

IMPACTS DES POLLUANTS METALLIQUES SUR LES MICRO-ORGANISMES DU SOL

Forneris Julien

Stage de Septembre 2001 à Juin 2002

Laboratoire d'écologie des sols tropicaux -I.R.D-
Laboratoire diversité et fonctionnement des Ecosystèmes - Paris XII-

Cotuteur de mémoire : Rouland Corinne, France Reversat et Lavelle Patrick
Tuteur de mémoire sur lieu de stage : Nahmani Johanne

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu Pr. Patrick Lavelle pour son accueil au sein du LEST, Madame Corinne Rouland pour m'avoir reçu à l'université de Créteil et pour la mise au point du protocole de numération. Je remercie tout particulièrement Madame France Reversat pour sa disponibilité et ses conseils en respirométrie. Merci également Michel Diouf et Edouard Miambi pour leur conseil, M. Philippe Mora pour les dépannages en eau distillé et M. Georges Reversat pour tous les piluliers prêtés et pour son dremel très pratique. Merci aussi à Nuria Ruiz-Camacho pour sa démonstration en dosage par la soude, Stéphanie Catsidonis pour m'avoir mis relation avec Johanne Nahmani.

Merci à Johanne pour son encadrement structuré et planifié, ses cours particuliers de Word et d'Excel ainsi que pour sa patience.

Résumé

En France, la pollution métallique d'origine anthropique est assez répandue. A Nivelles, en région Nord-Pas-De-Calais, une prairie a été fortement contaminée par dépôt de déchets métalliques engendrant un gradient de pollution.

Le 1^{er} objectif de cette étude est de voir si la pollution métallique affecte les micro-organismes du sol. Sachant par ailleurs qu'il existe une interaction entre la faune et les micro-organismes du sol, le 2^{ème} objectif est de voir si la pollution perturbe cette interaction.

Des prélèvements de sol et de faune ont été réalisés sur deux zones extrêmes de ce gradient. Une expérimentation en laboratoire a ensuite été réalisée et 9 traitements ont été effectués en variant l'abondance de la faune ainsi que le type de pollution (sol non pollué, sol pollué in situ et sol pollué in vitro). Au bout de 6 mois d'élevage de la faune dans ces 9 types de microcosmes, des turricules de vers ainsi que du sol de l'horizon 0-10 ont été prélevés. Des mesures de dégagement de CO₂ ont été mesurées sur les turricules et sur les sols d'horizon 0-10 cm. Ils ont ensuite été tamisés afin de voir l'effet de la structuration des éléments du sol.

Avant déstructuration, les résultats montrent que la pollution a un effet négatif significatif sur le dégagement de CO₂ du sol de l'horizon 0-10 avec des valeurs de 2.8 mg C (CO₂)/dg C pour le sol non pollué, 1.8 mg C (CO₂)/dg C pour le sol pollué in situ et 1.2 mg C (CO₂)/dg C pour le sol pollué in vitro.

On remarque aussi que l'abondance de la faune stimule l'activité des micro-organismes du sol seulement dans le cas des sols non pollués. La pollution semble donc inhiber cette stimulation des micro-organismes par la faune. Par ailleurs, la faune polluée n'est pas significativement différente du microcosme sans faune.

Enfin, la déstructuration d'un sol augmente son coefficient de minéralisation du CO₂.

Notre étude montre qu'il existe bien un lien entre la pollution métallique et la respirométrie du sol donc avec l'activité respiratoire des micro-organismes.

Sommaire

I-INTRODUCTION :	2
II-ETATS DES CONNAISSANCES :	3
A. les métaux lourds:	3
B. Mode de contamination	4
C. Les micro-organismes :	5
D. Interactions faune micro-organisme	6
E. Toxicité	6
III- MATERIEL ET METHODES :	7
A. Protocole expérimental utilisé	7
B. Méthodes	10
1. Respirométrie par infrarouge	10
2. Mise en culture et numération bactérienne	11
3. Analyses statistiques :	14
IV-RESULTATS:	15
A. Respirométrie	15
1. Effet pollution	15
1.1 Horizon 0-10 structuré (après 336h d'incubation)	15
1.2 Horizon 0-10 déstructuré (après 342h d'incubation)	16
1.3 Turricules structurés (après 515h40 d'incubation)	18
1.4 Turricules déstructurés (après 456h d'incubation)	18
2. Effet de l'abondance de la faune et des structures biogéniques sur l'activité microbienne 19	
2.1 Horizon 0-10 structuré (après 336h d'incubation)	19
2.2- Horizon 0-10 déstructuré (après 342h d'incubation)	20
2.3 Turricules structurés (après 515h40 d'incubation)	21
2.4 Turricules déstructurés (après 456h d'incubation)	21
3. Effet structuration de l'horizon 0-10 (après 336h d'incubation)	22
B. Numération bactérienne	22
V-DISCUSSION :	23
VI- CONCLUSION	25
VII- PERSPECTIVES	25
Bibliographie	27
Annexes	30

I-Introduction :

Notre étude s'intègre dans le projet de recherche intitulé « interactions entre biodiversité et fonctionnement dans les écosystèmes terrestres : aspects fondamentaux et appliqués » dont le but est de définir les rôles communs que jouent certaines espèces sur les écosystèmes (notion de groupes fonctionnels) ainsi que de voir leur réaction face à divers stress (notion de groupes de réponse). Ce projet est coordonné par le centre d'écologie fonctionnelle et évolutive du CNRS de Montpellier et implique le CNRS, l'INRA et l'IRD. Dans le cadre de ce projet, nous allons étudier l'impact d'une pollution métallique sur les organismes du sol.

En France, la pollution métallique d'origine anthropique est assez répandue. Ainsi, parmi les 896 sites recensés pollués en 1996, 20 % le sont par le plomb, 15 % par le zinc et 7 % par le cadmium (ministère de l'environnement, 1996). Durant la première moitié du 20^{ème} siècle, la Région Nord-Pas-De-Calais a connu une forte activité métallurgique qui a été à l'origine d'une large contamination en éléments toxiques métalliques. A Nivelles, où se déroule cette étude, des déchets métalliques sont susceptibles d'induire une multitude d'effets néfastes sur une prairie pâturable ainsi que sur les espèces vivantes exposées. Des études ont montré un impact négatif des métaux lourds sur la faune du sol et sur les micro-organismes. Il semble en effet que les métaux limitent l'activité des micro-organismes et leur multiplication. (Trevors 1987; Christie and Beattie 1989; FlieBbach, Martens et al. 1994; Kandeler, Tschërko et al. 2000; Sandaa, Torsvik et al. 2000).

Les micro-organismes jouent un rôle essentiel dans les processus d'évolutions des sols par leurs actions chimiques (Lee and Foster 1991) et mécanique (production d'agrégats organominéraux) (Tisdall 1994). Ils permettent entre autre la fixation du diazote, la minéralisation des formes organiques de C, N, P et S et des processus d'humification (Brookes 1993). De par leur ubiquité, leur abondance et leur surface de contact avec les éléments du sol, il s'agit du premier groupe d'organisme du sol à être potentiellement affecté par ce type de pollution (Doelman, Jansen et al. 1993).

Le 1^{er} objectif de cette étude est donc de voir si la pollution métallique affecte les micro-organismes du sol et pour cela nous allons tester les hypothèses suivantes :

H1 : les effets toxiques des métaux entraînent une baisse de respiration des micro-organismes.

H2 : les effets toxiques des métaux entraînent une baisse du nombre de bactéries du sol.

Sachant par ailleurs qu'il existe une interaction entre la faune et les micro-organismes du sol, le 2^{ème} objectif est de voir si la pollution perturbe cette interaction. Les hypothèses suivantes vont donc être testées :

H3 : la présence de macrofaune stimule l'activité des micro-organismes du sol.

H4 : La pollution inhibe cette stimulation des micro-organismes par la faune.

H5 : Les structures biogéniques (bioturbation, turricules) produites par la faune affectent l'activité respiratoire des micro-organismes.

II-Etats des connaissances :

A. les métaux lourds:

- Dans le sol :

Parmi les substances indésirables polluants les sols, figurent les métaux lourds appelés également « éléments traces métalliques » (ETM) (Baize 2000). Conventionnellement, les éléments traces sont les 68 éléments minéraux, constituants de la croûte terrestre, dont la concentration est pour chacun d'entre eux inférieure à 0.1 %. Ils ne représentent que 0.6 % du total, alors que les 12 éléments majeurs interviennent pour 99.4 % (Baize 1997a).

- Dans les organismes vivants :

Dans le groupe des ETM on trouve les micro-éléments (teneur inférieure à 0.01 % de la matière sèche de l'organisme) dont certains sont indispensables au déroulement des processus biologiques.

Ce sont les oligo-éléments qui ne sont pas les mêmes selon le règne animal ou végétal :

-Règne animal Cu, Co, Fe, Mn, Mo, Ni, Zn, As, Cr, Se, V

-Règne végétal B, Cu, Co, Fe, Mn, Mo, Ni, Zn

La plupart des oligo-éléments s'avèrent toxiques dès que leur teneur excède un seuil donné. D'autres micro-éléments comme le Cd, le Hg, le Pb, et le Sn, dont le caractère indispensable n'est pas démontré, sont également toxiques au-delà d'une certaine concentration (Baize 1997a).

B. Mode de contamination des sols

D'après Juste, le terme de « contamination » doit être employé pour les sols lorsqu'il y a des apports anthropiques importants mais sans effet apparent pour l'environnement. En revanche, ce même auteur préconise l'emploi du terme « pollution » lorsque des apports liés à des activités humaines ont des effets négatifs visibles sur l'environnement (Juste 1994).

A la notion de « contamination » on peut cependant associer deux idées :

- un accroissement des teneurs suite aux activités humaines, locales ou générales
- un accroissement du risque de nuire aux fonctions des sols naturels.

Mais c'est probablement plus la forme chimique de l'élément que sa teneur qui pourra provoquer un effet négatif sur le fonctionnement du sol ou sur la qualité des produits végétaux (Baize 1997a).

On peut classer les apports d'origine anthropique d'ETM en quatre catégories :

- apports modérés dues aux pratiques agricoles

Il s'agit des impuretés présentes dans les engrais, les amendements calcaires, les fumiers, les lisiers, les épandages divers, les boues de stations d'épuration, les composts urbains, les produits de traitement phytosanitaires (ses de cuivre, arséniate de plomb), etc. On notera que ces apports peuvent résulter d'une activité agricole « normale » (engrais, pesticide), d'une activité agricole intensive (lisiers) ou bien d'une activité urbaine ou industrielle (déchets d'entreprises agro-alimentaires, boues de stations d'épuration, composts urbains, scories). Comme ces apports sont gérés par parcelle, les ETM peuvent être présents en abondance dans une parcelle et en faible quantité dans la parcelle voisine, selon l'historique des apports antérieurs. En outre, les grandes parcelles d'aujourd'hui résultent souvent du remembrement d'anciennes parcelles plus petites dont l'histoire agronomique n'était pas forcément la même. L'activité humaine peut donc avoir apporté une grande hétérogénéité spatiale des teneurs totales en ETM.

En ce qui concerne les apports d'engrais, le cadmium est l'élément qui pourrait poser problème à long terme, dans le cas des phosphates naturels d'origine sédimentaire, les plus riches en Cd.

Les apports en boues d'épuration sont aussi préoccupants surtout ceux qui, provenant de grandes agglomérations urbaines ou de zones industrielles, sont les plus chargés en ETM. Le tonnage des boues va considérablement augmenter étant donné l'interdiction de mise en décharge qui va

s'imposer à partir de l'année 2002. Certains épandages anciens de boues très chargées à des doses excessives ont déjà fortement contaminé certains sols (Baize 1997).

-apports diffus aériens d'origine lointaine

Il s'agit des poussières et aérosols provenant des chauffages, activités industrielles, moteurs d'automobiles, etc. Ces apports se déposent aussi bien sur les secteurs cultivés que sur les forêts et prairies. Ils sont susceptibles de parcourir des centaines, voire des milliers de kilomètres à partir de leur source.

- transferts latéraux par ruissellement ou érosion à la surface

Les transferts latéraux des ETM se font en association avec des particules entraînées à la surface des sols par ruissellement ou érosion. Il s'agira de pertes ou au contraire d'apports selon la portion du site étudié sur le versant.

- apports massifs localisés d'origine proche

Il s'agit d'apports anthropiques accidentels ou résultant d'activités industrielles de longue durée sans protection efficace contre la dispersion dans l'environnement. Dans notre étude il s'agit de déchets industriels provenant d'une zinguerie qui ont été utilisés pour fabriquer le revêtement des routes avoisinantes.

Face à une pollution de type métallique, on peut craindre :

- le passage rapide des ETM ainsi apportés dans les plantes cultivées ou les fourrages, contaminant la chaîne alimentaire des animaux et de l'homme.

- des migrations rapides vers les nappes phréatiques ou les eaux superficielles, qui seraient dangereuses à court terme (mois, année).

- des accumulations des ETM indésirables dans les sols qui pourraient s'avérer dangereuses à long terme (décennies, siècle) (Baize 1997).

C. Les micro-organismes :

On désigne en général sous le nom de micro-organismes l'ensemble des protistes (organismes unicellulaires coenocytiques ou pluricellulaires sans différenciation) composés d'algues, de protozoaires, de champignons et de bactéries. Ils ont une organisation biologique relativement simple (Dommergues and Mangenot 1970).

De nombreux micro-organismes sont saprophages, ils décomposent les déjections animales, les résidus animaux et végétaux en de nombreux produits organiques et minéraux dont une partie sera réabsorbée par les organismes vivants : ce sont les décomposeurs. Ils peuvent aussi contribuer à la production de composés organiques azotés (cas des micro-organismes fixateurs de N₂). Ils sont aussi en partie responsables de la régulation de la circulation de l'énergie dans l'écosystème, en participant à la synthèse des macromolécules polysaccharidiques ou humiques (Dommergues and Mangenot 1970). Leur intervention dans les transformations cycliques des éléments comme C, N et S est capitale puisque leur absence, ou leur inactivité entraînerait un arrêt de l'approvisionnement naturel des sols en N minéral et un blocage du cycle de N, C et S se traduisant par une accumulation de ces éléments sous forme organique inutilisable pour les végétaux (Dommergues and Mangenot 1970).

D. Interactions faune micro-organisme

Les bactéries sont capables de digérer une bonne partie de l'ensemble des éléments organiques naturels, mais elles sont dans l'incapacité de se déplacer. De ce fait, une fois cette nourriture consommée, elles passent en dormance jusqu'à entrer en contact avec de la matière organique dégradable grâce à la bioturbation due aux ingénieurs du sol comme les vers de terre (macrofaune). Ceux-ci vont ingérer de la terre à laquelle ils ajoutent de l'eau et du mucus (matière organique hydrosoluble) qui va stimuler les micro-organismes. Dans la 2^{ème} partie du tube digestif du vers de terre les micro-organismes sont actifs, ils vont digérer la matière organique. Ils récupèrent une partie des métabolites et le vers de terre récupère le reste (Lavelle, Melendez et al. 1992). D'autres espèces agissent de façons similaires sur les micro-organismes du sol.

E. Toxicité

On différencie deux types d'effets toxiques :

- les effets létaux qui entraînent la mort rapide des espèces exposées après un court délai suivant l'absorption du composé nocif. On parle alors **d'effets toxiques directs**.
- **les effets sublétaux ou indirects** qui engendrent un cumul d'effets nocifs et occasionnent parfois des troubles dégénératifs très graves. A terme, si le potentiel adaptatif des espèces ne leur permet pas de devenir résistantes, les effets sublétaux peuvent indirectement engendrer la mort.

Au niveau des micro-organismes, ces effets peuvent se manifester par une diminution du nombre de bactéries et de levure et de l'activité respiratoire des sols (Walter and al, 1979 ; Trevors 1987).

Au niveau de la faune, ces effets peuvent se manifester par une perte de poids, une inhibition de la croissance, une apparition de troubles comportementaux ou physiologiques à tous les stades de la reproduction (Ramade, 1992).

A l'échelle de l'écosystème ils peuvent engendrer une perte de la diversité, une perte de l'activité biologique (décomposition, minéralisation, aération du sol...) un changement de structure de la communauté spécifique (Ramade, 1992).

Mais on peut également poser l'hypothèse que les métaux peuvent en affectant certaines espèces clés agir indirectement sur d'autres espèces avec lesquelles elles interagissent. Des études préliminaires sur notre site ont montré que la pollution modifie la structure de la communauté de la faune des sols en réduisant notamment les effectifs de vers. Au cours de notre étude, l'un des objectifs est de voir si ces modifications de structure de communautés due à la pollution vont avoir des conséquences sur l'activité des micro-organismes du sol, ce qui n'est généralement pas abordé dans la littérature.

III- Matériel et méthodes :

A. Protocole expérimental utilisé *

.Site d'étude

Les sols sur lesquels porte cette étude ont été prélevés à Nivelles, en région Nord-Pas-De-Calais dans une prairie ayant subi une pollution poly métallique. L'utilisation de déchets d'une zinguerie comme revêtement pour la réalisation d'un chemin reliant la RD468 à un blockhaus (construit en 1939, pour servir de ligne de défense française) est à l'origine de cette pollution.

.Echantillonnage

Deux prélèvements de terre ont été effectués, un dans la zone polluée, c'est à dire dans la prairie, à l'emplacement du chemin contaminé et l'autre dans la zone non polluée à proximité du chemin (annexe 1). Dans chacune de ces zones, la macrofaune du sol a également été prélevée, pour son identification d'une part mais aussi pour son mode de répartition.

* Les échantillonnages ainsi que la réalisation des microcosmes sont antérieurs au début de ce stage.

.Réalisation des Microcosmes

- Préparation des sols

Les deux types de sol prélevés sur le site d'étude ont été ramenés en laboratoire où ils ont été séchés, tamisés puis homogénéisés. Les teneurs totales en plomb, zinc et cadmium sont respectivement de 45, 195, 0.79 ppm pour le sol non pollué et de 1730, 7930, 10.5 ppm pour le sol pollué in situ. Un troisième type de sol a été réalisé à partir d'un échantillon de sol non pollué. A ce sol sont ajoutés des cailloux provenant du chemin contaminé et qui ont été au préalable broyés de manière à ce que leur taille ne dépasse pas 2mm pour ainsi simuler une pollution atmosphérique récente. Les teneurs en métaux lourds de ce sol sont approximativement les mêmes que pour le sol pollué in situ.

- Faune choisie

Les espèces dominantes de chaque zone échantillonnée ont été retenues. Leur proportions relatives dans les sols ont été respectées.

La faune provenant du sol non pollué est constituée de :

- 6 individus de l'espèce *Aporrectodea caliginosa* (vers endogé)
- 1 individu de *Lumbricus rubellus* (vers épigé)
- 1 individu d'une larve de *Tipulidae* (diptère)
- 1 individu d'une larve d'*Elateridae* (coléoptère)

La faune provenant du sol pollué est constituée de :

- 1 *Aporrectodea caliginosa*
- 2 *Lumbricus rubellus*
- 1 larve de *Tipulidae*
- 2 larve de *Elateridae*

- Traitements

A partir des 3 types de sols et des deux assemblages d'espèce, les 6 traitements suivants ont été obtenus par suite de croisement (figure 1) :

- Sol pollué avec faune provenant de sol pollué
- Sol pollué avec faune provenant de sol non pollué
- Sol non pollué avec faune provenant de sol pollué

- Sol pollué avec faune provenant de sol non pollué
- Sol pollué in vitro avec faune provenant de sol pollué
- Sol pollué in vitro avec faune provenant de sol non pollué

Par ailleurs, 3 autres traitements (sols sans faune) ont été réalisés et servent de témoin (Figure 1) :

- Sol pollué sans faune (SPSF)
- Sol non pollué sans faune (SNPSF)
- Sol pollué in vitro sans faune (SPVSF)

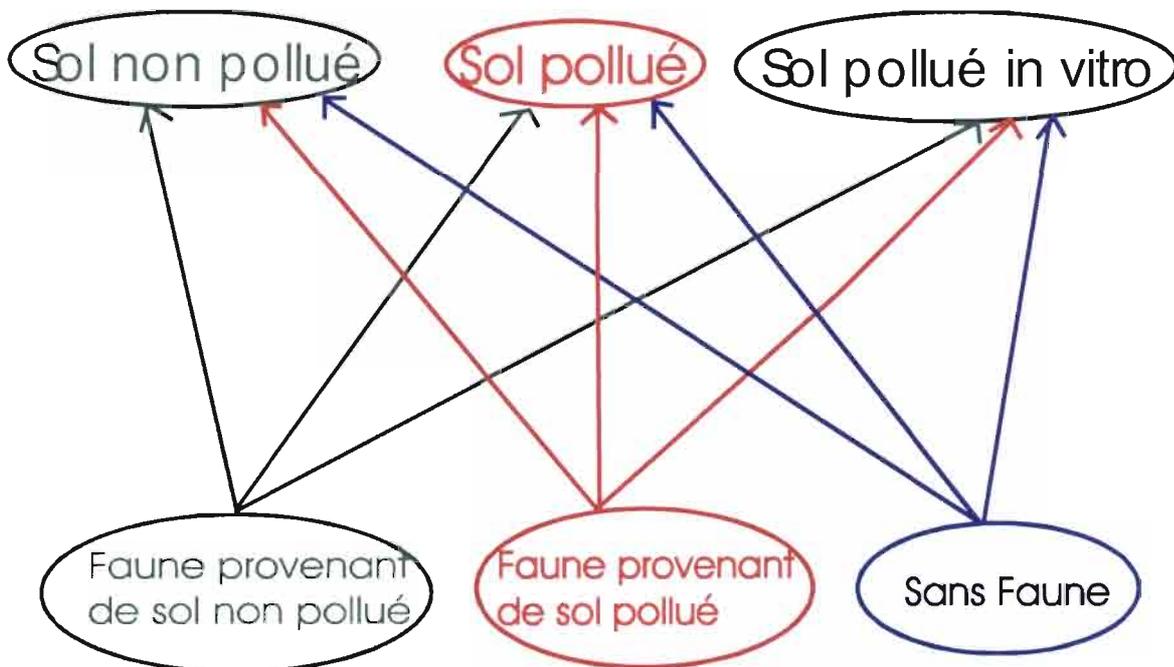


Figure 1: Schéma de la réalisation des microcosmes

On obtient 9 types de microcosmes réalisés dans des tubes en PVC de 16 cm de diamètre et respectant les horizons de terre 0 à 10 cm et 10 à 20 cm (figure 2). Après avoir été arrosés tous les 3 jours pendant 6 mois, les sols ont été prélevés pour les mesures de respirométrie. L'alternance jour / nuit est respectée et les températures de la salle climatisée vont suivre les variations extérieures entre 11 °C et 16 °C.

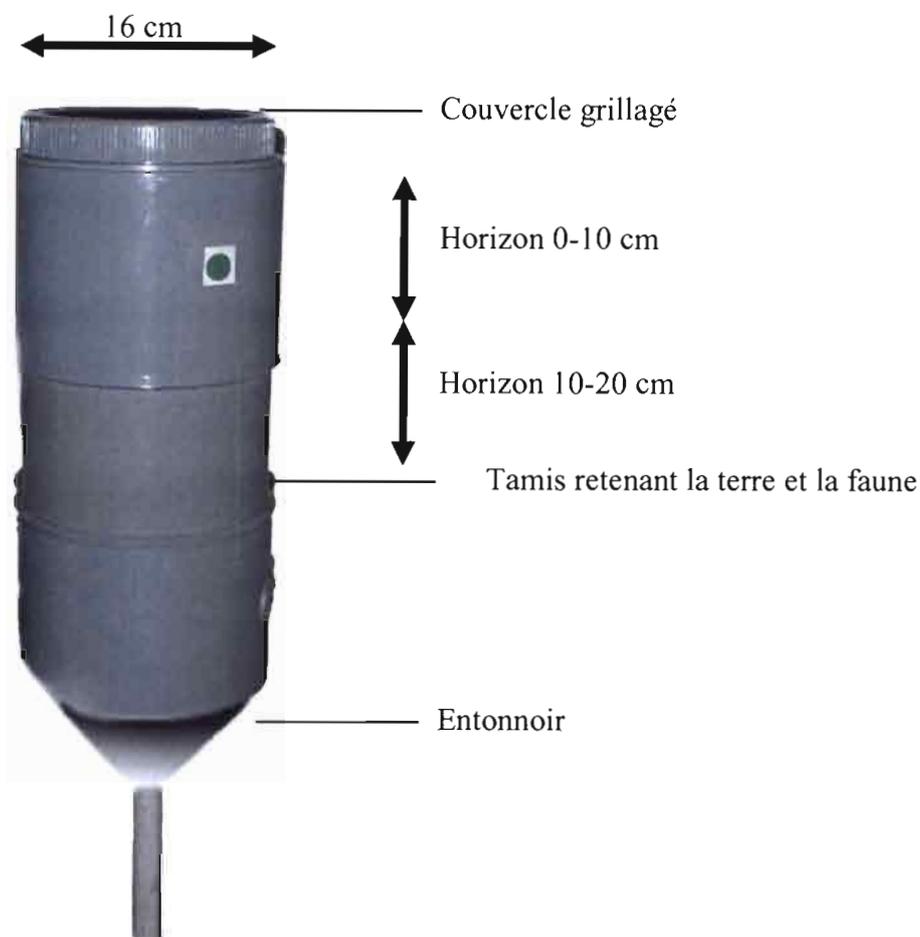


Figure 2: Photo d'un microcosme

B. Méthodes

Afin de tester nos hypothèses de recherche, des mesures de dégagement de CO₂ par respirométrie (protocole modifié Dommergues 1960) et des numérations bactériennes ont été réalisées.

1. Respirométrie par infrarouge

Principe: placés dans des conditions standardisées de température et d'humidité, les micro-organismes vont minéraliser la matière organique présente et dégager du CO₂. L'air contenant le CO₂ passe dans le transmetteur Polytron IR CO₂ qui mesure sa concentration d'après le principe de l'absorption du rayonnement infrarouge. L'absorption entraîne un signal électrique réduit délivré par le détecteur de mesure (mode d'emploi transmetteur Polytron IR CO₂). On obtient une valeur en ppm de CO₂ dégagé. A partir de cette mesure le coefficient de minéralisation est calculé (annexe 2). Le CO₂ est mesuré à plusieurs reprises pendant 21 jours afin de connaître la quantité de carbone minéralisé (Heinemeyer, Insam et al. 1989).

Protocole : Cette mesure est réalisée sur les turricules puis sur des échantillons de l'horizon 0-10 cm. Après la dernière mesure (21^{ème} jour) les turricules et l'horizon 0-10 sont déstructurés par tamisage à 2 mm afin de tester l'hypothèse 5 : Les structures biogéniques (bioturbation, turricules) produites par la faune affectent l'activité respiratoire des micro-organismes.

-Préparation des turricules :

A l'aide d'un pinceau et d'une spatule, les turricules de chaque sol ont été récupérés intacts. Ils ont été pesés (6 gr) puis placés dans des pots déposés dans des bocaux de 350 ml munis de tubulures et contenant 5 ml d'eau (afin d'éviter le dessèchement des turricules). Les turricules ont ensuite été humidifiés.

Une fois les bocaux fermés, on relie les tubulures à une pompe qui fait circuler dans le bocal de l'air appauvri en CO₂ par passage sur la chaux sodée et une première mesure est réalisée en reliant les tubulures du bocal à l'analyseur à infrarouge afin de connaître la teneur en CO₂ de départ.

La concentration de CO₂ dans les bocaux est mesurée à différents intervalles de temps avec l'analyseur de CO₂. Après chaque mesure on fait de nouveau circuler dans le bocal de l'air appauvri en CO₂ comme précédemment. Ensuite les turricules vont être déstructurés pour une nouvelle série de mesure.

- Préparation des échantillons de l'horizon 0-10 cm :

Les sols sont soigneusement prélevés à l'aide d'un cylindre. Leur structure intacte, ils sont pesés et déposés dans les bocaux de 1 L contenant 5 mL d'eau. Les mesures de CO₂ sont réalisées comme décrit précédemment. Les échantillons vont être déstructurés et de nouvelles mesures de CO₂ seront faites.

2. Mise en culture et numération bactérienne

- Afin de vérifier les hypothèses H2 et H3 nous allons mettre en culture les bactéries des différents microcosmes selon la méthode de Hayakawa et Nonomura (1987) modifiée au laboratoire.

- Prélèvement de 5 gr de sol en horizon 0-10 cm pour les 9 types de microcosmes avec 3 répétitions par traitement.

1^{ème} étape : Préparation de la solution dispersante

L'objectif de cette étape est la mise en solution des micro-organismes du sol.

Dans une bouteille de 500ml verser :

-1.5g de pyrophosphate

-0.3g de bactopeptone

Puis compléter à 250ml avec de l'eau distillée.

Homogénéiser avec un agitateur magnétique.

Stérilisation par autoclave (annexe 3).

Après stérilisation :

Placer les 5g de sol dans une bouteille stérilisée

Ajouter 50ml de solution dispersante stérilisée

Recouvrir la bouteille avec du papier d'aluminium tenu par du ruban adhésif.

Homogénéiser avec l'agitateur magnétique.

Laisser décanter pendant 20min sous la hotte.

2^{ème} étape : Préparation du milieu de culture

Une fois extrait, les micro-organismes vont être ensemencés dans un milieu de culture permettant le développement bactérien. Le milieu de culture est composé par les éléments suivants :

-3.76g d'extrait de levure

-3.76g de bactopeptone

-7.52g de glucose

Compléter à 750ml avec de l'eau distillée.

Ajuster le pH entre 6 et 7 en ajoutant de la soude ou de l'acide.

Ajouter 11.28g de gélose (agar).

Homogénéiser avec un agitateur magnétique.

Puis stériliser par autoclave.

A ce milieu, on ajoute la solution de vitamine suivante :

- 125mg de thiamine/HCl
- 125mg de riboflavine
- 125mg de vitamine B6 pyridoxohydrochlorid
- 62.5mg d'inositol
- 62.5mg de Ca pantathénat
- 62.5mg d'acide nicotinique
- 62.5mg d'acide para amino benzoïque
- 62.5mg de biotine

Puis compléter à 250ml avec l'eau distillée stérilisée précédemment.

Homogénéiser avec un agitateur magnétique désinfecté à l'alcool.

Afin d'éviter la contamination par des champignons, on prépare la solution d'antifongique comme suit :

Verser dans un tube à essai :

- 0.1g de Nystatine (1%)
- 10ml d'eau distillée

Sous la hotte, 3.76ml de solution de vitamine et 0.75ml d'antifongique sont ajoutés avec une pipette à filtration (membrane Millipore GS 0.2 μ m) au milieu de culture. Cette solution est déposée dans des boîtes de pétri stériles

3^{ème} étape : .Dilution et ensemencement

Dilution :

Sous la hotte,

Remplir le tube 1 avec le surnageant de notre solution de sol et 5 tubes numérotés de 2 à 7 avec 9ml d'eau physiologique stérilisée.

Prélever 1ml du tube 1 et l'ajouter au tube 2. Après avoir homogénéisé, prélever 1 ml du tube 2 et l'ajouter au tube 3. Répéter cette manipulation jusqu'au tube 7. On obtient 7 dilutions différentes de 10^{-1} pour le tube 1 à 10^{-7} pour le tube 7 (figure 3).

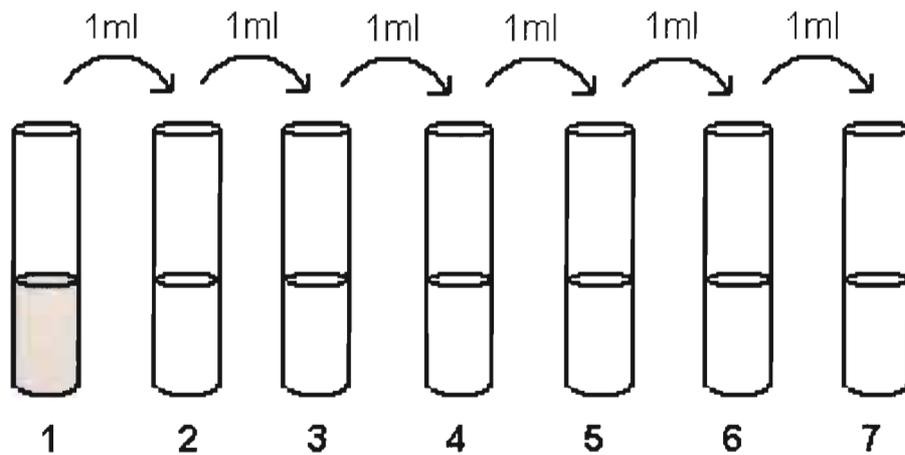


Figure 3: dilution du surnageant

Ensemencement :

Avec une pipette P200, prélever 100µl de chaque dilution.

Les verser dans 7 boîtes de pétri (préparée précédemment) différentes.

Etaler la solution sur toute la surface de la boîte de pétri.

Recommencer 5 fois cette étape.

Sceller les boîtes de pétri.

Les mettre à l'étuve à 28°C.

4^{ème} étape : Numération des colonies bactériennes

3. Analyses statistiques :

.Respirométrie : on a réalisé un test non paramétrique de Kruskal Wallis avec le logiciel Stat View (Vang, Baron et al. 1996) suivie d'un test non paramétrique de comparaisons multiples (Scherrer 1984) comme test à posteriori pour les effets faune et pollutions sur les horizons 0-10 déstructurés et structurés et pour l'effet pollution des turricules structurés et déstructurés. Un test U (non paramétrique) de Mann-Whitney est utilisé pour l'effet faune des turricules structurés et déstructurés et pour l'effet structuration de l'horizon 0-10.

IV-Résultats:

A. Respirométrie

1. Effet pollution

1.1 Horizon 0-10 structuré (après 336h d'incubation)

La figure 4 représente les variations du CO₂ dégagé au cours du temps dans les prélèvements des sols de l'horizon 0-10 des 9 traitements. Les tendances observées nous informe que les sols non pollués semblent dégager plus de CO₂ (entre 2.6 et 3 mg C(CO₂)/dg C) que les sols pollués in situ (entre 1.6 et 1.9 mg C(CO₂)/dg C) qui en dégagent plus que les sols pollués in vitro (entre 0.9 et 1.8 mg C(CO₂)/dg C) - exception faite du SPV sans faune (1.8 mg C(CO₂)/dg C) qui dégage plus de CO₂ que le SPS avec faune pollué (1.6 mg C(CO₂)/dg C).

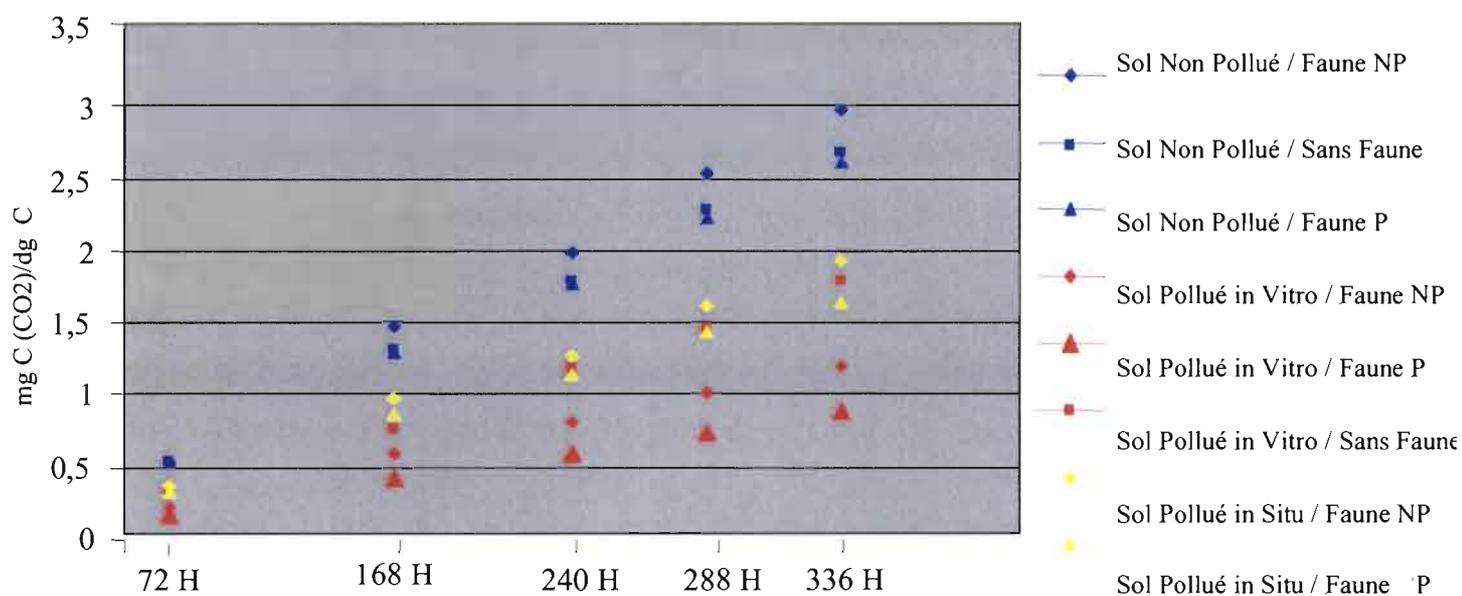


Figure 4 : Courbe du dégagement moyen de CO₂ cumulé des sols en fonction du temps

Afin de tester ces différences, un test de Kruskal Wallis a été réalisé. L'effet pollution est significatif ($P < 0.0001$) Le test à posteriori montre que le sol non pollué a un coefficient de minéralisation significativement plus fort que les sols pollués in vitro ($Z_{obs} = 4.02 > Z_{théo} = 2.40$) et in situ ($Z_{obs} = 4.19 > Z_{théo} = 2.40$). Les sols pollués (in vitro et in situ) sont aussi significativement différents entre eux ($Z_{obs} = 4.02 > Z_{théo} = 2.40$), avec un coefficient de minéralisation supérieur dans les échantillons de sol pollués in situ par rapport à celui des sols pollués in vitro (Figure 5).

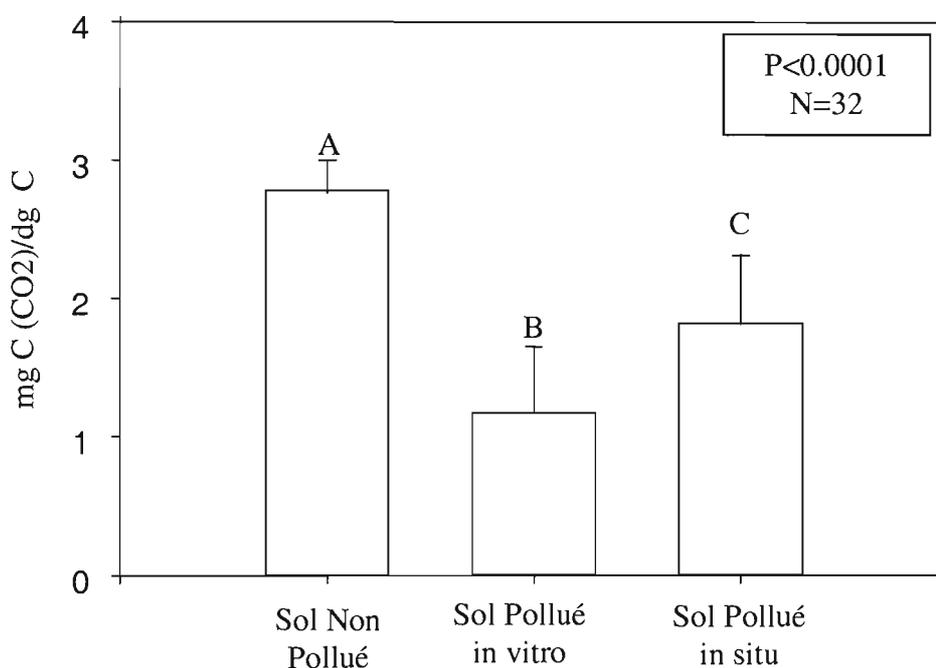


Figure 5: Moyenne du cumul de CO2 dégagé au dernier jour d'incubation par type de sol

1.2 Horizon 0-10 déstructuré (après 342h d'incubation)

D'après la figure 6, le coefficient de minéralisation des sols non pollués (entre 6.8 et 8.6 mg C(CO2)/dg C) semble supérieur à celui des sols pollués in situ (entre 4.4 et 4.9 mg C(CO2)/dg C) qui est supérieur à celui des sols pollués in vitro (entre 3 et 4.4 mg C(CO2)/dg C). Seul le sol pollué in vitro avec faune non polluée (4.4 mg C(CO2)/dg C) dégage autant de CO2 que le SPS avec faune polluée tout au long de l'incubation (Figure 6).

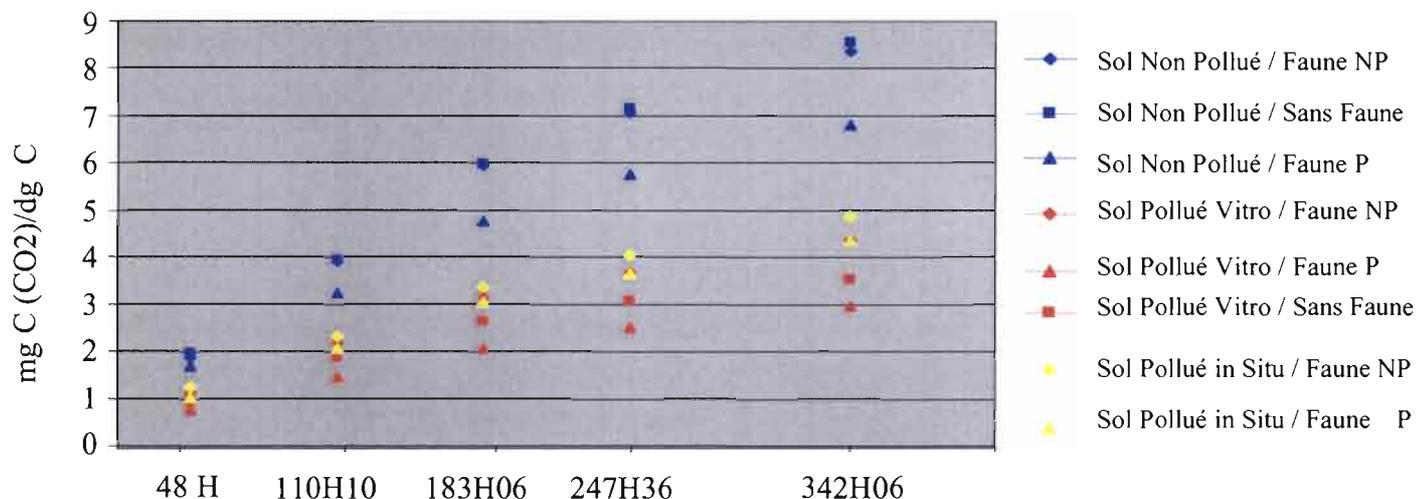


Figure 6: Courbe du dégagement moyen de CO2 cumulé des sols en fonction du temps

L'effet pollution est significatif ($P < 0.0001$) avec le test de Kruskal Wallis. Le test à posteriori montre que l'effet pollution est significativement différent entre le sol non pollué et les sols pollués in vitro ($Z_{obs} = 4.34 > Z_{théo} = 2.40$) ou in situ ($Z_{obs} = 2.85 > Z_{théo} = 2.40$). Par contre les sols pollués in vitro et in situ ne sont pas significativement différent ($Z_{obs} = 1.53 < Z_{théo} = 2.40$) (Figure 7)

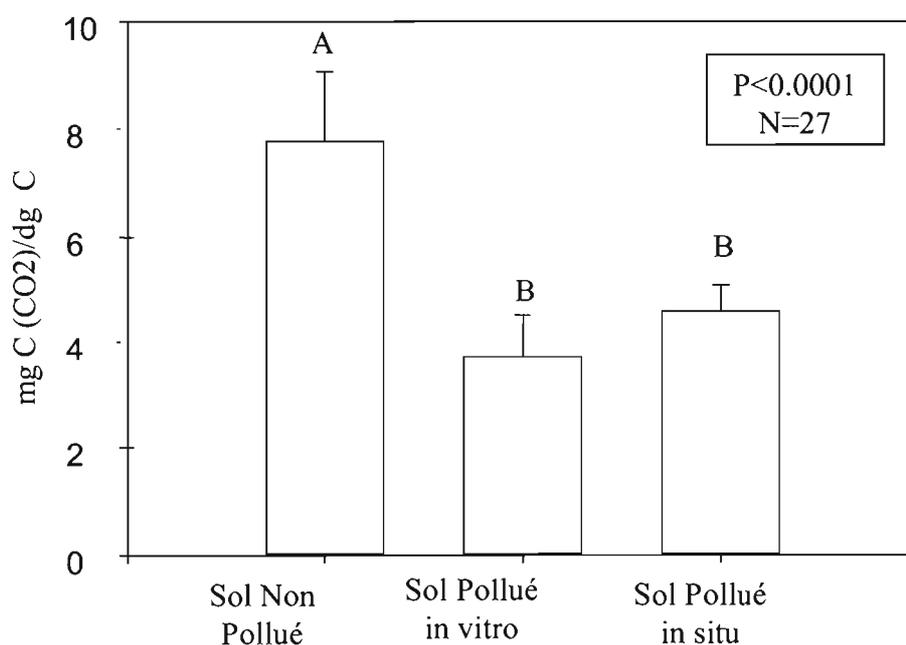


Figure 7: Moyenne du cumul de CO2 dégagé au dernier jour d'incubation par type de sol

1.3 Turricules structurés (après 515h40 d'incubation)

Le coefficient de minéralisation des turricules pollués in situ est trois fois plus important (0.47 mg C (CO₂)/dg C) que celui des turricules pollués in vitro (0.15 mg C (CO₂)/dg C) qui est supérieur au turricules non pollués (entre 0.07 et 0.13 mg C (CO₂)/dg C) (Figure 8). Cependant, ces différences ne sont pas significatives ($P=0.3816 \gg 0.05$).

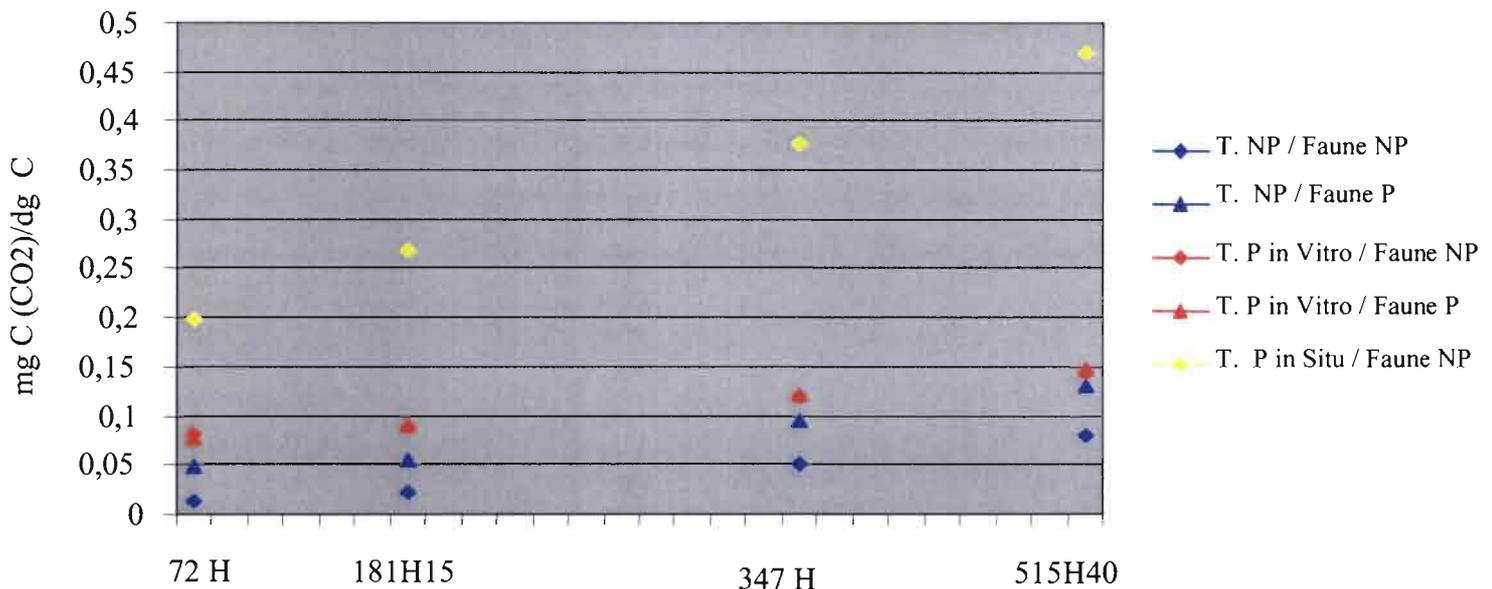


Figure 8: Courbe du dégagement moyen de CO₂ cumulé des turricules en fonction du temps

1.4 Turricules déstructurés (après 456h d'incubation)

Le coefficient de minéralisation des turricules non pollués est très hétérogène, 4.5 mg C (CO₂)/dg C pour le SNPFP et 1.4 mg C (CO₂)/dg C pour le SNPFPN. Le premier dégage plus de CO₂ que les turricules pollués contrairement au deuxième. Les turricules pollués in situ dégagent plus de CO₂ (1.5 et 1.7 mg C (CO₂)/dg C) que les turricules pollués in vitro (1.0 et 1.9 mg C (CO₂)/dg C). (Figure 9). L'effet pollution n'est pas significatif ($P=0.2221 \gg 0.05$).

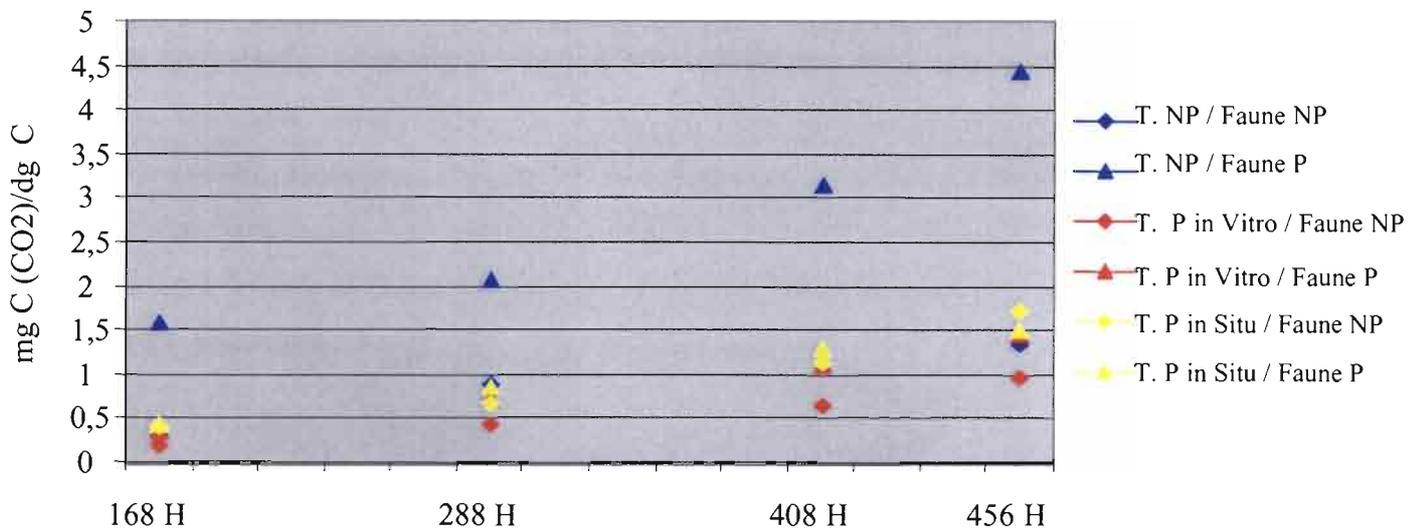


Figure 9: Courbe du dégagement moyen de CO2 cumulé des turricules en fonction du temps

2. Effet de la faune et des structures biogéniques sur l'activité microbienne

2.1 Horizon 0-10 structuré (après 336h d'incubation)

Les courbes en bleu de la figure 4 représentent les valeurs de CO2 cumulées au cours du temps pour les sols non pollués sans faune, avec l'assemblage de faune issue de la zone non polluée (FNP) et avec l'assemblage de faune issue de la zone polluée. Le coefficient de minéralisation est plus fort en présence de FNP (3 mg C (CO2)/dg C) qu'en absence de faune (2.6 mg C (CO2)/dg C) ou en présence de FP (2.65 mg C (CO2)/dg C). La présence de FP ou l'absence de faune semble avoir des effets comparables sur la minéralisation.

Les courbes en rouge de la figure 4 représentent les valeurs de CO2 cumulées au cours du temps pour les sols pollués in vitro sans faune, avec l'assemblage de faune issue de la zone non polluée (FNP) et avec l'assemblage de faune issue de la zone polluée. L'activité respiratoire des microorganismes semble plus importante en l'absence de faune (1.8 mg C (CO2)/dg C) qu'en présence de la faune non polluée (1.3 mg C (CO2)/dg C) qui est elle même plus forte qu'en présence de faune polluée (0.9 mg C (CO2)/dg C).

Dans les sols pollués in situ (courbes en jaune), les microorganismes des sols avec la faune non polluée minéralisent plus de CO2 (1.9 mg C (CO2)/dg C) que la faune polluée (1.6 mg C (CO2)/dg C) (Figure 4).

Un test de Kruskal Wallis a été réalisé sur l'ensemble des mesures de CO₂ (quelque soit le type de sol). Dans ce cas, il n'y a pas de différence significative de l'effet de la présence de la faune sur le dégagement de CO₂.

Cet effet a ensuite été testé pour chaque sol étudié séparément. Des différences significatives entre traitements ont été trouvées uniquement dans le cas des sols non pollués ($P < 0.0001$). Le test a posteriori nous montre que le traitement avec de la faune issue de la zone non polluée a des valeurs significativement supérieures que les sols pollués ($Z_{obs} = 2.45 > Z_{théo} = 2.40$). Il n'y a pas de différence par contre entre les 2 sols pollués (figure 10).

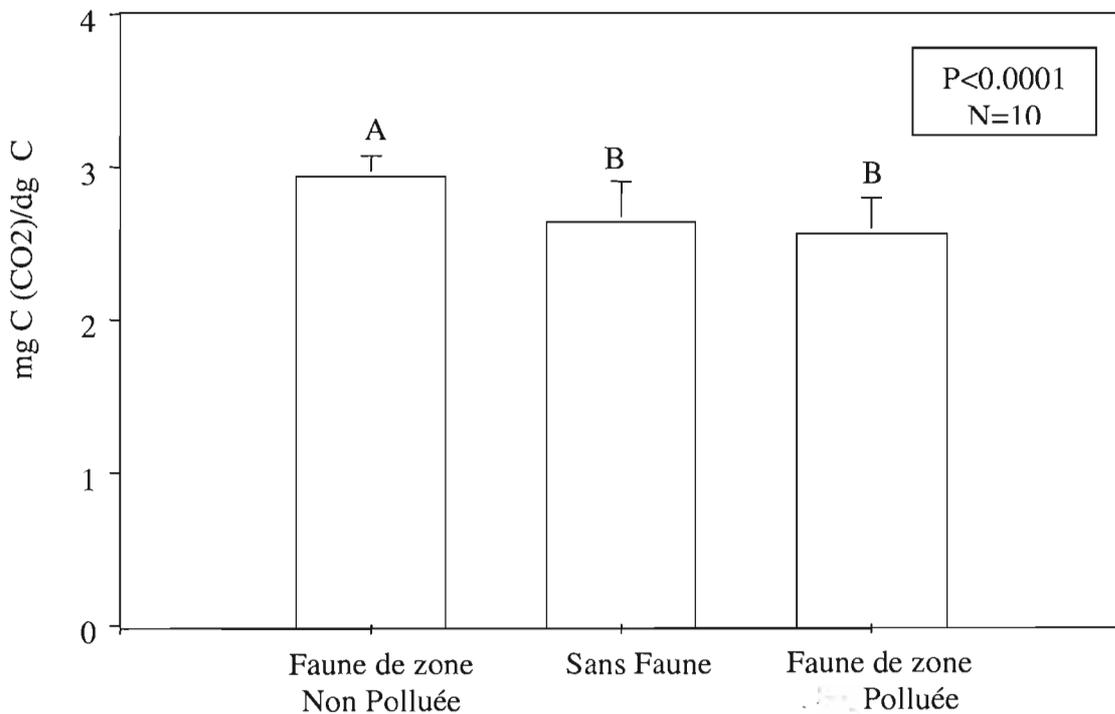


Figure 10: Moyenne du cumul de CO₂ dégagé au dernier jour d'incubation par type de faune

2.2- Horizon 0-10 déstructuré (après 342h d'incubation)

Les courbes en bleu de la figure 6 représentent les valeurs de CO₂ cumulées au cours du temps pour les sols non pollués sans faune, avec la faune issue de la zone non polluée (FNP) et celle issue de la zone polluée. Les minéralisations en présence de FNP et en absence de faune sont similaires (8.5

mg C (CO₂)/dg C) et supérieure à celle en présence de FNP (6.9 mg C (CO₂)/dg C).

Pour les sols pollués in vitro, (courbes en rouge, figure 6), les valeurs après 342H d'incubation sont de 4.4, 3.5 et 3 mg C (CO₂)/dg C respectivement en présence de FNP, en absence de faune et avec de la FP.

Pour les sols pollués in situ, le coefficient de minéralisation oscille entre 4.9 mg C (CO₂)/dg C avec de la FNP et 4.4 mg C (CO₂)/dg C en présence de la FP.

Afin de tester ces différences, des tests de Kruskal Wallis ont été réalisés comme précédemment sur l'ensemble des mesures puis sur chaque sol étudié séparément. Aucune différence significative n'a été mise en évidence.

2.3 Turricules structurés (après 515h40 d'incubation)

D'après la figure 8, les courbes correspondantes aux turricules non pollués (bleu) nous montre qu'en présence de FP le coefficient de minéralisation est plus fort (0.13 mg C (CO₂)/dg C) que celui en présence de FNP (0.08 mg C (CO₂)/dg C).

Par ailleurs, les courbes des turricules pollués in vitro (rouge) nous montrent que le CO₂ dégagé est tout aussi important avec FNP et FP (0.14 mg C(CO₂)/dg C).

Aucune différence significative n'a été mise en évidence suite au test de Kruskal Wallis.

2.4 Turricules déstructurés (après 456h d'incubation)

D'après la figure 9, les courbes correspondantes aux turricules non pollués (bleu) nous montre qu'en présence de FP, le coefficient de minéralisation est 3 fois plus fort (4.5 mg C (CO₂)/dg C) qu'en présence de FNP (1.4 mg C (CO₂)/dg C).

Par ailleurs, les courbes des turricules pollués in vitro (rouge) nous montre que le CO₂ dégagé est légèrement supérieur en présence de FP (1.5 mg C(CO₂)/dg C) qu'avec la FNP (1.0 mg C(CO₂)/dg C).

Enfin, les turricules pollués in situ présentent des valeurs similaires avec FNP et FP.

Aucune différence significative n'a été mise en évidence suite au test de Kruskal Wallis.

3. Effet structuration de l'horizon 0-10 (après 336h d'incubation)

En moyenne, les sols non pollués déstructurés (7.9 mg C (CO₂)/dg C) dégagent 2.8 fois plus de CO₂ que les sols non pollués structurés (2.8 mg C (CO₂)/dg C). De même pour les sols pollués in vitro, 2.8 fois plus de CO₂ est dégagé par les sols déstructurés (3.6 mg C (CO₂)/dg C) par rapport aux sols structurés (1.3 mg C (CO₂)/dg C). Les sols pollués in situ déstructurés ont un coefficient de minéralisation (4.6 mg C (CO₂)/dg C) 2.6 fois plus grand que celui des sols pollués in situ structurés (1.75 mg C (CO₂)/dg C). Un test non paramétrique de Mann et Whitney confirme l'existence d'un effet de la structure du sol sur l'activité respiratoire des micro-organismes (P<0.0001).

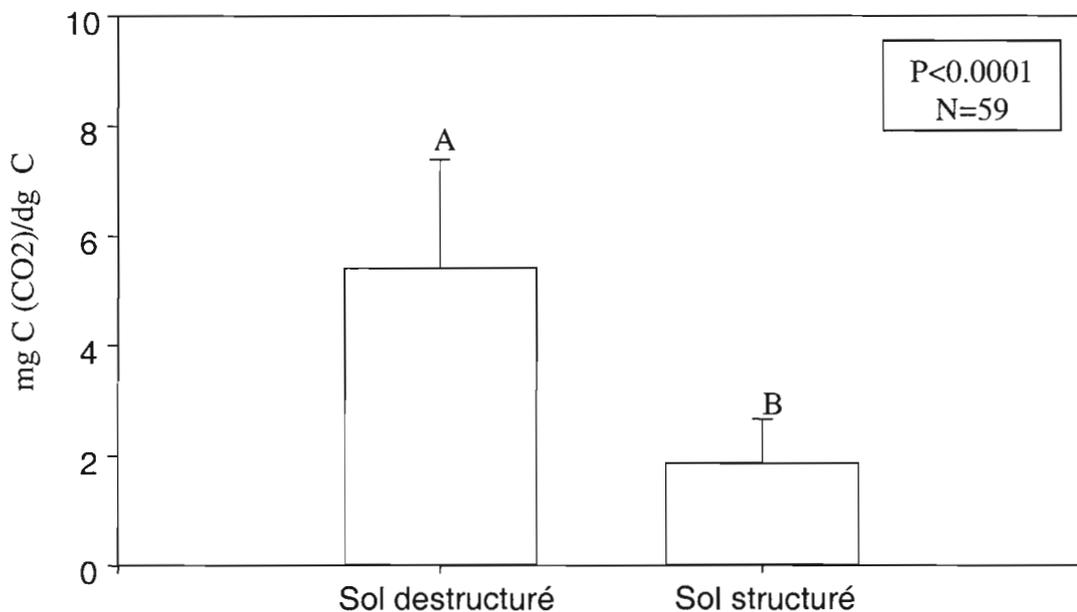


Figure 11: Moyenne du cumul de CO₂ dégagé au dernier jour d'incubation par type de sol

B. Numération bactérienne

Cette numération n'a pas donné de résultats exploitables en raison d'une importante contamination des cultures par des champignons. Des contraintes de temps ont empêché la poursuite de cette étude qui devra être réalisée ultérieurement en utilisant un mélange de plusieurs fongicides.

V-Discussion :

Cette étude a eu comme 1^{er} objectif de voir si la pollution métallique affecte les micro-organismes du sol, puis sachant qu'il existe une interaction entre la faune et les micro-organismes du sol le 2^{ème} objectif a été de voir si la pollution perturbe cette interaction.

Notre étude montre qu'il existe bien un lien entre la pollution métallique et la respirométrie du sol donc avec l'activité respiratoire des micro-organismes. Dans l'horizon 0-10, les micro-organismes minéralisent plus de CO₂ dans un sol non pollué (hypothèse H1) que dans un sol pollué (in vitro et in situ). De nombreux auteurs (Babich and Stotzky 1985 ; Nordgren, Baath et al. 1988 ; Baath 1989) ont trouvé cette relation. H. Insam montre qu'un sol non contaminé par un polluant métallique (<20.10⁻⁹ g de Cu/g de sol) respire trois fois plus qu'un sol pollué (417-984 10⁻⁹ g de Cu/g de sol) (Insam, Hutchinson et al. 1996). L'hypothèse H1 qui stipule que les effets toxiques des métaux entraînent une baisse de respiration des micro-organismes du sol est vérifiée. Par contre, on observe pour l'effet pollution dans l'horizon 0-10 structuré une différence significative entre les trois types de sols (non pollué, pollué in vitro et pollué in situ) alors que dans l'horizon 0-10 déstructuré les sols pollués in vitro et in situ ne sont pas significativement différents. Le fait de déstructurer le sol entraînerait soit une modification de la structure des polluants soit une augmentation des zones de contact entre les micro-organismes et les métaux lourds.

L'hypothèse H2 postulait que les effets toxiques des métaux entraînent une baisse du nombre de bactéries du sol. Des problèmes d'antifongiques pour la numération bactérienne ont entraîné une forte contamination des cultures empêchant un développement « normal » des colonies bactériennes et donc un dénombrement non biaisé. Le protocole de départ inadapté a été amélioré au fur et à mesure mais par manque de temps il n'a pas été finalisé. Cette expérience a été reprise (Leau 2002) et montre que le nombre de bactérie ne diffère pas significativement entre les sols pollués et non pollués. Or notre expérience prouve que la respirométrie est plus forte dans les sols non pollués. Ici, l'hypothèse H2 n'est donc pas vérifiée, les effets toxiques des métaux n'entraînent pas une baisse du nombre de bactérie du sol. D'autres auteurs ont montré que plus un sol est pollué plus la biomasse bactérienne diminue (Insam, Hutchinson et al. 1996 ; Kandeler, Tschirko et al. 2000). Dans notre cas ce phénomène ne s'explique pas par une perte de biomasse mais une étude de diversité bactérienne montre que les communautés de microorganismes diffèrent entre les 3 types de sol. On peut ainsi supposer que nos différences d'activité respiratoire s'expliquent par une différence de biodiversité spécifique et fonctionnelle des micro-organismes (Leau 2002).

L'hypothèse H3 était : la présence de la faune stimule l'activité des micro-organismes du sol. Cette hypothèse se vérifie seulement dans le cas des sols non pollués où l'on observe un dégagement de CO₂ plus important quand le nombre d'individu de faune augmente (FNP). Les vers de terre vont ingérer de la terre à laquelle ils ajoutent de l'eau et du mucus (matière organique hydrosoluble) qui va stimuler les micro-organismes et les rendre actifs (Barois and Lavelle 1986 ; Lavelle, Blanchart et al. 1993). De plus les vers sécrètent un mucus épidermique (pour glisser entre les particules formant la terre) qui tapisse leur galerie. Ce mucus formé de polysaccharide est très facilement dégradé par les micro-organismes, provoquant ainsi la minéralisation du CO₂ (Jégou, Schrader et al. 2000). Ils peuvent aussi par bioturbation libérer de la matière organique inaccessible aux micro-organismes (Scullion and Malik 1999).

Dans le cas des sols pollués, la faune n'a pas d'effet significatif. Cela peut être due à la perte de l'interaction faune micro-organisme inhibé par la mauvaise qualité de la matière organique du sol qui détériore la qualité du mucus produit par les vers de terre. La cause peut aussi venir de la différence des espèces de micro-organismes entre les sols non pollué et pollué. Les espèces des sols pollués sont peut être moins sensibles à l'activation engendrée par les vers de terre. Cela vérifie l'hypothèse H4 selon laquelle la pollution inhibe cette stimulation des micro-organismes par la faune. Dans le sol non pollué, l'effet de la faune polluée n'est pas significativement différente du microcosme sans faune. L'une des hypothèses envisageable serait d'après Mclean que l'effet de la macro faune ne se ressent qu'à partir d'un minimum d'individus or la faune polluée se compose de peu d'organismes (Mclean and Parkinson 1996).

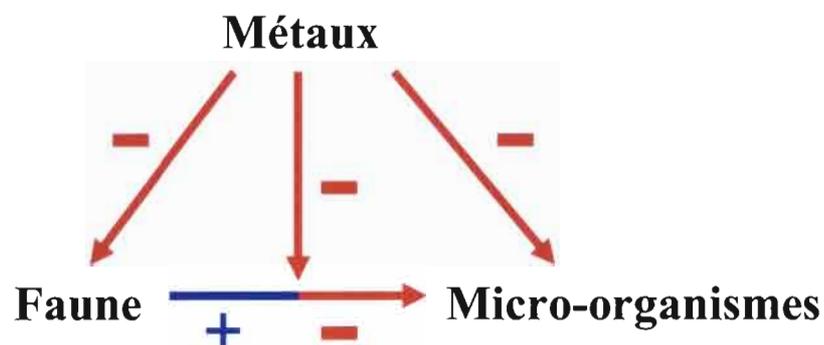
Le 3^{ème} facteur est l'effet de la structure qui est significatif quelque soit le type de sol, il vérifie l'hypothèse H5. La déstructuration d'un sol augmente son coefficient de minéralisation du CO₂ car la matière organique immobilisée par la structure même de la terre est libérée et devient accessible aux micro-organismes. Elle peut aussi libérer des bactéries en dormance prisonnières d'une galerie et les mettre en contact avec de la matière organique.

Dans le cas des turricules aucun test n'est significatif alors qu'en regardant les courbes on s'attend à trouver des différences. Cela peut s'expliquer par le manque de répétition et la faible quantité de sol que représente un turricule. En effet la méthode de respirométrie par infrarouge supporte des sols de 5gr à 100gr or les sols non pollués possèdent moins de turricules que les sols pollués se trouvant souvent sous les 5gr. Cette situation risque de biaiser les résultats et leur interprétation. On remarque toute fois que pour chaque type de sol le dégagement de CO₂ est plus important lorsque les turricules sont déstructurés. Les turricules sont enveloppés d'une paroi hydrophobe qui isole la matière organique qu'ils contiennent des micro-organismes avoisinant. Ce

phénomène est renforcé par la structure compacte du turricule (Martin, Balesdent et al. 1991 ; Lavelle and Martin 1992).

VI- Conclusion

Il est reconnu que la pollution par les métaux lourds a des effets toxiques directs sur la macrofaune et nous montrons ici que ces effets directs affectent également les micro-organismes du sol. De plus, cette toxicité semble être couplée à des effets indirects, via la faune, dont les conséquences se traduisent par une perte d'activité respiratoire des micro-organismes. On peut donc craindre que la pollution, en changeant la densité et/ou la diversité des organismes du sol, va entraîner la perte des interactions entre les espèces et nuire d'autant plus à la qualité des sols.



VII- Perspectives

Notre étude a montré des effets négatifs des métaux sur l'activité des micro-organismes des sols et dans certains cas un rôle des structures biogéniques sur la minéralisation du carbone. Des analyses complémentaires doivent cependant être menées :

- Afin d'observer les différences entre le sol (horizon 0-10) et les turricules, il faudra refaire l'expérience avec plus de réplicats et une masse plus importante de turricules.
- Par faute de temps la comparaison de l'horizon 0-10 et de l'horizon 10-20 permettant de voir l'effet de la profondeur n'a pas été encore réalisé.
- Il est indispensable de quantifier et de qualifier les agrégats et les galeries et de tester la corrélation entre ces paramètres et les mesures de respirométrie. Les analyses sont en cours.
- La numération bactérienne n'expliquant pas les résultats de respirométrie, une étude en biologie moléculaire est en cours pour identifier la diversité des micro-organismes. De plus des tests biochimiques (galerie API) permettront de voir leurs rôles fonctionnels pour les sols.

-Dans notre cas les micro-organismes anaérobies n'ont pas été considérés. Il serait intéressant de mener une étude en parallèle afin de voir si les différences de structures de communautés bactériennes de d'activité respiratoire entre sols pollués et non pollués sont due à ce groupe écologique.

Bibliographie

Baath, E. (1989). "Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review)." Water, Air, and Soil Pollut. **47**: 335-379.

Babich, H. and G. Stotzky (1985). "Heavy metal toxicity to microbe mediated ecologic processes : a review and potential application to regulatory policies." Environ. Res. **36**: 111-137.

Baize, D. (1997). Chapitre2: Les formes des éléments traces métalliques dans les sols. Un point sur...Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France).

Baize, D. (1997a). Chapitre1: Quelques définitions - Abréviations. Un point sur...Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). I. (Eds). Paris.: pp. 409.

Baize, D. (2000). "Teneurs totales en "métaux lourds" dans les sols français." Courrier de l'environnement de l'INRA **39**: 39-54.

Barois, I. and P. Lavelle (1986). "Changes in respiration rate and some physicochemical properties of a tropical soil during transit through *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochæta)." Soil Biol. Biochem. **18**(5): 539-541.

Brookes, P. C. (1993). "The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals." Biol. Fertil. Soils **19**: 269-279.

Christie, P. and J. A. M. Beattie (1989). "Grassland soil microbial biomass and accumulation of potentially toxic metals from long-term slurry application." J. Appl. Ecol. **26**: 597-612.

Doelman, P., E. Jansen, et al. (1993). "Effects of the heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, and ecologically relevant parameter." Biol. Fertil. Soils **17**: 177-184.

Dommergues, Y. (1960). "La notion de coefficient de minéralisation du carbone dans les sols." Agron. Trop. **XV**((1)): 54-60.

Dommergues, Y. and F. Manganot (1970). Ecologie microbienne du sol. Paris.

FlieBbach, A., R. Martens, et al. (1994). "Soil microbial biomass and microbial activity in soils treated with heavy metal contaminated sewage sludge." Soil Biol. Biochem. **26** (9): 1201-1205.

Heinemeyer, O., H. Insam, et al. (1989). "Soil microbial biomass and respiration measurements: An automated technique based on infrared gas analysis." Plant Soil **116**: 191-195.

Insam, H., T. C. Hutchinson, et al. (1996). "Effects of heavy metal stress on metabolic quotient of the soil microflora." Soil Biol. Biochem. **28**: 691-694.

Jégou, D., S. Schrader, et al. (2000). "Morphological, physical, and biochemical characteristics of burrow walls formed by earthworms." Appl. Soil Ecol. **17**: 165-174.

Juste, C. (1994). "Matières organiques et comportement des éléments traces dans le sol." Actes 4^{ème} journées de l'analyse de terre. GEMAS: matières organiques et agricultures: 115-123.

Kandeler, E., D. Tschirko, et al. (2000). "Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil." Biol. Fertil. Soils **32**: 390-400.

Lavelle, P., E. Blanchart, et al. (1993). Impact of soil fauna on the properties of soils in the humid tropics. Myths and Science of Soils in the Tropics. P. A. S. a. R. Lal: 157-185.

Lavelle, P. and A. Martin (1992). "Small-scale and large-scale effects of endogeic earthworms on soil organic matter dynamics in soil humid tropics." Soil Biol. Biochem. **24**: 1491-1498.

Lavelle, P., G. Melendez, et al. (1992). "Nitrogen mineralization and reorganization in casts of the geophagous tropical earthworm *pontoscolex corethurus* (glossoscolecidae)." Biol fertil soils **14**: 49-53.

Leau, B. (2002). Impact de la pollution par les métaux lourds sur la densité et la diversité des micro-organismes du sol.

Lee, K. E. and R. C. Foster (1991). "Soil fauna and soil structure." Aust. J. Soil Res. **29**: 745-775.

Martin, A., J. Balesdent, et al. (1991). "Earthworm diet related to soil organic matter dynamics through ¹³C measurements." Oecologia **91**: 23-29.

Mclean, M. A. and D. Parkinson (1996). "Changes in structure, organic matter and microbial activity in pine forest soil following the introduction of *Dendrobaena octaedra* (Oligochaeta, Lumbricidae)." Soil Biol. Biochem. **29**: 537-540.

Nordgren, A., E. Baath, et al. (1988). "Evaluation of soil respiration characteristics to assess heavy metal effects on soil microorganisms using glutamic acid as a substrate." Soil Biology & Biochemistry **20**(6): 949-954.

Ramade, F. (1992). Précis d'écotoxicologie. Masson. 45 - 85.

Sandaa, R.-A., V. Torsvik, et al. (2000). "Influence of long-term heavy-metal contamination on microbial communities in soil." Soil Biol. Biochem. **33**: 287-295.

Scherrer, B. (1984). Biostatistique, Gaetan morin éditeur.

Scullion, J. and A. Malik (1999). "Earthworm activity affecting organic matter, aggregation and microbial activity in soils restored after opencast mining for coal." Soil Biol. Biochem. **32**: 119-126.

Tisdall, J. M. (1994). "Possible role of soil microorganisms in aggregation in soils." Plant Soil **159**(1): 115-121.

Trevors, J. T. (1987). "Copper resistance in bacteria." Microbiol. Sci. **4**: 29-31.

Vang, E., C. Baron, et al. (1996). Manuel de référence de StatView, Abacus Concepts.

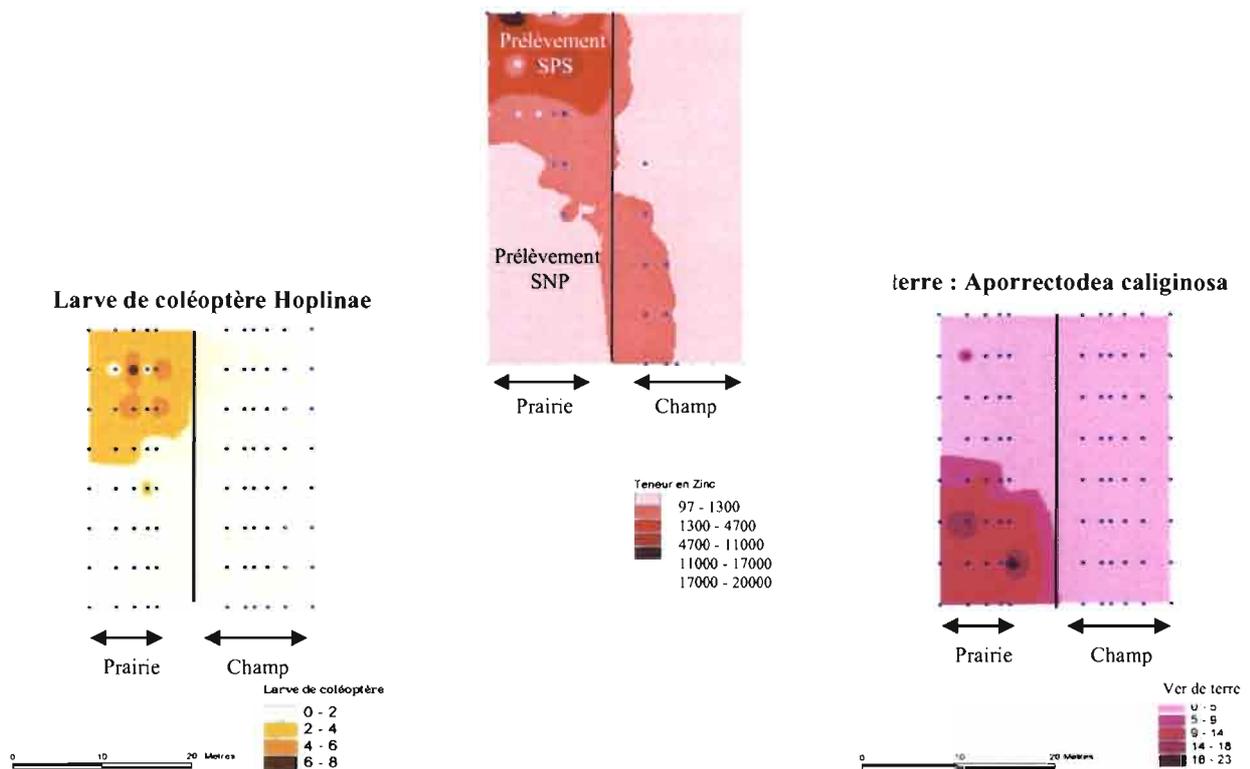
Walter J. and Stadelmann H. (1979) : Influence du Zn et du Cd sur les microorganismes ainsi que sur quelques processus biochimiques du sol. Schweiz. Landwirsch. Forsch. **18. 4** : 311-324.

Annexes

Annexe 1 : Prélèvement des échantillons de sols et de faunes

Répartition spatiale du zinc et de deux espèces de macro invertébrés du sol à Nivelles

Teneurs en zinc : Mise en évidence du chemin



Annexe 2 : Stérilisation

Afin d'éviter toute contamination, il est nécessaire de stériliser dans un autoclave à 120°C pendant 20 min le matériel suivant:

- 1 Erlenmeyer bouché avec du papier d'aluminium tenu par du scotch (sol)
- 8 petits récipients que l'on bouche avec du papier d'aluminium tenu par du scotch (7 pour les dilutions et un de secours)
- billes
- 1 bouteille d'eau physiologique à 9 pour 1000 de NaCl
- 1 bouteille d'eau distillée de 500ml (vitamine)
- 1 bouteille vide (vitamine)

- la solution dispersante
 - le milieu de culture
 - Cônes de 1000 μ l et de 100 μ l dans des boites recouverte de papier d'aluminium tenu par du scotch
 - Ajouter un scotch témoin de stérilité qui devient noir si la stérilisation a fonctionné.
- Une fois la stérilisation terminée, il faut laisser refroidir l'autoclave jusqu'à 100°C.

Annexe 3 : Calcul CO2 par infrarouge, mesuré en ppm

- x: mesure faite dans le bocal avec échantillon ppm;
- CO2 du bocal vide: en ppm/h
- Les volumes des bocaux utilisés sont de 404.5mL pour les petits, 1120mL pour les bocaux avec un petit couvercle et 1143mL pour ceux avec un grand couvercle.
- x ppm: x mL de CO2 pour un million d'air.

$$\text{Volume CO}_2 = \frac{X * V \text{ bocal}}{1.000.000} = \text{mL de CO}_2 \text{ dû à la respiration}$$

- 1 mole de CO2 22,414L de CO2
- 22414mL de CO2 (AVOGADRO) = 12000mg de CO2

$$\text{- Masse de carbone} = \frac{12000 * \text{Volume de CO}_2}{22414}$$