

EVALUATION DE LA TOXICITE DES POLLUANTS METALLIQUES PAR L'UTILISATION D'UN BIOTEST MICROBIOLOGIQUE METPLATE™

Ouafae El Hamiani, Hicham El Khalil et Ali Boularbah*

Laboratoire d'Aliment, Environnement et Santé, Université Cadi Ayyad, BP.549, 40000, Guéliz-Marrakech, Faculté des Sciences et Techniques Marrakech,.

*Tél : 024 43 31 63, Fax : 024 43 31 70, E-mail : boularbah@fstg-marrakech.ac.ma; aliboularbah@yahoo.fr.

RESUME

L'activité anthropogénique, tel que l'utilisation d'engrais phosphatés, les effluents provenant de l'industrie minière et les boues des stations d'épurations des eaux usées constitue la principale source de contamination par les métaux lourds dans l'environnement. La présence de ces micropolluants constitue donc un grand risque pour la santé humaine et animale par leur accumulation et leur persistance considérable dans les écosystèmes aquatiques et terrestres. Pour estimer le risque associé à la contamination de l'environnement, il est indispensable d'utiliser des méthodes permettant d'estimer la fraction de métaux mobiles et biodisponibles.

L'objectif de notre travail consiste à évaluer la contamination et la toxicité due aux polluants métalliques dans diverses matrices (Eaux de margines, eaux des puits, sédiments, boues de station d'épuration, sols miniers et eaux de ruissellement des mines) prélevées des sites susceptibles d'être pollués par les métaux lourds localisés dans la région de Marrakech et de Béni Mellal (Maroc). Cette évaluation est réalisée d'une part par le biais des extractions chimiques sélectives et analyse de métaux, d'autre part par l'application du biotest microbiologique MetPLATE™. Ce biotest MetPLATE™ est basé sur l'inhibition spécifique de l'activité de la β -galactosidase

d'une souche mutante d'*Escherichia coli* par les micropolluants métalliques. La réponse du biotest a été comparée à la méthode chimique (extractions sélectives). La toxicité des matrices liquides varie de 16% pour les eaux de puits (EP1) à 96% d'inhibition de l'activité de la β -galactosidase pour les eaux de ruissellements (ER1 et ER2) prélevées des sites miniers. A l'exception des boues de stations d'épuration, les autres matrices solides sont fortement toxiques (93-95% d'inhibition). En général, la toxicité exprimée par le biotest MetPLATE™ est expliquée par la présence de fortes concentrations en métaux principalement sous formes mobiles. Par conséquent, le biotest MetPLATE™ peut être utilisé comme un outil simple et fiable pour caractériser la nature des polluants causant la toxicité dans diverses matrices.

Mots clés : Micropolluants métalliques, sols, sédiments, eaux de surface, eaux souterraines, Biotest microbiologique MetPLATE™, mobilité et biodisponibilité.

ABSTRACT

Anthropogenic activities such as phosphate fertilizers, industrial wastewater effluents derived from the mining process or wastewater sludge represent the main source of metal contamination in the environment. The presence of heavy metals in the environment can lead to potential risks to humans and animals. Furthermore, metals are non biodegradable and therefore persist for long periods in aquatic as well as terrestrial environments. In order to assess the risk associated to the metal contamination of the environment, it is indispensable to find approaches for the estimation of the mobile and bioavailable fraction of toxic metals. The objective of this work was the assessment of heavy metal concentrations and toxicity in the various matrices (Olive oil mill wastewater, groundwater, sediments, wastewater sludge, soils, and soil runoffs) sampled from metal-contaminated sites located in Marrakech and Beni Mellal, Morocco. This evaluation was studied by running concurrently chemical extractions and analysis, and toxicity testing with MetPLATE™. This bioassay is based on the specific inhibition of

the β -galactosidase activity, enzyme of mutant strain of *Escherichia coli*, by the global metallic pollutants. The toxicity of liquid matrices varied between 16 % (well EP1) to 96% inhibition of the β -galactosidase activity (Soil runoff ER1 and ER2) sampled from the studied mine. The solid matrices were very toxic and displayed percent enzyme inhibition exceeding 93-95% except the wastewater sludge which is not toxic. The concentration of selected heavy metals in the studied matrices is compared to their metals toxicity as determined by the biotest. In general, the samples which displayed highest toxicity also had highest metal concentrations. Therefore, the MetPLATE™ bioassay is a reliable and fast bioassay to estimate the metals toxicity in the aquatic and solids samples.

Keys of Words: Metallic Micropolluants, soils, sediments, surface waters, ground waters, microbiological bioassay MetPLATE™, mobility and bioavailability.

INTRODUCTION

Les éléments en traces sont des constituants normaux de la lithosphère. Ils se trouvent grâce aux cycles biogéochimiques dans les sols et dans les eaux. Les organismes vivants tel que l'Homme ne font que modifier leur flux et leurs conditions de circulation au cours de ces cycles

Généralement, les deux principales sources de contamination de l'environnement par les éléments en traces sont d'une part les processus naturels d'érosion des sols suite à la nature de la roche mère qui influe directement sur la composition du sol en métaux (Shallari *et al.*, 1998) et d'autre part l'activité anthropique (pollution atmosphérique, utilisation des pesticides, d'engrais, de résidus urbains et industriels) qui contribue également à l'enrichissement des sols par les métaux lourds. Les molécules polluantes libérées dans les différents écosystèmes naturels peuvent être accumulées, dégradées à des vitesses variables, immobilisées sur la matière organique ou minérale ou au contraire être très mobiles. Par leur

accumulation et leur persistance considérable dans les écosystèmes terrestres et aquatiques, les métaux constituent donc un grand risque pour la santé de l'homme et des animaux (Asante *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2007 ; Khan *et al.*, 2008).

Plusieurs travaux ont été publiés sur le risque de la contamination des populations qui résident au voisinage des sites pollués par les métaux lourds (mines en activité ou abandonnées, zones d'épandage des déchets liquides et solides...) (Sedki *et al.*, 1994; Ye *et al.*, 2002 ; Boularbah *et al.*, 2006 a ; b ; El Khalil *et al.*, 2008). Il est donc primordial de pouvoir évaluer les risques de contamination de la chaîne alimentaire, suite aux rejets des déchets, liquides et solides, dans l'environnement.

Pour une action efficace et ciblée, les analyses chimiques ne permettent pas d'établir un diagnostic exact de l'impact de la pollution sur les organismes vivants. Cependant, les tests biologiques (utilisant les végétaux ou les animaux) s'avèrent souvent trop longs et trop coûteux. Par contre, l'utilisation des tests microbiologiques et enzymatiques peut constituer une alternative car ils sont simples à utiliser, rapides et reproductibles. L'objectif de notre travail consiste à évaluer la contamination et la toxicité due aux polluants métalliques dans diverses matrices liquides et solides prélevées au voisinage des sites susceptibles d'être pollués par les métaux lourds localisés dans la région de Marrakech et de Béni Mellal (Maroc). Cette évaluation est réalisée d'une part par le biais des extractions chimiques sélectives, d'autre part par l'application du biotest microbiologique MetPLATE™ (Bitton *et al.*, 1994).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Echantillonnage des diverses matrices testées

Dans le cadre de ce travail, diverses matrices (solide et liquide) ont été échantillonnées des zones susceptibles d'être polluées par les métaux lourds. Tous les échantillons ont été collectés dans la région de Marrakech (Sud du Maroc) à l'exception

des boues qui proviennent de la station d'épuration des eaux usées localisées à Béni-Mellal. Parmi les matrices étudiées, nous avons testé des boues de station d'épuration, des eaux de margines provenant de différents processus d'extraction de l'huile d'olive, des eaux des puits, des sédiments d'un effluent industriel, des eaux de ruissellement et des sols prélevés au voisinage d'une mine abandonnée (tableau I1).

Tableau I : Origines des diverses matrices échantillonnées

Matrice	Nombre	Origine
Liquide	Eaux de margine	2 Deux unités de trituration : moderne notée EM MN et semi-moderne notée EM SM.
	Eaux de puits	3 Prélevé au voisinage d'une mine polymétallique localisée au Nord-ouest de Marrakech notée respectivement EP 1, EP 2 et EP 3.
	Eaux de ruissellement	3 Prélevée au voisinage d'une mine abandonnée localisée à l'Ouest de Marrakech notée respectivement ER 1, ER 2 et ER 3.
solide	Sédiment effluent industriel	1 Correspondant au rejet d'un effluent industriel noté SEI.
	Boues de station d'épuration	1 Prélevée de la station d'épuration des eaux usées domestiques située dans la ville de Béni-Mellal notée BSE.
	Sols miniers	3 Prélevée au voisinage d'une mine abandonnée localisée à l'Ouest de Marrakech notée respectivement SM 1, SM 2 et SM 3.

2. Extraction et dosage des métaux dans les échantillons liquides et solides

2.1. Dosage de la teneur totale en métaux

❖ Teneur totale en métaux dans les échantillons liquides

Un volume de 50 ml, de chaque échantillon, a été évaporé dans une étuve à 80 °C jusqu'à évaporation complète. La matière sèche a été récupérée dans 10 ml d'un mélange d'acides (2 ml d'acide nitrique + 6 ml d'acide chlorhydrique + 2 ml d'acide perchlorique). L'ensemble a été porté à ébullition douce pendant 1 heure. Enfin, le minéralisât est filtré et ajusté à 25 ml avant le dosage des métaux par Spectrophotomètre d'Absorption Atomique (S.A.A)-UNICAM 929.

❖ Teneur totale en métaux dans les échantillons solides

Cette opération a été réalisée selon le protocole de l'attaque à l'eau régale présenté dans la norme française NF X 31-415 et la norme ISO II 466. Il s'agit d'une extraction des éléments traces solubles dans l'eau régale (1 volume d'acide nitrique / 3 volume d'acide chlorhydrique). Un gramme de terre a été mis dans 10 ml d'eau régale (2,5 ml d'acide nitrique et 7,5 ml d'acide chlorhydrique) pendant au moins 12 heures. Le mélange a été, ensuite, digéré à chaud pendant 2 heures. Le minéralisât obtenu, a été filtré et ajusté à 25 ml par de l'eau acidifiée à 1 % d'acide nitrique avant le dosage des métaux en S.A.A.UNICAM 929.

2.2. Dosage de la teneur en métaux mobiles dans les échantillons solides

Les terres ont été mélangées avec de l'eau distillée dans un rapport de 1/2,5, puis mises en agitation pendant 2 heures. Après centrifugation à 5000 rpm pendant 15 minutes, le surnageant a été récupéré. Une partie est employée pour le biotest MetPLATE™ après ajustement du pH entre 5 et 7,5. L'autre partie est acidifiée à 1 %

d'acide nitrique avant d'effectuer le dosage des métaux en S.A.A.-UNICAM 929.

3. Biotest MetPLATE™

Le biotest MetPLATE™ est basé sur l'inhibition de la β -galactosidase spécifiquement par les micropolluants métalliques. Ne réagissant qu'aux métaux, il constitue un test sélectif car il est insensible aux polluants organiques même à des concentrations très élevées qui dépassent celles trouvées dans la nature (Bitton *et al.*, 1994). Ce biotest a été développé à partir du biotest MetPAD™ pour une estimation quantitative de la toxicité due aux métaux lourds présents dans les effluents industriels et urbains (Bitton *et al.*, 1992 ; 1994). L'inhibition de la β -galactosidase est estimée selon le taux de dégradation du substrat exprimée par l'apparition de la coloration rouge-pourpre. Le kit comprend un flacon contenant la bactérie lyophilisée (souche mutante d'*E. coli*), le diluant, le tampon et un flacon contenant le Chlorophénol Rouge- β -GalactoPyranoside (CPRG) substrat d'enzyme (Bitton *et al.*, 1994).

Le test MetPLATE™ phase liquide est un test quantitatif, il permet de déterminer la concentration inhibant à 50 % l'activité de la β -galactosidase (EC_{50}). Le biotest MetPLATE™ est très sensible au Cd et au Hg (EC_{50} respectivement $0,029 \text{ mg l}^{-1}$ et $0,038 \text{ mg l}^{-1}$), sensible au Zn et au Cu (EC_{50} respectivement $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ et $0,22 \text{ mg l}^{-1}$) et peu sensible au Cr et au Pb (EC_{50} de l'ordre de $6,9 \text{ mg l}^{-1}$ pour Cr et 10 mg l^{-1} pour Pb). Ce biotest microbiologique présente une sensibilité aux métaux supérieure à celle du biotest Microtox et de même niveau que les biotests utilisant *Daphnia magna* et les poissons (Bitton *et al.*, 1994).

Les différentes étapes du biotest sont décrites dans la figure 1. Le blanc de l'échantillon (Be) et le blanc du témoin (Bt) ont été réalisés pour supprimer les interférences dues à la présence de la matière organique et à la présence de la β -galactosidase indigène (figure 1).

Le pourcentage d'inhibition de la β -galactosidase est calculé selon la formule suivante :

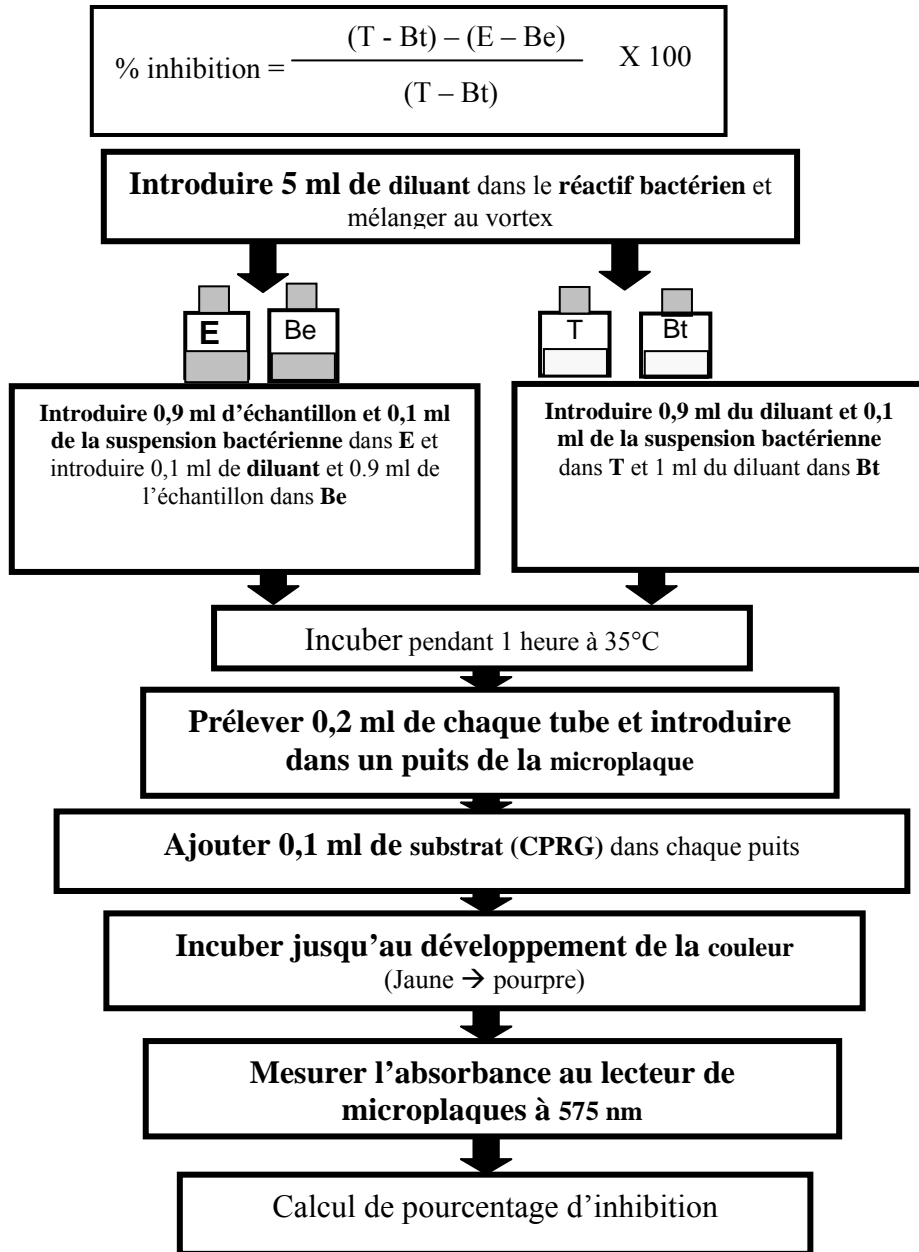


Figure 1: Etapes de biotest MetPLATE phase liquide (Bitton *et al.*, 1994)

E : Essai ; Be : Blanc d'essai ; T : Témoin ; Bt : Blanc témoin ; CPRG : Chlorophénol Rouge-β-GalactoPyranoside

T, Bt, E, Be sont les densités optiques à 575 nm des puits de la microplaque correspondant au témoin, blanc du témoin, échantillon et blanc de l'échantillon respectivement.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats d'application du biotest microbiologique MetPLATE™ sur les matrices liquides (tableau 2) montrent que les eaux des margines d'unité de trituration moderne (EM MN) présentent un pourcentage d'inhibition de 51,19 %. Cependant, les eaux de margines d'unité de trituration semi moderne provoquent une inhibition de 93,34 %. Cette importante toxicité est due aux teneurs élevées en Zn (1,28 mg Zn l⁻¹ pour EM MN et 2,79 mg Zn l⁻¹ pour EM SM), dont les valeurs dépassent la concentration qui inhibe à 50% l'enzyme (Bitton *et al.*, 1994). Les deux procédés de trituration aboutissent à des eaux de margines chargés en éléments métalliques surtout dans le cas de l'unité semi- moderne. Ben Sassi *et al.*, (2006) ont aussi montré que les eaux de margines d'unité de trituration semi-moderne sont plus toxiques au biotest microbiologique qualitatif MetPAD™ que celles d'unité moderne. L'application du biotest MetPLATE™ sur les eaux souterraines prélevées de différents puits situés au voisinage de la mine sont caractérisées par une faible toxicité à l'exception du puits P3 qui présente une inhibition de 95,4%. La réponse du biotest microbiologique a été comparée avec les teneurs totales des métaux dans ces eaux de puits (tableau 2). Dans la plupart des cas, la faible toxicité du biotest est confirmée par les faibles teneurs métalliques (tableau 2). Cependant pour le puits 3, la toxicité exprimée par MetPLATE™ est due aux teneurs remarquables en Zn (1,5 mg Zn l⁻¹) et en Cu (0,19 mg Cu l⁻¹). Les concentrations de Zn détectées dépassent largement les concentrations qui inhibent à 50% le biotest MetPLATE™ (Bitton *et al.*, 1994). Les trois eaux de ruissellement montrent un pourcentage d'inhibition très élevée. Ceci est expliqué par la présence de fortes teneurs en métaux en particulier Cu (tableau II). Ces résultats

concordent avec ceux trouvés par El Khalil *et al.*, (2008).

Tableau II : Comparaison de la réponse du test MetPLATE™ et la concentration des métaux dans les matrices liquides

Echantillons	MetPLATE™	Teneurs totales (mg l ⁻¹)		
	% Inhibition	Cd	Cu	Zn
EM MN	51,19 ± 1,18	<ld	0,16	1,28
EM SM	93,34 ± 6,68	<ld	0,10	2,79
EP 1	16,17 ± 2,6	<ld	<ld	0,12
EP 2	22,94 ± 6,29	<ld	<ld	0,09
EP 3	95,36 ± 0,21	<ld	0,19	1,5
ER 1	96,57 ± 3.4	0,38	61,20	19,85
ER 2	96.31 ± 2.9	0,41	22,08	24,58
ER 3	87.56 ± 8.7	0,33	9,56	4,83

<ld : Inférieur à la limite de détection

Les résultats d'application du biotest MetPLATE™ sur les matrices solides figurent dans le tableau 3. Ils montrent que le sédiment d'effluent industriel et les sols prélevés au voisinage de la mine abandonnée présentent des pourcentages d'inhibition très élevés (93,22%, 95,22%, 93,55% et 94.73% respectivement). La toxicité des sols a été comparée aux teneurs totales en Cd, Zn et Cu dans les sols et à leurs teneurs extractibles à l'eau (tableau 3). Les résultats montrent que la forte toxicité de ces sols est due principalement aux fortes teneurs en Cu mobiles. Nos résultats confirment ceux obtenus par Boularbah *et al.*, (2006a) en utilisant le biotest qualitatif MetPAD™. De même, El Khalil *et al.*, (2008) ont trouvé que les sols de cette région minière présentent d'une part de fortes teneurs métalliques surtout en Cu et par conséquent des pourcentages d'inhibition du biotest MetPLATE™ très élevés. Les teneurs métalliques

des trois sols miniers étudiés dépassent les valeurs européennes standards (Kabata-Pendias et Pendias, 1992 ; Baize, 1997).

Quant aux boues de la station d'épuration de Béni Mellal, elles ne présentent aucune toxicité vis à vis du biotest microbiologique. Cette faible toxicité est expliquée par la faible concentration des métaux extractibles à l'eau (tableau III) et par la richesse de boues des stations d'épuration en matière organique qui pourraient agir sur la mobilité et la biodisponibilité des éléments métalliques (Achterberg *et al.*, 2002 ; Zhou *et al.*, 2005).

TABLEAU III : Comparaison de la réponse du test MetPLATE™ et la concentration des métaux dans les matrices solides

Echantillons	MetPLATE™ % Inhibition	Concentration					
		dans l'extrait à l'eau en mg l ⁻¹			Concentration totale en mg Kg ⁻¹		
		Cd	Cu	Zn	Cd	Cu	Zn
SEI	93,22 ± 0,97	<ld	0,46	0,13	10,63	429,63	506,38
BSE	Non Toxique	<ld	0,30	0,23	8,50	145,25	885,50
SM 1	95,22±2.17	0,12	1,05	0,20	2,47	637,8	698
SM 2	93,55±2.32	0,07	454,20	0,80	2,92	3480	418
SM 3	94,73±2.59	0,03	16,54	4,70	1,11	1232	35,34

<ld : Inférieur à la limite de détection

L'ensemble des résultats obtenus par application du biotest microbiologique MetPLATE™ sur les diverses matrices liquides et solides (boues de station d'épuration, eaux de margines, eaux des puits, eaux de ruissellements, sédiments et sols) a montré une corrélation entre la toxicité exprimée par le biotest microbiologique utilisé (pourcentage d'inhibition) et les teneurs métalliques mobiles détectées dans les matrices analysées. En général, les différentes matrices qui présentent des pourcentages

d'inhibition très élevés sont fortement polluées par les métaux lourds.

CONCLUSION

Les résultats obtenus en appliquant le biotest MetPLATE™ sur diverses matrices (liquides et solides) collectées dans divers sites localisés à Marrakech et à Béni-Mellal ont montré une corrélation entre la toxicité exprimée par le pourcentage d'inhibition de l'enzyme et la teneur en métaux mobiles. Ce biotest peut donc être un outil simple et rapide pour le diagnostic de la pollution métallique et peut être utilisé pour distinguer les situations où la toxicité est due essentiellement aux métaux et ainsi pour prévenir le risque associé à la présence des micropolluants métalliques dans diverses matrices.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achterberg, E. P., Herzl, V. M. C., Braungardt, C. B. et Millward, G. E. (2002).** Metal behavior in an estuary polluted by acid drainage: the role of particulate matter. *Environmental Pollution*, **120** : 1-10.
- Asante, K. A., Agusa, T., Subramanian, A., Ansa-Asare, O. D., Biney, C. A. et Tanabe, S. (2007).** Contamination status of arsenic and other trace elements in drinking water and residents from Tarkwa, a historic mining township in Ghana. *Chemosphere*, **66**: 1513-1522.
- Baize, D. (1997).** Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). *Paris: Editions INRA*.
- Ben Sassi, A., Boularbah, A., Jaouad, A., Walker, G. et Boussaid, A. (2006).** A comparison of Olive Mill Wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco. *Process Biochemistry*, **41**: 74-78.
- Bitton, G., Jung, K. et Koopman, B. (1994).** Evaluation of microplate assay specific for heavy metal toxicity. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology*, **27**: 215-28.
- Bitton, G., Koopman, B. et Agami, O., (1992).** MetPAD™: a bioassay for rapid assessment of heavy metal toxicity in wastewater. *Water Environment Research*, **64**: 834-836.

- Boularbah, A., Schwartz, C., Bitton, G. et Morel, J.L. (2006a).** Heavy metal contamination from mining sites in south Morocco: 1. Use of a biotest to assess metal toxicity of tailings and soils. *Chemosphere*, **63**: 802-810.
- Boularbah, A., Schwartz, C., Bitton, G., Abouddrar, W., Ouhammou, A. et Morel, J.L. (2006b).** Heavy metal contamination from mining sites in South Morocco: 2. Assessment of metal accumulation and toxicity in plants. *Chemosphere*, **63**: 811-817.
- El Khalil, H., El Hamiani, O., Bitton, G., Ouazzani, N. et Boularbah, A. (2008).** Heavy metal contamination from mining sites in South Morocco: Monitoring metal content and toxicity of soil runoff and groundwater. *Environmental Monitoring and Assessment*, **136**: 147-160.
- Kabata-Pendias, A. et Pendias, H. (1992).** Trace elements in soils and plants. *CRC Press Inc., Boca Raton, Florid.*
- Khan, S., Cao, Q., Zheng, Y. M., Huang, Y. Z. et Zhu, Y. G. (2008).** Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. *Environmental Pollution*, **152**: 686-692.
- Li, M. S., Luo, Y. P. et Su, Z. Y. (2007).** Heavy metal concentrations in soils and plant accumulation in a restored manganese mineland in Guangxi, South China. *Environment Pollution*, **147** : 168-175.
- Shallari, S., Schwartz, C., Hasko, A. et Morel, J.L. (1998).** Heavy metals in soils and plants of serpentine and industrial sites of Albania. *The Science of the Total Environment*, **209**: 133-142.
- Sedki, A., Nejmeddine, A., Fars, S. et Pihan, J.C. (1994).** Les métaux lourds chez les vers de terre vivant dans les sols du champ d'épandage des eaux usées de la ville de Marrakech. *Revue de la Faculté des Sciences Marrakech*, **8** : 83-91.
- Ye, Z.H., Shu, W.S., Zhang, Z.Q., Lan, C.Y. et Wong, M.H. (2002).** Evaluation of major constraints to revegetation of lead/zinc mine tailing using bioassay techniques. *Chemosphere*, **47**: 1103-1111.
- Zhou, P., Yan, H. et Gu, B. (2005).** Competitive complexation of metal ions with humic substances. *Chemosphere*, **58**: 1372-1337.