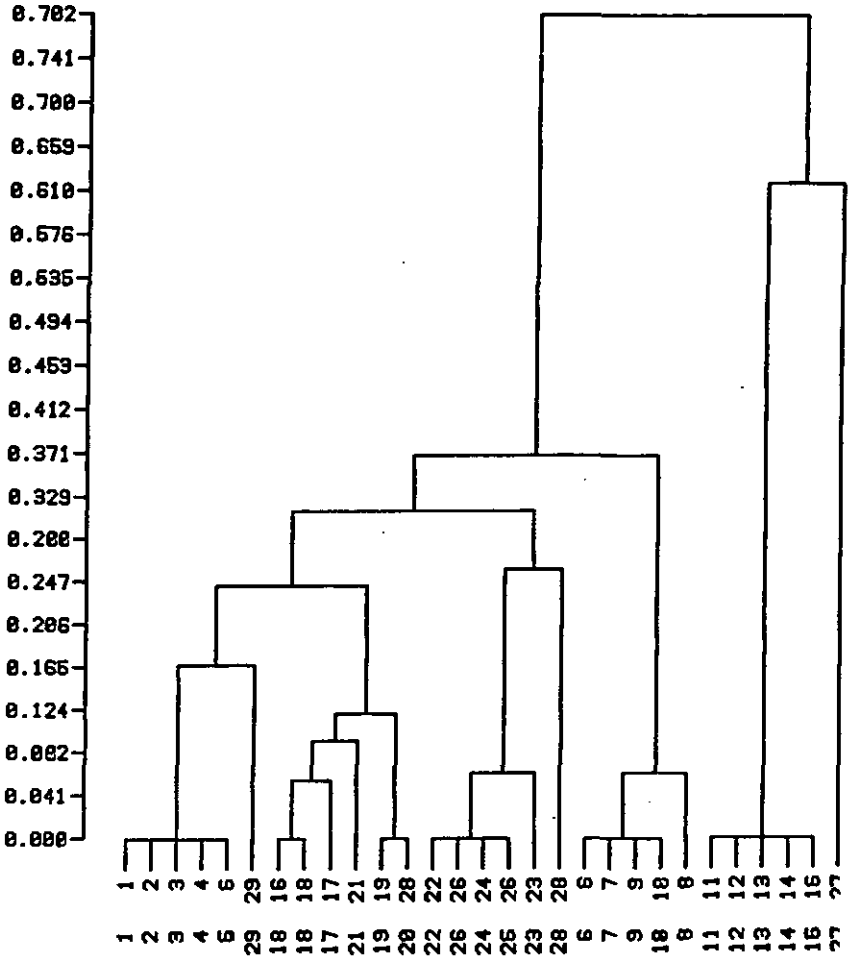


Tableau 7 : Proposition d'identification des 29 souches isolées.

---

Numéro des souches isolées	Groupes d'espèces définis dans le "Bergey's Manual"	Identification de l'espèce
1-5	11-13	<u>B. coagulans</u>
16-21	1-3	<u>B. licheniformis</u>
22-26	4-7	<u>B. cereus</u>
6-10	4-7	<u>B. megaterium</u>
11-15	14-17	<u>B. sphaericus</u>
27	14-17	-
28	-	-
29	11-13	-

---

D'une manière générale les procédures d'isolement proposées par CLAUS ont permis d'isoler les souches recherchées. On remarque cependant que, pour le groupe des souches 11-15 dont l'isolement devait fournir l'espèce B. polymyxa, on isole l'espèce B. sphaericus. Les souches obtenues possèdent une spore ronde déformante alors que l'espèce B. polymyxa possède une spore allongée. De plus ces souches ne produisent pas de gaz ni sur le bouillon au glucose, ni sur celui contenant du mannitol, elles ne sont pas anaérobies facultatives et n'hydrolysent pas la caséine.

Les souches 27 à 29 ne peuvent pas être identifiées avec suffisamment de précision, d'autres caractères différentiels devraient être examinés. Pour la souche 27 appartenant au groupe d'espèces 14-17 défini par Bergey, la fermentation de l'arabinose, du xylose et la décomposition de la tyrosine devraient être étudiées. Pour la souche 29 classée parmi le groupe d'espèces 11-13 on devrait définir les caractères déjà cités pour la souche 27 plus la production de la dihydroxyacétone. La souche 28, dont le caractère de la spore déformant la sporange est variable, ne peut pas être cataloguée dans un groupe d'espèces. Ces souches non identifiées sont laissées en suspens.

#### 4. 2. Choix de la bactérie à étudier :

La souche à retenir pour notre étude doit posséder les propriétés suivantes :

- caractère amylolytique. Le caractère amylolytique des souches, est déterminé selon le test de l'hydrolyse de l'amidon (cf. Matériel et Méthodes).
- production d' $\alpha$ -amylase : les souches isolées doivent posséder l' $\alpha$ -amylase et non la  $\beta$ -amylase, cette dernière enzyme étant surtout produite par les végétaux.
- prototrophie : ce caractère est essentiel pour notre étude car il permet de cultiver les bactéries dans un milieu de culture dépourvu de facteurs de croissance tels les acides aminés ou les vitamines. Les groupements  $-NH_2$ ,  $-COOH$  et  $-SH$  qui entrent dans la composition de ces substances complexent les métaux lourds (Cu, Cd) diminuant ainsi leur quantité soluble dans le milieu nutritif. Ce phénomène peut fausser les résultats obtenus lorsqu'on expérimente l'effet des métaux lourds sur les processus biochimiques régis par les bactéries. Le caractère prototrophe des souches est donné dans la 8ième édition du "Bergey's Manual.

**Tableau 8:** Activité amylolytique et prototrophie chez les souches isolées.

Numéro des souches	Espèce	Hydrolyse de l'amidon	Prototrophie (Bergey's Manual)
1-5	<u>B.coagulans</u>	+	-
6-10	<u>B.megaterium</u>	+	+
16-21	<u>B.licheniformia</u>	+	+
22-26	<u>B.cereus</u>	+	-
27	-	+	?

- croissance homogène : l'étude de la synthèse de l'  $\alpha$ -amylase, demandant une précision et une constance du pH et de la température, sera faite en fermenteur. Afin de faciliter ce type d'expérience, la croissance bactérienne doit être homogène. Les bactéries doivent ni se coller aux parois du récipient de croissance, ni former d'agrégats. Ceci empêcherait une lecture de la densité optique et favoriserait un échantillonnage hétérogène.

Dans des erlenmeyers de 50 ml, stériles, on ensemence, à l'aide d'une anse de platine 15 ml de milieu de culture WA contenant de l'amidon à 1%, avec le matériel bactérien (cf. Matériel et Méthodes). On examine 5 souches de B.megaterium, 6 souches de B.licheniformis et la souche no.27. Les souches appartenant aux espèces B.coagulans, B.cereus n'ont pas été testées ici car elles ne sont pas prototrophes.

Après incubation sur agitateur durant 24 heures à 30°C à 170 RPM, on observe la croissance des souches :

**Tableau 9** : Test de la croissance homogène de certaines souches isolées.

Espèce	No. de la souche isolée	Homogénéité de la croissance
<u>B.megaterium</u>	6	+
	7	+
	8	-
	9	-
	10	+
<u>B.licheniformis</u>	16	+
	17	+
	18	+
	19	+
	20	+
	21	+
non définie	27	-

Parmi les souches expérimentées seules les souches no.8, 9 et 27 forment au cours de leur croissance des dépôts sous la forme de petits grains blancs.

Des souches possédant tous les caractères requis on élimine celles appartenant à l'espèce B.megaterium car elles produisent la  $\beta$ -amylase et on choisit arbitrairement la souche no. 19 appartenant à l'espèce B.licheniformis. Cette souche sera désignée dans la suite de notre travail par B.licheniformis s<sub>4</sub>.

## 5. ETUDE EN MILIEU SYNTHETIQUE LIQUIDE

Avec la bactérie amylolytique B. licheniformis isolée précédemment à partir d'un sol peu contaminé en métaux lourds (bactérie non adaptée au polluant), on réalise la première partie du travail qui est l'étude dans un milieu synthétique liquide.

Cette recherche a pour buts :

- d'estimer l'effet soit du cadmium soit du cuivre sur la croissance de B.licheniformis  $\alpha_4$ , la synthèse et l'activité de son  $\alpha$ -amylase.
- de déterminer de ces paramètres lequel présente la plus grande sensibilité à ces éléments .

### 5. 1. Croissance bactérienne :

Avant d'étudier l'effet du cadmium ou du cuivre sur la croissance bactérienne on définit et choisit, dans un milieu de culture dépourvu de métal, les paramètres de croissance. On recherche ensuite la température optimale à laquelle se développe B. licheniformis puis l'influence de deux sources de carbone (glucose, amidon) sur la croissance bactérienne.

#### 5. 1. 1. Etude des paramètres de croissance :

Dans un erlenmeyer de 500 ml contenant 95 ml de milieu de culture on ajoute 5 ml de préculture de B.licheniformis  $\alpha_4$  (Matériel et Méthodes). La culture est agitée avec soin à 300 RPM à 37°C.

En fonction du temps d'incubation on suit le développement de la culture en mesurant sa densité optique à 436 nm ( $DO_{436}$ ).

On distingue sur la courbe de croissance (cf. figure 4) trois phases :

- la phase de latence (I) qui représente l'intervalle de temps entre l'inoculum et l'intersection entre la droite prolongée exprimant le taux de croissance et la droite partant de l'inoculum parallèlement à l'axe des X. La durée de la phase de latence dépend de l'âge de l'inoculum et de la différence entre la composition du milieu de la préculture et celle du milieu de culture. Avant de pousser les bactéries s'adaptent à ces nouvelles conditions et synthétisent les enzymes nécessaires à leur développement. La phase de latence est exprimée en heures (h).
- La phase exponentielle (II). Cette phase est caractérisée par un taux de croissance constant ( $\mu$ ). Il est exprimé, dans le modèle de croissance classique, selon la relation  $x = x_0 \cdot e^{\mu t}$ .  
avec  $x_0$  = biomasse de l'inoculum exprimée en D.O.  
 $x$  = biomasse au temps  $t$   
 $t$  = temps après l'inoculation

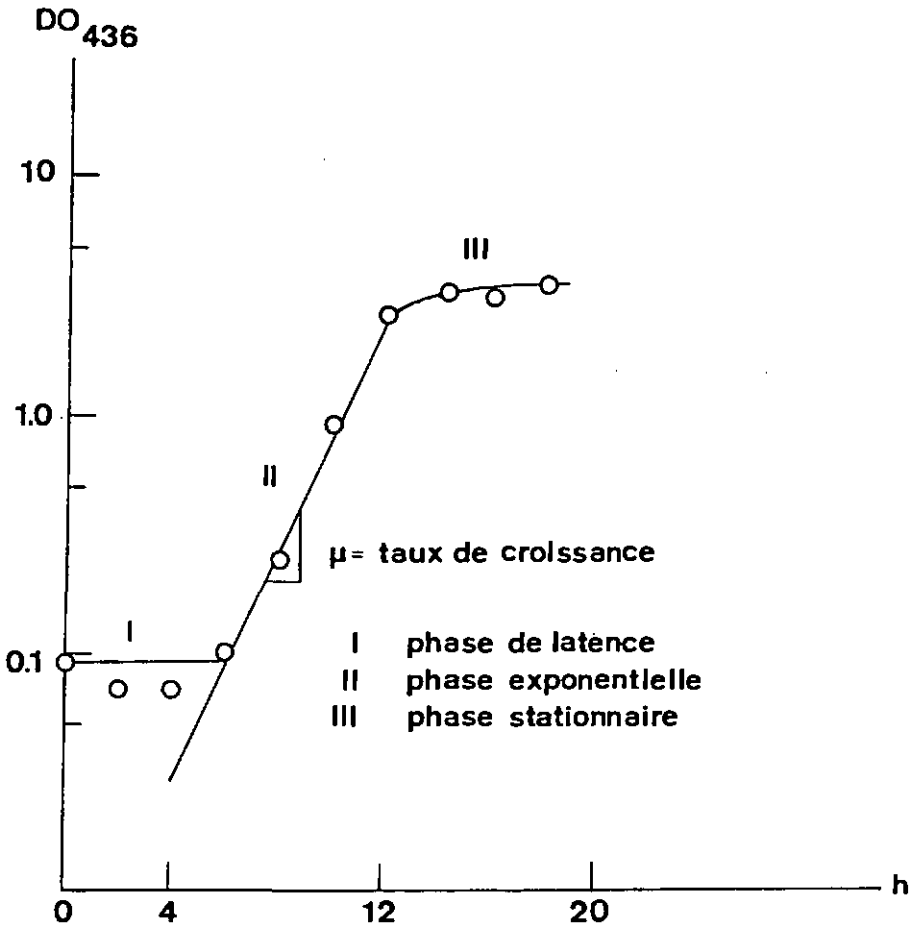
La relation linéaire est donnée par  $\ln x = \ln x_0 + \mu t$ . En calculant les paramètres de la droite on obtient  $\mu$  qui représente la pente de cette droite et  $\ln x_0$  la concentration de la biomasse dans l'inoculum. Le taux de croissance exponentiel est spécifique à chaque espèce bactérienne et dépend des conditions expérimentales.

- la phase stationnaire (III). Durant cette phase, la croissance bactérienne s'arrête. Cet arrêt de croissance peut être dû soit à un épuisement du substrat, soit à la production de métabolites toxiques pour les bactéries. Le rendement  $Y$  de la culture peut être exprimé, à un moment de la croissance quand  $\mu = \mu_{max}$ , par l'expression suivante :

$$Y = \frac{x - x_0}{s_0 - s}$$

- avec :  $x$  = biomasse au temps de la mesure  
 $x_0$  = biomasse de l'inoculum ou biomasse obtenue lors de la mesure antérieure  
 $s_0$  = concentration du substrat dans le milieu non inoculé, ou présente lors de la mesure antérieure  
 $s$  = concentration du substrat dans la culture au temps  $t$ .

figure 4 : Croissance de B.licheniformis en milieu liquide synthétique non renouvelé.



Des trois paramètres de croissance cités plus haut nous étudions la durée de la phase de latence et le taux de croissance.

5. 1. 1. 1. Influence de la température sur les paramètres de croissance:

L'objet de cette expérience est de trouver la température de croissance optimale pour B. licheniformis.

On fait un premier test qualitatif pour déterminer, approximativement, le domaine des températures pour lequel B. licheniformis s<sub>4</sub> montre une croissance optimale.

Dans des éprouvettes on ensemence le milieu nutritif WA à l'amidon avec quelques gouttes d'une préculture de B. licheniformis s<sub>4</sub> à 37°C (Matériel et Méthodes). Les éprouvettes sont placées dans des étuves à air. Au cours de la période d'incubation on observe plusieurs fois par jour la turbidité des cultures.

Les résultats sont donnés au tableau suivant :

Tableau 10 : Influence de la température sur la croissance de B. licheniformis s<sub>4</sub> dans le milieu de culture WA contenant de l'amidon à 1% (test qualitatif avec incubation des tubes dans un incubateur à air).

Température °C	Phase de latence (h)	Turbidité de la culture
10	longue	nulle
20	longue	faible
25	longue	faible
30	moyenne	faible
35	moyenne	forte
37	courte	forte
40	courte	forte
50	courte	faible

A 10°C, B. licheniformis s<sub>4</sub> ne croît pas, même après 80 heures de mise en culture. Ce résultat concorde avec celui donné dans le "Bergey's Manual" indiquant que la température minimale de croissance est de 15°C. Entre 25 et 37°C on remarque une diminution de la phase de latence. Pour 37; 40 et 50°C on observe une courte phase de latence. La température optimale pour la croissance de B. licheniformis s<sub>4</sub> n'est pas exactement établie. Elle se trouve au voisinage de 37°C à 40°C. On observe à ces températures l'apparition d'une pigmentation rouge, apparaissant en fin de phase stationnaire. A 50°C, la croissance de B. licheniformis s<sub>4</sub> débute rapidement mais la turbidité de la culture reste faible même après 3 jours d'incubation. La longueur de la phase de latence peut être influencée par la température de l'inoculum qui est à 37°C. Les nouvelles cultures sont incubées à des températures différentes se situant entre 10 et 50°C. Il est possible qu'au départ le système enzymatique présent dans la préculture ne soit pas approprié à ces températures et la bactérie devra synthétiser de nouveaux systèmes enzymatiques.

Pour choisir la température à laquelle nous allons poursuivre nos essais sur les métaux lourds, on teste en fermenteur la croissance de B. licheniformis s<sub>4</sub> sur le milieu WA contenant de l'amidon à 1%.

Les conditions de culture sont mentionnées sous le point 3.4. (cf. Matériel et Méthodes). On choisit d'expérimenter trois températures : 25, 37 et 50°C. La première est celle qui se rapproche le plus des températures que nos sols peuvent atteindre durant les mois d'été. 37°C reflète la température optimale de croissance pour B. licheniformis s<sub>4</sub> et 50°C est considérée comme la température optimale pour la synthèse de l' $\alpha$ -amylase (SAITO, 1973). La température de la préculture utilisée est de 37°C.

Les résultats sont mentionnés au tableau suivant :

Tableau 11 : Effet de la température sur les paramètres de croissance de B. licheniformis s<sub>4</sub> poussant sur le milieu WA contenant de l'amidon à 1%.

Température °C	Phase de latence h	Taux de croissance h <sup>-1</sup>
25	36	?
37	5	0.48
50	6	0.33

Après 36 heures on a renoncé à poursuivre l'expérience à 25°C étant donné la longueur de la phase de latence. De telles conditions rendraient une expérimentation avec les métaux lourds beaucoup trop longue. Cependant si, la préculture utilisée avait été incubée à 25°C on aurait peut-être observé une phase de latence plus courte. Il est possible que les enzymes synthétisées à 37°C dans la préculture ne soient pas appropriées pour une croissance à 25°C. Des deux autres températures, on choisit de travailler à 37°C qui est la température la plus basse se rapprochant des conditions naturelles.

5. 1. 1. 2. Influence de la source de carbone sur les paramètres de croissance :

Cette expérience est réalisée en erlenmeyer de 500 ml avec le milieu WA contenant soit du glucose à 0.5% soit de l'amidon à 1% (cf. Matériel et Méthodes). L'inoculum est une préculture préparée dans les mêmes conditions que la culture avec la même source de carbone. La température d'incubation est de 37°C.

L'effet de la source de carbone sur la phase de latence et sur le taux de croissance est présenté ci-dessous :

Tableau 12 : Influence du substrat carboné sur les paramètres de croissance de B.licheniformis a<sub>4</sub> poussant sur le milieu WA (expérience en erlenmeyer de 500 ml dans un milieu de culture non renouvelé).

Substrat	Phase de latence h	Taux de croissance h <sup>-1</sup>
glucose à 0.5%	6.00	0.43
amidon à 1%	5.40	0.37

## 5. 2. Influence du cadmium sur la croissance

Dans un milieu liquide synthétique simple, on étudie à 37<sup>0</sup>C, température proche de l'optimal pour B. licheniformis, l'effet du cadmium sur la croissance de cette bactérie prototrophe.

Cette étude a pour objets :

- de déterminer l'effet de cet élément sur les paramètres de la croissance bactérienne (phase de latence, taux de croissance)
- d'établir les concentrations de cadmium pour lesquelles on observe un début (CLT), 20% (IC<sub>20</sub>) et 50% (IC<sub>50</sub>) d'inhibition du taux de croissance.
- de voir si la croissance bactérienne a une influence sur la teneur en cadmium soluble du milieu de croissance.

Afin de différencier l'effet des métaux lourds sur la croissance bactérienne et sur la synthèse de l'α-amylase on utilise comme source de carbone pour le milieu de nutritif de base soit du glucose à 0.5% soit de l'amidon à 1%. La différence entre les 2 substrats est que le glucose peut être tout de suite métabolisé par B.licheniformis s<sub>4</sub> alors que l'amidon doit être tout d'abord hydrolysé. La bactérie doit synthétiser une exoenzyme, l'α-amylase pour l'hydrolyse de l'amidon. Les produits de cette hydrolyse sont transportés dans la cellule puis sont métabolisés.

Pour connaître dans quel domaine de concentrations les expériences sur les métaux lourds doivent être entreprises, on réalise en éprouvettes une première approche.

Dans des tubes à essai contenant le milieu WA au glucose ou à l'amidon on ajoute des concentrations croissantes de cadmium (cf. Matériel et Méthodes). Les concentrations finales du cadmium dans le milieu de croissance vont de 1.22 à 10000 µg/ml (cf. tableau 13).

Au cours de la période d'incubation à 37<sup>0</sup>C, on observe l'apparition d'une turbidité dans le milieu de croissance.

Les résultats de cette expérience sont donnés au tableau 13.

**Tableau 13** : Influence du cadmium sur la croissance de S. licheniformis s<sub>4</sub> poussant sur le milieu WA contenant comme source de carbone soit du glucose à 0.5% (G) soit de l'amidon à 1% (A).

Cadmium µg/ml	Durée d'incubation jour									
	0		1		2		3		4	
	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G
10000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
625	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
312.5	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
156.25	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
78.13	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
39.06	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
19.53	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
9.77	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
4.88	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.44	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.22	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ croissance

- pas de croissance

La croissance de S. licheniformis s<sub>4</sub> avec le glucose n'est pas inhibée pour des concentrations de Cd inférieures ou égale à 4.88 µg/ml. Pour le domaine de concentrations situé entre 4.88 et 625 µg/ml la croissance est retardée d'environ 48 heures comparée avec celle qui se déroule dans le milieu de culture dépourvu de métal lourd. On observe une inhibition totale du développement de la bactérie pour des concentrations situées entre 625 et 1250 µg/ml de Cd.

Sur le milieu WA à l'amidon B.licheniformis s<sub>4</sub> pousse en présence de cadmium jusqu'à une concentration située entre 4.88 et 9.77 µg/ml. Au-delà de cette concentration la croissance est totalement inhibée même après 4 jours de mise en culture.

Avec cette expérimentation en éprouvettes on remarque que la croissance bactérienne avec l'amidon est plus sensible au cadmium que celle qui a lieu avec le glucose. En effet sur le milieu WA la croissance de B.licheniformis est inhibée entre 4.88 et 9.7 µg Cd/ml lorsque la source de carbone est de l'amidon alors que l'arrêt de croissance se situe entre 625 et 1250 µg Cd/ml lorsque la source de carbone est du glucose.

#### 5. 2. 1. Influence du cadmium sur les paramètres de croissance :

L'expérience précédente a démontré que le cadmium perturbe la croissance sans pouvoir préciser sur quel paramètre il agit. Dans cette expérience nous voulons préciser ce fait.

Dans des erlenmeyers de 500 ml avec chicaneau contenant le milieu WA soit au glucose soit à l'amidon on ajoute des solutions de Cd de façon à obtenir les concentrations finales présentées aux tableaux 14 et 15 et aux figures 5 et 6.

La mise en culture et les conditions de croissance sont décrites sous le point 3. 4. (cf. Matériel et Méthodes). La température de croissance est de 37°C. Des concentrations de Cd supérieures à 80 µg/ml ne peuvent pas être expérimentées ici car on atteint la limite de solubilité du métal. Or la présence de précipité empêche la lecture de la densité optique de la culture et de plus la concentration active du métal ne correspondra plus à la concentration totale. La prise des échantillons et la mesure de la densité cellulaire sont décrites dans le paragraphe 3. 5. (cf. Matériel et Méthodes).

Les résultats de ces expériences sont présentés en partie aux tableaux 14 et 15 et aux figures 5 et 6.

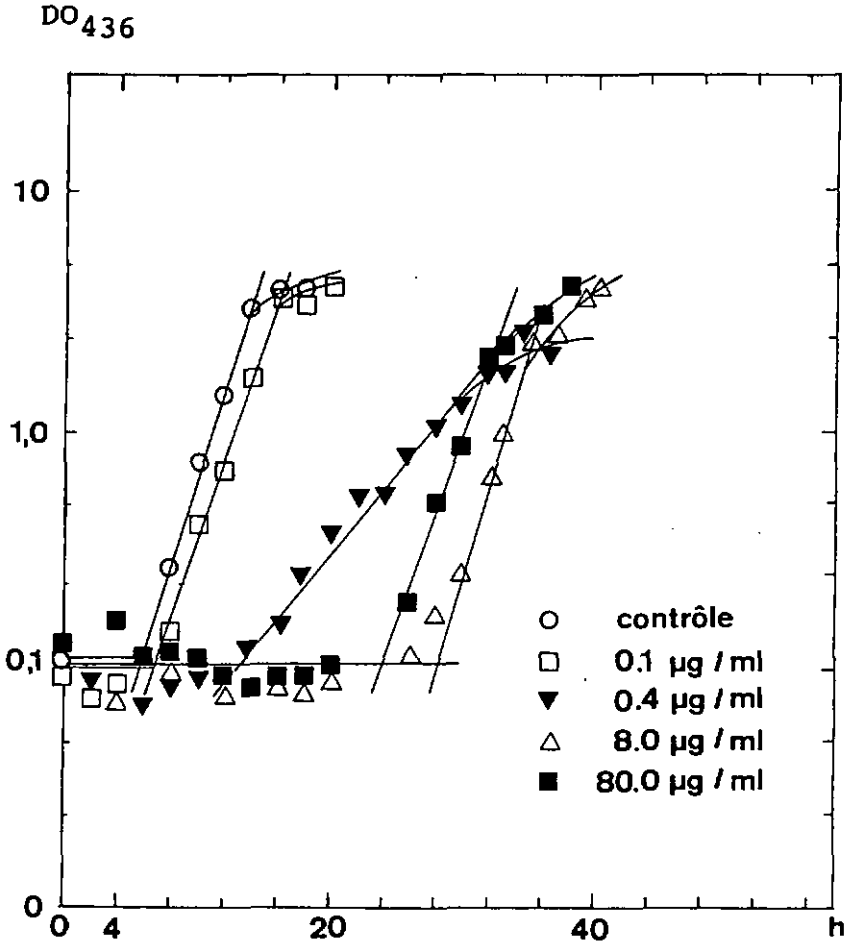
Tsbleau 14 : Effet du cadmium sur les paramètres de croissance de B. licheniformis s<sub>4</sub> poussant sur le milieu liquide WA additionné de glucose à 0.5%.

Cadmium µg/ml	Phase de latence h	Taux de croissance	
		h <sup>-1</sup>	%
0	6.0	0.43	100
0.1	6.0	0.36	83.72
0.2	6.0	0.39	90.7
0.4	12.0	0.14	32.6
0.8	12.0	0.14	32.6
8.0	28.0	0.30	69.8
40	24.0	0.33	76.7
80	25.3	0.36	83.7

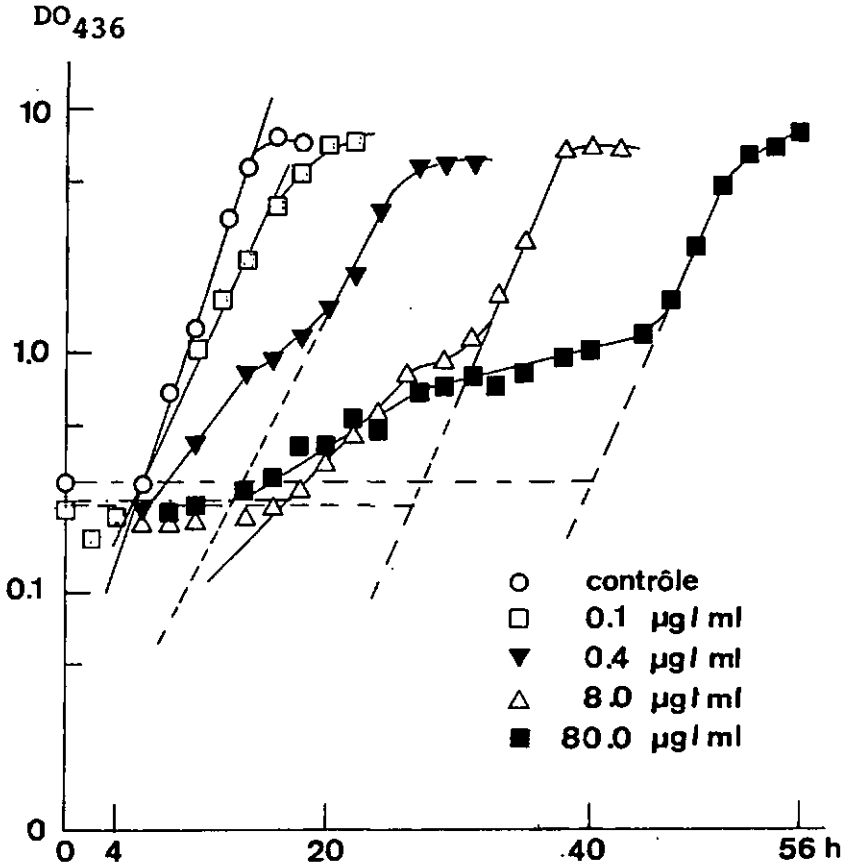
Tsbleau 15 : Effet du cadmium sur les paramètres de croissance de B. licheniformis s<sub>4</sub> poussant sur le milieu WA additionné d'amidon à 1%.

Cadmium µg/ml	Phase de latence h	Taux de croissance	
		h <sup>-1</sup>	%
0	5.30	0.37	100
0.2	5.30	0.38	103
0.5	5.36	0.36	97.3
1	5.45	0.25	67.6
2	6.00	0.23	62.2
5	8.00	0.23	62.2
10	10.00	0.19	51.4
15	17.00	0.16	43.2
20	29.00	0.20	54
30	-	0.11	29.7
50	-	0.29	78.4
80	40.00	0.27	73

figure 5 : Influence du cadmium sur la croissance de B.licheniformis s<sub>4</sub> poussant dans le milieu liquide WA au glucose (0.5%).



**figure 6** : Influence du cadmium sur la croissance de B.licheniformis s<sub>4</sub> poussant dans le milieu liquide WA à l'amidon (IX).



Pour les deux sources de carbone, on remarque une augmentation de la phase de latence. Cette augmentation a lieu entre 0.1 et 8 µg/ml pour le milieu au glucose (cf. figure 7) et entre 5 et 80 µg/ml pour le milieu à l'amidon (cf. figure 8). Ce prolongement de la phase latence dû au Cd a déjà été mis en évidence par de nombreux auteurs pour d'autres genres bactériens (MITRA et al., 1975 ; BALDREY et al., 1977 ; PICKETT et DEAN, 1979).

Le taux de croissance  $\mu$  de B. licheniformis  $S_4$  diminue entre 0.1 et 0.8 µg/ml sur le milieu WA au glucose et entre 0.5 et 15 µg/ml sur le milieu à l'amidon. Entre 8 et 80 µg Cd/ml dans le milieu au glucose et entre 20 et 80 µg Cd/ml dans le milieu à l'amidon  $\mu$  augmente. A 80 µg Cd/ml  $\mu$  est du même ordre de grandeur que celui obtenu lors de la croissance de la bactérie dans le milieu de culture dépourvu de Cd avec le glucose (cf. figure 5) et avec l'amidon (cf. figure 6).

Dès 5 µg Cd/ml la croissance bactérienne sur le milieu WA contenant de l'amidon présente un phénomène de croissance biphasique aussi observé sur le milieu glucosé dès 10 µg/ml de métal. On suppose que cette particularité est due au développement d'un mutant résistant au cadmium. Cette nouvelle population supplanterait la population initiale phénotypiquement non résistante à cet élément. A ce propos on a mis au point un modèle mathématique exprimant l'apparition des souches mutantes dans des cultures contenant des concentrations croissantes de Cd.

Ce modèle est exprimé par l'équation suivante :

$$y = x_0^S \cdot e^{-\mu_S t} + x_0^M \cdot e^{-\mu_M t}$$

- avec  $x_0^S$  = biomasse de la population initiale de la souche sauvage
- $x_0^M$  = biomasse de la population initiale de la souche mutante
- $\mu_S$  = taux de croissance de la souche sauvage
- $\mu_M$  = taux de croissance de la souche mutante

On attribue au mutant un taux de croissance,  $\mu_M$ , constant et au sauvage un taux de croissance,  $\mu_S$ , qui varie avec la concentration du cadmium. On pose que la fréquence de mutation correspond à  $10^{-7}$  ( $x_0^M = 10^{-7} \cdot x_0^S$ ).

La représentation de ce modèle se trouve à la figure 9. Les courbes calculées, en faisant varier  $\mu_S$  en fonction de différentes concentrations de cadmium, correspondent assez bien à celles obtenues expérimentalement.

Les résultats de cette étude montrent que la croissance intrinsèque de B. licheniformis s<sub>4</sub> est plus sensible au cadmium que le système  $\alpha$ -amylasique de cette bactérie ce qui est contraire aux observations faites en éprouvettes. Vu que les rapports entre le volume de l'inoculum et celui du milieu de culture sont différents en erlenmeyer et en éprouvette il se peut que la fréquence des souches mutantes soit différente dans les deux systèmes

#### 5. 2. 1. 1. Détermination de CLT, IC<sub>20</sub> et IC<sub>50</sub>.

Pour mieux définir les limites de toxicité du cadmium pour la croissance de B. licheniformis s<sub>4</sub> et la synthèse de l' $\alpha$ -amylase on définit trois paramètres :

- CLT qui représente la concentration limite de toxicité d'un métal lourd via à via d'un paramètre biologique. C'est la concentration d'élément toxique la plus élevée pour laquelle on a une activité biologique de 100% ou un pourcentage d'inhibition de 0. Les 100% d'activité correspondent à la valeur absolue de l'activité étudiée sans métal lourd. Dépassé la valeur de CLT on observe un début d'inhibition de l'activité biologique.
- IC<sub>20</sub> et IC<sub>50</sub> correspondent aux concentrations de métaux lourds pour lesquelles on a respectivement 20 et 50% d'inhibition du taux de croissance.

Pour déterminer ces valeurs une série d'expériences de croissance est effectuée. Dans des erlenmeyers de 500 ml avec chicanes contenant le milieu WA et comme source de carbone soit du glucose soit de l'amidon on ajoute des solutions de Cd.

Le modèle d'expérience et les conditions de croissance sont décrits sous le point 3. 4. (cf. Matériel et Méthodes).

Pour chaque source de carbone les concentrations de Cd sont données aux figures 10 et 11.

**figure 7** : Effet du cadmium sur la phase de latence (h) de la croissance de B.licheniformis s<sub>4</sub> dans le milieu liquide WA au glucose (0.5%).

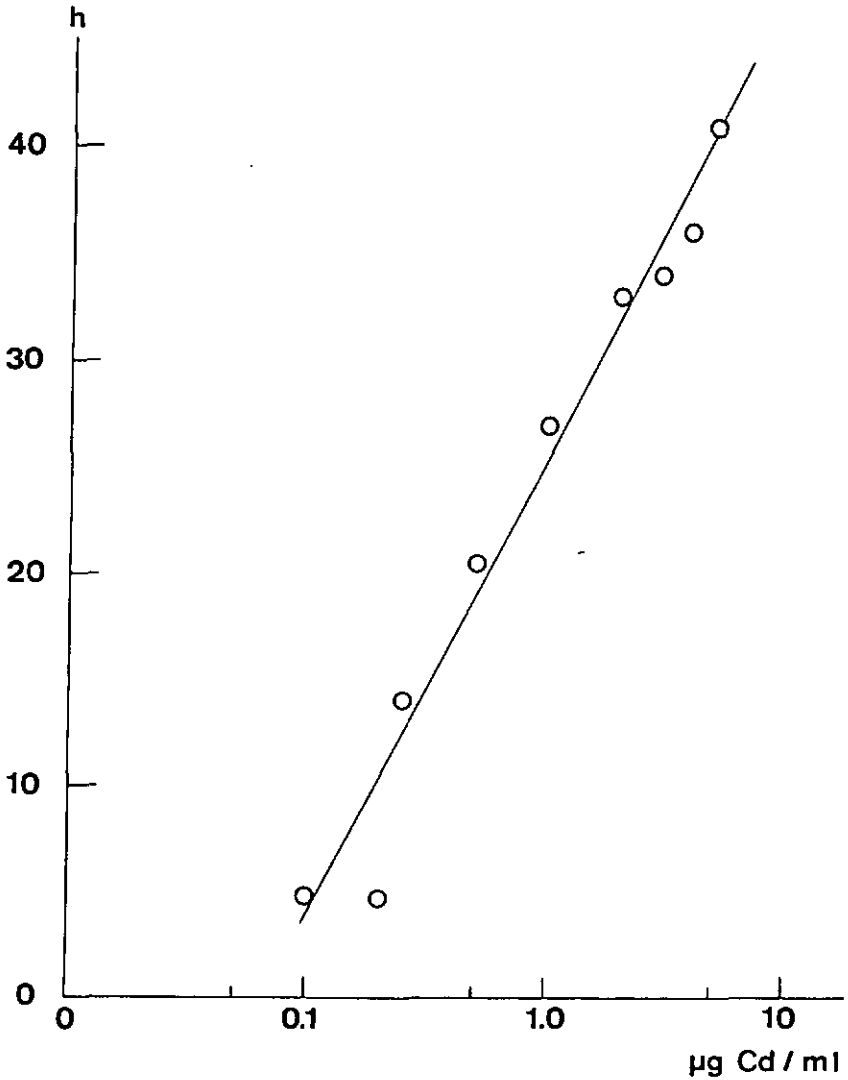


figure 8 : Influence du cadmium sur la phase de latence de la croissance de B.licheniformis  $s_4$  dans le milieu liquide WA à l'amidon (1%).

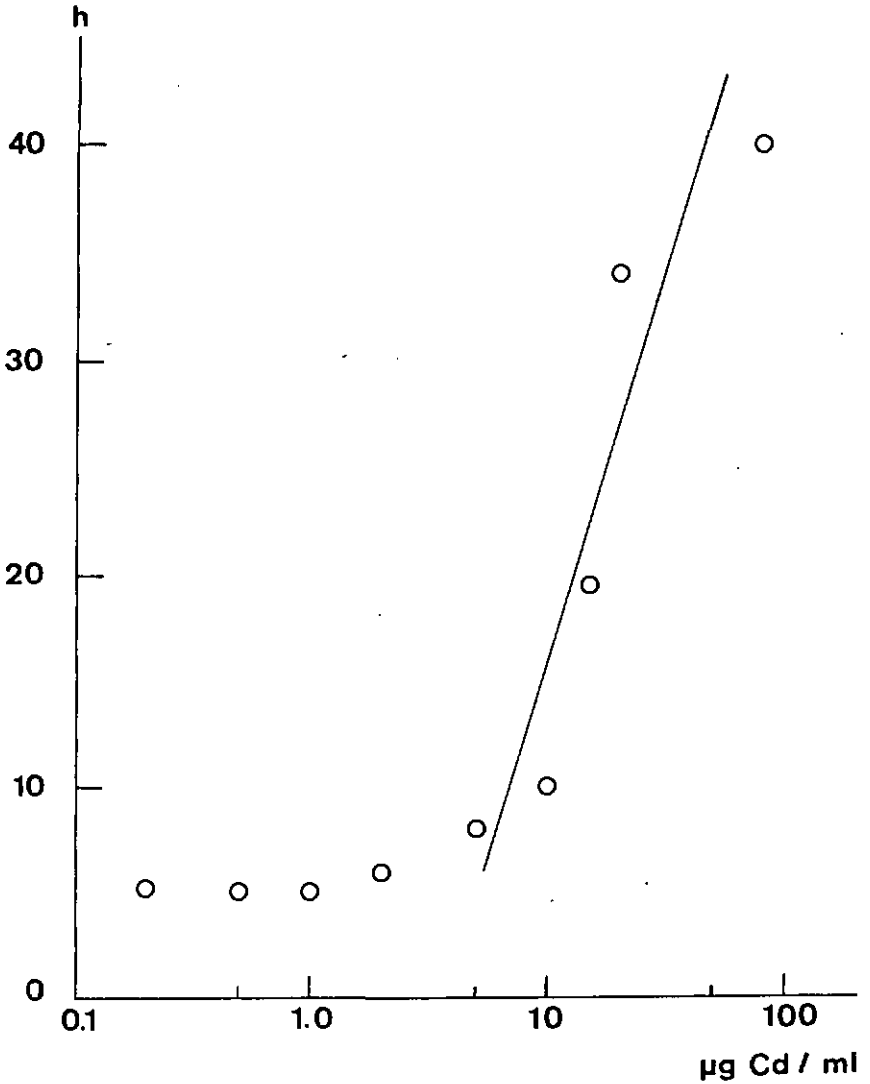
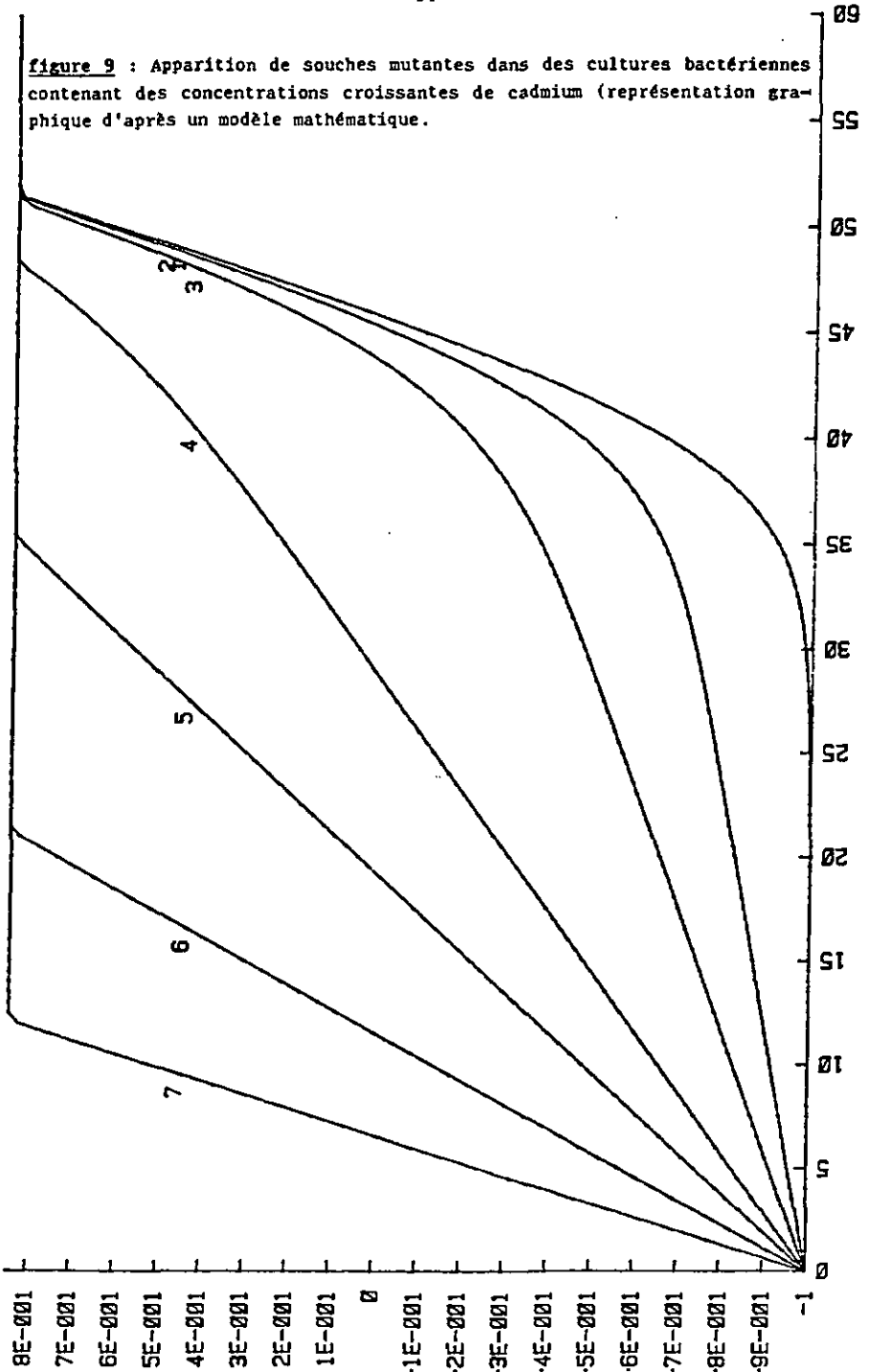


figure 9 : Apparition de souches mutantes dans des cultures bactériennes contenant des concentrations croissantes de cadmium (représentation graphique d'après un modèle mathématique).



La relation entre le taux de croissance bactérien et la concentration de cadmium dans le milieu de culture WA est présentée aux figures 10 et 11. Il s'agit ici du taux de croissance de la souche sensible au cadmium. Le taux de croissance est exprimé en valeur relative (%) de celui obtenu dans les mêmes conditions expérimentales en absence de métaux lourds.

Les valeurs CLT, IC<sub>20</sub> et IC<sub>50</sub> sont déterminées mathématiquement. On calcule, pour les concentrations de Cd et les taux de croissance correspondants, les paramètres a et b de la droite de régression  $y = ax + b$ . Puis y est remplacé dans l'équation de la droite par 100, 80 et 50 pour obtenir les valeurs x correspondant respectivement à CLT, IC<sub>20</sub> et IC<sub>50</sub>.

#### 5. 2. 2. Influence de la croissance de *B. licheniformis* s<sub>4</sub> sur la teneur du milieu en cadmium soluble.

Cette expérience a pour but de suivre l'évolution du cadmium soluble au cours du développement bactérien dans le milieu nutritif WA contenant soit de l'amidon à 1% soit du glucose à 0.5%. Cet essai présente un aspect écologique intéressant: si *B. licheniformis* modifie la teneur soluble en cadmium du milieu environnant il peut influencer la toxicité de ce métal à l'égard des espèces microbiennes qui l'entourent.

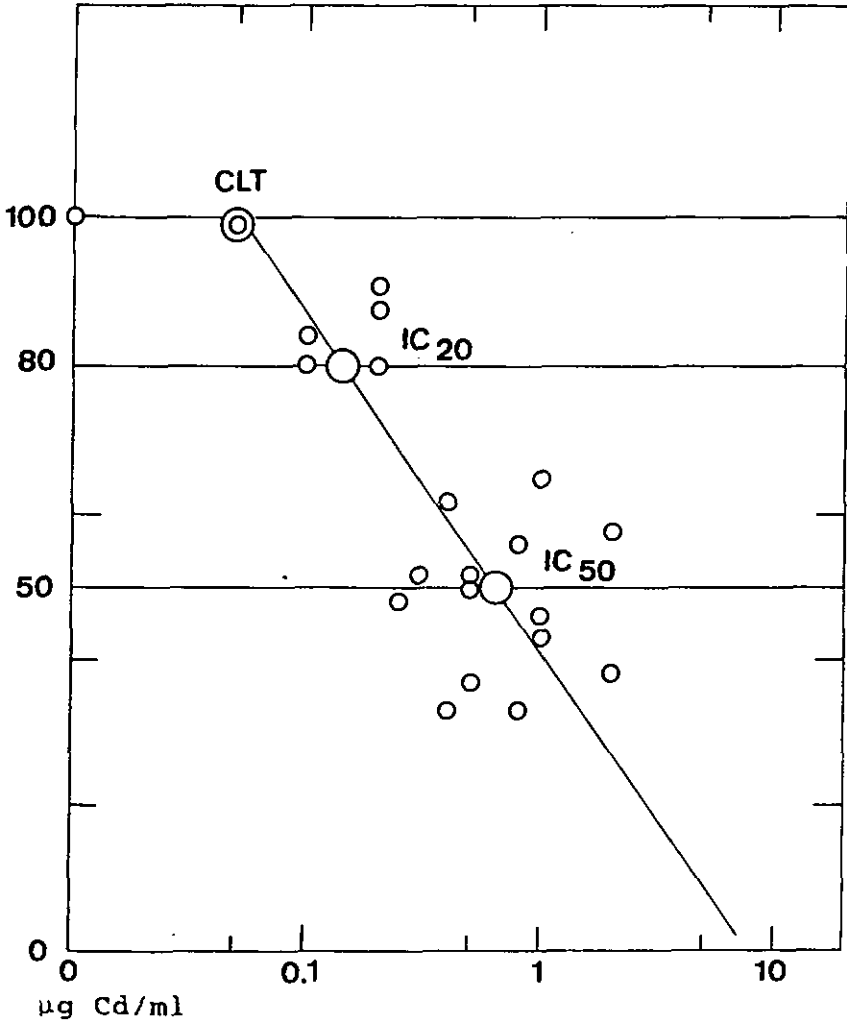
Dans des erlenmeyers de 500 ml avec chicanes contenant le milieu WA et soit de l'amidon à 1%, soit du glucose à 0.5% on ajoute soit 0.7 soit 0.2 µg de Cd/ml (concentration finale). Ces quantités représentent les concentrations de métal pour lesquelles on a une inhibition du taux de croissance proche de 20%.

Ces concentrations sont choisies à la place de celles correspondant aux concentrations limites de toxicité (CLT). Ces dernières, qui se trouvent à la limite de la sensibilité de la mesure du polarographe, ne peuvent pas être mesurées avec exactitude. Des concentrations plus élevées ne sont pas choisies car elles peuvent induire la croissance d'une nouvelle population bactérienne adaptée au cadmium.

Les milieux sont inoculés avec 5 ml de préculture et agités à 37<sup>0</sup>C à 300 RPM (cf. Matériel et Méthodes).

**figure 10** : Influence du cadmium sur le taux de croissance de B.licheniformis  $s_4$  poussant dans le milieu liquide WA au glucose (0.5%).

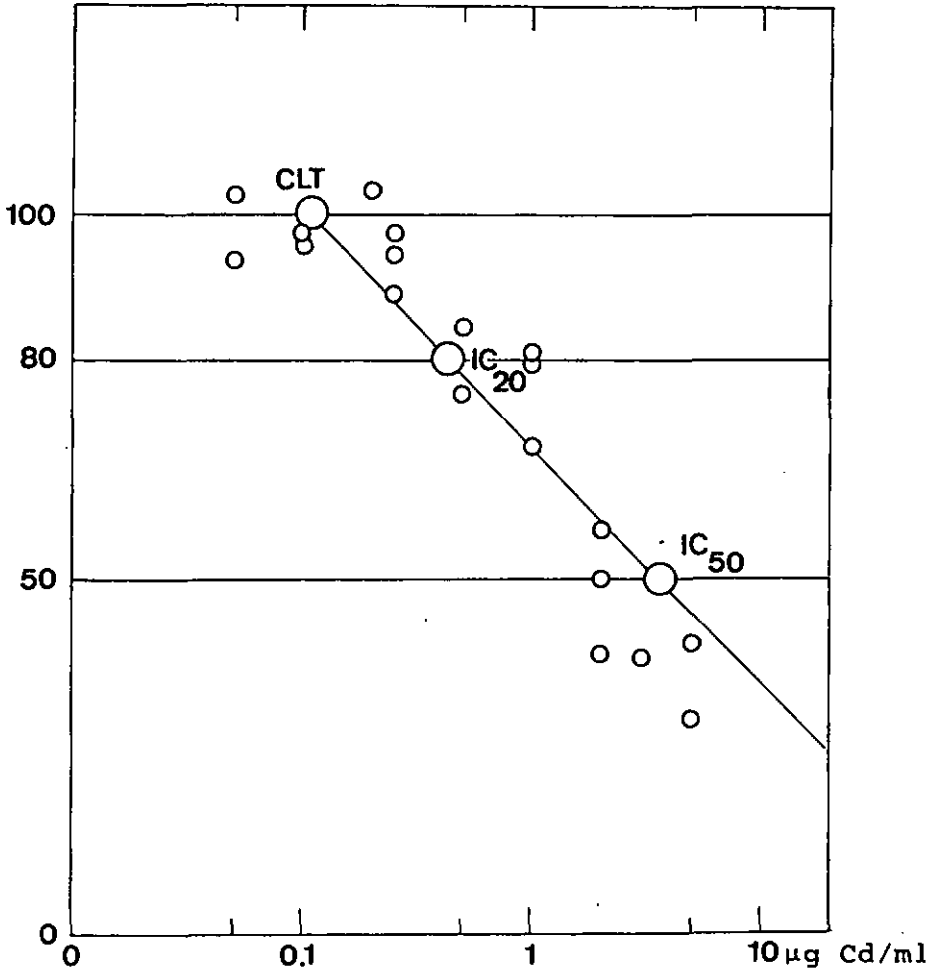
1)



1) Le taux de croissance est exprimé en valeur relative. 100% correspondent au taux de croissance de la bactérie poussant dans le milieu sans Cd.

**figure 11** : Influence du cadmium sur le taux de croissance de *B.licheniformis* s<sub>4</sub> poussant dans le milieu liquide WA à l'amidon (1%).

1)



1) Le taux de croissance est exprimé en valeur relative. 100% correspondent au taux de croissance de la bactérie poussant dans le milieu sans Cd.

Plusieurs fois au cours de la croissance de B. licheniformis s<sub>4</sub> on retire un erlenmeyer de l'agitateur. On fait une mesure de la densité optique, on détermine la matière sèche puis on centrifuge le reste de la culture à 4<sup>0</sup>C à 4500 g pendant 20 minutes. Le surnageant est conservé à 4<sup>0</sup>C dans un flacon en plastique de 100 ml pour l'analyse du cadmium soluble (cf. Matériel et Méthodes).

Pour les valeurs témoins on analyse le cadmium soluble dans le milieu de culture contenant soit de l'amidon soit du glucose sans inoculum.

Pour les 2 substrats on remarque que la concentration de cadmium en solution diminue avec l'augmentation de la biomasse (cf. tableaux 16 et 17).

**Tableau 16** : Influence de la croissance de B. licheniformis s<sub>4</sub> sur la teneur en cadmium soluble dans le milieu de culture WA additionné d'amidon à 1% après adjonction de 700 ng Cd/ml de milieu.

Matière sèche mg/ml	Cd soluble ng/ml	1) <sub>g</sub>
0.09	502	72
0.26	569	81
0.416	405	58
0.794	505	72
1.495	233	33

1) 100% correspondent à la quantité de Cd ajouté dans le milieu de culture avant l'inoculation de B. licheniformis s<sub>4</sub>.

L'analyse du cadmium soluble faite dans le milieu WA dépourvu de bactéries a révélé que le milieu à l'amidon avait la même quantité de cadmium que celui au glucose, environ 3%.

La croissance de B. licheniformis, soit sur le glucose, soit sur l'amidon cause une diminution de la teneur soluble en cadmium du milieu de culture. Les cellules poussant sur le glucose semblent prélever plus de cadmium dans le milieu de culture que celles croissant sur l'amidon.

Du point de vue écologique ce phénomène est très intéressant car en prélevant le cadmium du milieu B. licheniformis peut protéger d'autres espèces microbiennes sensibles à cet élément.

**Tableau 17** : Influence de la croissance de B.licheniformis a<sub>4</sub> sur la teneur en cadmium soluble dans le milieu de culture WA contenant du glucose à 0.5%, après adjonction de 200 ng Cd/ml de milieu de culture.

Matière sèche mg/ml	Cd soluble ng/ml	1) %
0.046	104.8	52.4
0.068	119.5	59.8
0.118	101.4	50.7
0.193	81.1	40.6
0.368	74.4	37.2
0.460	92.8	46.4

1) 100 % correspondent à la quantité de cadmium ajouté dans le milieu de culture avant l'inoculation de B. licheniformis.

### 5. 2. 3. Isolément de souches résistantes au cadmium

Au paragraphe 5. 2. 1. nous observons que B.licheniformis s<sub>4</sub>, en présence de 80 µg/ml de Cd, pousse avec un taux de croissance semblable à celui obtenu lors de la croissance dans un milieu dépourvu de métal lourd. Ce résultat obtenu après une longue phase de latence et indépendamment de la source de carbone (cf. tableaux 14 et 15) indique que la bactérie s'"adapte" à la toxicité du Cd.

Afin d'expliquer cette adaptation nous nous proposons d'isoler d'une population sauvage de B.licheniformis a<sub>4</sub> poussant avec du Cd, des souches résistantes à ce métal.

Dans des erlenmeyers de 500 ml contenant le milieu nutritif WA on ajoute soit 80 µg/ml de cadmium et de l'amidon à 1%, soit 10 µg/ml de Cd et du glucose à 0.5%. Après ensemencement du milieu avec une préculture on met les erlenmeyers sur un agitateur à 37<sup>0</sup>C à 300 RPM. A la fin de la phase exponentielle on fait une série de dilutions que l'on met sur boîte de Pétri. Après incubation de 3 jours à 37<sup>0</sup>C on observe sur l'agar des colonies blanches, les unes avec beaucoup de mucus, les autres d'aspect sec et ridé. On en choisit 5 isolées du milieu WA à l'amidon et 9 isolées du milieu au glucose (cf. tableau 18).

Afin de s'assurer de la pureté de ces souches et d'éviter une adaptation phénotypique au Cd on les repique 3 fois sur boîte de Pétri contenant du Nutrient Agar sans Cd. Les souches isolées sont conservées dans des éprouvettes sur de l'agar incliné à 4<sup>0</sup>C.

Aucune nouvelle détermination des souches n'est faite pour s'assurer qu'elles appartiennent à l'espèce B.licheniformis car, après plusieurs répétitions de cette expérience, on a toujours isolé les mêmes différents types de colonies décrits au tableau 18.

**Tableau 18** : Description des souches de B.licheniformis s<sub>4</sub> isolées du milieu WA contenant du cadmium et comme source de carbone soit de l'amidon à 1% (1A<sub>x</sub>) soit du glucose à 0.5% (1G<sub>x</sub>).

Souche	Morphologie de la colonie	Présence de mucus
1A <sub>1</sub>	ronde et blanche	-
1A <sub>2</sub>	blanche à contour irrégulier ourlé de lichens	+
1A <sub>3</sub>	forme irrégulière avec présence à la surface de ridea très serrées	-
1A <sub>4</sub>	même type que 1A <sub>2</sub>	+
1A <sub>5</sub>	même type que 1A <sub>3</sub>	-
1G <sub>1</sub>	forme irrégulière sans ride	+
1G <sub>2</sub>	même type que 1A <sub>2</sub>	+
1G <sub>3</sub>	"	+
1G <sub>4</sub>	"	+
1G <sub>5</sub>	"	+
1G <sub>7</sub>	"	+
1G <sub>8</sub>	"	+
1G <sub>9</sub>	"	+
1G <sub>10</sub>	"	+

### 5. 2. 3. 1. Mise en évidence des souches résistantes au cadmium

On teste en éprouvette la résistance au cadmium des souches isolées précédemment. La répartition du milieu de culture dans les tubes à essai et des solutions de Cd sont données au point 3. 3. (cf. Matériel et Méthodes). Les conditions de culture et les concentrations de Cd sont les mêmes que sous 5. 1. 2. 4.

Pendant la période d'incubation à 37°C on note la croissance des différentes souches de B. licheniformis a<sub>4</sub> en observant la turbidité du milieu de culture.

Les résultats sont présentés au tableau 19.

Parmi les 14 souches examinées on distingue 4 groupes de souches en fonction de la réponse de leur croissance au cadmium. Les groupes englobent les souches suivantes :

- groupe 1 : 1A<sub>1</sub>, 1A<sub>3</sub>, 1A<sub>5</sub>, 1G<sub>2</sub> et 1G<sub>7</sub> qui présentent un caractère d'adaptation au cadmium se traduisant par une croissance rapide.
- groupe 2 : 1G<sub>1</sub> et 1G<sub>9</sub> qui présentent un caractère d'adaptation "retardée" se traduisant par un début de croissance non immédiat mais plus rapide que celui de la souche sauvage (WA, WG).
- groupe 3 : les souches 1A<sub>2</sub> et 1G<sub>14</sub> qui réagissent comme la souche sauvage. Le début de leur croissance coïncide avec celui de la souche sauvage.
- groupe 4 : les souches 1A<sub>4</sub>, 1G<sub>3</sub>, 1G<sub>4</sub>, 1G<sub>5</sub> et 1G<sub>8</sub> qui ne présentent aucune croissance durant la période expérimentale examinée (9 jours).

En comparant les tableaux 18 et 19 on remarque que :

- les souches appartenant au groupe 1, 1A<sub>1</sub>, 1A<sub>3</sub> et 1A<sub>5</sub> forment toutes des colonies dépourvues de mucus. Les colonies formées par 1A<sub>3</sub> et 1A<sub>5</sub> ont une morphologie identique mais différente de celle de 1A<sub>1</sub>. Les souches poussant sur du glucose, 1G<sub>2</sub> et 1G<sub>7</sub> possèdent des colonies à mucus de morphologie pareille à celle formée par la souche sauvage.
- les souches appartenant aux groupes 2, 3 et 4 forment des colonies à mucus identiques à celle de la souche sauvage.

**Tableau 19** : Influence du cadmium (80 µg/ml dans le milieu à l'amidon et 10 µg/ml dans le milieu au glucose), en fonction du temps d'incubation, sur la croissance de B.licheniformis s<sub>4</sub> et sur des souches isolées du milieu de culture contenant du cadmium

Souche	Durée d'incubation (jour)							
	1	2	3	4	7	8	9	
wA	-	-	+	+	+	+	+	
1A <sub>1</sub>	+	+	+	+	+	+	-	
1A <sub>2</sub>	-	-	+	+	+	+	+	
1A <sub>3</sub>	+	+	+	+	+	+	-	
1A <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-	-	
1A <sub>5</sub>	+	+	+	+	+	+	+	
wG	-	-	-	-	+	+	+	
1G <sub>1</sub>	-	-	+	+	+	+	+	
1G <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	+	
1G <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	-	
1G <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-	-	
1G <sub>5</sub>	-	-	-	-	-	-	-	
1G <sub>7</sub>	+	+	+	+	+	+	+	
1G <sub>8</sub>	-	-	-	-	-	-	-	
1G <sub>9</sub>	-	+	+	+	+	+	+	
1G <sub>10</sub>	-	-	-	-	+	+	+	

wA = souche sauvage, B.licheniformis s<sub>4</sub>, poussant sur amidon à 1%  
 1A<sub>x</sub> = souches isolées du milieu WA contenant 80 µg Cd/ml  
 wG = souche sauvage, B.licheniformis s<sub>4</sub>, poussant sur glucose à 0.5%  
 1G<sub>x</sub> = souches isolées du milieu WA glucosé contenant 10 µg Cd/ml  
 - = pas de croissance  
 + = croissance

Les souches appartenant au groupe 4, ne poussent plus lorsqu'on les transfère isolément dans un milieu riche en cadmium de même composition que le milieu dont on les a isolées. Il se pourrait que les souches appartenant aux groupes 1, 2 et 3 protègent celles du groupe 4 de la toxicité du cadmium en produisant des substances qui lient ou chélatent le cadmium ou en accumulant le métal dans leur cellule. Ces processus d'adaptation provoqueraient une diminution de la concentration de cadmium du milieu de culture qui ne serait plus toxique pour les souches appartenant au groupe 4

En fonction de ces résultats on ne remarque aucune particularité ayant trait à la morphologie des colonies ou à la synthèse de mucus, qui pourrait différencier les souches résistantes de celles non adaptées au Cd.

Vu qu'on a effectué plusieurs repiquages en conditions non sélectives, la résistance au cadmium acquise par les souches à phase de latence raccourcie est stable. Ces souches sont donc des mutants de B. licheniformis s<sub>4</sub>.

#### 5. 2. 3. 2. Propriétés des souches mutantes au cadmium

Afin d'élucider le mécanisme de résistance au Cd on choisit une souche mutante à ce métal, 1A<sub>1</sub>. Les propriétés de cette souche sont comparées avec celles de la souche sauvage de B. licheniformis s<sub>4</sub>. Entre ces deux souches nous voulons voir si on trouve une variation dans :

- les propriétés de perméabilité de l'enveloppe cellulaire (membrane et paroi)
- la composition en acides aminés de leurs protéines cytoplasmiques.

Dans des erlenmeyers de 500 ml contenant le milieu nutritif WA et de l'amidon à 1% on ajoute 0,7 µg Cd/ml. On choisit cette faible concentration pour éviter de sélectionner des souches adaptées au Cd parmi la population sauvage de B. licheniformis s<sub>4</sub>. Les milieux de culture sont inoculés avec 1A<sub>1</sub> ou WA. Les conditions de croissance sont décrites sous le point 3. 4. (cf. Matériel et Méthodes). La température de croissance est de 37<sup>0</sup>C.

Chaque 2 heures on retire, de l'agitateur, un erlenmeyer. On mesure la densité cellulaire de la culture et on centrifuge immédiatement le reste à 6000 g pendant 25 minutes à 4<sup>0</sup>C pour l'analyse du cadmium libre (cf. Matériel et Méthodes).

Les résultats de cette expérience sont donnés par les figures 12 et 13.

Pour les deux souches sauvage et mutante de B. licheniformis s<sub>4</sub> on observe une diminution des ions Cd<sup>2+</sup> dans le milieu de croissance. On constate un léger relèvement de la concentration de cadmium à la fin de la croissance (cf. figure 12). Lorsqu'on analyse le cadmium lié au matériel cellulaire (cf. figure 13) on y remarque, en début d'expérience, une forte concentration de cadmium puis cette concentration diminue rapidement avec la durée d'incubation. Entre 4 et 10 heures d'incubation la biomasse augmente d'un facteur 8 pour la souche sauvage et de 6.7 pour la souche mutante alors que la concentration du cadmium dans le matériel cellulaire diminue seulement d'un facteur de 0.75 et de 0.60 chez respectivement la souche sauvage et la souche mutante.

De plus si l'on considère le cadmium qui est lié aux cellules au début et à la fin de la croissance, on remarque qu'après 10 heures de croissance les cellules de la souche sauvage et celles de la souche mutante lient respectivement 2.7 et 6.5 fois moins de cadmium qu'après 2 heures de croissance. La souche résistante au Cd, 1A<sub>1</sub> accumule légèrement moins de Cd dans sa matière sèche que la souche sauvage (figure 13). Au cours de la croissance on remarque un phénomène de "dilution" du cadmium dans la matière sèche. On observe cependant que la biomasse augmente linéairement avec le temps d'incubation ce qui n'est pas le cas pour la teneur en cadmium de la matière sèche. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la fixation du cadmium à la biomasse se fasse selon deux mécanismes:

- l'adsorption du cadmium à l'enveloppe cellulaire qui augmente avec la biomasse.
- le transport actif du cadmium dans la cellule qui varie avec le stade de croissance de la bactérie.

**figure 12** : Influence de la croissance des souches soit sauvage, soit mutante de B.licheniformis, sur la teneur en Cd soluble du milieu de culture.

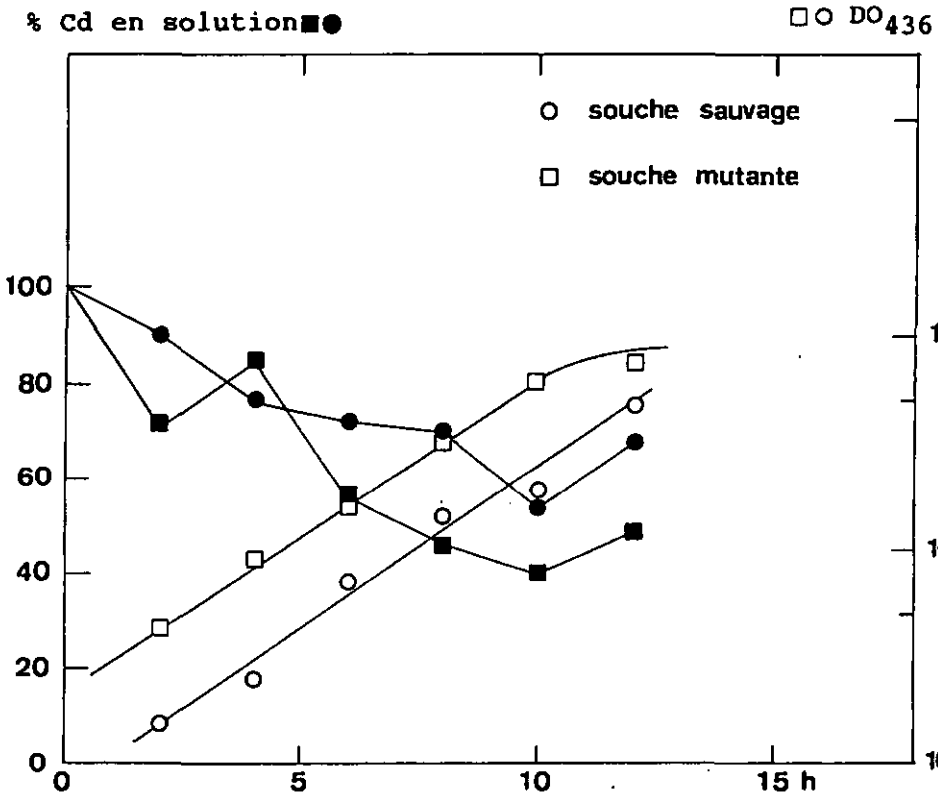
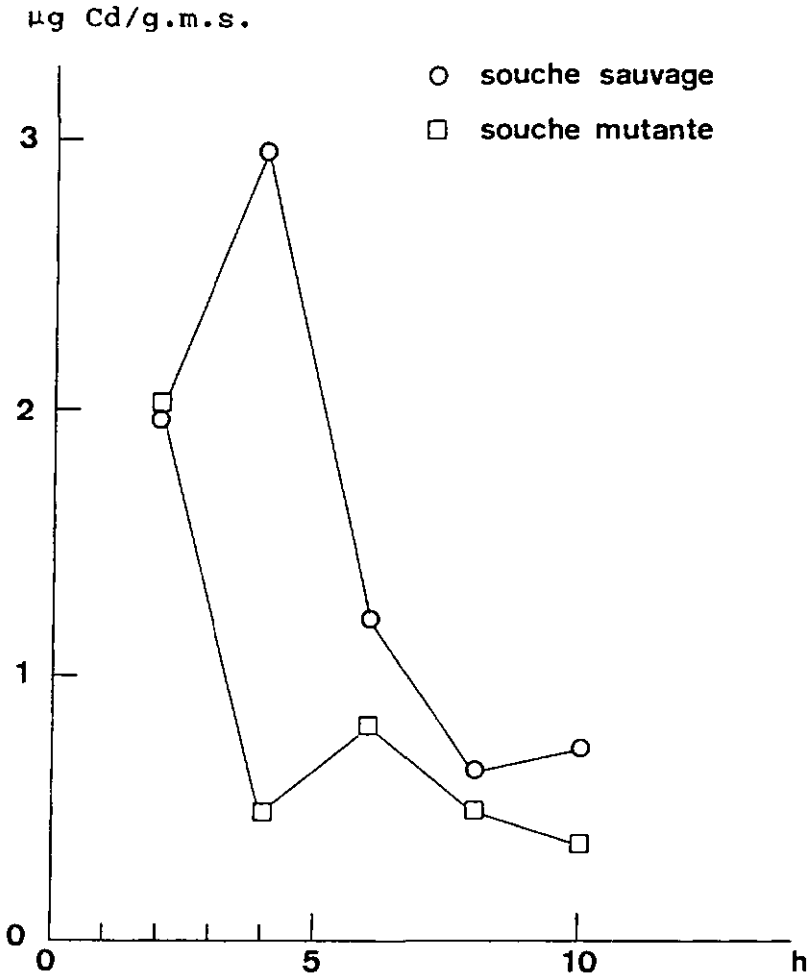


figure 13 : Teneur en Cd de la matière sèche des cellules, soit de la souche sauvage, soit de la souche mutante de B.licheniformis.



Si le phénomène de résistance au cadmium s'exprime réellement par une dilution de cet élément dans la biomasse on ne peut pas, à l'aide de cette expérience, analyser sa répartition et son accumulation dans les différentes fractions cellulaires.

Dans l'expérience précédente on remarque, après avoir ajouté au milieu de culture 0.7  $\mu\text{g}$  Cd/ml, qu'environ 50% de ce cadmium se lie au matériel cellulaire de la souche mutante. On se demande alors si cette dernière ne posséderait pas dans son cytoplasme des protéines pouvant complexer le cadmium, l'empêchant ainsi d'exercer sa toxicité. Ces protéines seraient de type métallothionéine donc riches en groupements sulfhydryles. Afin de vérifier cette hypothèse on teste, pour les deux souches, s'il y a une différence dans la composition en acides aminés de leurs protéines cytoplasmiques. Parmi les acides aminés on choisit d'analyser d'une part l'alanine et la glycine dont la teneur dans les protéines ne devraient pas être influencées par les métaux lourds et d'autre part la cystéine et la méthionine, acides aminés à groupement sulfhydryle dont la concentration dans les protéines pourrait augmenter.

Dans des erlenmeyers de 500 ml on inocule le milieu WA contenant de l'amidon à 1% avec les souches  $\lambda_1$  ou WA. On met en culture les milieux à 37°C sur un agitateur à 300 RPM.

Lorsque les bactéries se situent au milieu de la phase exponentielle de croissance ( $\text{DO}_{436} = 1$ ) on ajoute, à la culture une solution de  $\text{CdCl}_2$  de façon à avoir une concentration finale de 3  $\mu\text{g}$  Cd/ml. On remet les erlenmeyers sur l'agitateur dans les mêmes conditions de croissance que précédemment.

Les échantillons sont prélevés soit immédiatement après l'adjonction de Cd soit en fin de phase exponentielle. Après avoir mesuré leur densité optique à 436 nm, on centrifuge 20 ml à 4°C pendant 25 minutes à 6000 g. On conserve le culot qu'on lave 2 fois avec du tampon phosphate 50 mM, pH 7 (cf. Matériel et Méthodes). Après l'avoir resuspendu dans 20 ml de tampon on le stocke pendant la nuit à -20°C.

Les acides aminés alanine, glycine et ceux à groupement sulfhydryle des protéines cellulaires sont analysés selon les méthodes citées dans Matériel et Méthodes.

**Tableau 20** : Influence du cadmium sur la teneur en acides aminés à groupement sulfhydryle des protéines solubles des souches mutante  $1A_1$  et sauvage wA de S. licheniformis.

Souche	Ac. cystéique		Sulfone de méthionine	
	$\mu M$		$\mu M$	
	phase exponentielle	phase stationnaire	phase exponentielle	phase stationnaire
Sauvage	22.74	78.30	27.61	99.33
Mutante	25.84	42.50	30.00	60.63

Par cette méthode d'analyse des acides aminés à groupements -SH, on obtient l'acide cystéique qui correspond à la somme de la cystéine et de la cystine et la sulfone de méthionine équivalent à la méthionine.

Vu que la quantité en protéines des échantillons analysés n'a pas été déterminée, on choisit la somme de la teneur en alanine et en glycine comme référence pour calculer la quantité d'acides aminés à groupement sulfhydryle de chaque échantillon. Pour cela, on émet l'hypothèse que la teneur en glycine et en alanine des protéines solubles n'est pas influencée par le cadmium.

Pour estimer la teneur en acides aminés à groupement sulfhydryle, on procède comme suit :

- on calcule le rapport suivant :

$$\frac{(Ala + Gly)_s}{(Ala + Gly)_m} = r$$

avec (Ala + Gly) = quantité d'alanine plus celle de glycine analysée dans l'échantillon soit de la souche sauvage (Ala + Gly)<sub>s</sub> soit de la souche mutante (Ala + Gly)<sub>m</sub>.

r = rapport entre les deux

- puis  $(Cys + Met)_s = r.Cys_s + r.Met_s$

$$(Cys + Met)_m = Cys_m + Met_m$$

avec  $(Cys + Met) =$  quantité d'acide cystéique plus de celle de sulfone de méthionine chez la souche sauvage (s) ou chez la souche mutante (m).

Cys = quantité d'acide cystéique mesurée dans l'échantillon de la souche sauvage (s) et de la souche mutante (m).

Ces calculs se font successivement pour les échantillons pris en phase exponentielle tout de suite après l'adjonction du cadmium puis pour ceux prélevés en phase stationnaire.

Les résultats (cf. tableau 20) ne montrent aucune différence entre les souches WA et 1A<sub>1</sub> pour la teneur en acides aminés à groupement sulfhydryle pour les échantillons prélevés immédiatement après l'adjonction des ions Cd<sup>2+</sup>. A la fin de la phase stationnaire WA possède 1.7 fois plus d'acides aminés à groupement -SH que 1A<sub>1</sub>. Ces résultats sont contraires à ceux que nous avions espéré.

Il se pourrait, cependant, que ce ne soit pas la quantité de groupements sulfhydryles analysés dans l'ensemble des protéines qui soit importante ici mais celle que l'on mesurerait dans des protéines spécifiques responsables pour la détoxification du cadmium dans les cellules bactériennes. Nous aurions pu éclaircir cette hypothèse en essayant, à différents moments des phases exponentielle et stationnaire de la croissance, d'étudier la composition des protéines dans les souches mutante et sauvage. Nous aurions pu voir, en fonction du stade de croissance, si il y avait apparition d'une protéine chez la souche mutante qui était non existante chez la souche sauvage.

### 5. 3. Influence du cuivre sur la croissance.

Pour cette étude nous procédons de la même manière que pour le cadmium. Les différentes étapes de ce travail sont les suivantes:

- trouver, pour deux sources de carbone - glucose et amidon - le domaine de concentrations, pour lequel on a un effet positif ou négatif sur le développement bactérien et la synthèse de l'  $\alpha$ -amylase
- rechercher l'effet du cuivre sur les paramètres de croissance
- établir les valeurs de CLT, IC<sub>20</sub> et IC<sub>50</sub> pour la croissance intrinsèque de B. licheniformis s<sub>4</sub> et pour la croissance en présence d'amidon.
- voir l'influence de la croissance de B. licheniformis sur la teneur soluble en cuivre du milieu de culture.

La première étape est une étude qualitative.

Dans des éprouvettes contenant le milieu nutritif WA (cf. Matériel et Méthodes) et une source de carbone on ajoute des solutions de chlorure de cuivre. Les concentrations finales de cuivre dans le milieu nutritif vont de 0.0625  $\mu\text{g/ml}$  à 1.25  $\mu\text{g/ml}$  selon une progression géométrique. La répartition des différentes solutions entrant dans la composition du milieu nutritif et les conditions de culture sont mentionnées sous le point 3. 4. (cf. Matériel et Méthodes).

La température d'incubation est de 37<sup>0</sup>C. Durant le temps d'incubation on note la croissance bactérienne en observant la turbidité du milieu de culture.

Les résultats de cet essai sont présentés au tableau 21.

**Tableau 21** : Action du cuivre sur la croissance de B. licheniformis s<sub>4</sub> poussant sur le milieu liquide WA additionné soit d'amidon à 1% (A) soit de glucose à 0.5% (G). Cette expérience est réalisée en éprouvette sur un agitateur.

Cuivre µg/ml	Durée d'incubation (jour)									
	0		1		2		3		4	
	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G
1.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.625	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
0.3125	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.25	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.125	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.0625	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Entre 0.0625 µg/ml et 0.625 µg/ml le cuivre n'exerce pas d'influence négative sur la croissance ni dans le milieu au glucose ni dans le milieu à l'amidon. A 0.625 µg Cu/ml, la croissance est retardée de 24 heures sur le milieu à l'amidon lorsqu'on la compare avec celle de B. licheniformia s<sub>4</sub> dans le milieu nutritif sans métal.

Quel que soit le substrat on n'a pas de croissance en présence de 1.25 µg Cu/ml même après 4 jours de mise en culture.

Cette expérience indique que le cuivre déploie une grande toxicité sur la croissance de B.licheniformia s<sub>4</sub> et plus spécialement lorsque la bactérie pousse sur le milieu à l'amidon.

Le système enzymatique de l'α-amylase donne l'impression d'être plus sensible au cuivre que la croissance intrinsèque de la bactérie.

5. 3. 1. Influence du cuivre sur les paramètres de croissance.

Ce travail vise à rechercher sur quel paramètre de la croissance de B.licheniformis s<sub>4</sub> le cuivre exerce sa grande toxicité afin de mieux cerner son mécanisme d'action.

Dans des erlenmeyers de 500 ml avec chicanes contenant le milieu WA soit au glucose soit à l'amidon on ajoute des solutions de cuivre. Les concentrations finales de cuivre dans le milieu nutritif WA sont notées dans les tableaux 22 et 23.

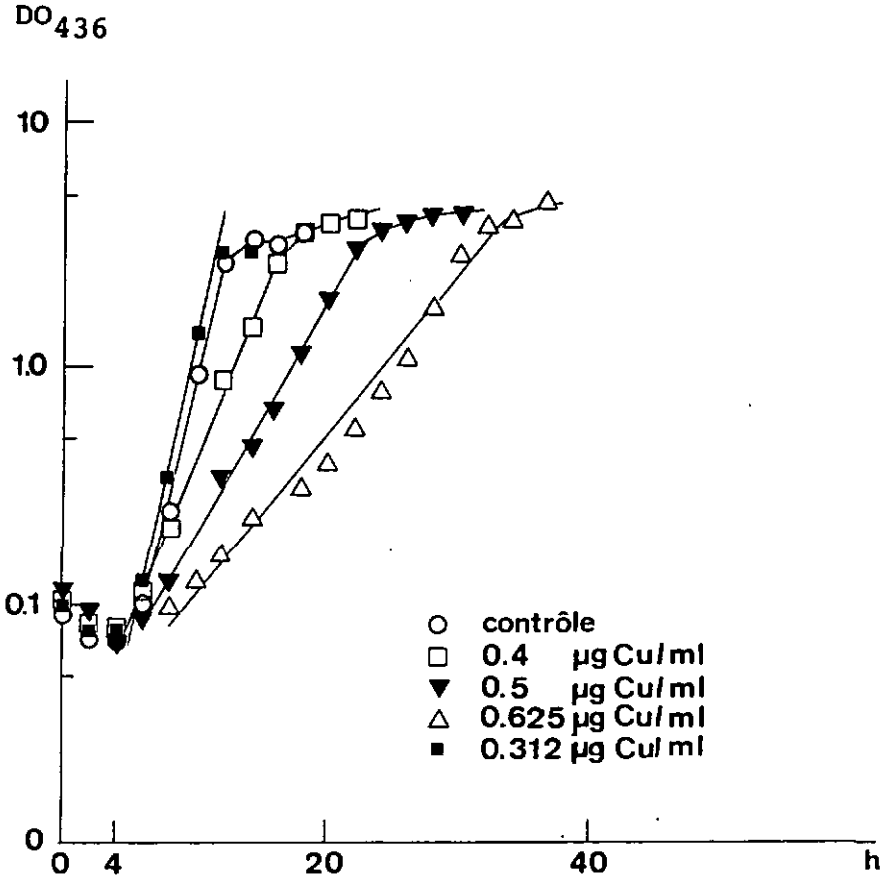
La mise en culture et les conditions de croissance sont décrites sous le point 3. 4. (Matériel et Méthodes). La température de croissance est de 37<sup>0</sup>C.

Les résultats de ces travaux sont résumés aux tableaux 22 et 23 et aux figures 14 et 15.

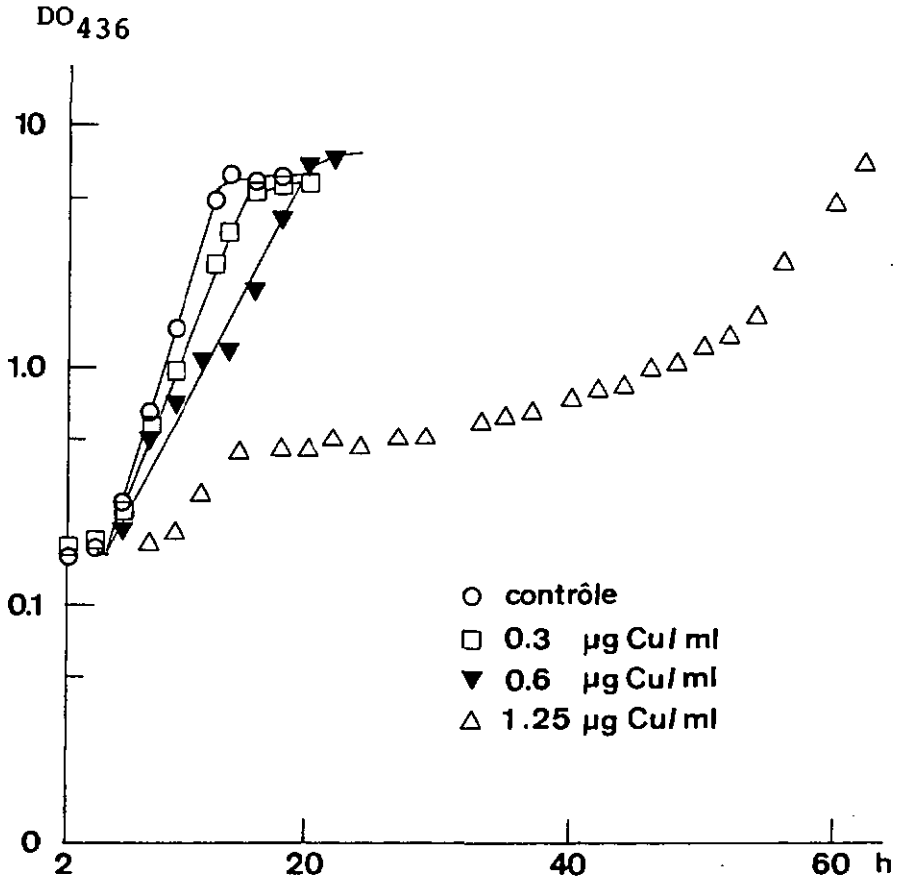
Tableau 22 : Effet du cuivre sur les paramètres de croissance de B.licheniformis s<sub>4</sub> poussant sur le milieu liquide WA additionné de glucose à 0.5%.

Cuivre µg/ml	Phase de latence	Taux de croissance	
	h	h <sup>-1</sup>	%
0	5.36	0.44	100
0.00125	6.00	0.55	125
0.0125	6.00	0.55	125
0.078125	5.36	0.54	123
0.15625	6.00	0.54	123
0.3125	6.00	0.53	120
0.4	6.00	0.32	73
0.5	6.48	0.21	48
0.625	9.36	0.14	31.8

**figure 14** : Influence du cuivre sur la croissance de B.licheniformis s<sub>4</sub> poussant dans le milieu liquide WA au glucose (0.5%).



**figure 15** : Influence du cuivre sur la croissance de B.licheniformis s<sub>4</sub> poussant dans le milieu liquide WA à l'amidon (1%).



**Tableau 23** : Effet du cuivre sur les paramètres de croissance de B. licheniformis  $s_4$  poussant sur le milieu liquide WA additionné d'amidon.

Cuivre $\mu\text{g/ml}$	Phase de latence h	Taux de croissance	
		$\text{h}^{-1}$	%
0	5.30	0.40	100
0.00125	5.30	0.38	95
0.005	5.30	0.40	100
0.0125	5.30	0.39	97.5
0.03	5.30	0.39	97.5
0.078125	5.30	0.39	97.5
0.125	5.30	0.36	90
0.15625	5.30	0.38	95
0.3125	5.30	0.31	77.5
0.625	6.00	0.23	57.5
1.25	6.30	0.13	32.5
2.50	31.30	0.02	5

On remarque que le cuivre a une influence différente sur la croissance de B. licheniformis  $s_4$  poussant dans le milieu au glucose de celle qui se déroule dans le milieu WA à l'amidon.

Entre 0.0125 et 0.3125  $\mu\text{g Cu/ml}$  de milieu au glucose, on a une élévation du taux de croissance jusqu'à 125% de celui de B. licheniformis  $s_4$  poussant sans cuivre. Pour des concentrations supérieures à 0.3125  $\mu\text{g/ml}$  on a une diminution brutale du taux de croissance.

La croissance dans le milieu à l'amidon est influencée moins brutalement par le cuivre. Entre 0.00125 et 0.125  $\mu\text{g/ml}$  le taux de croissance ne varie pas significativement. Entre 0.15625 et 2.5  $\mu\text{g/ml}$  la diminution est moins brutale qu'avec le glucose.

Dans le domaine de concentrations étudié la durée de la phase de latence n'est pas beaucoup influencée par le cuivre, excepté pour 2.5  $\mu\text{g/ml}$  où elle représente environ 6 fois celle obtenue lors de la croissance de B. licheniformis  $s_4$  poussant dans le milieu WA à l'amidon sans métal.

Cette réponse de la croissance au cuivre suggère que la bactérie ne réagit pas immédiatement au métal par un phénomène d'adaptation. Le cuivre pénètre dans la cellule, par un système spécifique de transport. Dans la cellule il est rapidement lié à des substances qui fonctionnent comme donneurs de métal pour les systèmes enzymatiques. Sa concentration dans la cellule reste plus ou moins constante mais si la concentration du métal extracellulaire augmente le cuivre peut devenir très toxique.

Le taux de croissance est réduit de 52% avec 0.5  $\mu\text{g}$  Cu/ml dans le milieu WA au glucose et de 67.5% avec 1.25  $\mu\text{g}$ /ml dans le milieu à l'amidon sans que la durée de la phase de latence soit rallongée.

### 5. 3. 1. 1. Détermination de CLT, IC<sub>20</sub> et IC<sub>50</sub>

Ce travail permet de déterminer lequel des paramètres étudiés - la croissance intrinsèque, la synthèse ou l'activité enzymatiques - est le plus sensible au cuivre.

Une série d'expériences est réalisée pour trouver les valeurs de CLT, IC<sub>20</sub> et IC<sub>50</sub>. Dans des erlenmeyers de 500 ml avec chicanes contenant le milieu WA et comme source de carbone soit du glucose soit de l'amidon, on ajoute des solutions de cuivre. Les concentrations finales de cuivre dans le milieu de croissance sont données aux figures 16 et 17.

Le modèle expérimental et les conditions de croissance sont décrits sous le point 3. 4. (cf. Matériel et Méthodes). La température de croissance est de 37°C.

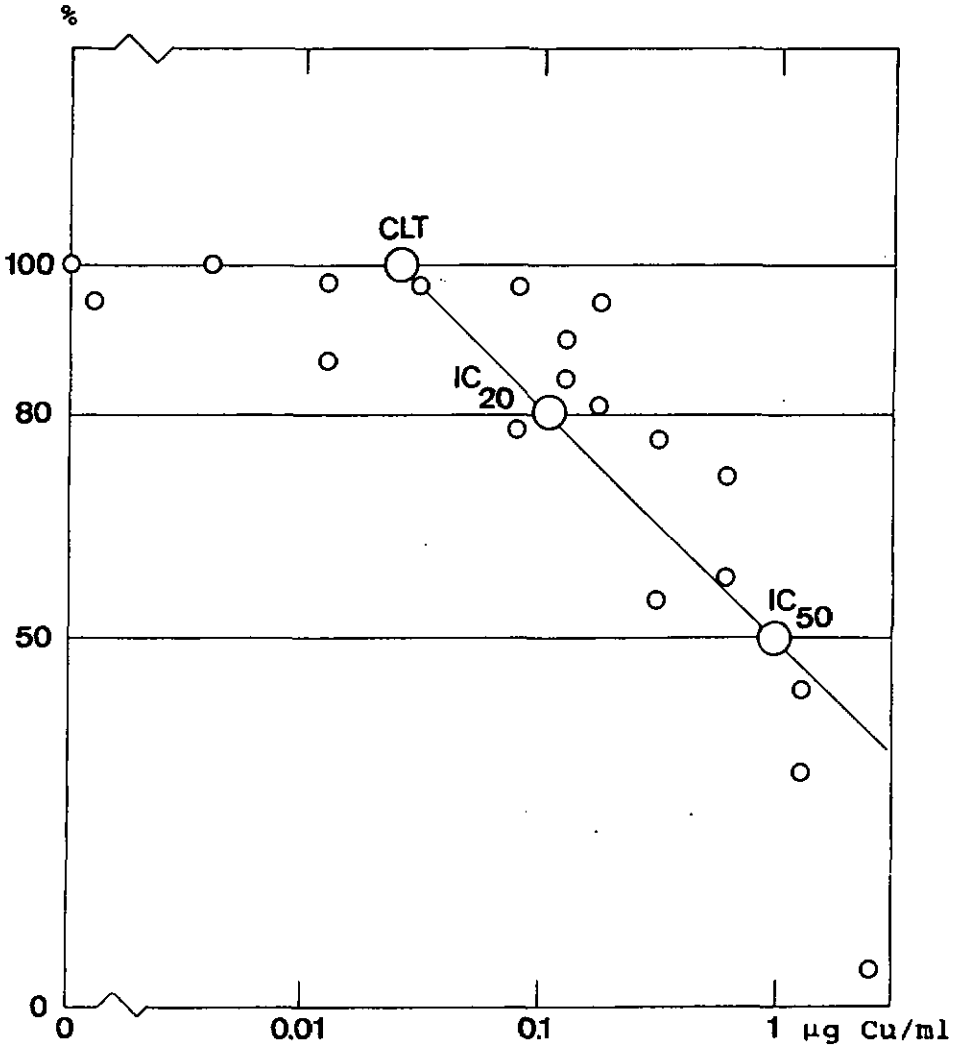
Les valeurs CLT, IC<sub>20</sub> et IC<sub>50</sub> sont déterminées, comme avec le cadmium, par le calcul.

Les résultats sont présentés aux figures 16 et 17.

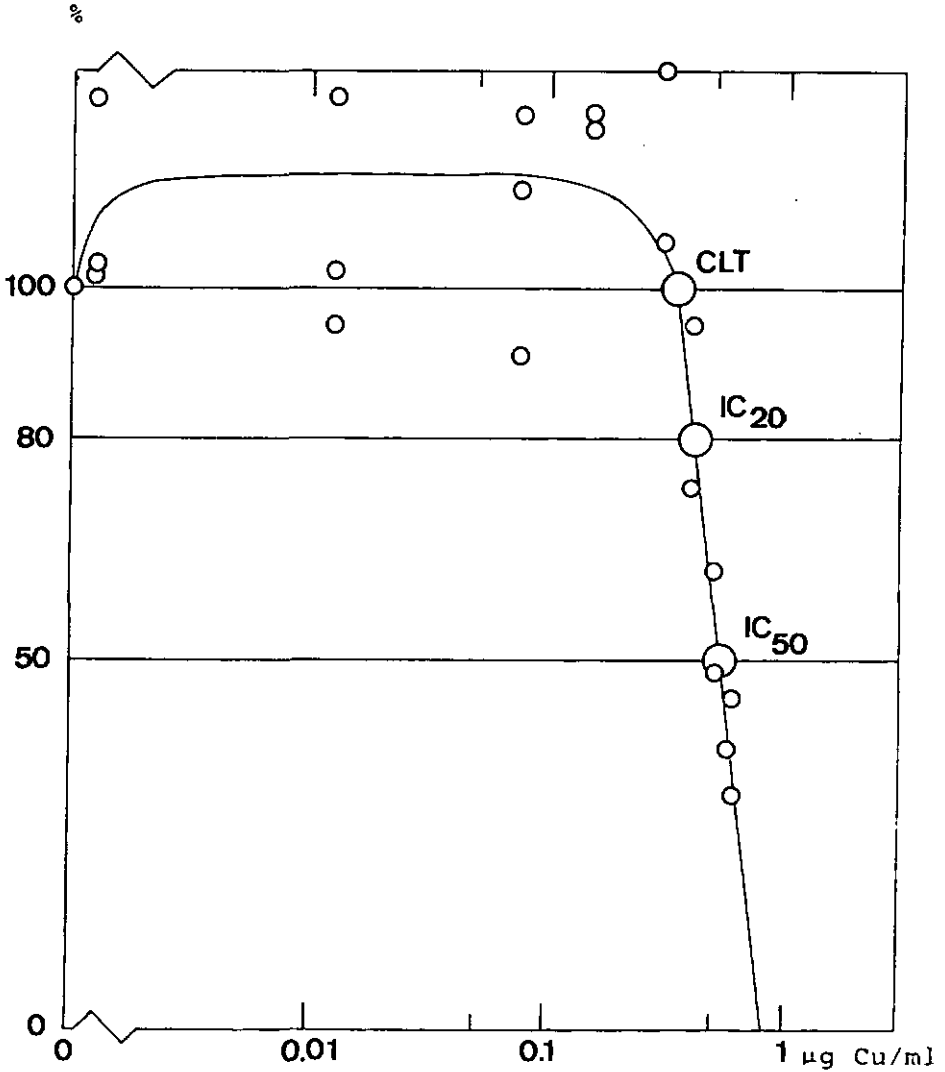
On remarque que la concentration limite de toxicité (CLT) est de 0.03  $\mu\text{g}$  Cu/ml pour la croissance de B. licheniformis s<sub>4</sub> sur le milieu WA à l'amidon (cf. figure 15) et de 0.34  $\mu\text{g}$ /ml pour la croissance sur le milieu au glucose (cf. figure 16).

Il faut 2 et 1.36 fois plus de cuivre dans le milieu glucosé que dans celui à l'amidon pour obtenir une même inhibition du taux de croissance bactérien respectivement de 20 et de 50%.

**figure 16** : Influence du cuivre sur le taux de croissance ( $\mu$ ) de *B.liche-niformis* s<sub>4</sub> poussant dans le milieu liquide WA à l'amidon (1%).  $\mu$  est exprimé en valeur relative (100% correspondent au  $\mu$  de la bactérie poussant dans le milieu de culture dépourvu de Cd).



**figure 17** : Influence du cuivre sur le taux de croissance ( $\mu$ ) de *B.liche-niformis*  $s_4$  poussant dans le milieu liquide WA au glucose (0.5%).  $\mu$  est exprimé en valeur relative (100% correspondent au  $\mu$  de la bactérie poussant dans le milieu de culture dépourvu de Cd).



Ces résultats prouvent que soit la synthèse soit l'activité de l' $\alpha$ -amylase est plus sensible au cuivre que la croissance intrinsèque de cette bactérie. Ils correspondent à ceux obtenus lors de l'analyse qualitative (étude en éprouvette).

### 5. 3. 2. Influence de la croissance de *B. licheniformis* s<sub>4</sub> sur la solubilité du cuivre.

Cette étude a pour objet de suivre l'évolution du cuivre en solution au cours de la croissance de *B. licheniformis* s<sub>4</sub> dans le milieu nutritif WA contenant de l'amidon à 1%.

Dans des erlenmeyers de 500 ml avec chicanes on inocule avec une préculture de *B. licheniformis* s<sub>4</sub> (cf. Matériel et Méthodes) le milieu WA à l'amidon contenant 0.2  $\mu\text{g}$  Cu/ml. On met la culture sur un agitateur à 37°C (cf. Matériel et Méthodes).

Aux temps 0, 2, 4, 6, 8 et 14 heures on analyse la teneur en cuivre en solution dans le surnageant et dans la matière sèche (cf. Matériel et Méthodes).

L'analyse du cuivre soluble sous forme de ions n'a pas pu être analysée, comme pour le cadmium, par polarographie. On suppose que la présence, dans le surnageant, de polysaccharides provenant des parois bactériennes dérange cette mesure. On décide donc d'analyser le cuivre en solution dans le surnageant, après centrifugation de l'échantillon (cf. Matériel et Méthodes), avec le spectrophotomètre d'absorption atomique (SAA).

On détermine la teneur en cuivre de la matière sèche comme suit:

$$x_t = \frac{0.2 - y_t}{m_t}$$

avec  $x_t$  =  $\mu\text{g}$  Cu/g.m.s. de cellules au temps  $t$   
0.2 = quantité de cuivre ajoutée en début d'expérience en  $\mu\text{g}/\text{ml}$   
 $y_t$  =  $\mu\text{g}$  Cu en solution/ml de surnageant au temps  $t$   
 $m_t$  = matière sèche en mg/ml au temps  $t$

Les résultats sont présentés au tableau 24 et à la figure 18.

**Tableau 24** : Influence de la croissance de B. licheniformis s<sub>4</sub>, poussant sur le milieu WA à l'amidon, sur la teneur en cuivre du milieu de culture après adjonction de 0.2 µg Cu /ml.

Matière sèche mg/ml	Cuivre soluble µg/ml	1) %
0.0432	0.18	90
0.115	0.15	75
0.251	0.13	65
0.552	0.09	45
1.001	0.09	-

1) 100 % correspondent à la quantité de cuivre ajouté dans le milieu de culture avant l'inoculation de B. licheniformis

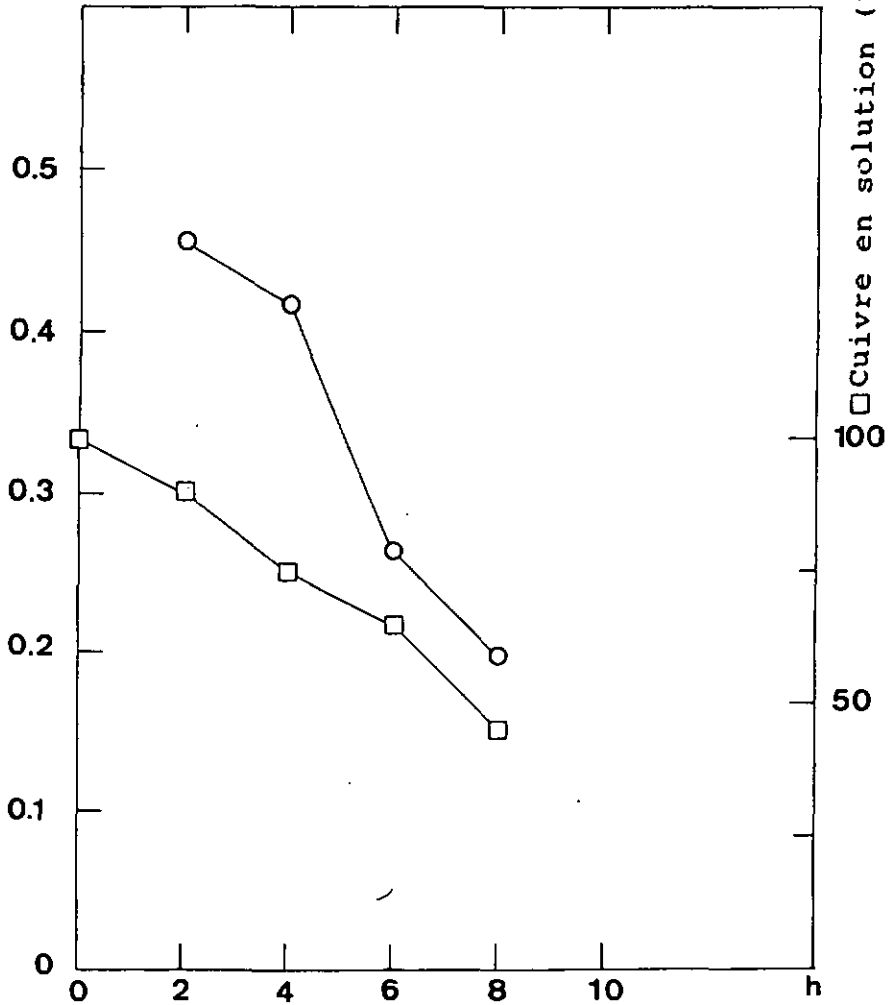
On remarque que le cuivre pénètre très rapidement dans le matériel cellulaire (cf. figure 18). Après 8 heures de croissance 55% de cuivre est associé aux cellules. La diminution de la teneur totale du cuivre dans le milieu de culture est fonction de la biomasse.

Après 8 heures d'expérience il n'est plus possible d'analyser l'accumulation du cuivre dans la matière sèche bactérienne. La quantité de cuivre en solution dans le surnageant est en dessous du domaine de sensibilité de mesure du spectrophotomètre d'absorption atomique.

Comme pour le cadmium, on observe que la croissance bactérienne en causant une diminution de la teneur en cuivre du milieu de culture peut protéger des germes sensibles au cuivre vivant à proximité de B. licheniformis.

figure 18 : Influence de la croissance de B.licheniformis s<sub>4</sub> sur la teneur en cuivre soit dissous dans la solution nutritive soit dans la matière sèche des cellules.

○  $\mu\text{g Cu/g.m.s.}$



#### 5. 4. Etude de l'activité $\alpha$ -amylasique de *B. licheniformis* S<sub>4</sub>

Après avoir examiné l'influence du cuivre et du cadmium sur la croissance de *B. licheniformis* on s'intéresse à voir leur effet sur l'activité  $\alpha$ -amylasique de cette bactérie, deuxième paramètre biologique choisi.

Cette étude a pour buts d'étudier :

- l'activité de l' $\alpha$ -amylase au cours de la croissance de *B. licheniformis* S<sub>4</sub>
- l'effet du cadmium et du cuivre sur l'activité enzymatique.

Dans les expériences précédentes on a analysé l'effet des métaux lourds sur la croissance de *B. licheniformis* S<sub>4</sub> dans le milieu nutritif WA contenant soit du glucose à 0,5% soit de l'amidon à 1% afin de pouvoir dissocier l'effet de ces éléments sur la croissance et sur le système amylasique. La croissance bactérienne sur le milieu WA à l'amidon ne permet, cependant, pas de différencier la synthèse de l'activité enzymatique. En effet lorsqu'on observe une inhibition du métal sur le taux de croissance de *B. licheniformis* S<sub>4</sub> poussant sur le milieu WA à l'amidon on ne peut pas distinguer si le métal a une action :

- sur la répression de la synthèse enzymatique
- sur une inhibition de l'activité de l'enzyme synthétisée.

Afin de connaître lequel de ces deux paramètres est le plus sensible aux métaux lourds, on décide d'examiner l'effet du cadmium et du cuivre sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase synthétisée dans le milieu de culture par *B. licheniformis* S<sub>4</sub>.

#### 5. 4. 1. Etude de l'activité $\alpha$ -amylasique

Dans un fermenteur de type mini Bioreactor, on ensemence avec une préculture de B.licheniformis s<sub>4</sub> le milieu WA contenant de l'amidon à 1%. La température d'incubation est maintenue à 37<sup>0</sup>C et le pH de la culture à 6,6 (cf. Matériel et Méthodes). Les échantillons sont prélevés toutes les deux heures pour l'analyse de la densité optique, la teneur en protéines et l'activité de l' $\alpha$ -amylase (cf. Matériel et Méthodes). L'activité  $\alpha$ -amylasique spécifique est exprimée en mg d'amylase disparu par heure et par mg de protéines.

Les résultats sont présentés à la figure 19.

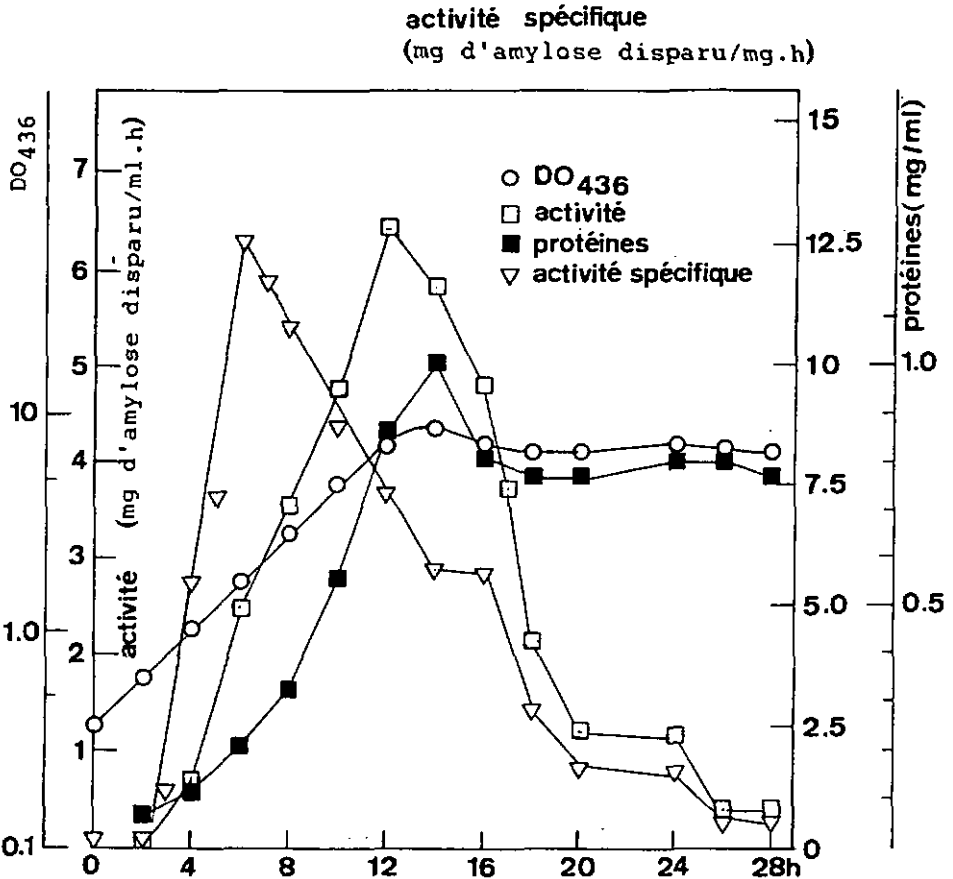
Dans ces conditions expérimentales, l'activité enzymatique n'est pas mesurable lors des deux premières heures de la croissance bactérienne. L'activité spécifique augmente très rapidement dans la phase exponentielle de croissance. Après 6 heures elle atteint son maximum. Ensuite l'activité de l'amylase diminue lentement durant 22 heures sans atteindre la valeur zéro.

La synthèse de l' $\alpha$ -amylase par B.licheniformis durant la phase exponentielle correspond aux résultats trouvés par WELKER et al. (1963) avec B.stearothermophilus et par COLEMAN et al. (1962) avec B.subtilis. Ces auteurs ont aussi démontré que la synthèse de l' $\alpha$ -amylase se déroule durant la phase exponentielle de la croissance bactérienne.

Les données sont contraires à celles obtenues par NOMURA et al. (1956), MEERS (1972) et SAITO et al. (1975). Ces deux derniers auteurs montrent que la synthèse de l' $\alpha$ -amylase par B.licheniformis débute seulement lorsque les bactéries atteignent la phase stationnaire. Ils suggèrent que la production de l' $\alpha$ -amylase est réprimée par le glucose et par des sucres métabolisables de faible poids moléculaire. SAITO et al. (1975) ont cependant isolé des souches mutantes de B.licheniformis capables de synthétiser l' $\alpha$ -amylase durant la phase exponentielle de la croissance. La production enzymatique de ces souches mutantes n'étaient plus réprimées par le glucose.

L'activité  $\alpha$ -amylasique de B.licheniformis s<sub>4</sub> décroît dès que la densité optique à 436 nm atteint 1.8. Cette observation suggère une synthèse ralentie de l' $\alpha$ -amylase et une dénaturation de l'enzyme. En effet si on avait seulement une synthèse ralentie de l'enzyme on observerait, dans le milieu de culture non renouvelé, un fléchissement de la courbe exprimant l'activité amylasique. Vu qu'on observe une diminution de l'activité en fonction du temps l'enzyme initialement présente doit être dénaturée.

figure 19 : Activité de l' $\alpha$ -amylase de *B.licheniformis* s<sub>4</sub> dans le milieu WA à l'amidon (fermenteur, 37<sup>0</sup>C, 1070 RPM).



#### 5. 4. 2. Influence du cadmium sur l'activité $\alpha$ -amylasique

Pour tester l'effet du cadmium sur l'activité enzymatique on réalise une expérience en fermenteur comme décrite précédemment. L'effet du métal sur l'activité de l'  $\alpha$ -amylase est analysé dans le surnageant de la culture (cf. Matériel et Méthodes). Les concentrations finales de cadmium dans le mélange réactionnel enzymatique vont de 100 à 400  $\mu\text{g/ml}$  (cf. figure 20).

La réponse de l'activité enzymatique au cadmium est exprimée en valeur relative. Les 100 % d'activité correspondent à la valeur trouvée pour l'analyse enzymatique du surnageant sans métal lourd. La concentration de cadmium soluble est déterminée à la fin de la réaction enzymatique.

Les résultats de cette expérience sont représentés à la figure 20.

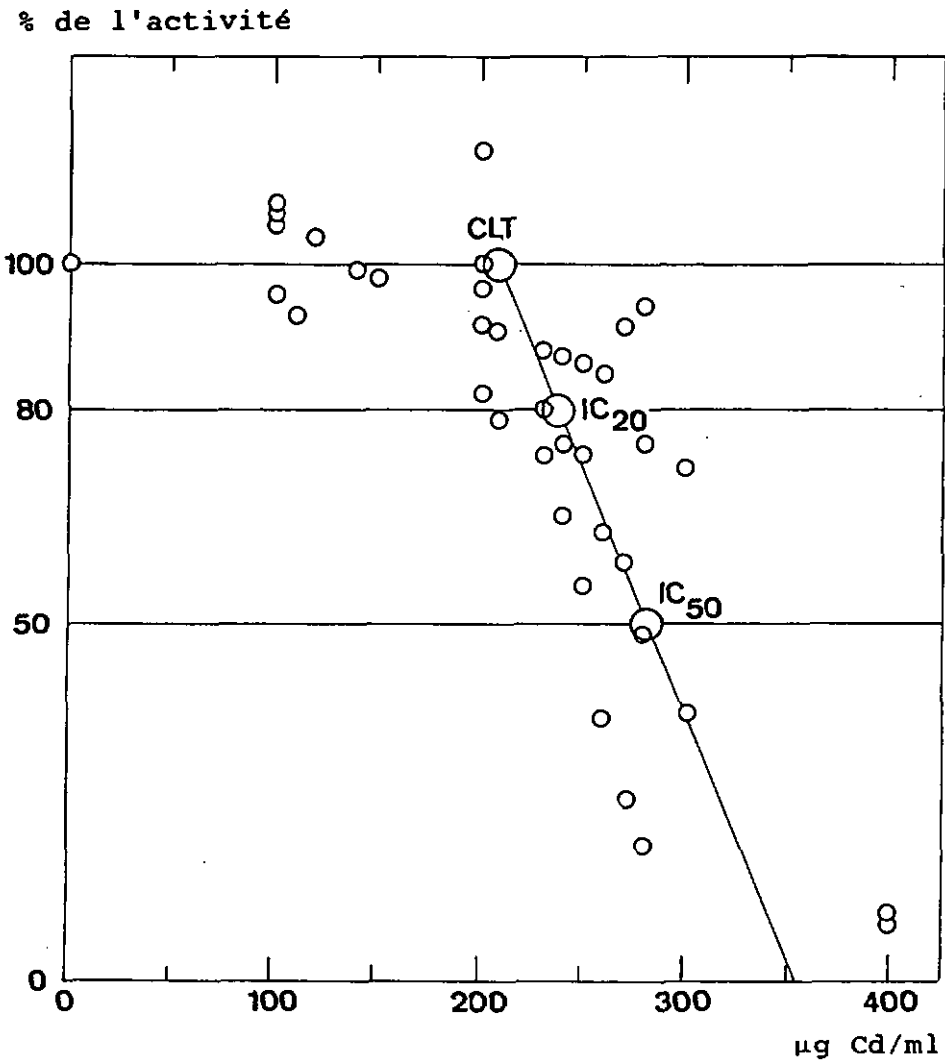
Les valeurs calculées de CLT,  $IC_{20}$  et  $IC_{50}$  correspondent à 208.6, 238.7 et à 283.1  $\mu\text{g Cd total/ml}$  et respectivement à 16.5, 19 et 22  $\mu\text{g Cd soluble/ml}$  de mélange réactionnel. On remarque que très peu de cadmium ajouté se trouve sous forme de ions solubles. Ceci suggère que le milieu dans lequel se déroule la réaction enzymatique contient des substances qui complexent une grande partie du cadmium additionné.

#### 5. 4. 3. Influence du cuivre sur l'activité $\alpha$ -amylasique.

On réalise cette expérience de façon identique à celle qui a été effectuée avec le cadmium. Les concentrations de cuivre choisies vont de 5 à 50  $\mu\text{g/ml}$  (cf. figure 21). Les analyses du cuivre soluble sont faites à la fin de la réaction enzymatique.

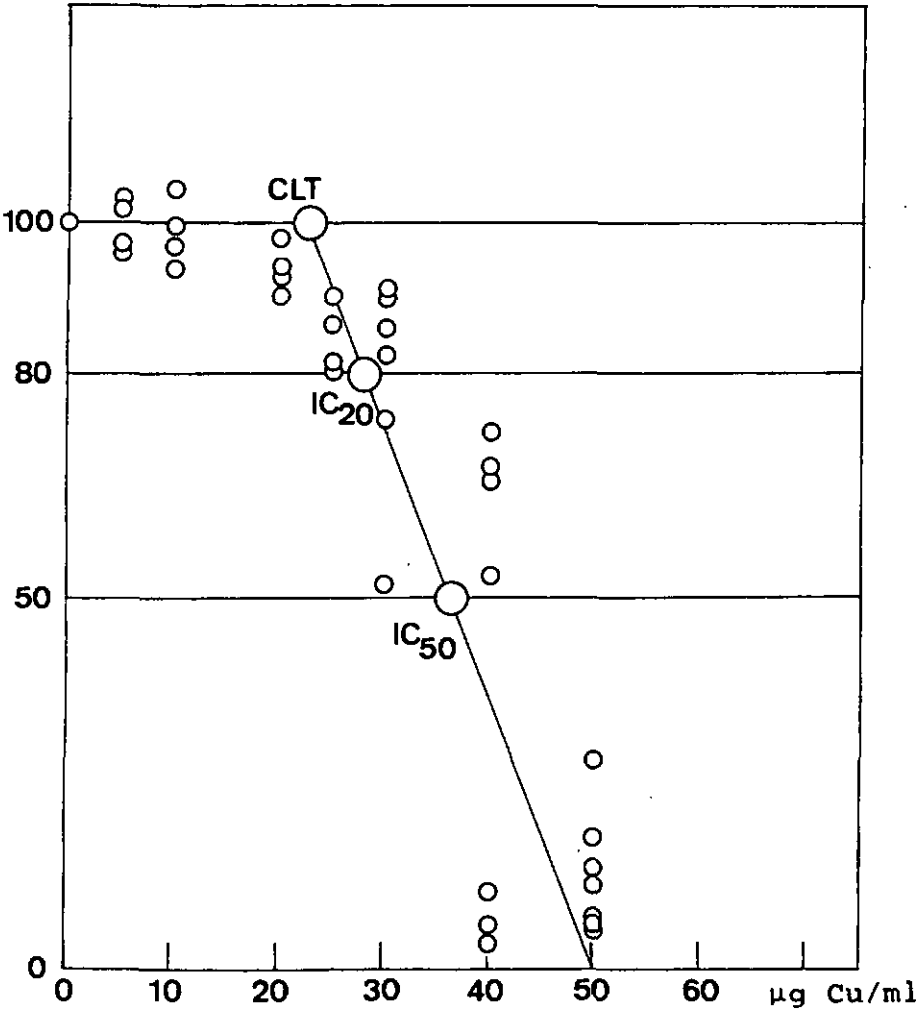
Les résultats de cette expérience sont donnés au figure 21. Les paramètres CLT,  $IC_{20}$  et  $IC_{50}$  calculés équivalent à 22.8, 28.4 et 36.8  $\mu\text{g Cu total/ml}$  respectivement 0.58, 0.647 et 0.747  $\mu\text{g Cu soluble/ml}$

figure 20 : Influence du cadmium sur l'activité  $\alpha$ -amylasique relative de B.licheniformis s<sub>4</sub>. (100% correspondent à l'activité mesurée dans le milieu réactionnel dépourvu de Cd).



**figure 21** : Influence du cuivre sur l'activité  $\alpha$ -amylasique relative de *B.licheniformis* s<sub>4</sub>. (100% correspondent à l'activité mesurée dans le milieu réactionnel dépourvu de Cu).

% de l'activité



## 6. ETUDE DANS LE SOL

Dans le sol - second milieu expérimental de recherche sur les métaux lourds - les buts suivants sont fixés:

- analyser l'effet du cadmium et du cuivre sur la population des asprophytes sérobies et sur l'activité amylasique du sol Steinhof nstif.
- comparer, pour le milieu liquide aynthétique et pour le sol, la réponse su cadmium et su cuivre du développement de B.licheniformis s<sub>4</sub>, de l'activité et de la synthèse amylasiques. Afin de résoudre le second point de notre étude on stérilise le sol Steinhof. Ce procédé élimine la microflore totale et réduit l'activité amylasique du sol. Après inoculation du sol stérilisé par B.licheniformis s<sub>4</sub>, la bactérie en recolonissent le sol, préalablement amendé avec de l'amidoo à 1 %, pourrs synthétiser son amylase.

L'estimation de l'activité amylasique dans le sol se fait de la même manière que celle qui est utilisée dans le milieu liquide synthétique.

### 6. 1. Mise au point d'une nouvelle méthode pour la détermination de l'activité de l' $\alpha$ -amylase dans les sols.

Une nouvelle méthode d'analyse de l'activité  $\alpha$ -amylasique est mise au point afin de pouvoir appliquer au sol une méthode analogue à celle qui a été utilisée pour le milieu synthétique liquide.

La mise au point de cette nouvelle méthode pour les sols a pour objectifs:

- d'utiliser pour le milieu liquide synthétique (premier milieu expérimental) et pour le milieu sol (second milieu expérimental) la même méthode d'analyse .

- de déterminer l'activité enzymatique en suivant la disparition du substrat et non l'apparition des produits. Les produits issus de la réaction catalytique sont des petites molécules qui peuvent être soit adsorbées aux particules du sol, soit être dégradées plus loin. Ce phénomène faussifie les résultats en provoquant une sous-estimation de l'activité enzymatique dans les sols.

Pour tester la méthode nous choisissons de mesurer l'activité dans 6 sols représentatifs des sols agricoles. Leurs propriétés physico-chimiques sont mentionnées au tableau 25.

**Tableau 25 :** Propriétés physico-chimiques des sols étudiés pour la détermination de l'  $\alpha$ -amylase

Prove- nance de sol	Type de sol	% ar- gile	% silt	% sable	pH	CEC	P	K	% C	% N	C/N
Gasel	1a	14.2	32.7	53.1	6.6	-	9.7	74.7	1.94	0.24	7.9
Erlach	1a	18.4	31.7	48.9	6.9	-	6.1	19.1	1.30	0.16	8.1
Gänse- moos	1s	15.9	28.3	55.8	5.6	-	0.8	78.9	2.91	0.26	11.1
La Châ- tagne	1	41.4	26.6	13.9	5.9	-	2.5	9.13	10.5	0.99	10.6
Liebe- feld	1s	16.1	29.2	54.7	6.3	-	7.5	24.1	2.20	0.24	9.0
Stein- hof	1a	17.6	37.3	45.1	5.6	10.7	70.5	4.9	0.72	0.13	5.5

1a = limon sableux

1 = limoneux

P = P soluble ( $\mu\text{g/g}$ )

K = K soluble ( $\mu\text{g/g}$ )

C = C organique

N = N total

### 6. 1. 1. Choix d'un tampon

Le tampon utilisé doit remplir les conditions suivantes :

- ramener le pH d'un sol à 6.0, pH optimal pour l'activité  $\alpha$ -amylasique de B.licheniformis (FUWA, 1954).
- maintenir la stabilité du pH au cours de la réaction catalytique

Pour cette expérience les tampons suivants sont testés avec le sol Gänsemoos :

- tampon acétate de sodium soit 0.02; 0.5; 1 ou 2 M de pH 6.0
- tampon phosphate de potassium 0.1 M de pH 6.0; 7.0 ou 8.0
- tampon tris d'aminométhane 0.1 M de pH 7.0 ou 8.0

Une quantité de sol frais correspondant à 2.5 g de matière sèche est pesée dans des tubes en plastique. 10 ml d'une solution de tampon à tester ainsi que 15 ml d'amylase à 0.5 % sont rajoutés au sol. Après une nuit à température de chambre le pH des différentes suspensions de sol est mesuré. Les résultats sont présentés au tableau 26.

Tableau 26 : Choix d'un tampon pour déterminer l'activité amylasique du sol Gänsemoos de pH 5.6 (rapport volumique sol:eau est de 1:2)

Tampon	Molarité du tampon	pH	pH de la suspension de sol contenant le substrat et le tampon
eau	-	-	5.8
acétate	0.02	6.0	5.9
acétate	0.50	6.0	6.1
acétate	1.00	6.0	6.1
acétate	2.00	6.0	5.9
phosphate	0.10	6.0	5.4
phosphate	0.10	7.0	6.4
phosphate	0.10	8.0	6.8
tris	0.10	7.0	5.9
tris	0.10	8.0	6.7

Parmi les tampons qui ramènent le pH du sol Gänsemoos de 5.6 au voisinage de 6.0 se trouvent les tampons acétate de molarités 0.02, 0.5, 1.0 et 2.0 de pH 6.0 et le tampon tris 0.1 M de pH 7.0. Parmi ceux-ci le tampon acétate 0.5 M de pH 6.0 est choisi car il a déjà été utilisé pour l'activité de l' $\alpha$ -amylase de B. licheniformis dans l'étude en milieu liquide synthétique.

Dans une deuxième étape ce tampon est testé pour les autres sols à étudier (cf. tableau 25). Les résultats de cette expérimentation sont reportés au tableau 27.

Tableau 27 : Effet du tampon acétate 0.5 M, pH 6.0 sur la stabilité du pH des milieux réactionnels au cours de la réaction enzymatique.

Provenance du sol	pH de la suspension de sol dans l'eau	pH de la suspension de sol dans le tampon
Gasel	6.0	6.1
Erlach	6.9	6.0
Gänsemoos	5.6	6.1
La Châtagne	5.9	6.0
Liebefeld	6.3	6.0
Steinhof	5.9	6.1

On remarque que le tampon acétate 0.5 M de pH 6.0 est bien adapté à l'analyse de l'activité amylasique. Malgré la variation du pH (5.3-6.9) et de la teneur en matière organique (0.7-2.91%) des sols examinés, le pH est maintenu constant au cours de la réaction enzymatique : il se situe entre 6.0 et 6.1.

### 6. 1. 2. Recherche du $K_m$ apparent de l'amylase.

Le but de cette étude est de déterminer l'affinité de l'enzyme dans le sol pour le substrat. Cette recherche est entreprise avec le sol Steinhof.

#### 6. 1. 2. 1. Mode opératoire

Dans des ballons jaugés de 100 ml on met :

- du sol frais correspondant à 5 g de matière sèche
- 1.5 ml de toluène que l'on laisse agir pendant 15 min. Le toluène est utilisé pour prévenir la prolifération et l'activité microbiennes.
- 20 ml de tampon acétate 0.5 M de pH 6.0

Ce mélange est préincubé durant 1 heure à 37<sup>0</sup>C

- 5, 10, 15, 20, 25 ou 30 ml d'une solution d'amylose à 1 % correspondant à 10, 20, 30, 40, 50 ou 60 mg d'amylose par g de matière sèche de sol

Le mélange est agité sur un agitateur à 390 RPM pendant 3 min

Après une incubation de 4 h à 37<sup>0</sup>C on analyse la quantité de substrat hydrolysé en procédant comme suit :

- au mélange réactionnel on rajoute de l'eau distillée à 37<sup>0</sup>C jusqu'à 100 ml
- après une agitation vigoureuse on filtre les suspensions de sol avec des filtres en papier (Schleicher et Schüll 602 1/2)
- dans des cylindres gradués, 10 ml de filtrat sont récoltés
- 2 ml de ce filtrat sont transvasés dans un ballon jaugé de 100 ml
- on y rajoute environ 80 ml d'eau distillée
- puis 2 ml de solution de Lugol
- on ajuste ce mélange à 100 ml avec de l'eau distillée
- à 700 nm l'extinction du complexe amylose-Lugol est mesurée en utilisant comme solution de référence de l'eau distillée.

### 6. 1. 2. 2. Courbe standards

Dans un ballon jaugé de 500 ml on pipette 30 ml d'une solution d'amylose à 0.5 % (amylose à 0.03 %). De cette nouvelle solution d'amylose à 0.03 % on pipette dans des ballons jaugés de 100 ml les volumes suivants :

Amylose à 0.03 % ml	Amylose mg/100ml
3	0.9
4	1.2
5	1.5
6	1.8
7	2.1
8	2.4
9	2.7
10	3.0
12	3.6

A chacune de ces solutions on ajoute environ 80 ml d'eau distillée puis 2 ml de solution de Lugol. On ajuste chaque solution à 100 ml avec de l'eau distillée. L'extinction de chaque solution est mesurée à 700 nm comme décrit sous le point 6. 2. 1.

### 6. 1. 2. 3. Calcul pour déterminer l'activité amyliase

A chaque concentration de substrat de la courbe standard correspond une extinction à 700 nm. A l'aide de ces couples de valeurs on calcule une droite de régression. La quantité d'amylose ajoutée par gramme de matière sèche de soi (a) de même que la concentration d'amylose restant après 4 heures de réaction (b) sont établies avec les paramètres de la droite de régression.

L'activité de l'  $\alpha$ -amylase est définie puis calculée comme suit :

a-b .100 ml de solution à filtrer  
(2ml de filtrat)

On la définit en mg d'amylose disparu par gramme de matière sèche et par 4 heures (mg d'amylose disparu/g.m.a.4h).

6. 1. 2. 4. Recherche du  $K_m$

Les résultats de l'expérience décrite sous 6.1.2.1. sont présentés au tableau 28.

Tableau 28 : Influence de la teneur en substrat sur l'activité amylasique du sol Steinhof.

Quantité d'amylose mg/g.m.s.	Activité amylasique mg amylose utilisé/g.m.s.4h
10	2.4
20	2.9
30	2.8
40	2.9
50	3.0
60	3.8

A l'aide de ces résultats  $1/S$  et  $1/v$  sont calculés puis représentés graphiquement selon le modèle de Lineweaver-Burk.  $S$  correspond à la quantité d'amylose (mg/g.m.s.) et  $v$  à l'activité amylasique (mg d'amylose disparu /g.m.s.4h). Avec les couples de valeurs  $1/S$  et  $1/v$  on calcule la droite de régression  $y = ax + b$  ou  $b$  équivaut à  $1/V_{max}$  et  $a/b$  au  $K_m$ . Pour le sol Steinhof la valeur de  $V_{max}$  est de 3.34 mg d'amylose disparu/g.m.s. et celle du  $K_m$  est de 3.49 mg d'amylose/g.m.s. La concentration de substrat à choisir pour saturer l'enzyme devrait être environ 10 fois celle du  $K_m$  (34.9).

**6. 1. 3. Détermination de l'activité amylasique pour 6 sols de propriétés physico-chimiques différentes.**

Le but de ce travail est de s'assurer que la méthode de détermination de l'activité amylasique est applicable à d'autres sols d'activité biologique plus importante que celle du sol Steinhof. Ce sol malgré la valeur de son rapport C/N de 5.5 présente une activité biologique faible. Celle-ci pourrait être due soit au bas pH du sol ou soit à une composition de la matière organique ne favorisant pas l'action microbienne.

Pour tester la méthode d'analyse de l'activité amylasique il est important de s'assurer que la concentration du substrat soit saturante pour l'enzyme dans les conditions expérimentales choisies (température, durée de l'incubation).

**6. 1. 3. 1. Influence de la concentration du substrat.**

Les concentrations d'amylose testées sont de 5, 10, 20, 30, 40, 50 et 60 mg par gramme de matière sèche de sol. Le mode opératoire utilisé est le même que celui décrit sous le point 6. 1. 2. 1. Les résultats de cette expérimentation sont présentés aux tableaux 29 et 30.

**Tableau 29** : Influence de la teneur en substrat sur l'activité amylasique de 6 sols de propriétés physico-chimiques différentes.

Quantité d'amylose mg/g.m.s.	Activité amylasique mg d'amylose disparu/g.m.s.4h					
	Steinhof	Gänsemoos	La Chatagne	Liebefeld	Gasel	Erlach
5	2.0	2.6	2.9	2.4	2.3	1.0
10	2.4	3.6	4.1	3.0	2.4	2.0
20	2.9	3.8	5.1	3.0	2.5	1.8
30	2.8	4.9	6.0	3.5	2.9	2.1
40	2.9	4.0	6.4	3.3	2.0	2.2
50	3.0	5.0	7.4	3.4	2.5	1.8
60	3.8	6.4	7.7	3.3	3.0	2.5

**Tableau 30** : Km et Vmax de 6 sols de propriétés physico-chimiques différentes.

Paramètres biologiques	Provenance des sols					
	Steinhof	Gänsemoos	La Châtagne	Liebefeld	Gasel	Eriach
Vmax	3.34	5.46	8.07	3.53	2.57	2.10
Km	3.49	5.59	9.16	2.28	0.61	0.52

Pour chaque sol on remarque un accroissement de l'activité enzymatique lorsque la quantité de substrat augmente (cf. tableau 29). Cependant pour avoir des quantités de substrat optimales pour saturer l'enzyme (environ 10 fois le Km), on devrait apporter dans les sols étudiés ci-dessus des teneurs en amylose allant de 5,21 à 91,61 mg/g.m.s. (cf. tableau 30). Vu que l'on ne peut pas ajouter aux sols plus de 30 mg d'amylose/g.m.s., les enzymes des sols Steinhof, Gänsemoos et La Châtagne se trouveront dans des conditions de saturation sous-optimales par le substrat. Les raisons pour lesquelles on ne peut pas ajouter au sol plus de 30 mg d'amylose/g.m.s. sont que l'amylose est difficilement soluble dans NaOH 1M (solution-mère) et qu'il n'est pas possible d'ajouter au sol un plus grand volume d'eau pour maintenir les 41,3% de la capacité maximale en eau (capacité au champ).

#### 6. 1. 3. 2. Influence du temps d'incubation.

La relation entre la durée d'incubation et la quantité de substrat disparu dans les sols cités au tableau 25 sert à établir que la quantité de substrat choisie (30 mg/g.m.s.) est saturante pour l'amylose dans les conditions expérimentales sélectionnées (4 heures d'incubation). Pour une concentration de 30 mg d'amylose par gramme de matière sèche de sol, l'activité enzymatique est déterminée à 37°C après 5, 8, 24 et 27 heures. On l'exprime en mg d'amylose disparu/g.m.s.h.

Durant les huit premières heures de réaction, l'activité amylosique est constante pour tous les sols étudiés à l'exception du sol Gänsemoos (cf. tableau 31). Pour ce sol, on suppose que la faible activité observée après 8 heures pourrait être due à une erreur expérimentale.

**Tableau 31** : Influence du temps d'incubation sur l'activité amylasique de quelques sols.

Provenance	Activité amylasique en fonction du temps d'incubation. mg d'amylase diapaar/g.m.s.h.			
	5	8	24	27
Steinhof	0.360	0.363	0.294	0.292
La Chatagne	0.620	0.625	0.404	0.433
Casel	0.260	0.263	0.171	0.170
Gänsemoos	1.060	0.600	0.717	0.796

Ces chiffres prouvent que la concentration de substrat est saturante pour l' amylase se trouvant dans chaque sol considéré en particulier pour les 4 heures de réaction enzymatique.

**6. 2. Influence du cadmium et du cuivre sur la microflore naturelle et sur l'activité amylasique du sol Steinhof.**

Cette recherche a pour objectifs :

- de trouver, dans le sol Steinhof natif, lequel de ces deux paramètres biologiques (microflore des saprophytes aérobies ou activité amylasique) est le plus sensible au cuivre ou au cadmium
- d'étudier l'effet du temps d'incubation sur l'influence de chacun des métaux lourds sur ces deux critères biologiques.

Si la diminution de l'activité causée par le métal est compensée après un mois on ne la prendra pas en considération. Au cours de cette période, les populations microbiennes sensibles aux métaux lourds pourraient être remplacées par d'autres populations résistantes synthétisant de nouvelles enzymes.

Si, au contraire, l'influence négative après cette période subsiste on estimera que l'effet du métal lourd est un phénomène irréversible.

### 6. 2. 1. Influence du cadmium

Dans des bouteilles en verre de 250 ml stériles et préalablement tarées on met :

- 94.32 g de sol frais correspondant à 80 g.m.s. de sol

- 2 ml d'une solution de  $CdCl_2$ . Les concentrations finales de Cd dans le sol sont 0.1 ; 0.25; 1.0; 2.5; 10; 25; 100; 250; 1000; 2500; 10000  $\mu g/g.m.s.$  de sol

Les solutions de cadmium sont réparties d'une manière homogène, à l'aide d'une seringue montée de 2 ml., sur toute la surface du sol. On mélange ensuite soigneusement le sol et la solution de cadmium avec une petite spatule.

- de l'eau distillée afin d'ajuster le mélange à 99.6 g pour avoir 41.3 % de la capacité maximale en eau du sol (capacité au champ).

Après avoir bien mélangé le tout on met les bouteilles en incubation à 25°C. Après 1, 2, 4, 8, 16 et 32 jours le nombre des aérophytes aérobies (cf. Matériel et méthodes) et l'activité amylasique sont déterminés.

Chaque semaine le sol est réhydraté à 41.3 %.

La teneur en cadmium soluble est mesurée pour les échantillons prélevés après 32 jours d'incubation. Dans cette expérience la teneur en cadmium soluble correspond à la quantité de ce métal présent dans le sol sous forme de ion. Son analyse se fait avec une électrode spécifique au cadmium (cf. Matériel et Méthodes).

#### 6. 2. 1. 1. Effet sur la microflore des saprophytes aérobies

L'effet du cadmium sur la population des saprophytes aérobies est représenté à la figure 22.

On établit une relation entre le logarithme en base 10 du nombre des saprophytes aérobies et la durée d'incubation.

Pour des teneurs inférieures ou égales à 1000  $\mu\text{g/g.m.s.}$  (338  $\mu\text{g Cd soluble/g.m.s.}$ ) le nombre de germes trouvé dans le sol Steinhof n'est pas modifié. Des concentrations égales ou supérieures à 2500  $\mu\text{g Cd/g.m.s.}$  (1130  $\mu\text{g Cd soluble/g.m.s.}$ ) entraînent une diminution de la population des saprophytes aérobies. Cette diminution s'accélère avec la concentration en métal lourd et est irréversible au cours de 32 jours d'incubation étudiés. 2500  $\mu\text{g}$  et plus de Cd/g.m.s. sont bactéricides.

La méthode utilisée ici pour déterminer le nombre des germes présente certaines limites. En diluant l'échantillon de terre la concentration de cadmium du milieu diminue empêchant ainsi de mettre en évidence l'effet bactériostatique du cadmium. Cette méthode est de plus imprécise étant donné qu'on enregistre des variations situées entre 40 et 60 %. Il est donc possible que pour des concentrations inférieures et égales à 1000  $\mu\text{g/g.m.s.}$  le cadmium exerce un effet négatif réversible sur la croissance des germes saprophytes aérobies.

#### 6. 2. 1. 2. Effet sur l'activité enzymatique

L'activité amylasique du sol non traité avec du cadmium diminue au cours de la période d'incubation (cf. figure 23). Après un mois elle représente, environ les 45% de celle analysée après 24 heures.

En-dessous de 250  $\mu\text{g Cd total/g.m.s.}$  l'activité amylasique dans le sol n'est pas modifiée.

Entre 250 et 10000  $\mu\text{g/g.m.s.}$  le cadmium cause une diminution de l'activité enzymatique en fonction de sa concentration. Cet effet négatif est immédiat (après 24 heures) et ne s'accroît pas durant la période d'incubation.

**figure 22** : Influence du cadmium sur le nombre de germes saprophytes aérobies du sol Steinhof en fonction du temps d'incubation.

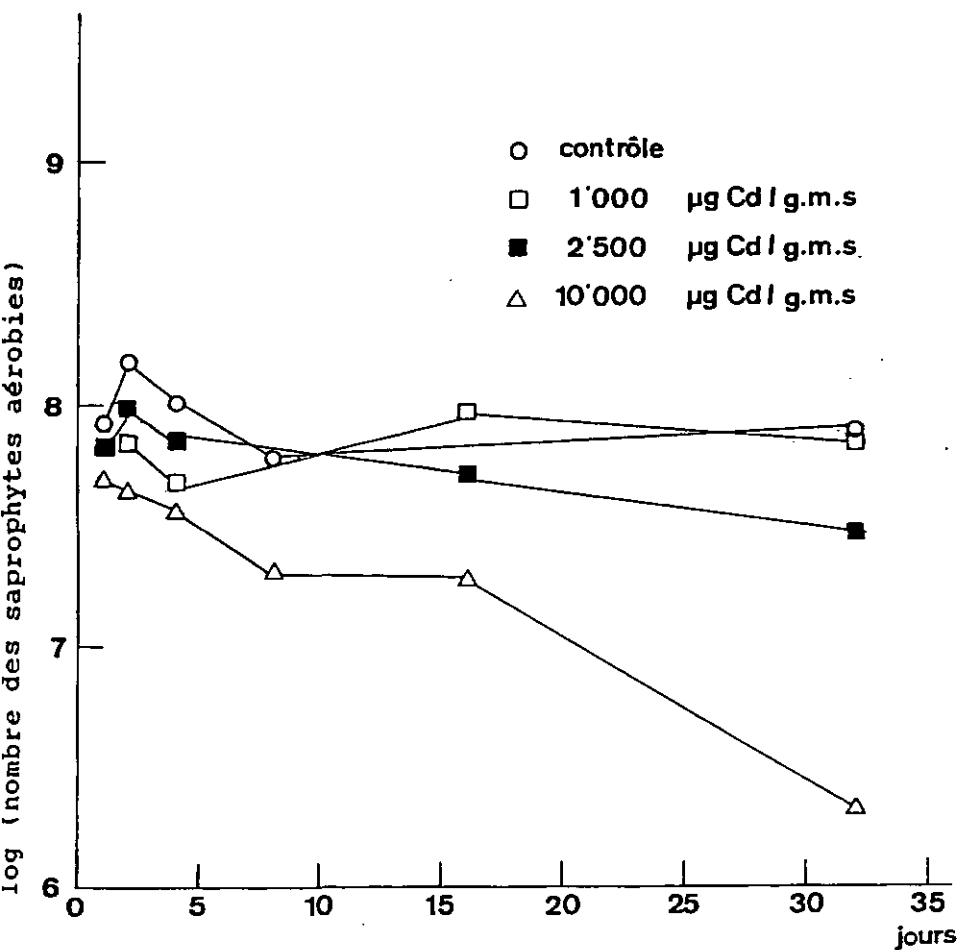
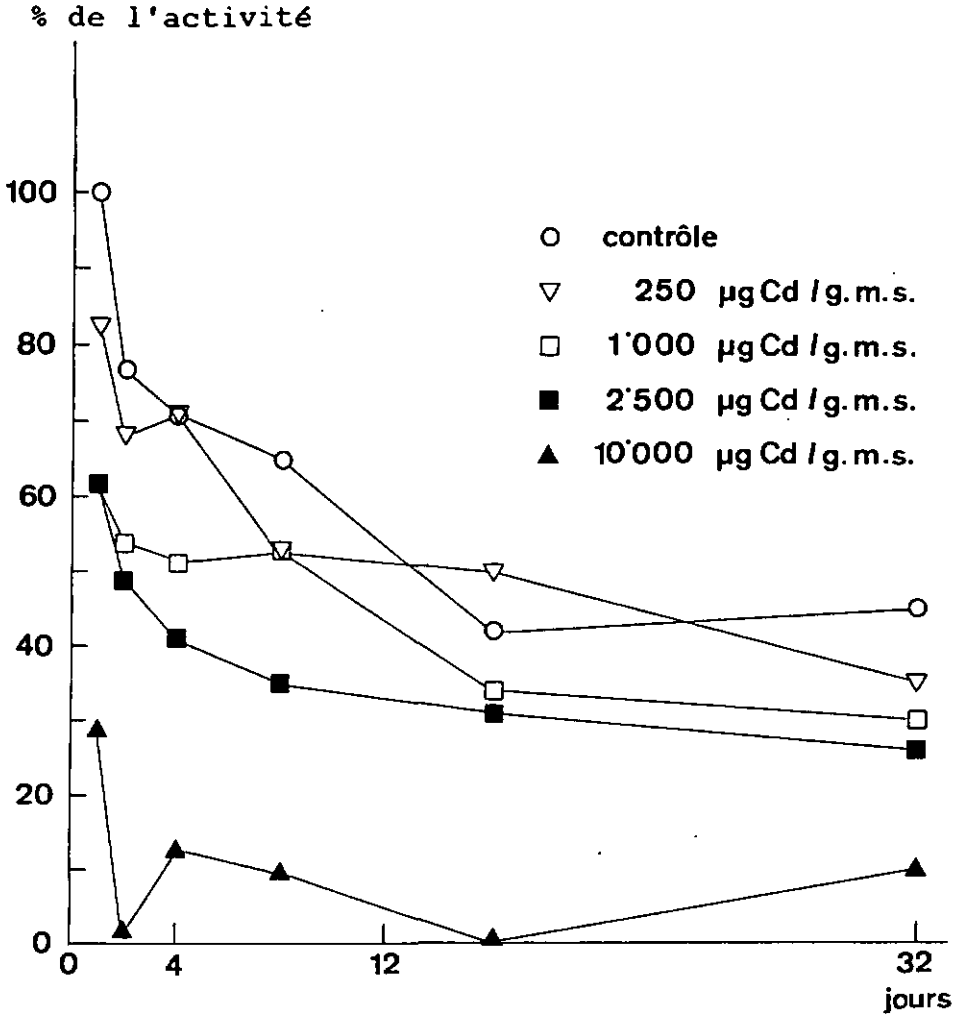


figure 23 : Influence du cadmium sur l'activité amylasique relative du sol Steinhof en fonction du temps d'incubation. (100% correspondent à l'activité mesurée dans le sol sans adjonction de Cd).



Cette observation suggère que la structure de l'enzyme subit une modification au contact du métal qui la rend moins active. Cette modification de l'enzyme est fonction de la concentration du cadmium et est maintenue au cours du temps d'incubation.

La méthode utilisée ici ne permet pas de faire une mesure in situ de l'activité enzymatique dans le sol. En ajoutant les solutions de tampon et de substrat à l'échantillon de sol on le dilue, ainsi que la concentration de métal, d'un facteur 35 (cf. 6. 1.). Ainsi par dilution, l'effet du cadmium sur l'enzyme peut être réversible : en abaissant la concentration du métal en contact avec l'enzyme, la structure de cette dernière peut retrouver sa configuration fonctionnelle initiale. Notre méthode ne nous permet donc pas de mettre en évidence, pour des concentrations inférieures à 250 µg Cd total/g.m.s., l'effet négatif réversible du métal.

L'effet négatif observé à 250 µg Cd total/g.m.s. est irréversible, c'est-à-dire que, malgré l'effet de dilution du métal, la structure enzymatique initiale ne peut plus être retrouvée.

### 6. 2. 2. Influence du cuivre

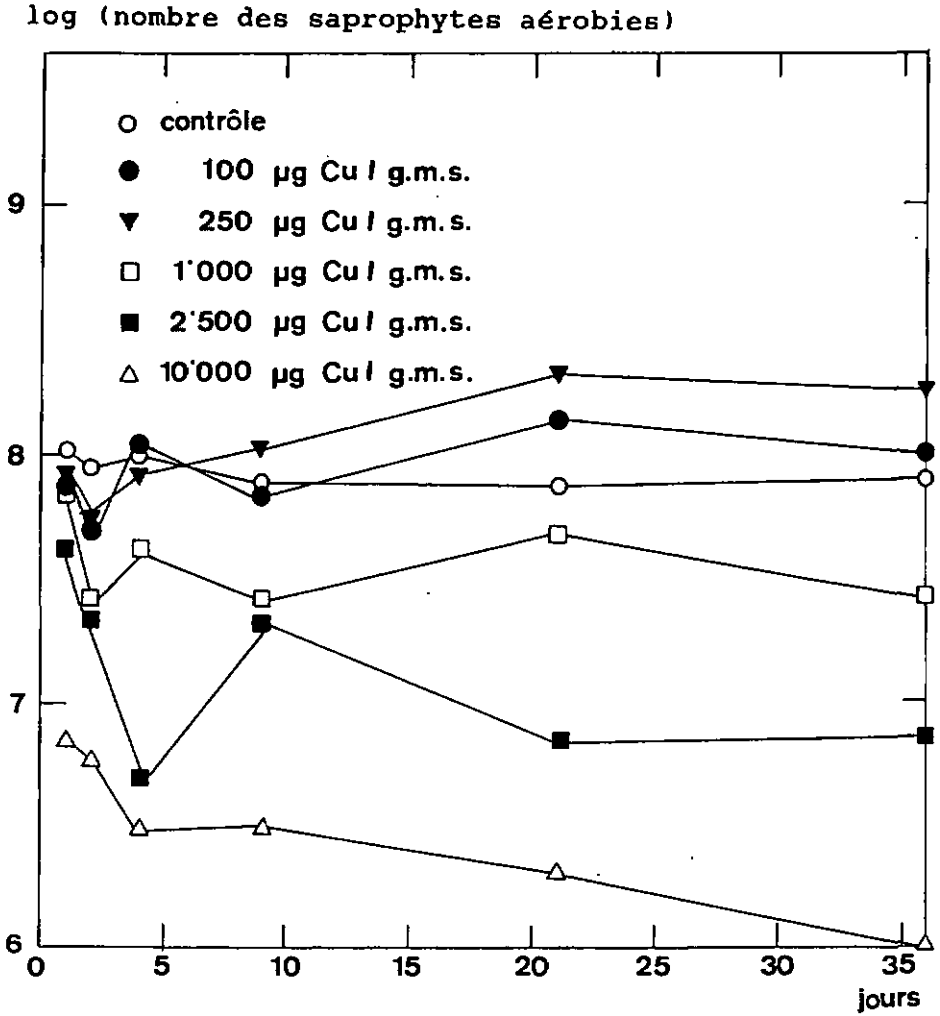
Afin de connaître l'influence du cuivre sur la population bactérienne et l'activité amylasique du sol Steinhof, on réalise la même expérience que celle décrite précédemment pour le cadmium (cf. 6. 2. 1.).

Les concentrations de cuivre étudiées vont de 0.1 à 10000 µg/g.m.s.

Après 1, 2, 5, 9, 21 et 36 jours d'incubation à 25°C on analyse la population des saprophytes aérobies et l'activité amylasique.

La concentration de cuivre soluble est analysée en fin d'expérience, elle correspond à la quantité de cuivre sous forme de ions.

**figure 24** : Influence du cuivre sur le nombre des germes saprophytes aéro-  
biques du sol Steinhof en fonction du temps d'incubation.



#### 6. 2. 2. 1. Effet sur la microflore des saprophytes aérobies.

Entre 0.1 et 100  $\mu\text{g/g.m.s.}$  le cuivre n'influence pas le nombre des bactéries (cf. figure 24).

Pour des concentrations situées entre 100 et 250  $\mu\text{g/g.m.a.}$  (0.06 et 4.9  $\mu\text{g Cu soluble/g.m.s.}$ ) le cuivre entraîne une augmentation du nombre des germes des saprophytes aérobies. Cet accroissement pourrait s'expliquer par les hypothèses suivantes :

- le sol Steinhof peut présenter une carence en cuivre pour la croissance des germes microbiens. En ajoutant au sol cet élément on favorise un développement optimal des populations microbiennes.
- des populations sensibles au cuivre peuvent être remplacées par des populations microbiennes résistantes, préexistantes ou mutantes, dont le développement est supérieur à celui des populations initiales.

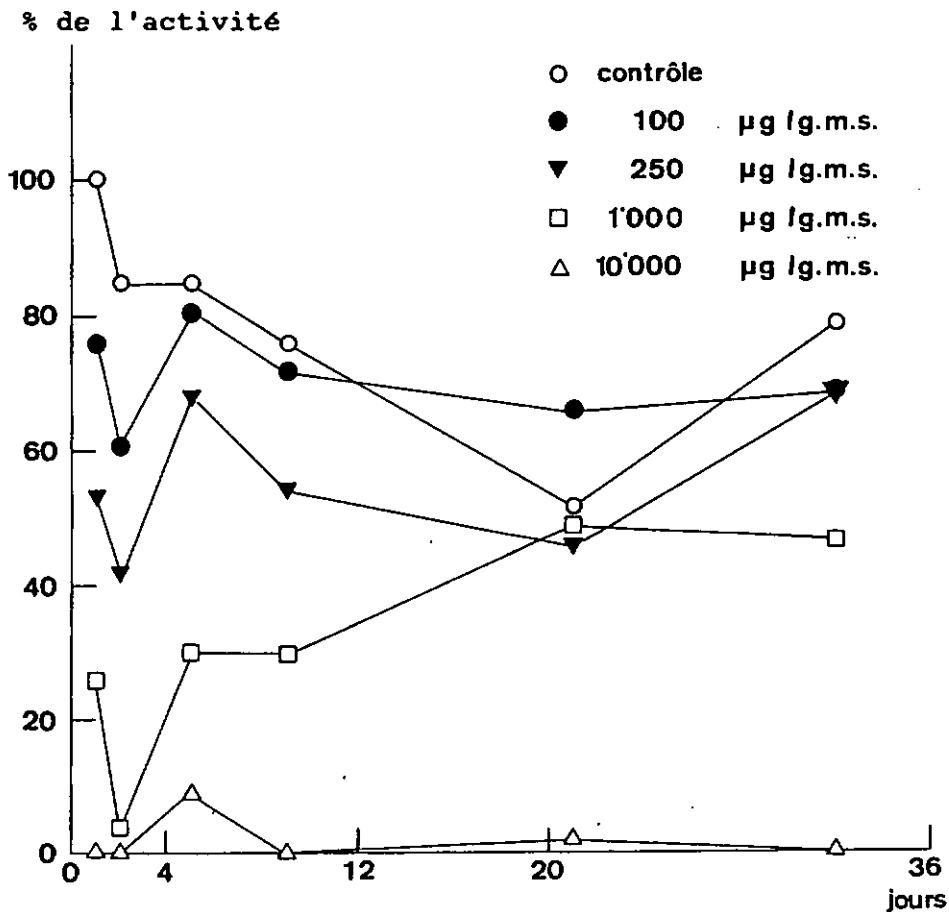
A partir de 1000  $\mu\text{g/g.m.s.}$  (197  $\mu\text{g Cu soluble/g.m.s.}$ ) le cuivre réduit le nombre des saprophytes aérobies dès le premier jour d'incubation. Cette diminution du nombre des germes créée par le cuivre est fonction de sa concentration et n'est pas annulée après une période d'un mois d'incubation pour le domaine de concentrations étudié.

#### 6. 2. 2. 2. Effet sur l'activité amylasique.

Pour des concentrations inférieures à 100  $\mu\text{g/g.m.s.}$  (0.06  $\mu\text{g Cu soluble/g.m.s.}$ ) le cuivre n'exerce aucun effet négatif sur l'activité amylasique du sol Steinhof. Entre 100 et 10000  $\mu\text{g/g.m.s.}$  (0.06 et 8288  $\mu\text{g Cu soluble/g.m.s.}$ ) cet élément entraîne une inhibition de l'activité enzymatique qui est fonction de sa concentration ( cf. figure 25). Cet effet négatif par rapport au sol témoin est immédiat (après 24 heures d'incubation) et n'est pas accentué avec le temps.

La diminution de l'activité amylasique est maintenue constante durant le temps d'incubation dans le sol contenant 10000  $\mu\text{g Cu total/g.m.s.}$  Avec 1000  $\mu\text{g Cu total/g.m.s.}$  l'activité amylasique augmente de 5 à environ 50% entre le troisième et le vingtième jour d'incubation. Cette augmentation de l'activité pourrait s'expliquer par le fait que des populations microbiennes résistantes au cuivre deviennent, après vingt jours, prédominantes et synthétisent de nouvelles enzymes.

figure 25 : Influence du cuivre sur l'activité amylasique relative du sol Steinhof en fonction du temps d'incubation. (100% correspondant à l'activité mesurée dans le sol sans adjonction de Cd).



### 6. 3. Stérilisation du sol

Afin de pouvoir rechercher la réponse de B.licheniformis au cuivre et au cadmium on procède à la stérilisation du sol. Cette étude a pour but de rechercher une méthode de stérilisation permettant :

- de tuer la microflore naturelle du sol
- d'éliminer ou de diminuer d'une manière importante l'activité amylasique native.

La méthode de stérilisation ne doit, cependant pas entraîner de grandes modifications des propriétés physico-chimiques du sol.

Les traitements de stérilisation étudiés sont :

- l'autoclavage
- la tyndallisation
- l'irradiation par rayonnement gamma d'intensité de 3, 8 ou 12 Mrad.

Ces méthodes de stérilisation sont décrites sous le point 3. 8. (cf. Matériel et Méthodes). Pour estimer l'efficacité de ces différents traitements, le nombre de germes bactériens et l'activité amylasique sont déterminés. Ces méthodes sont décrites respectivement sous les points 3. 9. 1. (cf. Matériel et Méthodes) et 6. 1. Après stérilisation on observe l'effet des différents traitements sur la population bactérienne et l'activité amylasique.

#### 6. 3. 1. Effet sur la microflore

Au tableau 32 on remarque que, pour chaque traitement, à l'exception de la tyndallisation, les bactéries présentes dans le sol sont éliminées. Parmi les  $5,10^7$  bactéries présentes initialement dans le sol 52 germes résistent à la tyndallisation.

6. 3. 2. Effet sur l'activité amylasique

Le mode de stérilisation le plus efficace pour abaisser l'activité enzymatique des amylases est l'irradiation du aol avec un rayonnement gamma d'intensité 12 Mrad ( cf. tableau 32). L'activité enzymatique correspond aux 26.2% de la valeur témoin. L'autoclavage et la tyndallisation réduisent de la même manière l'activité enzymatique (38%). Ce traitement n'est cependant pas très approprié pour notre étude car il entraîne de grandes modifications des propriétés physico-chimiques des sols.

Tableau 32 : Influence du mode de stérilisation sur la population bactérienne et sur l'activité amylasique absolue et relative (% de la valeur obtenue pour le aol témoin) du aol Steinhof.

Traitement de stérilisation	Bactéries/g.m.a.	Activité amylasique	
		mg amylose disparu/ g.m.a.5h.	%
Non traité	5. 10 <sup>7</sup>	2.52	100
Autoclavage(120 <sup>0</sup> C,30 min.)	0	0.96	38.1
Rayonnement gamma.			
3 Mrad	0	1.51	60
8 Mrad	0	0.80	31.8
12 Mrad	0	0.66	26.2
Tyndallisation(100 <sup>0</sup> C,30min trois fois à intervalle de 24 heures)	52	0.96	38.1

#### 6. 4. Recolonisation du sol irradié par *B. licheniformis*

Cette étude a pour objet d'introduire, dans le sol Steinhof stérilisé, *B.licheniformis* s<sub>4</sub> afin de :

- suivre son développement
- étudier la synthèse de son  $\alpha$ -amylase après avoir amendé le sol avec de l'amidon à 1%.

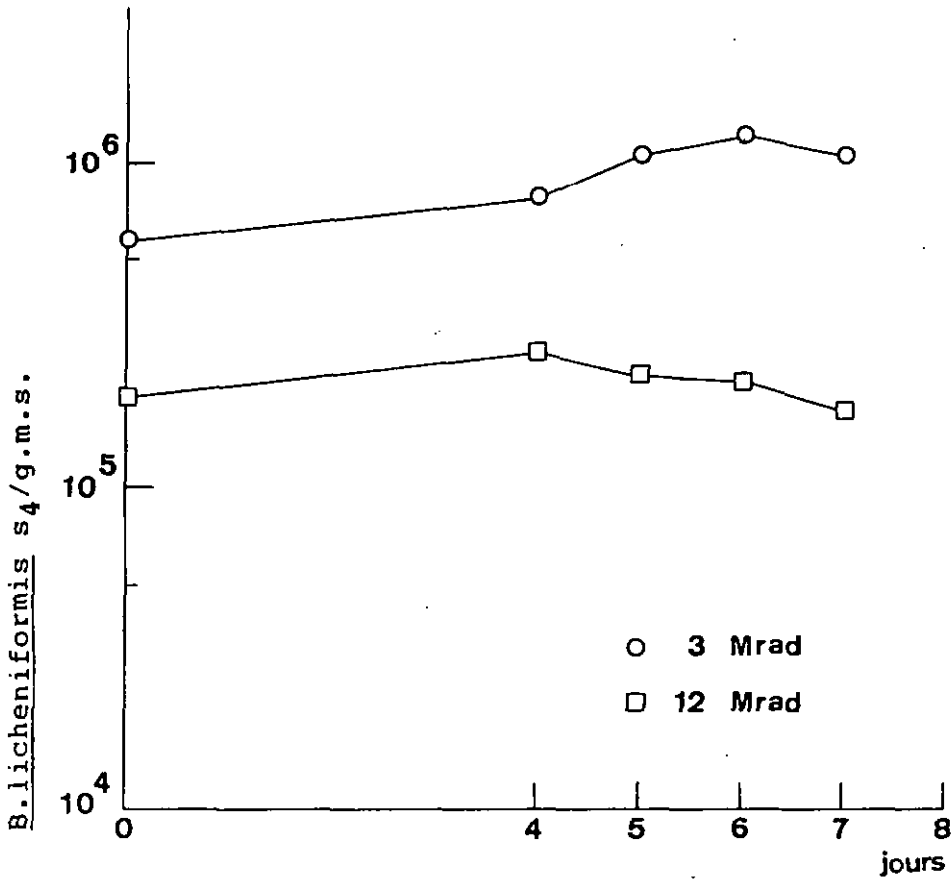
Dans le but de vérifier, après l'introduction de *B.licheniformis* s<sub>4</sub> dans le sol, que la hausse de l'activité  $\alpha$ -amylasique provient réellement du métabolisme bactérien, on teste l'effet du surnageant de la préculture. Le surnageant contient de l' $\alpha$ -amylase produite lors de la croissance de *B.licheniformis* s<sub>4</sub> en milieu liquide. Dans le sol, au cours du temps d'incubation, cette activité devrait rester constante ou diminuer étant donné que le surnageant est dépourvu de bactéries. En revanche, dans l'échantillon de sol contenant *B.licheniformis* s<sub>4</sub> on devrait observer pendant la durée d'incubation une augmentation de l'activité  $\alpha$ -amylasique.

Parmi les différents traitements de stérilisation du sol, l'irradiation gamma est choisie pour l'étude sur la recolonisation bactérienne. La raison de ce choix est que ce procédé entraîne moins de perturbations des propriétés physico-chimiques du sol que celui avec la chaleur (PETERSON, 1962, MCLAREN et al. 1957, STOTZKY et al. 1959).

Dans des bouteilles en verre de 250 ml préalablement stérilisées, on met :

- 29.4 g de sol frais stérilisé soit avec 3 Mrad soit avec 12 Mrad. Cette quantité correspond à 25 g de matière sèche de sol.
- 0.89 ml d'une solution d'amidon à 28% équivalent à une concentration finale dans le sol de 1%. Cette solution est répartie uniformément, à l'aide d'une seringue, à la surface du sol. On mélange ensuite soigneusement le sol et la solution d'amidon.
- 0.85 ml d'une préculture de *B. licheniformis* (Matériel et Méthodes) ou, pour la valeur témoin, 0.85 ml du surnageant de la préculture. On répartit ces solutions de la même manière que celle décrite précédemment pour la solution d'amidon. Le surnageant est obtenu comme suit : la préculture est centrifugée à 4500 g à 4°C pendant 15 minutes. Le surnageant est récolté dans un récipient stérile. Il est ensuite stérilisé par filtration.

figure 26 : Recolonisation du sol stérilisé par radiation  $\gamma$  par B.licheniformis s<sub>4</sub> .



- à ce mélange on ajoute de l'eau stérile jusqu'à l'obtention de 41.3% de la capacité maximale en eau du sol. On mélange ensuite le tout.

Un premier témoin est réalisé comportant le sol stérilisé sans adjonction d'amidon et de bactéries. Le second est composé uniquement de sol stérilisé et d'eau stérile.

Ces bouteilles sont incubées à 25°C. Aux temps d'incubation 0, 4, 5, 6, 7 et 12 jours, le nombre de colonies de B.licheniformis et l'activité de l' $\alpha$ -amylase sont analysés.

La teneur en eau du sol est réajustée chaque fois qu'un échantillon est analysé.

#### 6. 4. 1. Effet sur la population bactérienne et sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase

La population de B. licheniformis n'augmente que très faiblement dans le sol irradié (cf. figure 26). Ce manque de croissance peut être dû soit à la présence de substances toxiques ou inhibitrices dans le sol, soit parce que le sol présente des conditions favorables pour la sporulation.

Le bombardement du sol avec du  $\text{Co}^{60}$  cause une radiolyse de l'eau avec formation de radicaux H, OH,  $\text{HO}_2$ . Ces substances hautement réactives en réagissant, soit avec les protéines, soit avec les acides nucléiques (SCHOLES, G., WEISS, J., 1960) peuvent empêcher un développement bactérien optimal.

On aurait pu vérifier cette hypothèse en inoculant le sol stérile avec du sol frais. Un faible développement de la population mixte aurait indiqué que le sol stérile contenait effectivement des substances toxiques ou inhibitrices pour les microorganismes.

L'influence de la recolonisation du sol irradié par B.licheniformis, sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase est présentée aux figures 27 et 28. L'activité de l' $\alpha$ -amylase du sol irradié contenant le surnageant est plus élevée au jour 0 que celle du sol renfermant B.licheniformis. L'activité enzymatique du contrôle (sol irradié sans adjonction) commence à diminuer approximativement après 4 jours d'incubation à 25°C. L'activité du sol contenant B.licheniformis augmente légèrement pendant les quatre à cinq premiers jours d'incubation avant de diminuer.

figure 27 : Influence de la recolonisation du sol Steinhof, irradié avec 3 Mrad, par B.licheniformis s<sub>4</sub> sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase.

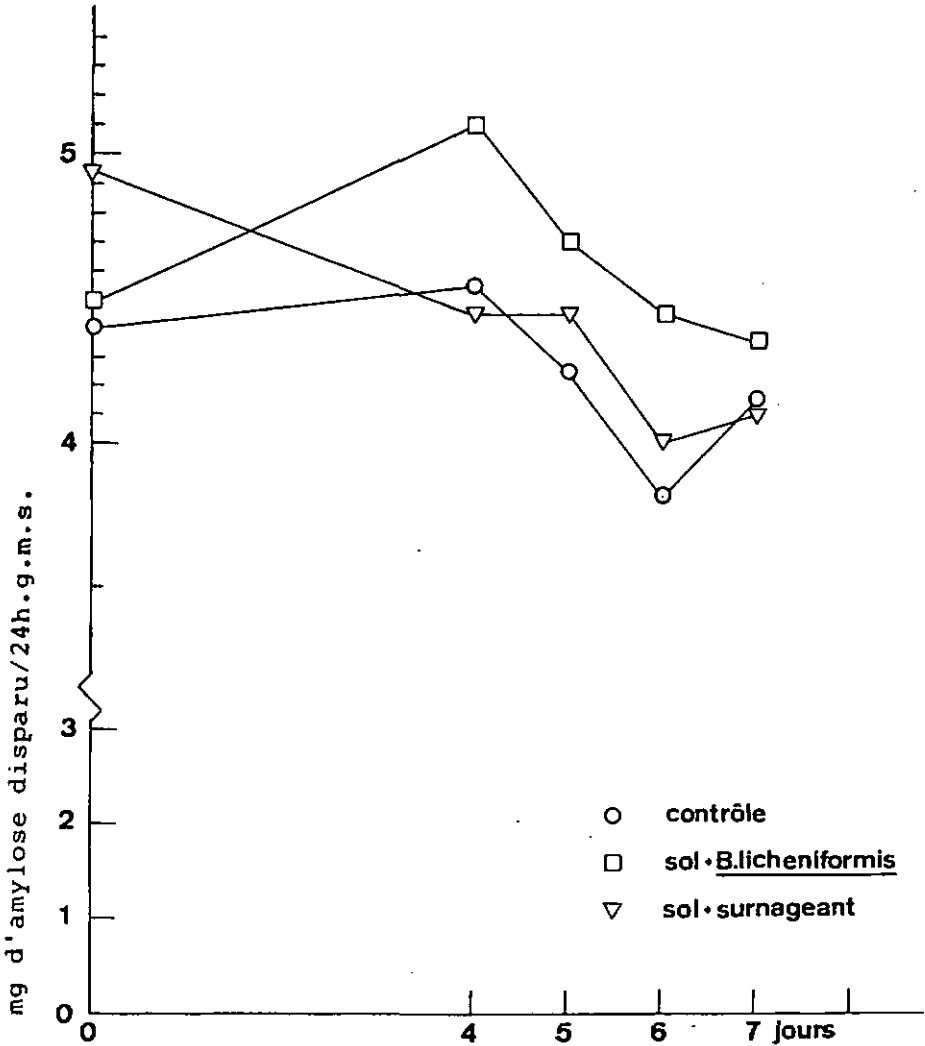
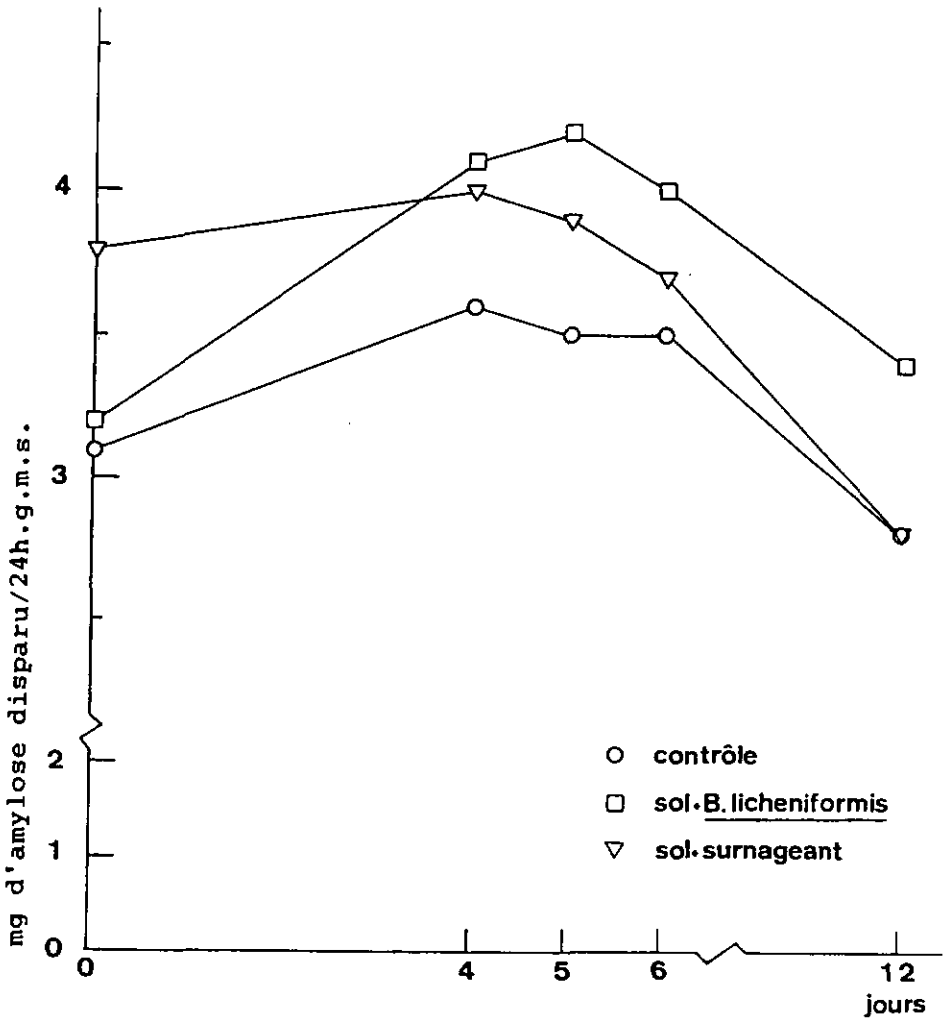


figure 28 : Influence de la recolonisation du sol Steinhof, irradié avec 12 Mrad, par B.licheniformis  $S_4$  sur l'activité de l' $\alpha$ -amylase.



On observe, malgré cette diminution, que l'activité amylasique du sol contenant B.licheniformis est plus élevée que celle du sol renfermant le surnageant seul. Ceci laisse supposer qu'entre le quatrième et le septième jour d'incubation et le cinquième et douzième jour respectivement pour le sol traité avec 3 et 12 Mrad la diminution de l'activité est compensée par une légère synthèse. Cette synthèse est cependant trop faible pour permettre une étude avec les métaux lourds qui soit représentative.

#### 6. 4. 2. Influence de la L-alanine sur la recolonisation du sol irradié avec 3 Mrad par B. licheniformis

Lorsqu'on inocule le sol Steinhof irradié avec B.licheniformis S<sub>4</sub> cette bactérie présente une faible croissance et peu d'activité enzymatique. Afin de tester si cette inertie est due à la sporulation bactérienne on tente d'ajouter au sol une substance connue comme agent germinateur des spores (L-Ala). Pour réaliser cette expérience on choisit de travailler avec le sol irradié avec 3 Mrad. Pour cette dose, la microflore native du sol Steinhof est éliminée alors que l'activité enzymatique est réduite d'environ 40% seulement. Si on opte tout de même pour 3 Mrad c'est pour, éventuellement, diminuer la formation des substances toxiques issues lors du traitement du sol au rayonnement gamma. Ces substances peuvent entraver le développement bactérien.

Dans des bouteilles en verre de 250 ml stériles, on ajoute :

- 29.4 g. de sol frais stérilisé avec 3 Mrad. Cette quantité équivaut à 25 g.m.s. de sol
- 2.5 g. de L-Ala. Le sol témoin se trouve sans adjonction de L-Ala.
- 0.89 ml d'une solution d'amidon à 26% (concentration finale 1%)
- 0.85 ml d'une préculture de B.licheniformis S<sub>4</sub>

La façon de répartir la solution d'amidon et la préculture est décrite sous le point 6. 4.

A ce mélange on ajoute de l'eau stérile jusqu'à l'obtention de 41.3% de la capacité maximale en eau du sol.

Après 2 heures, 2, 4, 7 et 14 jours d'incubation à 25°C on analyse le nombre de colonies de B.licheniformis s<sub>4</sub> formées sur du Nutrient Agar et l'activité amylasique des échantillons.

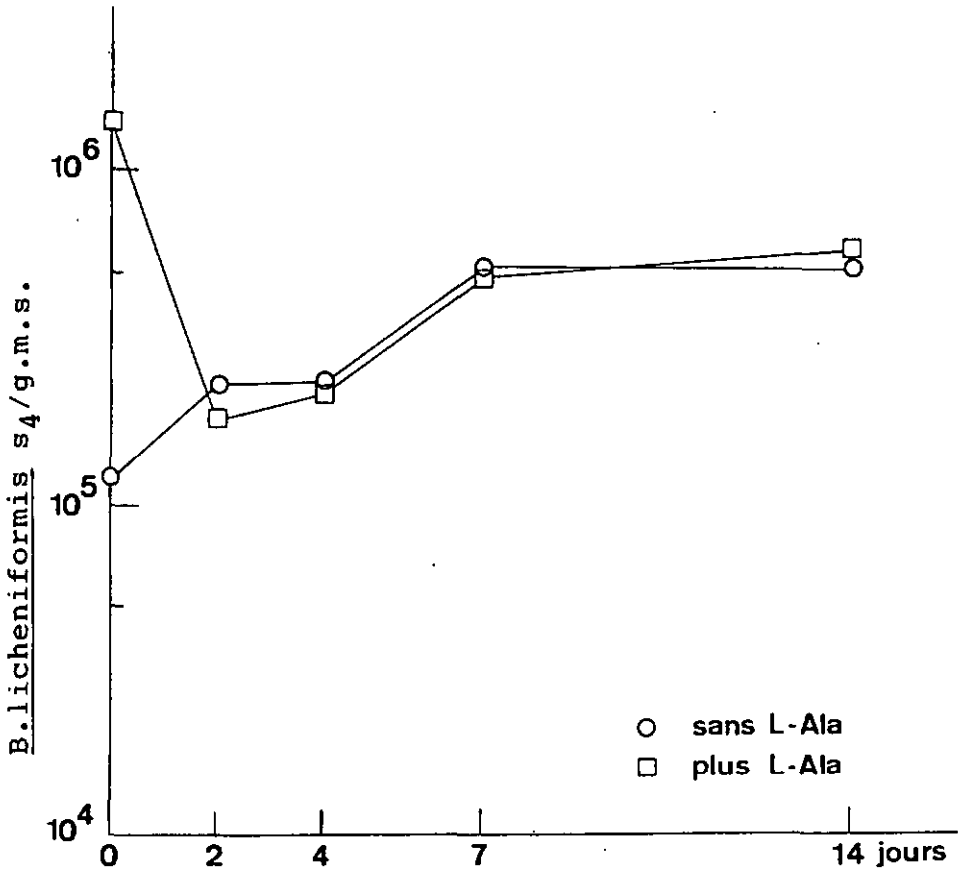
L-Ala semble engendrer une augmentation de la population de B.licheniformis tout de suite après son addition dans le sol (cf. figure 29). Après deux jours d'incubation le nombre de B. licheniformis est redescendu à la valeur du témoin. Ce fait est surprenant étant donné qu'il faudrait aux microorganismes plusieurs heures pour se développer. Il se pourrait que la façon de répartir B.licheniformis dans le sol ne permette pas d'obtenir une bonne homogénéité des échantillons. Celui contenant L-Ala au temps 0 pourrait avoir plus de bactéries que les autres. On aurait pu vérifier cette hypothèse en prélevant plusieurs échantillons dans une même bouteille.

L'activité de l'  $\alpha$ -amylase n'est pas influencée de manière significative par L-Ala (cf. tableau 33). Elle correspond à l'activité enzymatique après l'irradiation puis diminue avec la durée d'incubation.

Tsbleau 33 : Influence de la L-Alanine (L-Ala) sur l'activité de l'  $\alpha$ -amylase du sol Steinhof irradié avec 3 Mrad puis recolonisé par B.licheoiformis

Durée d'incubation jour	Activité de l' $\alpha$ -amylase mg d'amylose disparu/g.m.a.24h	
	Sans L-Ala	Avec L-Ala
0	2.53	2.02
2	2.52	2.72
4	2.41	1.87
7	2.56	2.10
14	3.50	2.70

figure 29 : Influence de la L-alanine sur la recolonisation du sol Steinhof, irradié avec 3 Mrad, par B.licheniformis s<sub>4</sub>.



6. 4. 3. Influence de la teneur en amidon sur la recolonisation du sol irradié avec 3 Mrad par B. licheniformis et sur l'activité amylasique

Afin de connaître si l'inactivité de B. licheniformis s<sub>4</sub>, dans le sol irradié avec 3 Mrad, est due à une carence en nutriment carboné, on ajoute au sol de l'amidon de manière à obtenir une concentration finale de 1, 2 et 4%. De plus, on expérimente si la croissance bactérienne est meilleure à 25°C qu'à 37°C.

Cette expérience est réalisée dans des bouteilles en verre de 250 ml stériles dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (cf. 6.4.). Le sol contrôle correspond au sol inoculé avec B. licheniformis s<sub>4</sub> sans adjonction d'amidon. Après 2 heures, 3, 5 et 6 jours d'incubation soit à 25°C soit à 37°C on détermine le nombre de B. licheniformis et l'activité amylasique du sol. Le sol est ramené à 41,3% de sa capacité maximale en eau.

Les résultats sont présentés aux tableaux 34 et 35.

On ne remarque aucune influence de la température sur le nombre de B. licheniformis. Comparé avec le contrôle, l'adjonction d'amidon semble entraîner une diminution du nombre de bactéries. Cependant la variation des résultats observée au tableau 34 ne permet de tirer aucune conclusion. L'activité amylasique du sol irradié n'augmente pas ni à la suite d'une adjonction d'amidon ni en élevant la température à 37°C (cf. tableau 35). Au contraire lorsqu'on la compare avec celle du sol contrôle, l'activité enzymatique des sols amendés avec de l'amidon est plus faible. On observe une exception pour l'expérience réalisée à 37°C après 5 jours d'incubation. D'une manière générale, une élévation de la température à 37°C semble entraîner une baisse de l'activité lorsqu'on la compare à celle analysée à 25°C (sauf après 5 jours d'incubation).

Vu la grande variation des résultats obtenus à partir de cette expérience il n'est pas possible de tirer des conclusions sur l'effet soit de la température soit de l'amidon sur le nombre des bactéries et de l'activité amylasique analysée dans le sol.

Cette grande variation pourrait provenir d'une distribution non homogène de la source carbonée. De plus, l'adjonction au sol de l'amidon entraîne du collage des particules de sol et ceci pourrait créer des microsites anaérobies alternant avec d'autres aérobiea rendant ainsi l'échantillonnage hétérogène.

Afin de vérifier ceci on aurait dû analyser dans un système expérimental (une bouteille de terre conteoant une concentration d'amidon) la variation de la population bactérienne et celle de l'activité amylasique.

**Tableau 34** : Influence de la teneur d'amidon ajouté au sol et de la température sur la recolonisation du sol Steinhof irradié avec 3 Mrad par B. licheniformis

Durée d'incubation jour	Nombre de bactéries ( $\cdot 10^5$ /g.m.s.)							
	Contrôle		Amidon 1%		Amidon 2%		Amidon 4%	
	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C
0	9.4	55	24.7	14.1	8.3	4.8	2.1	3.4
3	130.0	110	1.3	1.4	6.3	6.9	7.8	11.1
5	147.0	191	14.2	11.3	9.6	9.4	11.6	12.5
6	234.0	198	112.0	15.4	12.6	20.0	16.7	11.4

**Tableau 35** : Influence de la teneur en amidon ajouté au sol et de la température sur l'activité amylasique du sol irradié avec 3 Mrad après inoculation par B. licheniformis

Durée d'incubation jour	Activité de l' $\alpha$ -amylase (mg d'amylose disparu/g.m.s.24h)							
	Contrôle		Amidon 1%		Amidon 2%		Amidon 4%	
	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C
0	5.7	5.1	-	5.3	4.9	4.9	5.1	4.1
4	5.4	5.0	5.2	4.7	5.5	4.9	5.7	5.3
5	5.3	4.3	5.1	5.5	5.0	5.0	4.4	4.5
6	5.6	6.0	4.8	3.4	4.3	4.0	4.3	3.4

6. 5. Influence de l'inoculation par *B. licheniformis* s<sub>4</sub> du sol Steinhof naturel après adjonction d'amidon sur la population bactérienne

Etant donné que dans le sol irradié *B. licheniformis* s<sub>4</sub> se développe mal et ne synthétise que très peu d'  $\alpha$ -amylase on choisit de travailler avec le sol Steinhof natif. Cette étude a pour but d'inoculer le sol Steinhof, amendé avec de l'amidon à 1%, avec *B. licheniformis* s<sub>4</sub> afin d'observer :

- le développement de *B. licheniformis* s<sub>4</sub>
- la croissance des saprophytes aérobies
- la synthèse amylasique

Afin de vérifier si la synthèse amylasique du sol provient du métabolisme de *B. licheniformis* s<sub>4</sub> on teste l'activité enzymatique du sol contenant de l'amidon à 1% et du surnageant de la préculture de *B. licheniformis*.

Dans des bouteilles en verre de 250 ml stériles, on met :

- 29.4 g de sol frais (25 g.m.s. de sol)
- 0.89 ml d'une solution d'amidon à 28% équivalent à une concentration finale de 1%
- 0.85 ml d'une préculture de *B. licheniformis* s<sub>4</sub> ou de surnageant

On répartit la solution d'amidon et la préculture de *B. licheniformis* comme décrit sous le point 6.4.

A ce mélange on ajoute de l'eau stérile jusqu'à l'obtention de 41.3% de la capacité maximale en eau du sol.

Après une incubation de 2 heures, 4, 5 et 7 jours à 25°C on analyse la quantité des saprophytes aérobies, celle de *B. licheniformis* s<sub>4</sub> et l'activité amylasique du sol. Pour dénombrer *B. licheniformis* s<sub>4</sub> on compte les colonies en forme de lichen que forme cette bactérie sur le Nutrient Agar. Lorsqu'on n'ajoute pas de *B. licheniformis* au sol, on ne remarque que très rarement la présence de colonies en forme de lichen sur les boîtes de Pétri. Le sol contrôle correspond au sol amendé avec le l'amidon à 1% sans adjonction ni de surnageant, ni de préculture bactérienne.

6. 5. 1. Influence sur la microflore bactérienne

Dans le sol inoculé par B.licheniformia s<sub>4</sub> on remarque, quelques heures après l'inoculation, que la population des saprophytes aérobies est moins élevée que celle du sol contrôle (cf. tableau 36). L'adjonction d'amidon provoque l'agréation des particules du sol. Ainsi il se pourrait que B.licheniformis soit réparti de manière non uniforme. L'échantillon de sol inoculé par B.licheniformia et prélevé au jour zéro contiendrait moins de bactéries. On aurait pu vérifier cette hypothèse en prélevant dans une bouteille plusieurs échantillons afin de connaître la répartition des bactéries.

Au cours du temps d'incubation on n'observe aucune augmentation du nombre ni des saprophytes aérobies ni de B.licheniformis s<sub>4</sub> ceci soit pour le sol inoculé, soit pour le sol contrôle. Ainsi dans ces conditions expérimentales, l'amidon n'induit pas le développement ni de la population bactérienne totale ni celle de B.licheniformis.

Tableau 36 : Influence de l'inoculation du sol Steinhof, amendé avec 1% d'amidon, par B.licheniformis s<sub>4</sub> sur la croissance des saprophytes aérobies et de B.licheniformis s<sub>4</sub>

Durée d'incubation jour	Contrôle		Sol inoculé par <u>B. licheniformis</u>	
	Nombre de bactéries .10 <sup>6</sup>	Nombre de <u>B.licheniformis</u>	Nombre de bactéries .10 <sup>6</sup>	Nombre de <u>B.licheniformis</u> .10 <sup>6</sup>
0	160	0	65.5	0.75
4	142	0	158.0	0
5	111	0	191.5	0.50
7	179	0	162.0	0.67

### 6. 5. 2. Influence sur l'activité amylasique

Dans cet essai on considère la biosynthèse enzymatique durant trois phases, définies comme suit (cf. figure 30) :

- phase 1 : correspondant à la synthèse enzymatique entre les jours 0 et 2.
- phase 2 : synthèse ayant lieu entre les jours 2 et 5.
- phase 3 : synthèse ayant lieu entre les jours 5 et 7.

On a choisi ces 3 phases afin de pouvoir, éventuellement lors de cette période expérimentale, mettre en évidence une adaptation au métal de la microflore amylolytique. En effet, dans le milieu liquide on a observé après une latence de 24 à 48 heures une adaptation au cadmium de la croissance de B.licheniformis.

Pour calculer la biosynthèse on établit cette relation :

$$\frac{A_x - A_y}{x - y}$$

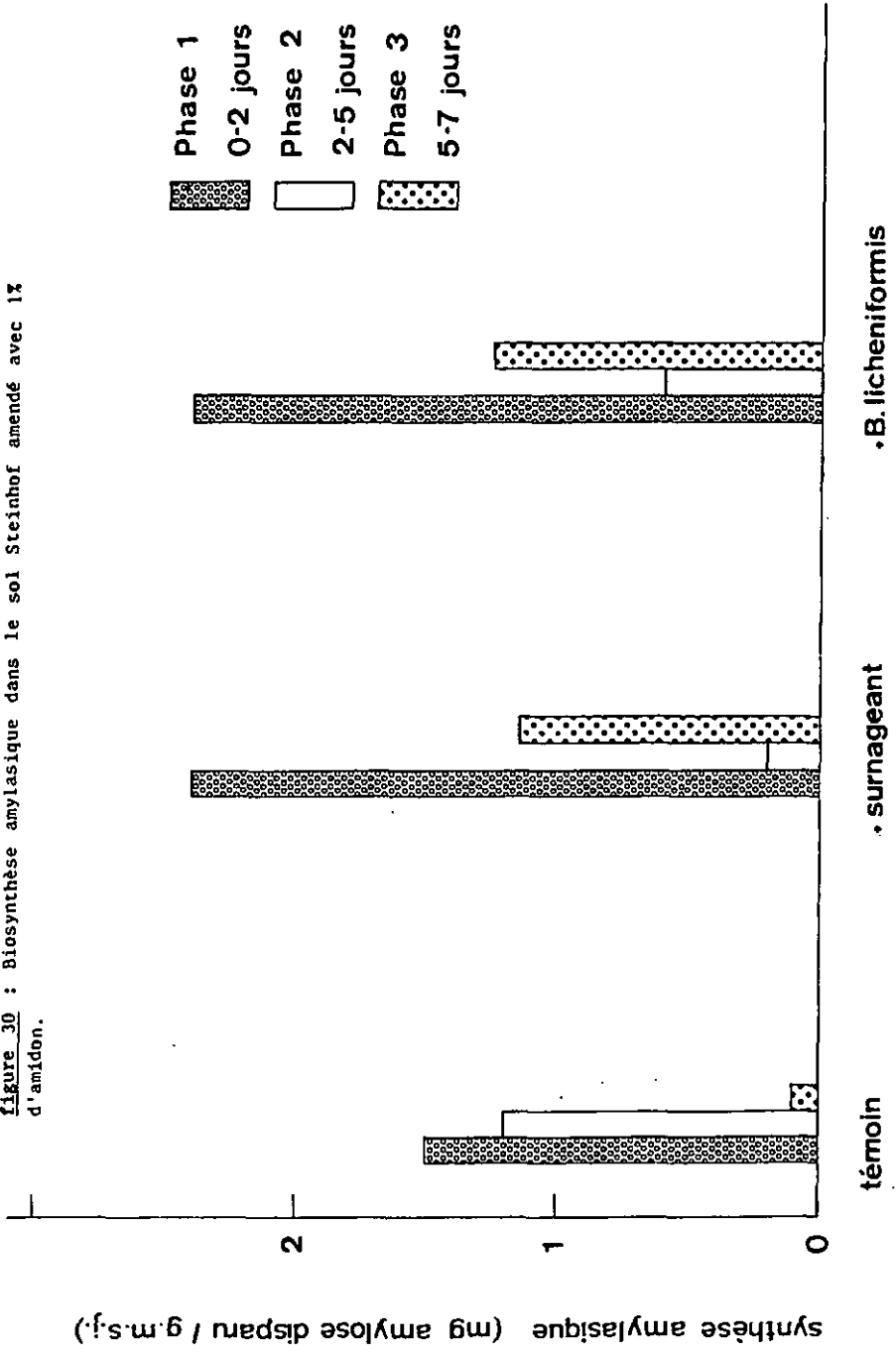
- avec  $x = 2$ ;  $y = 0$  pour la phase 1
- $x = 5$ ;  $y = 2$  pour la phase 2
- $x = 7$ ;  $y = 5$  pour la phase 3.

On observe pour le sol témoin une biosynthèse enzymatique maximale durant la phase 1 puis elle diminue lors des deux phases successives.

On remarque durant la phase 1 que la biosynthèse amylasique, dans le sol contenant soit le surnageant soit B.licheniformis  $s_4$  est supérieure à celle mesurée dans le sol témoin. On ne distingue cependant aucune influence de B.licheniformis  $s_4$  sur la biosynthèse enzymatique. On obtient effectivement la même biosynthèse dans les sols traités soit avec B.licheniformis soit avec le surnageant.

L'augmentation de la biosynthèse observée dans les sols contenant le surnageant ou B.licheniformis  $s_4$  pourrait s'expliquer par le fait que la culture bactérienne contient des molécules stimulant la biosynthèse amylasique des germes amylolytiques présents dans le sol. L'augmentation de la synthèse ne peut pas provenir de B.licheniformis  $s_4$  puisque les activités enzymatiques considérées aux jours 0 et 2 (cf. tableau 37) sont identiques quel que soit le sol considéré (les traitements faits).

Figure 30 : Biosynthèse amyliasique dans le sol Steinhof amendé avec 1% d'amidon.



Durant les phases 2 et 3 on observe, comme pour le sol témoin, une diminution de la biosynthèse dans les sols contenant soit le surnageant soit B.licheniformis s<sub>4</sub>.

**Tableau 37** : Effet de l'inoculation du sol Steinhof par B.licheniformis sur l'activité amyliasique après adjonction d'amidon à 1%

Durée d'incubation jour	Activité amyliasique mg d'amylase disparu/g.m.s.4h		
	Contrôle	Sol + surnageant	Sol + <u>B.licheniformis</u>
0	2.6	2.6	2.5
1	2.8	2.8	2.7
2	5.6	7.4	7.3
5	9.2	8.0	9.1
6	10.6	10.2	9.6
7	9.4	10.3	11.6

6. 6. Influence du cadmium sur la synthèse de l'amylase, la microflore totale et amylytique du sol Steinhof

Après avoir inoculé le sol Steinhof stérile avec B.licheniformis s<sub>4</sub> on s'est aperçu que la croissance bactérienne de même que la synthèse de son  $\alpha$ -amylase étaient trop faibles pour entreprendre une étude avec les métaux lourds.

Le développement de la population bactérienne ainsi que la synthèse amyliasique n'ont pas été améliorés après adjonction soit d'un agent germinateur soit d'une source de carbone (amidon).

Dans cette expérience on décide d'étudier l'effet des métaux lourds sur la synthèse amyliasique régie par la population amylytique du sol Steinhof natif amendé avec de l'amidon à 1%.

Ce travail a pour buts :

- de déterminer lequel des paramètres - synthèse enzymatique, population des saprophytes aérobies et celle des germes amylolytiques - réagit avec le plus de sensibilité au cadmium.
- d'observer si, comme dans la solution synthétique liquide, on a, après 48 heures, la sélection de souches résistantes au cadmium.

Dans une boîte de polystyrol préalablement stérilisée avec de l'alcool on met :

- 58.8 g. de sol frais correspondant à 50 g.m.a. de sol
- 5 g. d'amidon
- 1.65 ml d'une préculture de B.licheniformia

On choisit d'ajouter au sol cette bactérie, bien qu'elle n'ait qu'une faible influence sur la biosynthèse amyliasique, car elle a été le sujet de la première partie de notre étude.

- 1 ml de solution de  $CdCl_2$  de différentes concentrations. Ces concentrations sont choisies de manière à ce que les concentrations finales de Cd soient 0.1; 1; 10; 100; 1000 et 10000  $\mu g/g.m.a.$
- de l'eau stérile de façon à ce que le sol ait 41.3% de sa capacité maximale en eau.

La répartition de la préculture et des solutions de cadmium ajoutées au sol est décrite sous le point 6. 4.

Après 2 heures, 2, 4 et 7 jours d'incubation à 25°C, on analyse le nombre de bactéries saprophytes aérobies, amylolytiques et l'activité amyliasique. Le nombre des bactéries est déterminé selon la méthode du nombre le plus probable de germes (cf. tables de McCrady).

La quantité de Cd soluble est déterminée après 7 jours d'incubation.

La synthèse amylasique est définie selon trois étapes :

- la synthèse entre les jours 0 et 2 (phase 1) :

$$\frac{A_2 - A_0}{t_2 - t_0}$$

- la synthèse entre les jours 2 et 4 (phase 2) :

$$\frac{A_4 - A_2}{t_4 - t_2}$$

- la synthèse entre les jours 4 et 7 (phase 3) :

$$\frac{A_7 - A_4}{t_7 - t_4}$$

avec  $A_0, A_2, A_4, A_7$  = activité enzymatique mesurée aux jours 0, 2, 4 et 7.

$t_0, t_2, t_4, t_7$  = temps d'incubation 0, 2, 4 et 7 jours

#### 6. 6. 1. Effet sur la microflore totale et amylolytique

Pour des concentrations de cadmium inférieures à 100  $\mu\text{g Cd total/g.m.s.}$  la population des germes saprophytes aérobies n'est pas influencée (cf. figure 31).

Avec 100, 1000 et 10000  $\mu\text{g Cd total/g.m.s.}$  on remarque, en début d'expérience, que le nombre des germes saprophytes aérobies est inférieur à celui que l'on détermine dans le sol témoin. Il semblerait qu'on ait ici la destruction des germes saprophytes aérobies sensibles au cadmium.

Avec 100  $\mu\text{g Cd total/g.m.s.}$  on remarque une forte augmentation de la population des germes saprophytes aérobies entre les jours 2 et 4. Il est possible qu'après 4 jours d'incubation une flore mutante ou préexistante résistante au cadmium supplante la population dominante initiale sensible au cadmium.

**figure 31** : Influence du cadmium sur la population des saprophytes aérobie du sol Steinhof naturel amendé avec 1% d'anidon.

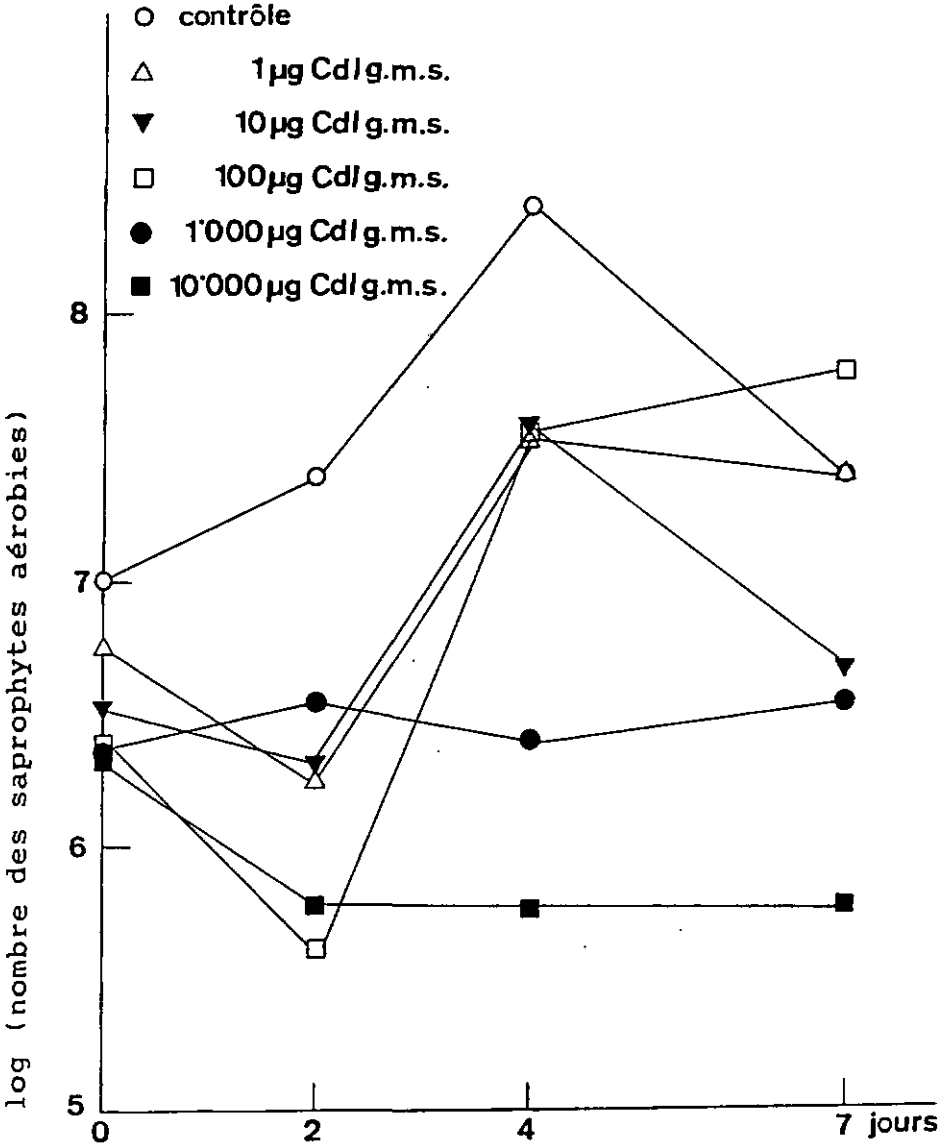
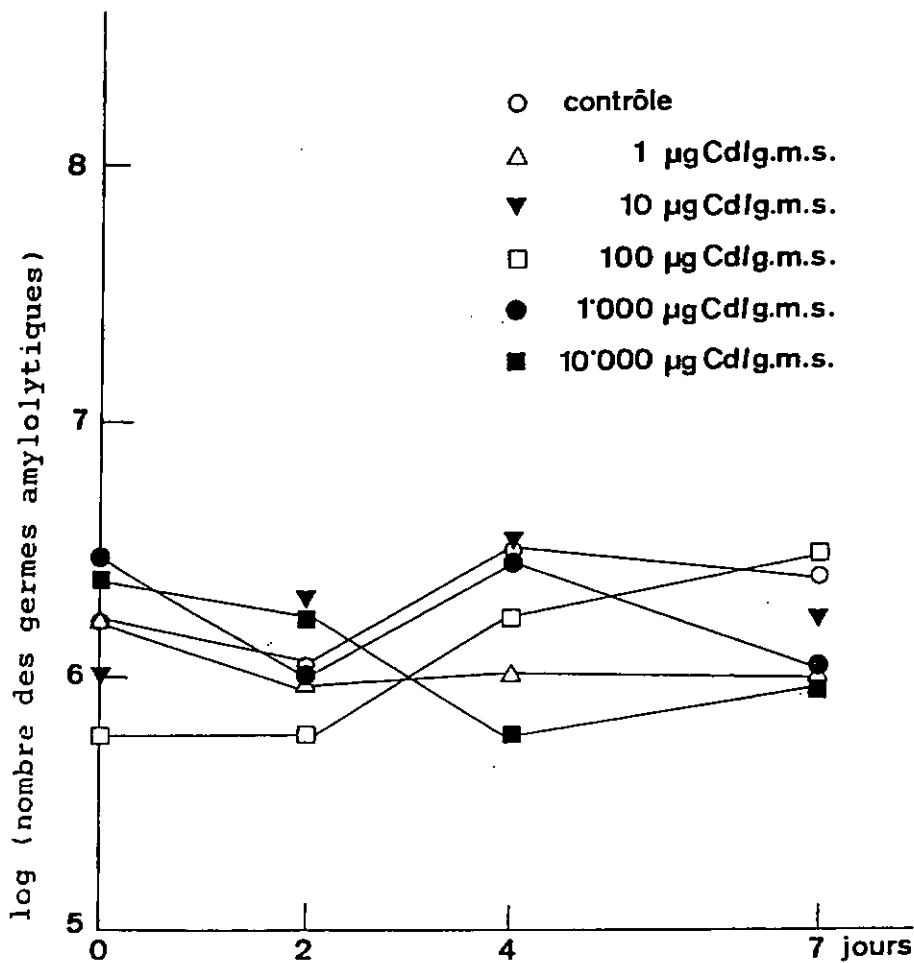


figure 32 : Influence du cadmium sur la population des germes amylolytiques du sol Steinhof natif amendé avec 1% d'amidon.



Avec 1000  $\mu\text{g}$  Cd total/g.m.s. on n'observe aucune variation importante du nombre des germes totaux durant la période d'incubation.

Avec 10000  $\mu\text{g}$  Cd total/g.m.s. une partie des germes saprophytes aérobies est détruite durant les deux premiers jours d'incubation puis n'est pas remplacée.

Il semblerait que la sélection d'une flore résistante au cadmium a lieu jusqu'à une certaine concentration de métal puis au-delà aucune sélection de germes résistants n'est possible.

La population des germes amylolytiques réagit d'une manière analogue à celle des saprophytes aérobies. En-dessous de 100  $\mu\text{g}$ /g.m.s. le cadmium n'influence pas d'une manière significative le développement des germes amylolytiques (cf. figure 32).

Avec 100  $\mu\text{g}$  Cd total/g.m.s. le nombre des germes amylolytiques se trouve en dessous de celui qui est analysé dans le sol témoin durant les deux premiers jours d'incubation. Après 48 heures le nombre des germes amylolytiques augmente.

Ces observations suggèrent que la flore initiale est détruite par le cadmium puis, après 4 et 7 jours, une flore résistante au cadmium s'installe.

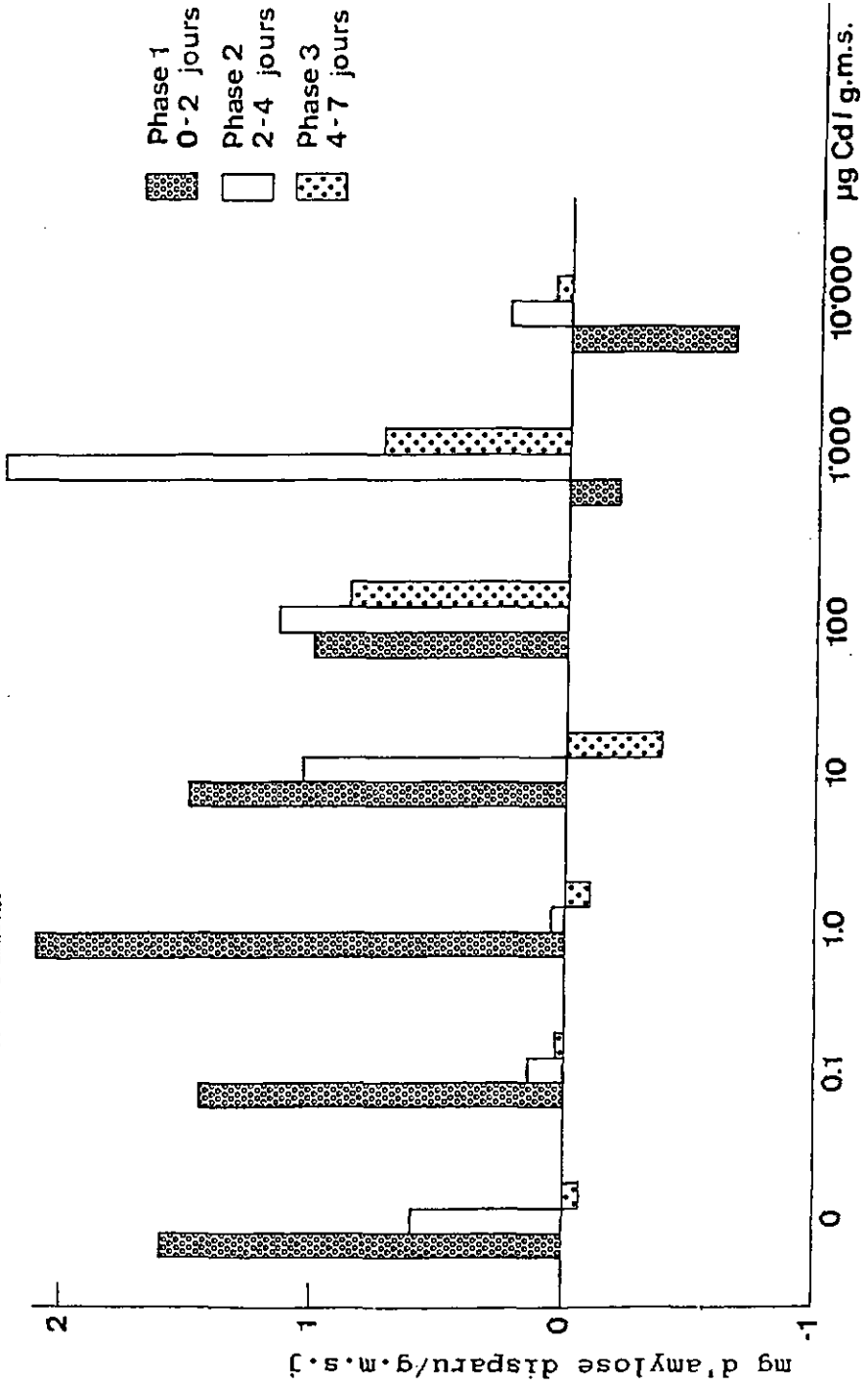
Avec 1000 et 10000  $\mu\text{g}$  Cd total/g.m.s. la flore amylolytique réagit au cadmium de la même façon que la flore des saprophytes aérobies.

Il n'est pas à exclure que le cadmium pourrait avoir un effet bactéricide au-dessous de 100  $\mu\text{g}$  Cd total/g.m.s. vis à vis d'une flore sensible à ce métal. Cependant notre méthode de détermination du nombre des germes ne permet pas d'observer les variations dans l'équilibre des populations microbiennes.

#### 6. 6. 2. Effet sur la synthèse amyliasique

Lors de la première phase (0-2 jours) on observe une augmentation de la biosynthèse amyliasique en présence de 1  $\mu\text{g}$  Cd total/g.m.s. (figure 33). Cette stimulation pourrait résulter d'une perturbation de cette synthèse enzymatique. Au-delà de 10  $\mu\text{g}$  /g.m.s. le cadmium réprime la biosynthèse. En présence de 1000 et 10000  $\mu\text{g}$  Cd total/g.m.s. l'enzyme est détruite.

hof naturel amendé avec 1% d'amidon.



Durant la seconde phase (2-4 jours) la biosynthèse amylasique est retardée en présence de 1000 µg Cd total/g.m.s.

Lors de la troisième phase (4-7 jours) on remarque qu'avec 100 et 1000 µg Cd total/g.m.s. la biosynthèse cozymatique est supérieure à celle du sol témoin.

Ces derniers résultats suggèrent que la biosynthèse qui a lieu après 48 heures provient de l'activité d'une nouvelle flore microbienne résistante au cadmium. De plus il se peut qu'on ait la synthèse de nouvelles amylases plus résistantes au cadmium que les amylases préexistantes.

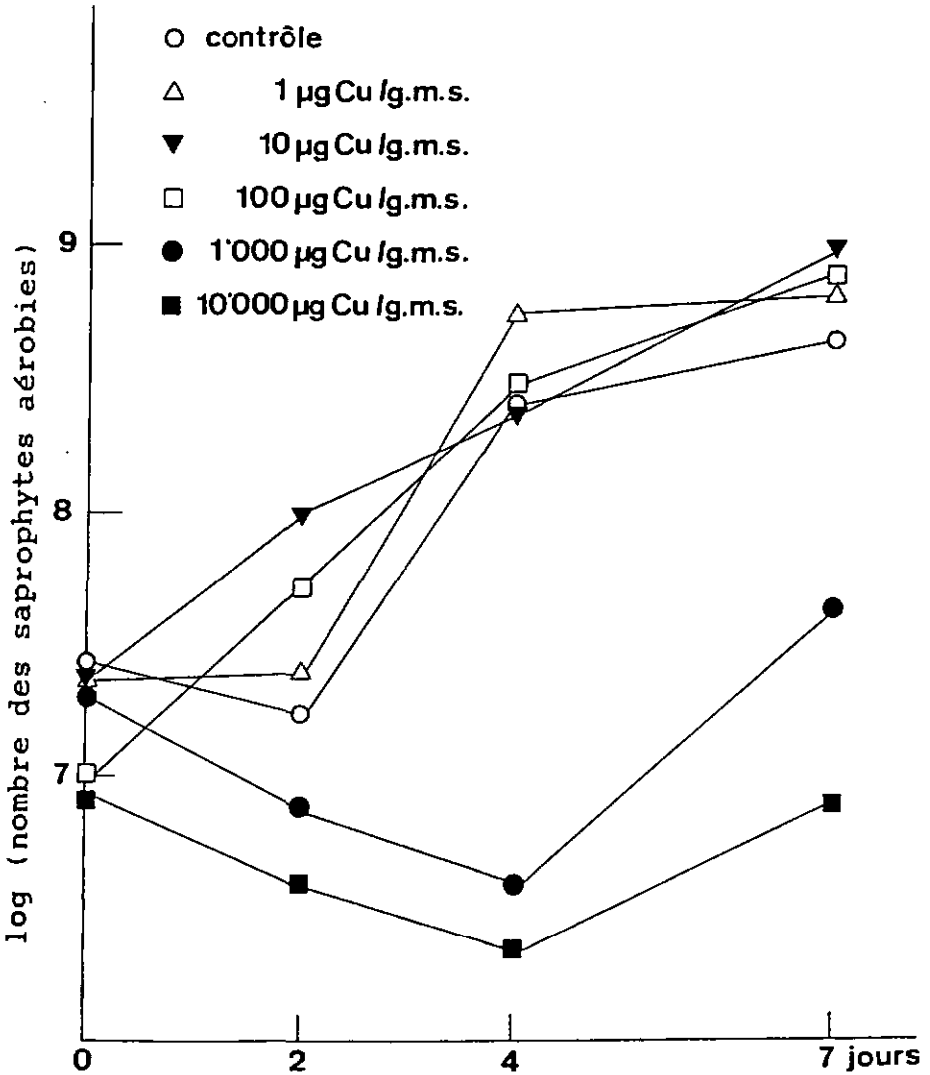
**Tableau 38 : Influence du cadmium sur l'activité amylasique du sol Steinhof amendé avec 1% d'amidon.**

Teneur en cadmium µg/g.m.s	Durée d'incubation jour			
	0	2	4	7
0	3.1	6.3	7.5	7.3
0.1	3.3	6.4	6.7	6.8
1	2.8	7.0	7.1	6.8
10	3.0	6.0	8.1	7.0
100	3.1	5.1	7.4	10.0
1000	3.0	2.6	7.1	9.3
10000	3.0	1.7	2.2	2.4

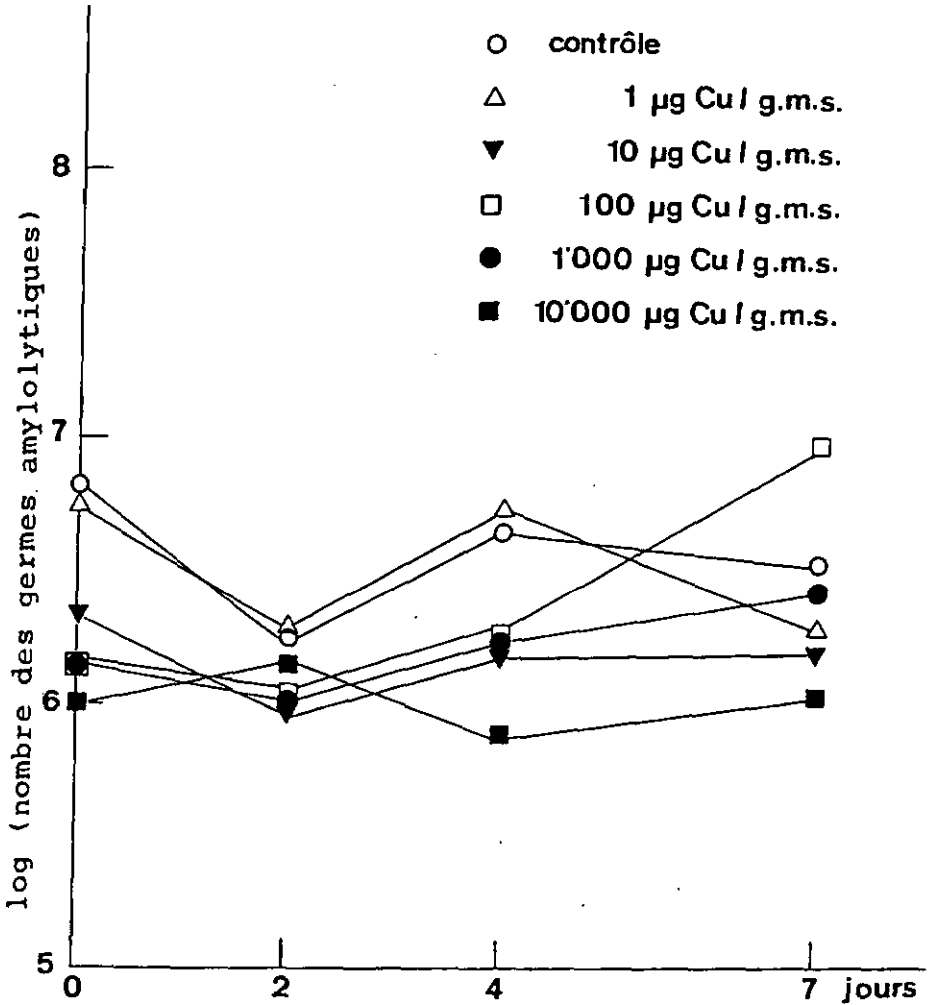
**6. 7. Influence du cuivre sur la synthèse amylasique la microflore totale et amylolytique du sol Steinhof**

Cette expérience est réalisée de la même manière que celle décrite sous le paragraphe 6. 6. Le cuivre est ajouté à la place du cadmium. Les concentrations de cuivre choisies sont les mêmes que pour le cadmium. L'analyse du cuivre soluble est aussi réalisée en fin d'expérience.

figure 34 : Influence du cuivre sur la population des germes saprophytes aérobie du sol Steinhof naturel amendé avec 1% d'amidon.



**figure 35** : Influence du cuivre sur la population des germes amylolytiques du sol Steinhof naturel amendé avec 1% amidon.



### 6. 7. 1. Effet sur la microflore totale et amylolytique

Pour le sol témoin et pour les sols contenant 1, 10 et 100  $\mu\text{g}$  Cu/g.m.s. la population des saprophytes aérobies augmente durant le temps d'incubation (cf. figure 34). La croissance est plus rapide pour les sols contenant 10 et 100  $\mu\text{g}$  Cu total/g.m.s.

En présence de 1000 et 10000  $\mu\text{g}$  Cu total/g.m.s. la population microbienne diminue durant les quatre premiers jours d'incubation. Cette diminution est fonction de la concentration du cuivre et pourrait provenir de l'élimination des germes sensibles. Après sept jours le nombre des germes saprophytes aérobies, comparé avec celui obtenu après quatre jours, a augmenté. Cette observation suggère qu'une nouvelle flore, mutante ou préexistante, résistante au cuivre a remplacé la population initiale sensible au cuivre.

La microflore amylolytique ne semble pas être influencée significativement en-dessous de 100  $\mu\text{g}$  Cu total/g.m.s. (cf. figure 35).

Avec 100, 1000 et 10000  $\mu\text{g}$  Cu total/g.m.s. le nombre des germes initialement présents est inférieur à celui qui est déterminé dans le sol témoin.

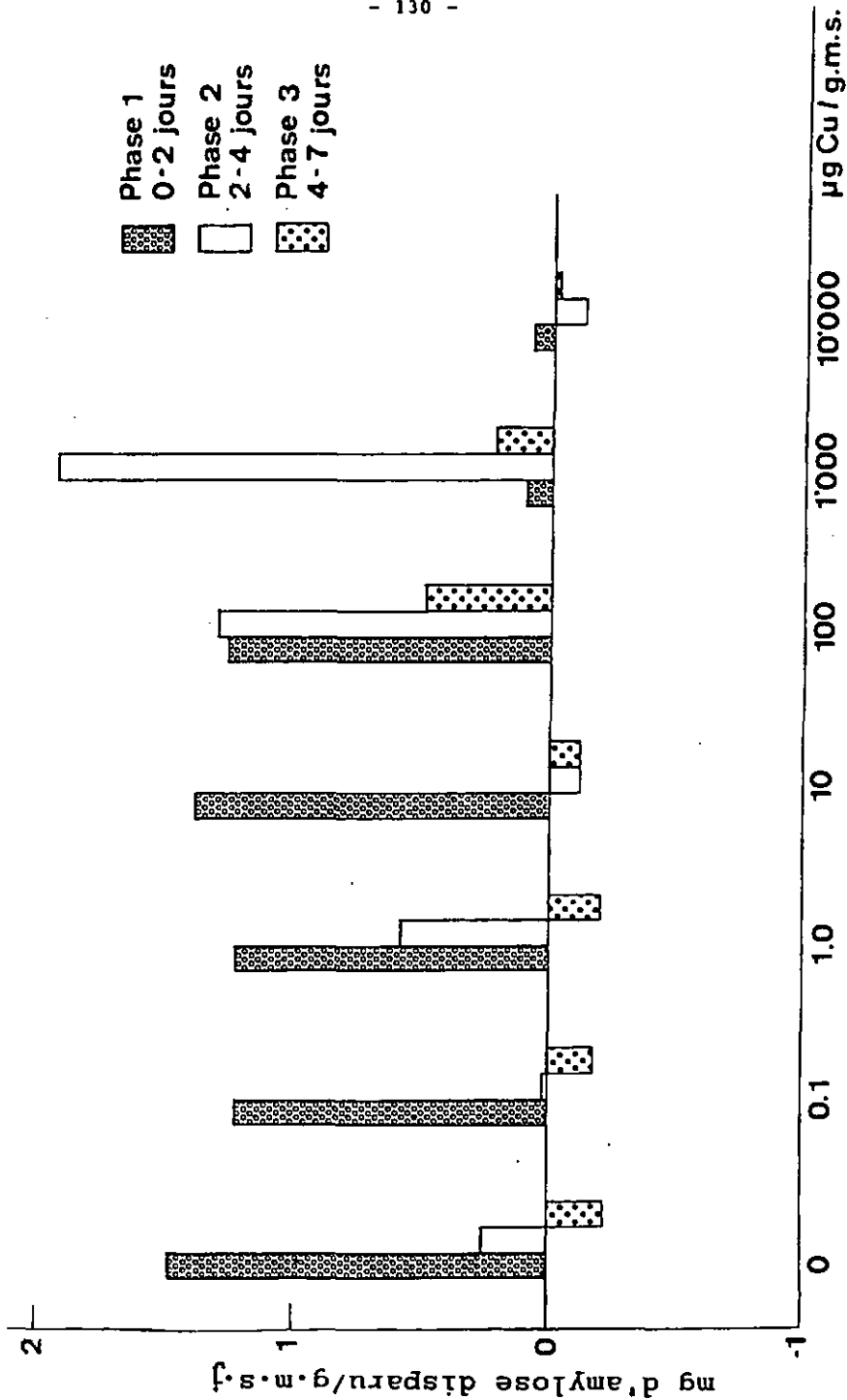
En présence de 100  $\mu\text{g}$  Cu total/g.m.s. le nombre des germes amylolytiques, après une phase de latence de 48 heures, subit une forte augmentation qui pourrait être due au développement d'une nouvelle flore résistante au cuivre. Avec 1000  $\mu\text{g}$  Cu total/g.m.s. on observe le même phénomène mais d'une manière moins distincte.

Avec 10000  $\mu\text{g}$  Cu total/g.m.s. la flore est maintenue plus ou moins constante au cours du temps d'incubation. Il semblerait que pour des concentrations de cuivre aussi élevées la sélection de germes résistants au cuivre n'ait plus lieu.

### 6. 7. 2. Influence sur la synthèse amyliasique

Lors de la première phase (0-2 jours) la synthèse enzymatique n'est pas réprimée pour des concentrations inférieures à 100  $\mu\text{g}$  Cu total/g.m.s. Avec 100  $\mu\text{g}$  Cu total/g.m.s. on observe une répression de la biosynthèse enzymatique qui augmente avec la concentration du métal (figure 36).

Figure 36 : Influence du cuivre sur la synthèse amyliasique du sol Steinhof naturel amendé avec 1% d'amidon.



Durant la seconde phase (2-4 jours), la synthèse amylasique est retardée en présence de 1000  $\mu\text{g}$  Cu total/g.m.s. Avec 10000  $\mu\text{g}$  Cu total/g.m.s. la biosynthèse est totalement réprimée.

Lors de la troisième phase (4-7 jours), la biosynthèse enzymatique en présence de 100 et 10000  $\mu\text{g}$  Cu total/g.m.s. est plus élevée que celle que l'on détermine dans le sol témoin.

Ces résultats suggèrent les hypothèses suivantes :

- la biosynthèse amylasique due à des germes sensibles au cuivre (phase 1) est réprimée à partir de 100  $\mu\text{g}$  Cu total/g.m.s.
- après 48 heures (phase 2) une flore mutante ou préexistante résistante au cuivre remplace la population des germes amylolytiques sensibles initialement dominante. Cette nouvelle flore synthétise de nouvelles enzymes. Celles-ci peuvent être plus résistantes au cuivre que celles qui se trouvaient au départ dans le sol.

**Tableau 39** : Influence du cuivre sur l'activité amylasique du sol Steinhof amendé avec 1% d'amidon.

Teneur en cuivre $\mu\text{g/g.m.s.}$ totale	Durée d'incubation jour			
	0	2	4	7
0	2.62	5.58	6.08	5.42
0.1	2.61	5.04	5.12	4.54
1	2.75	5.20	6.38	5.77
10	2.47	5.24	5.00	4.63
100	2.31	4.83	7.42	8.89
1000	1.93	2.13	5.98	6.65
10000	1.34	1.50	1.26	1.24

## 7. DISCUSSION

Dans un milieu liquide synthétique, on a testé l'influence du cadmium et du cuivre sur la croissance de B. licheniformis, la synthèse et l'activité de son  $\alpha$ -amylase. Afin d'exprimer la toxicité des métaux lourds à l'égard de ces paramètres biologiques, on a défini trois paramètres: la concentration limite de toxicité (CLT), les concentrations causant soit 20 ( $IC_{20}$ ) soit 50 % ( $IC_{50}$ ) d'inhibition. Ces valeurs ont été obtenues mathématiquement. Dans la seconde phase du travail, on a observé dans un milieu complexe, le sol, quelles étaient les réponses au cadmium et au cuivre des mêmes paramètres biologiques. Les résultats obtenus contribuent à l'élaboration des valeurs indicatives pour le cadmium et le cuivre figurant dans l'Ordonnance sur les polluants du sol (Oaol).

### 7. 1. Valeurs pour le cadmium et pour le cuivre de CLT; $IC_{20}$ et $IC_{50}$

Les valeurs CLT;  $IC_{20}$  et  $IC_{50}$  pour le cadmium sont mentionnées au tableau 40 et celles pour le cuivre au tableau 41. Elles sont données pour la croissance de B. licheniformis et la synthèse  $\alpha$ -amylasique, en teneur totale et non en teneur soluble. L'analyse du cadmium et du cuivre sous forme ionique n'était pas possible car les concentrations étaient en-dessous du seuil de détection du polarographe qui est de 5 ppb pour les 2 éléments. Pour l'activité  $\alpha$ -amylasique, les teneurs solubles de CLT,  $IC_{20}$  et  $IC_{50}$  représentaient approximativement le douzième et le quarantième de la teneur totale respectivement du cadmium et du cuivre. Ces résultats indiquent que le cuivre présent dans le milieu liquide se trouvait plus sous une forme liée chimiquement que ne l'était le cadmium.

**Tableau 40** : Sensibilité au cadmium de la croissance de B.licheniformis s<sub>4</sub> de la synthèse et de l'activité de son α-amylase dans un milieu liquide synthétique.

Paramètres biologiques	CLT (µg Cd/ml)		IC <sub>20</sub>		IC <sub>50</sub>	
	total	soluble	total	soluble	total	soluble
Croissance	0.05	-	0.13	-	0.64	-
Synthèse de l'α-amylase	0.13	-	0.44	-	2.05	-
Activité de l'α-amylase	208.58	16.5	238.71	19.0	283.08	22.0

**Tableau 41** : Sensibilité au cuivre de la croissance de B.licheniformis s<sub>4</sub> de la synthèse et de l'activité de son α-amylase dans un milieu liquide synthétique

Paramètres biologiques	CLT (µg Cu/ml)		IC <sub>20</sub>		IC <sub>50</sub>	
	total	soluble	total	soluble	total	soluble
Croissance	0.34	-	0.41	-	0.54	-
Synthèse de l'α-amylase	0.03	-	0.10	-	0.95	-
Activité de l'α-amylase	22.76	0.58	28.37	0.65	36.76	0.75

Dans notre travail les concentrations inhibant de 50 % la croissance de B.licheniformis s<sub>4</sub> sont de 0.637 µg Cd/ml et de 0.54 µg Cu/ml. Ces concentrations sont très faibles par rapport à celles obtenues par HAAVIK (1976) pour B.licheniformis ATCCI4580 qui sont égales à 9 µg Cd/ml et à 21.8 µg Cu/ml. Pour d'autres espèces de Bacillus les concentrations de cadmium causant un début d'inhibition de la croissance sont de 10 µg/ml pour B.subtilis (SUROWITZ et al.1984) et de 40 µg/ml pour B.cereus (DOYLE et al.1974) contre 0.052 µg/ml pour notre bactérie. Ces grandes différences s'expliquent par le fait que le milieu de culture utilisé dans notre étude est un milieu synthétique simple composé uniquement de quelques sels et d'une source de carbone (cf. Matériels et Méthodes ) alors que les milieux utilisés par les auteurs cités précédemment sont très complexes. Le milieu dans lequel pousse B.licheniformis ATCCI4580 contient des substances complexes telles le Difco Bacto-soytone et le Difco Bacto-peptone, celui utilisé pour la croissance de B. subtilis du tryptophane et celui

dans lequel pousse B.cereus est du bouillon de culture. Ces substances, en complexant les métaux lourds, réduisent leur toxicité (GADD et al.197B, STERRIT et al.1980).

On observe pour B.licheniformis s<sub>4</sub> une diminution de l'activité amylasique de 50% en présence de 36.B µg Cu total/ml et de 20% avec 23B.7 µg Cd total/ml. KRISHNAN et al. (1983) trouvent que l'activité enzymatique de B.licheniformis CUCMC 305 diminue de 42% avec 31.B µg Cu total/ml et de 20% en présence de 56.2 µg Cd/ml.

Pour le cuivre nos résultats concordent avec ceux de KRISHNAN et al. alors que pour le cadmium l'activité α-amylasique de B.licheniformis CUCMC 305 est environ quatre fois plus sensible que celle de notre souche. Cette variation dans la réponse au cadmium d'amylases synthétisées par des souches de B.licheniformis différentes suggère que la composition ou la séquence des acides aminés de l'α-amylase peut changer d'une souche à l'autre et entraîner une sensibilité différente à l'égard de certains métaux lourds. De plus des substances contenues dans le surnageant telles des petites protéines, des polysaccharides et des métabolites produits au cours de la croissance de B.licheniformis a<sub>4</sub> pourraient lier le cadmium et abaisser ainsi son effet inhibiteur sur l'α-amylase.

## 7. 2. Toxicité du cadmium et du cuivre envers la croissance de B. licheniformis, la synthèse et l'activité de son α-amylase

En fonction des valeurs CLT obtenues (cf. tableaux 40 et 41) on remarque que le cadmium et le cuivre possèdent une séquence de toxicité différente pour les paramètres biologiques étudiés:

Cd : croissance > synthèse de l' α-amylase > activité de l' α-amylase

Cu : synthèse de l' α-amylase > croissance > activité de l'α-amylase

La croissance de B. licheniformis se montre plus sensible au cadmium (CLT = 0.05 µg/ml) qu'au cuivre (CLT = 0.34 µg/ml). On observe, cependant que le taux de croissance µ diminue plus lentement lorsqu'on ajoute au milieu de culture du cadmium que du cuivre (cf. graphiques 10 et 17). En effet, de faibles augmentations de cuivre entraînent une diminution brutale du taux de croissance. Cette observation suggère l'hypothèse suivante: le cuivre, élément essentiel à la vie, peut pénétrer dans la cellule par une perméase spécifique. Une fois dans le cytoplasme il se liera à des protéines cupriques essentielles au métabolisme cellulaire alors que l'excédent pourra se fixer de manière non spécifique à des groupements -SN; NH<sub>2</sub> ou

-COOH d'autres protéines les rendant ainsi partiellement ou totalement inactives. Le cadmium par contre utilisera une perméase spécifique au  $Mn^{2+}$  (Silver, 1981) pour entrer dans la cellule. A l'intérieur il pourra, comme le cuivre, inactiver certaines protéines en se fixant aux groupements amino, carboxyle ou sulfhydrile. Il pourra d'autre part exercer une toxicité indirecte en créant une carence de  $Mn^{2+}$  dans la cellule.

B. licheniformis réagit différemment à la toxicité du cadmium et à celle du cuivre. La durée de la phase de latence double lorsqu'on passe pour le cadmium de CLT à  $IC_{50}$  alors que pour le cuivre le passage de CLT à  $IC_{50}$  ne s'accompagne d'aucune modification de la durée de la phase de latence (cf. tableaux 14 et 22). Ces résultats suggèrent que la cellule peut s'adapter au cadmium mais non au cuivre. Nous avons effectivement isolé d'un milieu riche en cadmium (80  $\mu g/g.m.s.$ ) une série de mutants résistants à cet élément alors que nous n'avons sélectionné aucun mutant pour le cuivre. Nous n'affirmerons pas, cependant, que B. licheniformis  $s_4$  ne puisse pas présenter un phénomène de résistance au cuivre car nous n'avons pas disposé de suffisamment de temps pour approfondir nos études à ce sujet. Les mutants accumulaient moins de cadmium dans leur cellule que la souche sauvage. Le mécanisme de la résistance acquise par la mutation n'a pas pu être éclaircie. On entrevoit cependant deux hypothèses de travail:

- une modification de la perméabilité membranaire
- la synthèse de substances chélatantes immobilisant le cadmium du milieu.

Les mutants au cadmium semblent jouer un rôle important à l'égard des souches sensibles. En effet après avoir isolé différentes souches d'un milieu enrichi en cadmium (80  $\mu g/ml$ ), on a observé que lorsqu'on les remettait, individuellement en culture dans un milieu contenant du cadmium certaines ne poussaient plus du tout. Ce phénomène nous suggère d'opter pour la deuxième des hypothèses de travail présentées ci-dessus.

Comparé au cadmium, le cuivre exerce une grande toxicité à l'égard du système  $\alpha$ -amylasique. La synthèse de l' $\alpha$ -amylase s'est montrée particulièrement sensible au cuivre (CLT = 0.03  $\mu g Cu/ml$ ) et au cadmium (CLT = 0.13  $\mu g Cd/ml$ ).

### 7. 3. Réponse de la croissance de *B.licheniformis*, la synthèse et l'activité de l' $\alpha$ -amylase au cadmium et au cuivre dans un sol

Ce point n'a pas pu être élucidé. Après avoir stérilisé le sol Steinhof avec des doses différentes de rayonnement gamma on s'est aperçu que *B.licheniformis* s<sub>4</sub> colonisait difficilement le sol stérile (cf. figure 26) et qu'après quatre jours la bactérie reatait inactive (cf. figures 27 et 28). La synthèse de l' $\alpha$ -amylase était si faible qu'il ne nous a pas été possible d'étudier l'effet des métaux lourds sur ce processus. Ce comportement de "dormance" de *B.licheniformis* s<sub>4</sub> n'a pas été modifié après avoir ajouté, soit au sol stérilisé, soit au sol naturel, des concentrations croissantes de nutriment carboné (amidon de 1 à 4 %). De même des adjonctions de L-alanine, substance connue comme agent germinateur des spores, n'a eu aucune influence sur le métabolisme de la bactérie.

Ces résultats sont surprenants étant donné que nous avons choisi cette bactérie pour notre étude parce que représentante du genre *Bacillus* qui est très répandu dans les sols et possède une aptitude extraordinaire à coloniser des habitats très différents (BERGEY 1974, PRIEST 1977). De plus nos résultats ne semblent pas correspondre à ceux obtenus par WEST et al. (1985). Ces auteurs ont observé, après avoir amendé un sol autoclavé avec de l'extrait de levure, du glucose et du K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, une meilleure croissance de *B.cereus* et de *B.thuringiensis*. Ils ont aussi démontré que la croissance de ces deux espèces était totalement inhibée dans des sols naturels ou autoclavés de pH 5.0.

Ainsi il se pourrait que la faible croissance de *B.licheniformis* s<sub>4</sub> soit due au pH légèrement acide du sol Steinhof. Cependant nos expériences n'apportent aucun élément nous permettant d'adopter cette hypothèse plutôt qu'une autre.

### 7. 4. Influence du cadmium et du cuivre sur la croissance des germes saprophytes, des germes amylolytiques, sur la synthèse et l'activité amylasique dans un sol naturel

Vu les difficultés d'obtenir une forte croissance de *B.licheniformis* s<sub>4</sub> et une synthèse importante de son  $\alpha$ -amylase dans le sol Steinhof irradié, on s'est décidé d'étudier l'effet du cadmium et du cuivre sur :

- la population des saprophytes aérobies et sur l'activité amylasique du sol Steinhof naturel

- la croissance des saprophytes aérobies, des germes amylolytiques et de la synthèse amylasique dans le sol Steinhof naturel après amendement avec de l'amidon à 1 %.

Les résultats de cette étude sont présentés aux tableaux 42 et 43.

**Tableau 42** : Sensibilité au Cd de différents paramètres biologiques étudiés dans le sol Steinhof.

Paramètres biologiques	CLT ( $\mu\text{g Cd/g.m.s.}$ )	
	total	soluble
Population des saprophytes aérobies	1000-2500	338-1130
Croissance des saprophytes aérobies	100-1000	5.8-199.4
Croissance des germes amylolytiques	100-1000	5.8-199.4
Activité amylasique	100-250	3.6-58
Synthèse amylasique		
- par des germes sensibles	1-10	0.03-0.39
- par des germes résistants	1000	199.4

**Tableau 43** : Sensibilité au Cu de différents paramètres biologiques étudiés dans le sol Steinhof.

Paramètres biologiques	CLT ( $\mu\text{g Cu/g.m.s.}$ )	
	total	soluble
Population des saprophytes aérobies	250-1000	4.9-197
Croissance des saprophytes aérobies	100-1000	0.16-98.3
Croissance des germes amylolytiques	10000	6605.2
Activité amylasique	25-100	<0.06-0.06
Synthèse amylasique		
- par des germes sensibles	10-100	0.03-0.16
- par des germes résistants	1000	98.3

On remarque comme pour l'étude en milieu synthétique liquide une séquence de toxicité différente pour le cadmium et pour le cuivre :

Cd : synthèse amylasique > activité > croissance des saprophytes aérobies  
= croissance des germes amylolytiques > population des saprophytes  
aérobies

Cu : synthèse amylasique = activité > croissance des saprophytes aérobies  
> population des saprophytes aérobies > croissance des germes amylo-  
lytiques.

#### 7. 4. 1. Effet du cadmium et du cuivre sur la population, la croissance des germes saprophytes aérobies et sur la croissance des germes amylolyti- ques

La population des saprophytes aérobies est plus sensible au cuivre (197 µg Cu soluble/g.m.s.) qu'au cadmium (1130 µg Cd soluble/g.m.s.). Elle se comporte en paramètre biologique intéressant pour tester la toxicité des métaux lourds puisqu'il faut apporter aux sols des concentrations énormes pour qu'elle réagisse à ces éléments.

Cependant, nous avons observé au cours de notre travail, après avoir étalé sur boîte de Pétri des suspensions de sol fortement contaminé soit par le cadmium soit par le cuivre, que la diversité des colonies diminuait mais que le nombre total des bactéries était peu ou pas influencé par les métaux lourds. Nous n'avons cependant pas cherché à faire une analyse précise de ce phénomène. Certains auteurs l'ont mis en évidence et ont remarqué que d'une manière générale les bactéries Gram négatives sont plus tolérantes aux métaux lourds que les Gram positives (BABICH et al.1978, DUXBURY et al.1982). Parmi les bactéries Gram positives le genre Bacillus s'est montré très tolérant vis à vis des métaux lourds (TIMONEY et al.1978, AUSTIN et al.1977, BABICH et al.1978). De plus cette grande tolérance au cadmium et au cuivre de la population des saprophytes aérobies n'est pas très surprenante lorsqu'on connaît la réponse au cadmium de la croissance de B.licheniformis s<sub>4</sub> en milieu liquide synthétique. On observe une diminution du taux de croissance de la bactérie pour de faibles concentrations de cadmium (0,052 µg/ml). Mais lorsqu'on ajoute au milieu de culture des quantités de cadmium aussi élevées que 80 µg Cd/ml le taux de croissance de B.licheniformis s<sub>4</sub> devient du même ordre que celui obtenu lors de la croissance bactérienne dans un milieu dépourvu de cadmium. Nos résultats ont prouvé que ce phénomène était dû à la sélection de souches mutantes capables de se développer normalement dans un milieu fortement contaminé par le cadmium. Ce phénomène de tolérance au cadmium a été démontré pour des bactéries du sol par WILLIAMS et al. (1985). Ces auteurs ont remarqué en étudiant 58 bactéries que 7 étaient tolérantes, 13

non tolérantes, 9 étaient stimulées par 5 µg Cd/g.m.s. 29 étaient non tolérantes à 5 µg Cd/g.m.s. mais exprimaient une grande tolérance pour des concentrations de cadmium plus élevées que 5 µg/g.m.s. Ils en concluent que la réponse au cadmium des microorganismes du sol dépend certainement d'un mécanisme de protection qui est opératif pour de grandes concentrations de cadmium alors qu'il ne l'est pas pour de faibles concentrations de métal.

Dans notre étude on observe que la population des saprophytes aérobies est beaucoup plus sensible au cadmium et au cuivre dans le sol amendé avec 1% d'amidon que dans le sol naturel. Dans le sol non amendé avec 1% d'amidon la population des saprophytes aérobies reste constante au cours d'un mois d'étude (cf. figures 22 et 24) à l'exception des sols contenant 1000 µg/g.m.s. soit de cadmium soit de cuivre. Cette inertie provient du fait que la croissance des germes telluriques est limitée par un manque de nutriment. En effet après avoir ajouté au sol de l'amidon on observe un développement de la microflore des germes saprophytes aérobies et amylolytiques (cf. figures 31, 32, 34 et 35). Notre expérience prouve ainsi que le cuivre et le cadmium exercent une plus grande toxicité sur des microorganismes dont le métabolisme est actif que sur des germes en état d'inaction.

Dans cette étude on ne peut pas préciser lequel des deux paramètres - la croissance des saprophytes aérobies ou la croissance des germes amylolytiques - est le plus sensible au cadmium car pour chacun la concentration limite de toxicité se situe entre 5.8 et 199.4 µg Cd soluble/g.m.s. Afin de connaître lequel des deux montre la plus grande sensibilité au cadmium on aurait dû effectuer une série d'expériences avec plusieurs concentrations de métal situées entre 5.8 et 199.4 µg Cd soluble/g.m.s.

Pour le cuivre on observe la même chose. La concentration limite de toxicité pour la croissance soit des germes saprophytes aérobies soit des germes amylolytiques est située dans le domaine de concentrations allant de 0.16 à 98.3 µg Cu soluble/g.m.s.

Cependant la croissance des microorganismes étudiés paraît être plus sensible au cuivre qu'au cadmium. On remarque, de plus, que la croissance des saprophytes aérobies est stimulée pour des concentrations inférieures à 100 µg Cu total/g.m.s. ZIBILSKE et al. (1982) observent le même phénomène pour des sols traités avec respectivement 11 et 78 µg Cu/g.m.s. Dans notre cas il se peut que le sol Steinhof de pH 5.9 présente une légère carence en cuivre pour la croissance des microorganismes.

#### 7. 4. 2. Influence du cadmium et du cuivre sur l'activité amylasique d'un sol

L'activité amylasique du sol est très sensible au cuivre. On observe un début d'inhibition de l'activité pour des concentrations inférieures à 0.06 µg Cu soluble/g.m.s. Cette sensibilité au cuivre de l'activité amylasique dans les sols a aussi été notée par MATHUR et al. (1980) qui observent une inhibition de 50 % pour 5 µg Cu soluble/g.m.s. (cuivre extrait avec OIPA-TEA). L'activité amylasique dans le sol est moins sensible au cadmium qu'au cuivre. Le début d'inhibition de l'activité a lieu pour une concentration située entre 3.6 et 58 µg Cd soluble/g.m.s.

Les expériences faites dans le sol pour tester les concentrations soit de Cd soit de Cu causant un début d'inhibition de l'activité amylasique ne permettent pas d'estimer l'effet in situ des métaux lourds sur l'activité dans le sol. En effet les conditions de mesure de l'activité impliquent une dilution de l'échantillon de sol d'un facteur 35 (20 ml de tampon plus 10 ml de substrat). La concentration de métal lourd initialement présente diminue et son effet négatif sur l'activité enzymatique pourrait être ainsi annulé. Il est donc possible qu'en présence de quantités inférieures à 100 µg Cu total/g.m.s. ou à 250 µg Cd total/g.m.s. l'activité amylasique soit inhibée de manière réversible. La diminution de la quantité de métal qui se trouve en contact avec l'enzyme permettrait à cette dernière de retrouver son activité initiale. Par contre lorsque les métaux lourds se trouvent en quantité suffisamment grande ils endommageront la structure de l'enzyme de manière irréversible. Même après dilution des métaux lourds la structure amylasique ne pourra plus retrouver sa configuration fonctionnelle.

#### 7. 4. 3. Influence du cadmium et du cuivre sur la synthèse amylasique d'un sol

La synthèse de l'amylase dans le sol Steinhof est beaucoup moins sensible au cuivre que l'activité enzymatique. On observe durant la première phase (0-2 jours) une répression de la synthèse enzymatique entre 0.03 et 0.16 µg Cu soluble/g.m.s. Durant la seconde phase (2-4 jours) on remarque une biosynthèse retardée de l'amylase dans le sol contenant 98.3 µg Cu soluble/g.m.s.

Ces résultats suggèrent que la population amylolytique autochtone sensible au cuivre est remplacée après 48 heures de latence par une population amylolytique résistante au cuivre qui synthétiserait l'amylase même en présence de 98.3 µg Cu soluble/g.m.s.

La synthèse amylasique obtenue durant la troisième phase (4-7 jours) dans le sol contenant 98.3 µg Cu soluble/g.m.s. est beaucoup plus élevée que celle mesurée dans le sol contrôle durant la première phase de synthèse (0-2 jours). Ce phénomène pourrait s'expliquer à l'aide de 3 hypothèses :

- la première serait que, par l'élimination des populations microbiennes sensibles au cuivre, l'amidon ajouté au sol resterait disponible pour la flore résistante à ce métal. La disparition de la compétition pour la source de carbone entre ces deux populations favoriserait ainsi une bonne croissance des germes amylolytiques résistants. Un plus grand développement de ces germes amylolytiques entraînerait une plus forte synthèse amylasique. Afin de vérifier cette hypothèse on pourrait, sur boîte de Pétri, observer si la diversité des colonies est la même dans le sol témoin que dans les sols contenant du Cu.
- la seconde serait que le cuivre favoriserait la sélection de souches mutantes amylolytiques synthétisant une nouvelle enzyme à activité spécifique plus élevée.
- la troisième serait, que dans les sols, on ait plusieurs familles d'amylases, synthétisées par des germes microbiens différents de sensibilité différente aux métaux lourds. L'enzyme la plus résistante supplanterait les autres familles. La véracité de cette hypothèse pourrait être testée en étudiant l'effet du cuivre sur des amylases d'origine différente.

Pour le cadmium on observe une réponse de la synthèse amylasique du même type que celle obtenue avec le cuivre.

Durant la première phase (0-2 jours) la biosynthèse amylasique est reprise entre 0.03 et 0.39 µg Cd soluble/g.m.s. Durant la seconde phase (2-4 jours) on observe que la biosynthèse de l'amylase dans le sol contenant 199.4 µg Cd soluble/g.m.s. est retardée.

Ces observations suggèrent que durant la première phase on a une répression de la biosynthèse enzymatique due à l'inhibition des populations sensibles au cadmium. Puis après un retard de 48 heures la population des germes résistants se développerait et synthétiserait l'amylase. Ces résultats concordent avec ceux que l'on a obtenu pour B.licheniformis s<sub>4</sub> dans le milieu synthétique liquide.

Durant la troisième phase (4-7 jours) on observe comme pour le cuivre une biosynthèse amylasique en présence de 199.4 µg Cd soluble/g.m.s. supérieure à celle que l'on obtient pour le sol témoin durant la première phase. Cela suggère les mêmes trois hypothèses que celles que l'on a présentées ci-dessus pour le cuivre (voir plus haut).

La plus grande synthèse enzymatique observée dans le sol additionné de 0.03 µg Cd soluble/g.m.s. pourrait provenir d'un déséquilibre du métabolisme microbien que l'on explique par l'hypothèse suivante :

- si l'activité amylasique est inhibée par le cadmium on aura moins de glucose produit. Le glucose est un répresseur catabolique qui régularise la synthèse amylasique. Lorsque sa concentration diminue la répression est levée et la synthèse amylasique peut se faire. Les germes microbiens synthétiseront l'enzyme jusqu'à ce que la concentration de glucose soit suffisante pour rétablir la régulation de la synthèse enzymatique.

Ces résultats suggèrent que lorsqu'on ajoute à un sol de l'amidon ou de l'amylose la dégradation de ces substrats se fera avec un certain retard pour des concentrations situées entre 0 et 98.3 µg Cu soluble/g.m.s. et entre 0 et 199.4 µg Cd soluble/g.m.s. Mais si on ajoute au sol des concentrations supérieures soit à 98.3 µg Cu soluble/g.m.s. soit à 199.4 µg Cd soluble/g.m.s. il y aura le danger que la dégradation de l'amidon ou de l'amylose ne se fasse plus ou très peu et on aura ainsi une accumulation de la matière organique.

#### 7. 5. Contribution de notre étude à l'élaboration de l'Ordonnance sur les polluants du sol

Dans la problématique on s'était fixé le but de contribuer à l'élaboration de valeurs indicatives pour le cuivre et pour le cadmium. Ces valeurs visent à empêcher une accumulation de ces éléments dans les sols afin de préserver leur fertilité à long terme. Pour réaliser ce projet on voulait comparer l'effet du cadmium et celui du cuivre sur la croissance, la synthèse et l'activité de l' $\alpha$ -amylase de B.licheniformis s<sub>4</sub> dans un milieu liquide synthétique et dans un milieu sol. Afin d'évaluer ces résultats on a déterminé les concentrations pour lesquelles les métaux lourds causaient un début (CLT), 20 (IC<sub>20</sub>) et 50 % d'inhibition (IC<sub>50</sub>) d'une activité biologique. Ces valeurs étaient exprimées en teneur totale et en teneur soluble. La teneur soluble du métal est une valeur importante car elle correspond à la quantité de métal sous forme de ions biologiquement active.

Pour une même teneur soluble on s'attend à obtenir dans des milieux liquides de composition chimique différente le même effet sur un paramètre biologique donné.

En revanche, si l'on compare l'effet d'une même quantité de métal soluble dans un millilitre de solution nutritive ou dans un gramme de sol on peut s'attendre à observer une réaction plus rapide de l'activité biologique mesurée dans le sol que celle analysée dans le milieu liquide. En effet dans la solution nutritive la quantité de métal soluble est répartie d'une manière homogène alors que dans le sol cette quantité sera concentrée dans sa phase aqueuse (pores). Ainsi dans un sol la concentration biologiquement active dépendra de l'importance du volume des pores.

Dans notre étude on n'a pas pu choisir les mêmes paramètres biologiques pour les deux milieux expérimentaux puisque B.licheniformis S<sub>4</sub> demeurait inactif dans le sol Steinhof irradié. On essaiera cependant de tirer quelques conclusions sur les résultats obtenus en comparant :

- l'effet du cadmium et du cuivre sur la synthèse et l'activité de l' $\alpha$ -amylase de B. licheniformis dans le milieu liquide synthétique et sur la synthèse et l'activité amylasiques issues de populations bactériennes natives du sol Steinhof.
- la réponse de la population amylolytique avec celle de B.licheniformis a<sub>4</sub> poussant sur le milieu WA à l'amidon.

Dans les deux milieux expérimentaux, l'activité et la synthèse amylasiques présentent une plus grande sensibilité au cuivre qu'au cadmium.

De plus la concentration limite de toxicité pour l'activité enzymatique est comparable dans les deux milieux. Elle correspond pour le cuivre à 0.06  $\mu\text{g}$  Cu soluble/g.m.s. de sol et à 0.58  $\mu\text{g}$  Cu soluble/ml dans le milieu synthétique liquide. Pour le cadmium la concentration limite de toxicité pour l'activité enzymatique est située entre 3.6 et 58  $\mu\text{g}$  Cd soluble/g.m.s. de sol et de 19  $\mu\text{g}$  Cd soluble/ml dans le milieu synthétique liquide.

Concernant la synthèse amylasique il est plus difficile de comparer les résultats obtenus dans les deux milieux expérimentaux :

- dans le milieu synthétique liquide les concentrations limites de toxicité sont de 0.13  $\mu\text{g}$  Cd total/ml et 0.03  $\mu\text{g}$  Cu total/ml. Elles correspondent à des concentrations qui inhibent la croissance de la souche sauvage sensible de B.licheniformis S<sub>4</sub> soit au cadmium soit au cuivre. Or, nous avons vu que lorsqu'on ajoute à la solution nutritive 80  $\mu\text{g}$  Cd total/ml on sélectionnait des souches mutantes poussant très bien dans le milieu liquide contenant de l'amidon comme seule source de carbone.

Ce résultat signifie que la synthèse de l' $\alpha$ -amylase par des souches résistantes au cadmium n'est pas inhibée pour des concentrations inférieures à 80  $\mu\text{g Cd total/ml}$ .

- dans le sol on observe que les concentrations limites de toxicité sont situées entre 0.03 et 0.16  $\mu\text{g Cu soluble/g.m.s.}$  et entre 0.03 et 0.39  $\mu\text{g Cd soluble/g.m.s.}$  pour la synthèse amyliacique des populations sensibles soit au cuivre soit au cadmium. Alors que si l'on considère les concentrations limites de toxicité de la synthèse amyliacique des populations résistantes soit à l'un soit à l'autre de ces éléments elles sont de 98.3  $\mu\text{g Cu soluble/g.m.s.}$  soit de 199.4  $\mu\text{g Cd soluble/g.m.s.}$

Le développement des germes amyliolytiques de même que la croissance de B.licheniformis  $s_4$  dans le milieu WA à l'amidon présentent une plus grande sensibilité au cadmium qu'au cuivre. La croissance de la souche sauvage de B.licheniformis  $s_4$  était inhibée avec 0.05  $\mu\text{g Cd total/ml}$  alors que le développement des germes amyliolytiques sensibles était perturbé entre 0.03 et 0.39  $\mu\text{g Cd soluble/g.m.s.}$

Si l'on compare nos résultats avec les valeurs indicatives proposées par l'Ordonnance sur la teneur en polluants dans les sols qui sont de 0.03  $\mu\text{g Cd soluble/g.m.s.}$  et 0.7  $\mu\text{g Cu soluble/g.m.s.}$  on remarque que :

- 0.03  $\mu\text{g Cd soluble/g.m.s.}$  peuvent entraîner une modification de la population microbienne amyliolytique autochtone qui sera remplacée par une population résistante au cadmium. De plus, la croissance de certaines souches sensibles au cadmium telle B.licheniformis  $s_4$  sera inhibée.
- 0.7  $\mu\text{g Cu soluble/g.m.s.}$  est une valeur beaucoup trop élevée. Pour cette concentration on observe une inhibition de l'activité amyliacique, une diminution de la croissance des aérophytes aérobies et de celle de B.licheniformis  $s_4$  de même que la sélection de populations microbiennes amyliolytiques résistantes au cuivre.

## 8. CONCLUSIONS

De notre étude, on tire les conclusions suivantes:

- la toxicité du cadmium à l'égard de B. licheniformis s'exprime par une diminution du taux de croissance  $\mu$  et par une augmentation de la phase de latence précédant sa croissance. La bactérie réagit à la toxicité du cuivre essentiellement par une diminution du taux de croissance
- B. licheniformis s'adapte à la toxicité du cadmium en acquérant une résistance génétique. Les mutants protègent les souches sensibles de la toxicité du cadmium. Ces phénomènes nous suggèrent deux hypothèses de travail:
  - modification de la perméabilité membranaire du mutant limitant l'entrée du cadmium dans la cellule
  - par synthèse de substances chélatantes (acides organiques, polysaccharides) les mutants protégeraient les souches sensibles en abaissant la concentration du cadmium actif (libre) du milieuAucun phénomène de mutation n'a pu être mis en évidence pour le cuivre
- au cours de la croissance bactérienne la concentration soit de cadmium, soit de cuivre diminue dans le milieu de culture. Cette diminution des substances toxiques dans le milieu peut avoir une grande importance écologique.
- le nombre des saprophytes aérobies et des germes amylolytiques telluriques n'est que très peu influencé par les métaux lourds étudiés. On observe, cependant, une diminution du spectre microbien en présence de l'un ou de l'autre de ces éléments
- la population totale des germes saprophytes aérobies de même que la population des germes amylolytiques ne sont pas des paramètres biologiques sensibles aux métaux lourds. La sélection de souches mutantes résistantes aux métaux lourds fait que le nombre de germes microbiens total n'est influencé négativement que pour de très hautes concentrations de métaux lourds. Les méthodes utilisées pour la détermination du nombre des germes totaux ne permettent pas de mettre en évidence l'effet bactéricide du cuivre et du cadmium sur les souches sensibles

- les populations microbiennes physiologiquement actives sont plus sensibles à l'action du cadmium et du cuivre que les populations en état d'inaction
- l'activité amylasique est un paramètre très sensible aux métaux lourds. On observe un effet négatif irréversible pour des concentrations de cuivre solubles inférieures à  $0.06 \mu\text{g/g.m.s.}$  et pour des concentrations de cadmium solubles situées entre  $3.6$  et  $58 \mu\text{g/g.m.s.}$  Afin d'estimer les effets négatifs réversibles exercés soit par le cadmium, soit par le cuivre il faudrait mesurer l'activité enzymatique directement dans le sol.
- la synthèse de l'amylase dans le sol est un paramètre qui n'est pas très sensible aux métaux lourds. Elle est réprimée seulement à partir de  $98.3 \mu\text{g Cu soluble/g.m.s.}$  ou de  $199.4 \mu\text{g Cd soluble/g.m.s.}$  Son étude est cependant intéressante car sa réponse aux métaux lourds permet de mettre en évidence la présence de plusieurs populations microbiennes :
  - des populations sensibles dont la synthèse de l'amylase réagit pour de faibles concentrations de métaux lourds
  - des populations résistantes qui, après une période de latence, se développent et synthétisent l'enzyme.
- le milieu synthétique liquide est un modèle, pour l'étude des métaux lourds, qui s'adapte assez bien au sol. Dans chacun des deux milieux expérimentaux on observe une plus grande sensibilité de l'activité et de la synthèse amylasique au cuivre. Concernant la croissance des germes microbiens on remarque dans les deux milieux la sélection de souches mutantes résistantes au cadmium après 48 heures.
- les valeurs indicatives proposées pour le cadmium et pour le cuivre dans l'Osol sont certainement trop élevées pour le cuivre car pour cette concentration on risque d'observer une accumulation de la matière organique (inhibition du système amylasique).

## REMERCIEMENTS

Sans le Prof. M. Aragno cette thèse n'aurait sans doute jamais pu être réalisée. Je le remercie de tout coeur d'avoir accepté de diriger cette nouvelle recherche, tâche peu facile puisqu'elle osait se diriger dans les labyrinthes de la biologie des sols, domaine peu exploité dans nos universités. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir toujours bien accueillie dans son laboratoire, pour ses encouragements aux moments les plus difficiles, et pour son engagement personnel dans ce travail.

Mes remerciements vont aussi au Dr. F.X. Stadelmann qui m'a offert la possibilité de faire cette thèse dans son laboratoire et qui su créer dans son petit groupe de travail un climat favorable pour mes études.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Madame E. Wälti pour sa collaboration dans les travaux pratiques ainsi que Madame S. Geering pour les analyses chimiques. Je remercie également le Dr. P. Lavanchy pour l'analyse des acides aminés et mon ami Horst pour la réalisation graphique de ce travail.

Ma reconnaissance va également à mon collègue, le Dr. S. K. Gupta qui m'a soutenue tout le long de ce travail par ses précieux conseils.

Je remercie également toutes les personnes de la FAC qui m'ont assistée dans cette recherche ainsi que les directeurs E. Bovay et J. von Ah et mon chef de section le Dr. O.J. Furrer.

Merci aussi à l'Institut fédérale de recherches en matière de réacteurs de Würenlingen pour l'irradiation de mes sols d'étude.

Ma gratitude va également à l'Office fédéral de l'éducation et de la science, à Cost et à l'entreprise Ciba-Geigy pour le financement de cette recherche.

Aux membres du jury de thèse les Drs. J.M. Gobat, H. Häni et F.X. Stadelmann, je tiens à témoigner ma sympathie pour leur participation constructive lors du jugement de mon travail.

A mes parents et à tous mes amis, j'exprime ma profonde reconnaissance

pour leurs encouragements et pour la patience qu'ils ont eue à mon égard  
au cours de ces longues années de travail.

## 9. BIBLIOGRAPHIE

AIKING, H., KOK, K., VAN HEERIKHUIZEN, H. and VAN 'T RIET, J. (1982) : Adaptation to cadmium by Klebsiella aerogenes growing in continuous culture proceeds mainly via formation of cadmium sulfide. Appl. Environ. Microbiol. 44(4), 938-944.

AIKING, H., GOVERS, H. and VAN 'T RIET J. (1985) : Detoxification of mercury, cadmium, and lead in Klebsiella aerogenes NCTC 418 growing in continuous culture. Appl. Environ. Microbiol. 50(5), 1262-1267.

ANDERSSON, A. (1975) : Relative efficiency of nine different soil extractants, Swedish J. Agric. Res., 5, 125-135.

AUSTIN, B. ALLEN, D. A., HILLS, A. L., COLWELL, R. R. (1977) : Numerical taxonomy of heavy metal-tolerant bacteria isolated from an estuary. Can. J. Microbiol., 23, 1433-1447.

BABICH, H., STOTZKY, G. (1977) : Effect of cadmium on fungi and on interactions between fungi and bacteria in soil: influence of clay minerals and pH. Appl. Environ. Microbiol., 33 (5), 1059-1066.

BABICH, H., STOTZKY, G. (1977) : Reductions in the toxicity of cadmium to microorganisms by clay minerals. Appl. Environ. Microbiol., 33 (3), 696-705.

BABICH, H. and STOTZKY, G. (1978) : Effects of cadmium on the biota : influence of environmental factors. Adv. Appl. Microbiol., 23, 55-117.

BALDRY, M. G. C., HOGARTH, D. S. and DEAN, A. C. R. (1977) : Chromium and copper sensitivity and tolerance in Klebsiella (Aerobacter) aerogenes. Microbios Letters, 4, 7-16.

BALICKA, N., WEGRZYN, T. and CZEKANOWSKA, E. (1977) : Microorganisms as indices of environmental pollution by smelting industry. Acta Microbiologica Polonica, 26(3), 301-308.

BECK, T. (1981) : Untersuchungen über die toxische Wirkung der in Siedlungsabfällen häufigen Schwermetalle auf die Bodenmikroflora. 2. Pflanzenernaehr. Bodenk., 144(6), 613-627.

BERGEY'S. (1974). Manual of determinative bacteriology. Eighth Edition.

BEVERIDGE, T. J. and MURRAY, R. G. E. (1976) : Uptake and retention of metals by cell walls of Bacillus subtilis. Journal of Bacteriology, 127(3), 1502-151B.

BEVERIDGE, T. J. and KOVAL, S. F. (1981) : Binding of metals to cell envelopes of Escherichia coli K-12. Applied and Environmental Microbiology, 42(2), 325-335.

BISCHOFF, B. (1982) : Effects of cadmium on microorganisms. Ecotoxicology and Environmental Safety, 6, 157-165.

BISESSAR, S. (1982) : Effect of heavy metals on microorganisms in soils near a secondary lead smelter. Water, Air, and Soil Pollution, 17, 305-308.

BREMNER, I. (1974) : Heavy metal toxicities. Quart. Rev. Biophys. 7:75-124

BROOKES, P. C. and MCGRATH, S. P. (1984) : Effects of metal toxicity on the size of the soil microbial biomass. Journal of Soil Science, 35, 341-346.

BRUNNER, P. H., BACCINI, P. (1981) : Schwermetalle, Sorgenkinder der Entsorgung? Neue Zürcher Zeitung Nr.70 vom 25.3.1981, S. 65.

CLAUS, D. (1963) : Anreicherungen und Direkisolierungen aerober sporenbildender Bakterien. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Mygiene, 1, Abteilung Supplement 1, 337-362.

COLE, M. A. (1978) : Solubilization of heavy metal sulfides by heterotrophic soil bacteria. Soil Science. 127(5), 313-317.

COLEMAN, G. and ELLIOT, W. H. (1962) : Studies on  $\alpha$ -amylase by Bacillus subtilis. Biochem. J. B3, 256-263.

COUGHTREY, P.J., JONES, C. H., MARTIN, M. H., SHALES, S. W. (1979) : Litter accumulation in woodlands contaminated by Pb, Zn, Cd and Cu. Oecologia (Berl.) 39, 51-60.

DOELMAN, P. and HAANSTRA, L. (1979) : Effects of lead on the soil bacterial microflora. *Soil Biol. Biochem.*, 11, 487-491.

DOYLE, J. J., MARSHALL, R. J., PFANDER, W. H. (1975) : Effects of cadmium on the growth and uptake of cadmium by microorganisms. *Appl. Microbiol.*, 29, 562-564.

DOYLE, R. J., MATTHEWS, T. H. and STREIPS, U. N. (1980) : Chemical basis for selectivity of metal ions by the Bacillus subtilis cell wall. *Journal of Bacteriology*, 143(1), 471-480.

DREWS, G. (1976) : *Mikrobiologisches Praktikum*. Dritte, oebearbeitete Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

DUGAN, P. R. and PICKRUM, H. M. (1972) : Removal of mineral ions from water by microbial produced polymers. 27th Annual Industrial Waste University. 1019-1038.

DUXBURY, T. (1985) : Ecological aspects of heavy metal responses in microorganisms. *Advances in Microbial Ecology*, 8, 185-235.

DUXBURY, T., BICKNELL, B. (1983) : Metal-tolerant bacterial populations from natural and metal-polluted soils, *Soil Biol. Biochem.* 15, 243-250.

FANAKI, F. (1985) : Atmospheric transport of heavy metals - a review., in *Heavy Metals in the Environment*. Volume, 1., 209-213, Athens-September 1985

FRIEDMAN, B. A. and DUCAN, P. R. (1968) : Concentration and accumulation of metallic ions by the bacterium Zoogloea. in *Development Industrial Microbiology*, 3B1-38B.

FURRER, D. J., KELLER, P., HANI, H., GUPTA, S. K. (1980) : Schadstoffegrenzwertere- Entatehung und Notwendigkeit. EAS-Seminar "Landwirtschaftliche Verwertung von Abwasserschlämmen" in Basel vom 24-28 Sept.

FURRER, D. J. und GUPTA, S. K. (1983) : Effects of agricultural use of municipal composta. *Qual. Plant Plant Foods Hum. Nutr.* 33, 251-259.

FURRER, D. J. (1984) : Schadstoffe bedrohen die Landwirtschaft. *Schweizerische Landwirtschaftliche Monatshefte*, 62, 35-52.

FUWA, H. (1954) : A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. *J. Biochem. (Tokyo)*, 41, 583-603

GADD, G. M. and GRIFFITHS, A. J. (1978) : Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbial Ecology*, 4, 303-317.

GADD, G. M., STEWART, A., WHITE, C. and MOWLL, J. L. (1984) : Copper uptake by whole cells and protoplasts of a wild-type and copper-resistant strain of Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Microbiology Letters*, 24, 231-234.

GRIFFITHS, A. J., HUGUES, D. E., THOMAS, O. (1975) : Some aspects of microbial resistance to metal pollution. In M. J. Jones (Ed.) : *Minerals and the Environment*, pp. 387-394. Institution of Mining and Metallurgy, Washington, D.C.

GUPTA, S. K., HANI, W. und SIEGENTHALER, A. (1983) : Bedeutung von Gesamt- und biorelevanten Schwermetallgehalten zur Festlegung von Richtwerten in Böden. *Schweiz. Landw. Fb.* 22 (3/4).

GUPTA, S. K., HANI, M. und Schindler, P. (1980) : Mobilisierung und Immobilisierung von Metallen durch die organische Bodensubstanz. Schlussbericht des Forschungsprojekts.

HAAVIK, W. I. (1976) : On the role of bacitracin peptides in trace metal transport by Bacillus licheniformis. *Journal of General Microbiology*, 96, 393-399.

HORITSU, M. and KATO, H. (1980) : Comparisons of characteristics of cadmium-tolerant bacterium, Pseudomonas aeruginosa G-1 and its cadmium-sensitive mutant strain. *Agric. Biol. Chem.* 44(4), 777-782.

JAGGI, W. (1976) : Die Bestimmung der CO<sub>2</sub>-Bildung als Mass der bodenbiologischen Aktivität. *Schweiz. Landw. Forschung*, 15 (3/4), 371-380.

JOHO, M., IMAI, M. and MURAYAMA, T. (1985) : Different distribution of Cd<sup>2+</sup> between Cd-sensitive and Cd-resistant strains of Saccharomyces cerevisiae. *Journal of General Microbiology*, 131, 53-56.

JORDAN, M. J. and LECHEVALIER, M. P. (1975) : Effects of zinc-smelter emissions on forest soil microflora. *Canadian Journal of Microbiology*, 21, 1855-1865.

KNIGHT, C. J. G. and PROOM, M. (1950) : A comparative survey of nutrition and physiology of mesophilic species in the genus Bacillus. *J. Gen. Microbiol.*, 4, 508-538.

KORKEALA, H. (1979) : The distribution of cadmium between cellular sub-fractions in cadmium-sensitive and cadmium-resistant Staphylococcus aureus. Acta vet. scand. 20, 438-446.

KRISHNAN, T., CHANDRA, A. K. (1983) : Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from Bacillus licheniformis CUMC305. Appl. Environ. Microbiol., 46 (2), 430-437.

KUREK, E., JANUSZ, C. and BOLLAG, J. M. (1982) : Sorption of cadmium by microorganisms in competition with other soil constituents. Appl. Environ. Microbiol. 43:1011-1015.

KUSTER, E. (1983) : Einfluss anorganischer Schadstoffe auf die Mikroorganismen im Boden. KALI-BRIEFE (Büntehof), 16(9), 523-528.

LOWRY, D. H. ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. (1951) : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.

MACASKIE, L. E. and DEAN, A. C. R. (1984) : Cadmium accumulation by a Citrobacter sp.. Journal of General Microbiology, 130, 53-62.

MARINSKY, J. A., GUPTA, S. and SCHINDLER, P. (1982) : The interaction of Cu(II) ion with humic acid. J. Colloid Interface Sci., 89 (2), 401-411.

MARINSKY, J. A., GUPTA, S. and SCHINDLER, P. (1982) : A unified physico-chemical description of the equilibria encountered in humic acid gels. J. Colloid Interface Sci., 89 (2), 412-426.

MATHUR, S. P., SANDERSON, R. B. (1980) : The partial inactivation of degradative soil enzymes by residual fertilizer copper in histosols. Soil Sci. Soc. Am. J., 44 (4) 750-755.

HCKNIGHT, D. M. and HOREL, F. H. M. (1979) : Release of weak and strong copper-complexing agents by algae. Limnol. Oceanogr. 24(5), 823-837.

HCLAREN, A. D., RESHETKO, L. and HUBER, W. (1957) : Sterilization of soil by irradiation with an electron beam and some observations on soil enzyme activity. Soil Sci. 83, 497-502.

MEERS, J. L. (1972) : The regulation of  $\alpha$ -amylase production in Bacillus licheniformis. Antonie van Leeuwenhoek 38, 585-590.

MITRA, R. S., GRAY, R. H., CHIN, B. and BERNSTEIN, I. A. (1975) : Molecular mechanisms of accommodation in Escherichia coli to toxic levels of  $Cd^{2+}$ . J. Bacteriol. 121 (3), 1180-1188.

MOORE, S. (1963) : On the determination of cystine as cysteic acid. J. Biol. Chem., 238 (1), 235-237.

MURRAY, A. D., KIDBY, D. K. (1975) : Sub-cellular location of mercury in yeast grown in the presence of mercuric chloride. Journal of General Microbiology, 86, 66-74.

NAVEKE, R. und TEPPER, K. P. (1979) : Einführung in die mikrobiologischen Arbeitsmethoden mit Praktikumsaufgaben. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. New York.

NOMURA, M., MARUO, B. and AKABORI, S. (1956) : Studies on amylase formation by Bacillus subtilis. I. Effect of high concentration of polyethylene glycol on amylase formation by Bacillus subtilis. J. Biochem. (Tokyo) 43, 143-152.

NORDGREN, A., BAATH, E. and SODERSTROM, B. (1983) : Microfungi and microbial activity along heavy metal gradient. Appl. Environ. Microbiol. 45:1829-1837.

NORRIS, P. R. and KELLY, D. P. (1979) : Accumulation of metals by bacteria and yeasts. in Development in Industrial Microbiology, vol. 20, 299-308.

NUGENT, C. E., ATCHISON, C. J., NELSON, D. W. and MCINTOSH, A. W. (1980) : The effects of heavy metals on microbial biomass in sediments of Palestine Lake. Hydrobiologia, 70, 69-73.

OLSON, B. H. and THORNTON, I. (1982) : The resistance patterns to metals of bacterial populations in contaminated land. Journal of Soil Science, 33, 271-277.

PAGE, A. L. and CHANG, A. C. (1979) : Contamination of soil and vegetation by atmospheric deposition of trace elements. Phytopathology, 69(9), 1007-1011.

PETERSON, G. H. (1962) : Respiration of soil sterilized by ionizing radiations. Soil Sci. 94, 71-74.

PICKETT, A. W. and OLAN, A. C. R. (1979) : Cadmium and zinc sensitivity and tolerance in Bacillus subtilis subsp. and in a Pseudomonas sp.. Microbios, 24, 51-64.

POCHON, J., TAROIEUX, P. (1962) : Techniques d'analyse en microbiologie du sol.

PRIEST, F. G. (1977) : Extracellular enzyme synthesis in the genus Bacillus. Bacteriol. Rev., 41 (3), 711-753.

ROTHSTEIN, A. (1959) : Cell membrane as site of action of heavy metals. Federation Proceedings, 18, 1026-1035.

RUHLING, A. and TYLER, G. (1973) : Heavy metal pollution and decomposition of spruce needle litter. OIKOS, 24, 402-416.

SAITO, N. (1973) : A thermophilic extracellular  $\alpha$ -amylase from Bacillus licheniformis. Arch. Biochem. Biophys., 155, 290-298.

SAITO, N. and YAMAMOTO, K. (1975) : Regulatory factors affecting  $\alpha$ -amylase production in Bacillus licheniformis. J. Bacteriol., 121 (3), 848-856.

SCHNACHTCHABEL, P., BLUME, H. P. (1982) : Schadstoffe. Lehrbuch der Bodenkunde, 271-303.

SCHINNER, F. A., NIEDERBACNER, R. and NEUWINGER, I. (1980) : Influence of compound fertilizer and cupric sulfate on soil enzymes and  $CO_2$ -evolution. Plant and Soil, 57, 85-93.

SCHOLES, G., WEISS, J. (1960) : Organic hydroxy-hydroperoxides: a class of hydroperoxides formed under the influence of ionizing radiations. Nature, 185, 305-306.

Schweizerischer Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung Abteilung Nationale Forschungsprogramme. NFP-22 Nutzung des Bodens in der Schweiz. Kurzfassung der Pilotprojekt. Die Belastung der Böden mit Schadstoffen in der Schweiz.

SILVER, S. (1981) : Mechanisms of plasmid-determined heavy metal resistances. in Molecular Biology, Pathogenicity, and Ecology of Bacterial Plasmids (Levy, S., Clowes, R. and Koenig, E., Eds.), Plenum, New-York, 179-189.

SINGLETON, F. L. and GUTHRIE, R. K. (1977) : Aquatic bacterial populations and heavy metals-I. Composition of aquatic bacteria in the presence of copper and mercury salts. Water Research, 11, 639-642.

SPACKMAN, D. H., STEIN, W. N. and MOORE, S. (1958) : Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids, Anal. Chem., 30 (7), 1190-1206.

STADELMANN, F. X., GUPTA, S. K., RUOAZ, A., SANTSCHI-FUHRMANN, E. (1984) : Die Schwermetallbelastung des Bodens als Gefahr für die Bodenmikroorganismen. Schweiz. Landw. Fo., 23(3), 227-238.

STANIER, R. Y., DOUDOROFF, M. and ADELBERG, E. A. (1975). in General Microbiology. Third Edition.

STERRITT, R. N. and LESTER, J. N. (1980) : Interactions of heavy metals with bacteria, The Science of the Total Environment, 14, 5-17.

STERRITT, R. M. and LESTER, J. N. (1980) : Influence of bacterial growth on the forms of cadmium in defined culture media, Bull. Environm. Contam. Toxicol. 24(2), 196-203.

STICNER, H. (1980) : Schadstoffe im Boden: Wann können sie in der Nahrungskette gelangen? Schweiz. Landw. Fo. 19 (3/4).

STOFEN, D. (1975) : Blei- Gefahr für Mensch und Tier. Kosmos, 6/75, 158-160.

STOTZKY, G. and MORTENSON, J. L. (1959) : The effect of gamma radiation on growth and metabolism of micro-organisms in an organic soil. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 23, 125-127.

SUROWITZ, K. G., TITUS, J. A. and PPISTER, R. M. (1984) : Effects of cadmium accumulation on growth and respiration of a cadmium-sensitive strain of Bacillus subtilis and a selected cadmium resistant mutant. Arch. Microbiol. 140, 107-112.

TIMONEY, J. F., PORT, J., GILES, J., SPANIER, J. (1978) : Heavy-metal and antibiotic resistance in the bacterial flora of sediments of New York Bight. Appl. Environ. Microbiol., 36, 465-472.

TREVORS, J. T., OOOIE, K. M. and BELLIVEAU, B. H. (1985) : Metal resistance in bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 32, 39-54.

TYLER, G. (1974) : Heavy metal pollution and soil enzymatic activity. *Plant and Soil*, 41, 303-311.

TYLER, G. (1975) : Effect of heavy metal pollution on decomposition and mineralization rates in forest soils, p. 217-226. in T. C. Hutchinson, A. L. Page, and J. C. van Loon (ed.), *International Conference on Heavy Metals in the Environment*, Toronto, Ontario, Canada.

UEHLEKE, H. (1984) : Toxizitaet und Sicherheit von Schwermetallen beim Menschen. *Gottlieb Duttweiler Institut Rueschlikon/Zurich*, 88-106.

WAKATSUKI, T., IMAHARA, H., KITAMURA, T. and TANAKA, H. (1979) : On the absorption of copper into yeast cell. *Agric. Biol. Chem.* 43 (8), 1687-1692.

WELKER, H. E. and CAMPBELL, L. L. (1963) : Induced biosynthesis of  $\alpha$ -amylase by growing cultures of Bacillus stearothermophilus. *J. Bacteriol.* 86, 1196-1201.

WEST, A. W. , BURGESS, H. D., DIXON, T. J. and WYBORN, C. H. (1985) : Survival of Bacillus thuringiensis and Bacillus cereus spore inocula in soil : effects of pH, moisture, nutrient availability and indigenous microorganisms. *Soil Biol. Biochem.*, 17(5), 657-665.

WILLIAMS, S. E., WOLLUM, A. G. (1981) : Effect of cadmium on soil bacteria and actinomycetes. *J. Environ. Qual.*, 10 (2), 142-144.

ZIBILSKE, L. M., WAGNER, G. H. (1982) : Bacterial growth and fungal genera distribution in soil amended with sewage sludge containing cadmium, chromium and copper. *Soil Sci.*, 134 (6), 364-370.