

Université Abdelhamid
Ibn Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



DEPARTEMENT DE BILOGIE

N°/SNV/2017

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

LAKHMI Nourelhouda

SAKMECHE Fadela

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité : BIOTECHNOLOGIE DES MICROORGANISMES

THÈME

Soutenu publiquement le **16/09/2017**

DEVANT LE JURY

Président	MEKHALDI Abdelkader	Professeur U. Mostaganem
Encadreur	BOUZNAD Ahcene	Professeur U. Mostaganem
Examineur	DJIBAOUI Rachid	Professeur U. Mostaganem

Thème réalisé au Laboratoire pédagogique de microbiologie au niveau de l'université de Mostaganem

Remerciements

Au début et avant tout, le remerciement et louange à Dieu le tout puissant, de nous avoir donné le courage, la santé de finaliser ce travail

*Nous devons l'aboutissement de ce mémoire à de nombreuses personnes.
Tout d'abord, nous remercions notre encadreur Mr BOUZNED , professeur à l'université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, pour l'honneur qu'il nous a fait en dirigeant ce travail, de nous avoir permis de travailler sur un projet des plus intéressants.*

Nos remerciements les plus chaleureux au président de jury Mr. MIKHALDI Abdelkader, professeur à l'université de Mostaganem pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury.

Nous remercions également Mr. DJIBAOUI Rachid , professeur à l'université de Mostaganem d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Un remerciement s'adresse aux techniciens des Laboratoires de Microbiologie, à Mr Mohammed, Mme Hafida et Mr Djilali merci pour vos conseils.

En fin, nos remerciements vont également à l'ensemble de nos enseignants qui nous ont accompagnés pendant notre cursus universitaire.

Dédicace

Je dédie ce travail

A ma très chère Mère pour tous ses sacrifices, et son amour.

A mon Père qui m'a toujours aidé et encouragé.

*Très chers parents. Recevez ici l'un des plus précieux cadeaux que
Je puisse vous offrir. Car c'est grâce à vous que je suis arrivée là où je
suis.*

A mon frère Abdelrahmen et mes sœurs Khadidja et Hassna.

A mes cousines Amira, Zaki, Ikram.

A toute ma famille.

A mes amis, Souria et Ahlem, Sarah, Fadhila.

NOURELHOUDA

Résumé

Les micro-organismes possédant une tolérance aux métaux et capables de promouvoir la croissance végétale, peuvent jouer un rôle important dans la remédiation de sols contaminés par les métaux. Ce travail consiste de vérifier la tolérance de certains PGPR aux métaux lourds (Co, Cu, Cd et Pb). Pour atteindre cet objectif, nous avons inoculé des souches (B, D, E et F) (culture jeune de 18h) ; qui ont été isolées de la rhizosphère du sol, dans un milieu LB à de différentes concentrations (50% 100% 200%) pour chaque métal, après une incubation de 72h à 30 °C. Certaines souches sont tolère en présence métaux lourds, de faibles concertations et même en forte concertations, et d'autre souches ne résiste plus de faibles et même de forte concertations. Comparé à des souches non inoculées aux métaux lourds (0 %).

En conclusions ; tenant compte du potentiel de métaux lourds sur la croissance des bactéries on peut recommander son application pratique dans la phytoremédiation ou bioremédiation de sols contaminés.

Les mots clés: PGPR; pollution du sol; métal lourd; tolérance.

Abstract

The microorganisms having a tolerance with metals and able to promote the vegetable growth, can play a significant role in cured of grounds contaminated by metals. This work consists to check the tolerance of some PGPR to heavy metals (Co, Cu, Cd and Pb). To achieve this goal, we inoculate stocks (B, D, E and F) (young culture of 18h). Which were isolated from the rizosphere of the ground, gifts a medium LB has various concentrations (50% 100% AND 200%) for each metal, after an incubation of 72h with 30°C; results based of statistical analysis. Certain stocks are tolerated in heavy metal presence, of weak dialogues and even into strong dialogues, and of another stocks does not resist any more weak and even of the strong one consultation. Compared to stocks not inoculated with heavy metals (0%). Conclusions, taking account of the potential of heavy metals on the growth of the bacteria one can recommend its practical application in the phytoremediation or the bioremediation of contaminated grounds.

Keywords: PGPR; soil pollution; heavy metal; tolerance.

Liste des abréviations

Al : Aluminium

Cd : Cadmium

Co : Cobalt

Cu : Cuivre

Do : Densité Optique

ETMs : Eléments Traces Métalliques

Fe : Fer

Hg : Mercure

Ni : Nickel

MTCs : Maximal Tolérable Concentration

MICs : Minimal Inhibition Concentration

Se : Sélénium

Pb : Plomb

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria

ppm : Part Per Million

Liste des figures

Figure 01 : Classification périodique des éléments.....	03
Figure 02 : Origine des métaux lourds dans le sol.....	04
Figure 03 : Schéma illustrant la mobilité des métaux lourds.....	07
Figure 04 : Les mécanismes d'action des rhizobactéries.....	10
Figure 05 : représentation schématique des différentes stratégies de phytoremédiation.....	20
Figure 06 : Schématisation des interactions entre les métaux et les bactéries.....	21
Figure 07 : Préparation des concentrations.....	22
Figure 08 : Les étapes d'ensemencement des isolats.....	23
Figure09 : Effet de variation de la concentration du cadmium sur la croissance des bactéries à effet PGP.....	24
Figure10 : Effet de variation de la concentration du Cobalt sur la croissance des bactéries à effet PGP.....	25
Figure11 : Effet de variation de la concentration du Plomb sur la croissance des bactéries à effet PGP.....	26
Figure12 : Effet de variation de la concentration du Cuivre sur la croissance des bactéries à effet PGP.....	27

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classement des métaux.....04

Tableau 02 : Les principales technologies utilisées dans la bioremédiation.....16

Tableau 03 : Les principales technologies utilisées dans la phytoremédiation.....19

Annexe I

Milieu LB :

Extrait de levure.....	6 g/l
Peptone	10 g/l
Chlorure de sodium	10 g/l
Eau distillée	1l

pH = 7

Spectrophotomètre à UV (laboratoire de microbiologie N°03)

Sommaire

Remerciements

Dédicace

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
I. Les métaux lourds	2
I.1. Définition des métaux lourds:	2
I.2. Classifications des métaux lourds :	3
I.3. Origine de la contamination des sols par les métaux lourds :	4
I.3.1. Origine naturelle :	5
I.3.2. Origine anthropique :	5
I.4. Mobilité et biodisponibilité des métaux lourds :	5
I.5. Principaux métaux lourds étudiés :	7
I.5.1. Le cadmium :	7
Toxicité.....	7
I.5.2. Le cuivre :	7
Toxicité.....	8
I.5.3. Le plomb :	8
Toxicité.....	8
II. Les PGPR.....	10
II.1. Les PGPR :	10
II.2. Quelques bactéries PGPR :	11
II.2.1. Les bactéries du genre <i>Pseudomonas</i> :	11
II.2.2. Les bactéries du genre <i>Azospirillum</i> :	11
II.2.3. Les bactéries du genre <i>Rhizobium</i> :	11
II.2.4. Les bactéries du genre <i>Bacillus</i> :	11
II.3. Effet des métaux lourds sur les microorganismes du sol :	12
II.3.1. Biomasse :	13
II.3.2. Activité enzymatique :	13
III. Les techniques de traitement des sols contaminés par les métaux lourds	14

III.1. Les techniques chimiques :.....	14
III.2. Les traitements thermiques :.....	15
III.3. Les traitements physiques :.....	15
III.4. Les techniques biologiques :	15
III.4.1 La bioremédiation :.....	15
III.4.1.1. Les microorganismes utilisés en bioremédiation :	18
III.4.2 La phytoremédiation :.....	18
III.5. Mécanismes de résistance des bactéries aux métaux lourds :.....	21
IV. Matériels et méthodes :	22
IV.1. Le matériel biologique :	22
IV.2. Estimation de la tolérance des bactéries aux métaux lourds:.....	22
IV.2.1. Préparation des milieux de culture à concentrations variables en métaux lourds :	22
IV.2.2. Préparation de l'inoculum :	23
IV.2.3. Ensemencement et incubation :.....	23
IV.3.Effet de variation de la concentration du cadmium sur la croissance des bactéries à effet PGP : ..	24
IV.4. Effet de variation de la concentration du Cobalt sur la croissance des bactéries à effet PGP :.....	25
IV.5. Effet de variation de la concentration du Plomb sur la croissance des bactéries à effet PGP :.....	26
IV.6. Effet de variation de la concentration du Plomb sur la croissance des bactéries à effet PGP :.....	27
Discussion :	29
Conclusion et perspectives	30
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction

Au fil des siècles, les activités anthropiques telles que les procédés métallurgiques, la production industrielle, les activités agricoles et l'exploitation minière, ont entraîné une élévation des teneurs en métaux lourds et donc une vaste contamination qui menace le bien-être de l'environnement mondial d'aujourd'hui. L'industrie minière est parmi les principaux contributeurs qui a conduit à un fort accroissement de la pollution métallique des terres, des rivières et de l'air dans de nombreuses parties du monde (**Wuana and Okieimen, 2011 Akpor et al., 2014 ; Cinnirella et al., 2014**). Cette contamination métallique, et particulièrement celle des sols, est devenue un problème majeur et préoccupant, en terme de risques pour la santé humaine et environnementale (**Cinnirella et al., 2014**).

En effet, les métaux lourds, sont des composés stables, non dégradables et donc hautement persistants, ils peuvent avoir des répercussions négatives sur le comportement des organismes vivants présents sur le site ou dans les zones environnantes. A compter d'une certaine concentration même les oligoéléments tels que le Zn et le Cu...deviennent toxiques pour la vie animale et végétale (**Young, 1992**), même à l'échelle microscopique, les métaux lourds ont des effets néfastes sur les populations bactérienne, Pour cela, il existe des techniques conventionnelles de dépollution qui font appel aux procédés physico-chimiques et thermiques. Elles sont, efficaces pour certains types de contaminants mais elles sont très onéreuses et très lourdes à mettre en œuvre car elles nécessitent l'excavation des sols, le transport, et le lavage. D'autres techniques de dépollution innovantes appelées bioremédiation ont été envisagées. Elles présentent l'avantage d'être moins onéreuses et plus écologiques faisant appel à des procédés biologiques qui peuvent impliquer des micro-organismes (**Gaur et al., 2014**) D'autres techniques par contre font appel à des plantes on parle alors de la phytoremédiation (**Ali et al., 2013**). Elle consiste à utiliser des plantes pour réduire le niveau de pollution présent dans le sol. (**Pilon-Smits, 2005 ; Callahan et al., 2006**).

I.1. Définition des métaux lourds:

Le terme de « métaux lourds » reste aujourd'hui mal défini par la communauté scientifique car il comprend certains métaux non particulièrement lourds ($< 5\ 000\ \text{kg m}^{-3}$, par exemple l'Al qui a une masse volumique de $2700\ \text{kg m}^{-3}$) et d'autres éléments non métalliques comme le Se ou appartenant au groupe des métalloïdes comme l'As (**Figure 01**). Les métaux lourds sont présents dans tous les compartiments de l'environnement mais généralement en faible quantité ($< 1\ \%$) ou à l'état de trace, d'où le terme d' « Eléments Traces Métalliques (ETMs) » aussi employé à la place de « métaux lourds ».

Du point de vue science de la vie, les métaux lourds se trouvent par définition en concentration inférieure à $100\ \text{mg/Kg}$ de matière sèche dans les organismes vivants, végétaux ou animaux, non affectés par des carences ou des toxicités (**Nieboer and Richardson, 1980 ; Coïc and Coppenet, 1989 ; Loué, 1993**).

La majorité des métaux lourds tels que le Zn, Cu, Mn, Co, Ni, Fe et Se sont essentiels à la vie sous forme d'oligoéléments sont des éléments indispensables à l'état de trace pour de nombreux processus cellulaires et qui se trouvent en proportion très faible dans les tissus biologiques (**Loué, 1993 ; Kabata-Pendias et Pendias, 2001**). Mais peuvent s'avérer toxiques à de fortes concentrations, d'autres métaux lourds tels que le Cd, Pb, Hg sont exclusivement toxiques, même en faibles quantités, ont un caractère polluant avec des effets toxiques pour les organismes vivants même à faible concentration ils n'ont aucun rôle biologique connu.

Tableau 01 : Classement des métaux (d'après Hopkin 1989).

Class A	Intermédiaire	Classe B
Calcium	Zinc	Cadmium
Manganèse	Plomb	Cuivre
Potassium	Fer	Mercure
Strontium	Chrome	Argent
Sodium	Cobalt	
	Nickel	
	Arsenic	

I.3. Origine de la contamination des sols par les métaux lourds :

Les métaux lourds sont des éléments naturellement présents dans les roches et les sols. Leur présence dans les milieux tels que l'air ou l'eau, résulte des processus naturels mais aussi des activités humaines qui les utilisent pour leurs propriétés particulières ou les rejettent indirectement dans l'environnement (**Figure 2**).

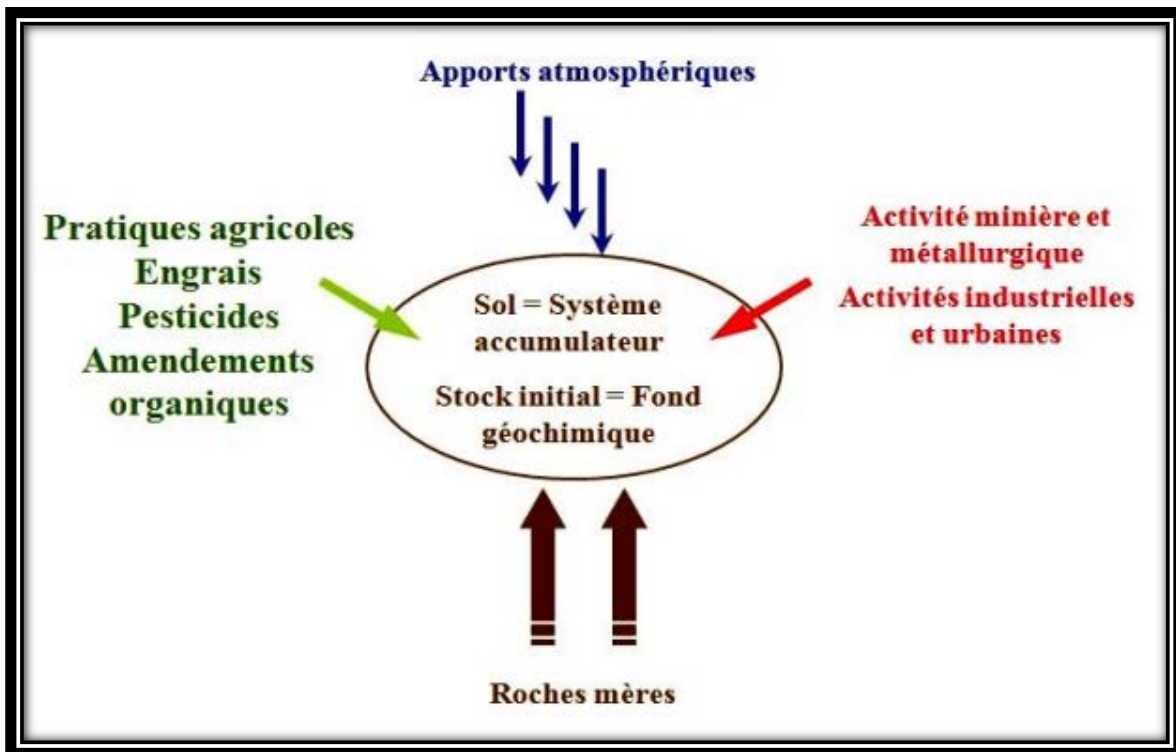


Figure 02 : Origine des métaux lourds dans le sol (d'après Robert et Juste, 1999).

I.3.1. Origine naturelle :

Les métaux lourds sont présents naturellement dans les roches, ils sont libérés lors de l'altération de celles-ci pour constituer le fond géochimique (**Bourrelier et Berthelin, 1998**). La concentration naturelle de ces métaux lourds dans les sols varie selon la nature de la roche, sa localisation et son âge.

I.3.2. Origine anthropique :

Cependant, la source majeure de contamination est d'origine anthropique. Au cours des dernières décennies, l'apport de métaux lourds au sol dans le monde s'est étendu ; à l'heure actuelle on l'estime à 22000 tonnes de cadmium, 939000 t de cuivre, 783000 t de plomb, et 1350000 t de zinc (**Singh et al, 2003**).

Les principaux types de pollutions anthropiques responsables de l'augmentation des flux de métaux, sont la pollution atmosphérique (rejets urbains et industriels), la pollution liée aux activités agricoles et la pollution industrielle. La pollution atmosphérique résulte des activités industrielles (rejets d'usine) et urbaines (gaz d'échappement, etc...). Il faut distinguer les apports diffus aériens d'origine lointaine des apports massifs localisés d'origine proche. Dans les apports diffus sont classés les poussières et aérosols provenant des chauffages ainsi que des moteurs d'automobiles. Les apports massifs localisés résultent d'apports anthropiques accidentels liés aux activités industrielles sans protection efficace contre la dispersion dans l'environnement (**Baize, 1997**).

Certaines pratiques agricoles sont à l'origine de l'introduction de métaux lourds dans le sol. Les produits destinés à améliorer les propriétés physico-chimiques du sol sont souvent plus riches en métaux lourds que le sol lui-même par exemple les engrais, les composts et les boues de station d'épuration (**Robert et Juste, 1999**).

I.4. Mobilité et biodisponibilité des métaux lourds :

Les métaux lourds ont tous un potentiel toxique qui dépend principalement de leur concentration dans le milieu considéré et de leur biodisponibilité, c'est-à-dire de leur fraction soluble et accessible par les organismes.

La biodisponibilité en métaux lourds définit leur aptitude à être transférés d'un compartiment vers un autre. Plus l'espèce métallique est libre et mobile, plus elle est biodisponible et plus il y a un risque de toxicité sur les organismes vivants.

La biodisponibilité dépend de la spéciation du métal (différentes formes chimiques d'un élément métallique) ainsi que des conditions physico-chimiques de l'environnement où se trouve le métal considéré (pH, teneur en phosphate disponible, teneur en matière organique, activités biologiques). En effet, les métaux lourds existent soit sous forme élémentaire soit sous forme dérivée. Etant chargés positivement, ils sont alors susceptibles d'interagir avec n'importe quels éléments chargés négativement pour former des dérivés inorganiques (sel, sulfure, oxyde) ou organiques (avec liaison carbone).

L'acidification du sol favorise la mobilité des métaux lourds notamment par la mise en solution de sels métalliques ou la destruction de la phase de rétention. Inversement, l'augmentation du pH provoque l'immobilisation par la formation de composés insolubles.

La plupart des plantes excrètent par leur racine des acides afin de favoriser l'absorption d'éléments nutritifs et du coup solubilisent aussi d'autres éléments pas forcément nécessaires à la plante. Ainsi, l'acidification de la rhizosphère faciliterait la capture par la plante des métaux lourds devenus plus disponibles suite à la baisse du pH (**Delorme et al., 2001**). A l'inverse, des sols carbonatés, argileux ou riches en matière organique globalement chargés négativement ont tendance à retenir les cations métalliques et donc les rendre moins disponibles (**Pardo et al., 2011**).

Les activités biologiques de certains organismes peuvent aussi influencer la disponibilité des métaux lourds présents dans le sol. Certaines activités métaboliques microbiennes influencent aussi la mobilité des métaux lourds par solubilisation, insolubilisation ou volatilisation (**Misra, 1992; Gadd, 2010**).

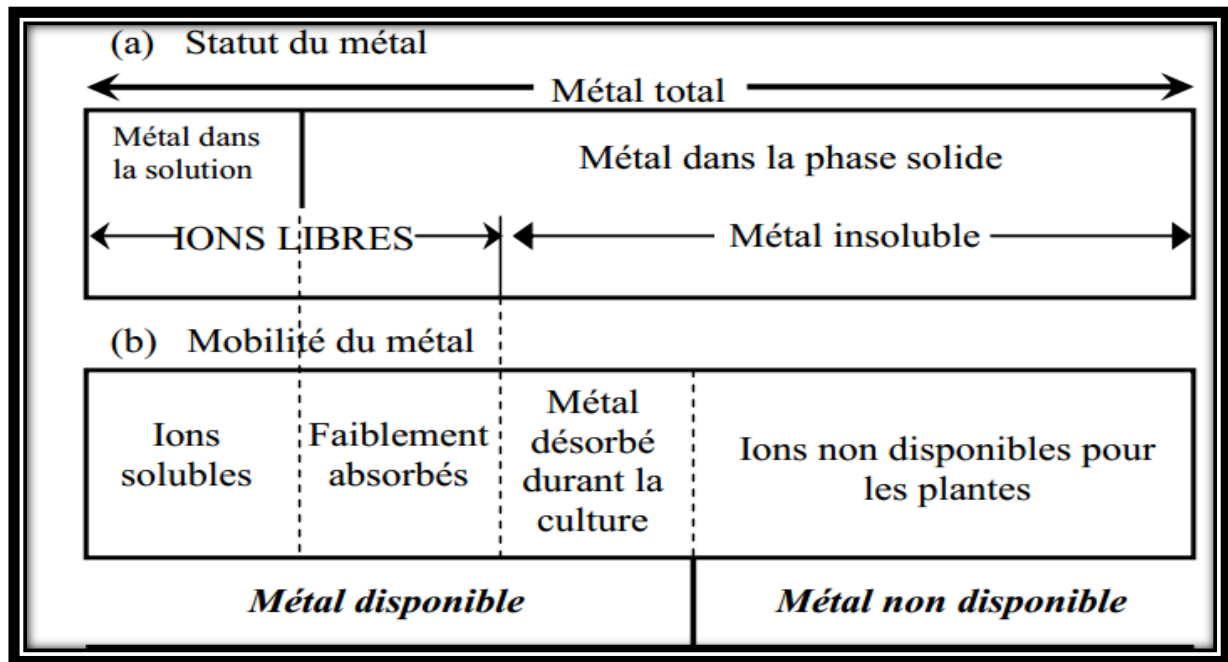


Figure 03: Schéma illustrant la mobilité des métaux lourds
(D'après Shallari, 1997).

I.5. Principaux métaux lourds étudiés :

Les éléments traces sélectionnés pour ce travail sont parmi les polluants métalliques les plus fréquemment rencontrés dans les sols contaminés et étudiés :

I.5.1. Le cadmium :

Le cadmium est un métal relativement rare dans la croûte terrestre (0,2 mg/kg), 67^{ème} élément par ordre d'abondance dans la lithosphère. C'est un élément naturel présent dans certains minerais sous forme d'impuretés. Il ne se trouve pas à l'état élémentaire dans la nature ; il est généralement présent dans des minerais de zinc ou de plomb. Il peut se constituer suite à une altération et une érosion des roches cadmifères et constituer également un produit de raffinage d'autres métaux tel que Cu, Pb et le Zn. La concentration normale en Cadmium dans l'air et dans l'eau est de 0,001 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ et 1 $\mu\text{g}/\text{l}$ respectivement (**Haguenoer and Furon, 1981**). Dans les sols, la concentration en Cadmium est de 0,1 à 11ppm selon qu'il dérive des roches éruptives, métamorphiques ou sédimentaires (**Weissenhorn, 1994**).

Toxicité

Le cadmium occupe la septième position dans la liste des substances toxiques. Le cadmium n'est essentiel pour aucune fonction biologique et a une toxicité élevée pour l'homme (**Perronnet et al., 2000 ; ASTDR, 2012**). Il est assez mobile et facilement disponible, il risque soit de passer dans la chaîne alimentaire par l'intermédiaire des végétaux pour lesquelles il présente une forte phytodisponibilité, il peut s'accumuler dans les racines ou les parties aériennes (**Grant et al., 1998**), comme il peut migrer en profondeur pour aller contaminer les nappes phréatiques (**Jacobs and Foreman, 2005**).

I.5.2. Le cuivre :

Le cuivre est assez fréquemment retrouvé dans la nature, par exemple sous forme de chalcopryrite. Ses caractéristiques chimiques n'autorisent cependant pas l'existence de fortes concentrations dans les eaux naturelles. La composition moyenne de la croûte terrestre en Cuivre serait comprise entre 45 et 70 mg/kg selon (**Baize, 1997**).

Toxicité

Le cuivre est un élément essentiel aussi bien pour l'homme que pour la plante (**Welch, 1995**). Il semble poser plus de problèmes de carence chez les végétaux, le bétail et l'homme, que de toxicité. Les manifestations pathologiques chez les plantes, le cuivre peut provoquer une phytotoxicité dans certains cas. Il induit des symptômes de la chlorose ferrique et une diminution de l'absorption du fer et du phosphore (**Loué, 1986**). Il induit également une réduction de la photosynthèse et une réduction de la croissance des feuilles et des racines (**Pedersen et al., 2000 ; Mateos-Naranjo et al., 2008**) et diminue la nodulation des légumineuses même à faible concentration (**Kopittke et al., 2007**). Aussi, le cuivre s'accumule dans les racines (**Pedersen et al., 2000 ; Kopittke et al., 2009**). Pour cette raison, la concentration de Cu dans les plantes est très bien réglementée (**Peñarrubia et al., 2010**).

I.5.3. Le plomb :

Le plomb est présent dans la croûte terrestre et dans tous les compartiments de la biosphère. On le trouve principalement dans des minerais comme la galène (PbS). La concentration moyenne en plomb de la croûte terrestre serait de l'ordre de 13 à 16 mg/kg. D'après **Juste et al. 1995** de nombreux auteurs s'accorderaient pour affirmer que les sols non contaminés contiendraient 10 à 30 mg/kg, tandis que les sols situés loin des centres urbains et industriels mais affectés par des contaminations diffuses présenteraient des

concentrations comprises entre 30 et 100 mg/kg. Des concentrations supérieures à 110ppm de plomb traduiraient l'existence d'une source polluante à proximité.

Toxicité

Le plomb n'est ni essentiel ni bénéfique pour les êtres vivants. Chez les plantes, le plomb diminue la croissance des racines spécialement les racines principales même en présence de faibles concentrations. Elles deviennent épaisses, courtes et très ramifiées. Aussi, des précipitations de plomb on été observées dans les zones apicales chez les plantes traitées par le plomb (**Kopittke et al., 2007**).

II.1. Les PGPR :

Les PGPR ou «Plant Growth-Promotion Rhizobacteria » sont des bactéries qui se développent dans la rhizosphère, et qui ont un effet positif sur la plante, pour ces effet on les considère comme rhizobactéries promotrice de la croissance végétale (**Dey et al. 2004 ; Herman et al. 2008 ; Microrsky, 2008**). Ces bactéries sont utilisées en agriculture pour la biofertilisation des sols (**Glick, 2007**) en fixant l'azote atmosphérique qui pourra être par la suite utilisé par les plantes, améliorant leur croissance lorsque l'azote du sol est limitant.

La fixation biologique de l'azote, joue un rôle majeur dans le cycle de l'azote. Les bactéries fixatrices d'azote possèdent un complexe enzymatique, appelé nitrogénase, qui assure la réduction de l'azote moléculaire en ammoniacque (**Glick, 2007**). Ces bactéries présentent une très grande diversité dans leur mode de vie et leur association avec les végétaux. Elles peuvent induire la croissance des plantes par la promotion directe ou indirecte (**Verma et al. 2010**). Les bactéries PGPR peuvent avoir un impact positif sur les plantes de manière directe ou indirecte (**Figure 04**).

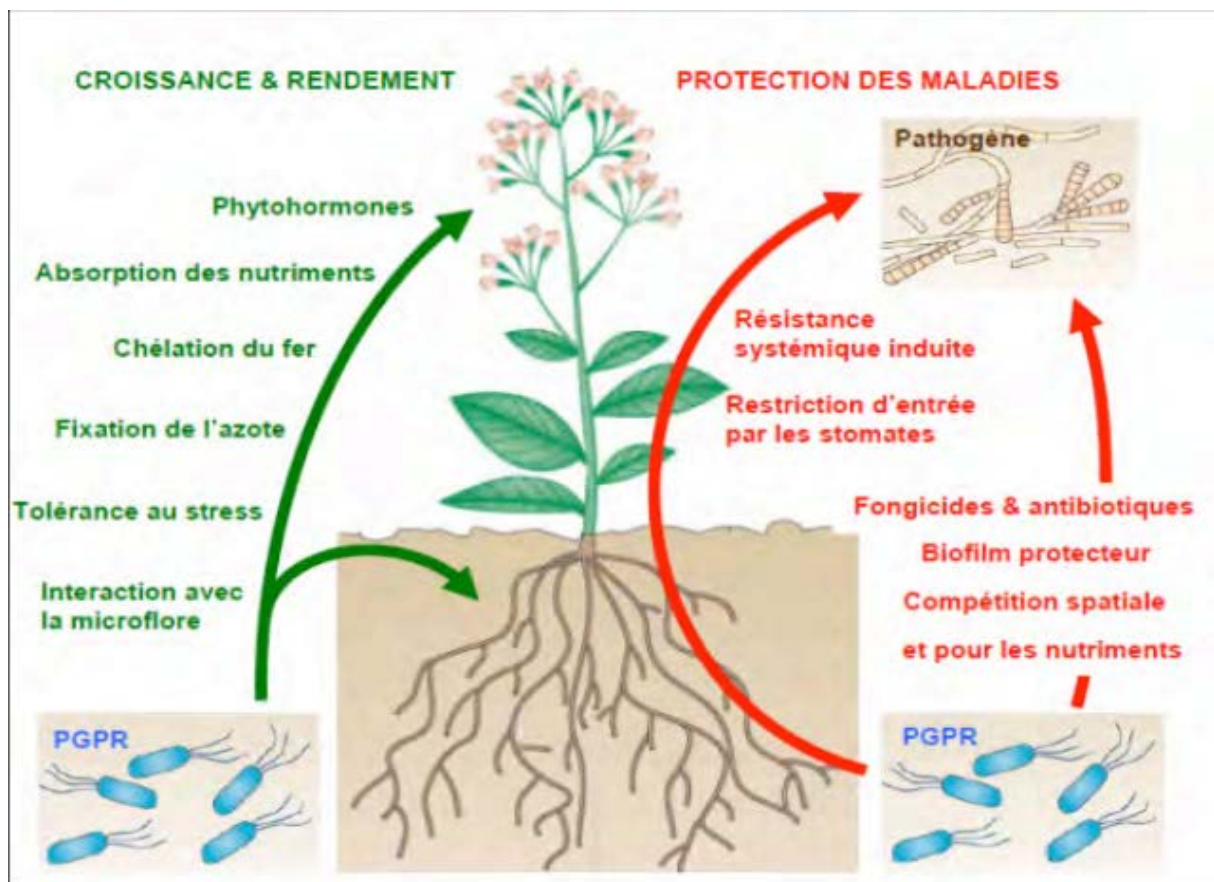


Figure 04: Les mécanismes d'action des rhizobactéries (**Ramos et al. 2009**).

II.2. Quelques bactéries PGPR :

II.2.1. Les bactéries du genre *Pseudomonas* :

Les *Pseudomonas* appartiennent au phylum des *Proteobacteria*, classe des *Gammaproteobacteria*, ordre des *Pseudomonales*. Ce sont des bacilles à Gram négatif, droits et fins, aux extrémités arrondies, d'une taille moyenne de 2 sur 0,5 μm (Palleroni, 1984). Ces bactéries sont mobiles grâce à une ciliature polaire monotriche, lophotriche ou multitriche, elles sont capables d'utiliser de nombreux substrats hydrocarbonés comme sources de carbone et d'énergie. Les *Pseudomonas* ont une capacité élevée à coloniser la rhizosphère ainsi que les racines des plantes, elles sont capables de former des associations intimes avec leurs hôtes (Hoft et de Vos, 2006), ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les microorganismes pathogènes et par conséquent, leur croissance (Reyes *et al.* 2004).

II.2.2. Les bactéries du genre *Azospirillum* :

Azospirillum est une bactérie mobile, à Gram négatif, appartenant à l'ordre des *Rhodospirillales*, associée avec les racines des monocotylédones, notamment des cultures importantes comme le blé, le maïs et le riz. Plusieurs souches d'*Azospirillum* ont montré des effets bénéfiques sur la croissance des plantes et sur le rendement des cultures, en serre ou dans des essais au champ, sous divers sols et diverses conditions climatiques, et sont donc qualifiées de PGPR. Elles peuvent établir une symbiose associative avec les céréales (Bashan *et al.* 2004).

II.2.3. Les bactéries du genre *Rhizobium* :

Les rhizobiums, ou rhizobia, sont des bactéries aérobies du sol appartenant à la famille des *Rhizobiaceae* (Sahgal et Johri, 2006). Ces bactéries sont capables d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec des plantes de la famille des légumineuses. Cette symbiose se traduit par la formation sur les racines de la plante hôte des nodules (nodosités). Les nodosités sont le lieu d'une activité symbiotique : la plante fournit les substances carbonées aux bactéries, et les bactéries fournissent à la plante les substances azotées synthétisées à partir de l'azote atmosphérique (Downie, 2005). Le processus de la fixation symbiotique d'azote aide la plante à survivre et à rivaliser efficacement sur les sols pauvres en azote.

II.2.4. Les bactéries du genre *Bacillus* :

Les *Bacillus* forment un genre de bactéries à gram positif, appartenant à la famille des bacillacées (*Bacillaceae*), l'ordre des bacillales (*Bacillales*), la classe des bacilles (*Bacilli*). Ces bactéries sont capables de produire des endospores leur permettant de résister à des conditions environnementales défavorables. C'est le genre le plus abondant dans la

rhizosphère, l'activité PGPR de certaines de ces souches a été connue depuis plusieurs années (**Probanza et al. 2002**). Elles sont potentiellement utiles comme agents de lutte biologique (**Nagórska et al. 2007**) et capables de solubiliser le phosphate, produire de l'AIA, séderophore et antifongique (**Charest et al. 2005**).

II.3. Effet des métaux lourds sur les microorganismes du sol :

Le sol est un compartiment de l'écosystème possédant de multiples fonctions comme : support pour les organismes et les microorganismes vivants, réservoir de matière organique et minérale, lieu de transformations, système épurateur, régulateur des flux et des échanges dans les cycles biogéochimiques (cycle de l'azote, du carbone...) (**Gobat et al. 1998**).

De nombreux organismes participent à la réalisation de ces fonctions. **Whitman et al. (1998)** ont estimé à $2,6 \times 10^{29}$ le nombre total de cellules procaryotes vivant dans les sols. Différents types de microorganismes y sont représentés où ils jouent un rôle crucial dans les cycles biogéochimiques des éléments. En moyenne, on compte 10^7 bactéries, 10^5 champignons, 10^5 protozoaires et 10^4 algues par gramme de sol sec (**Robert et Just, 1999**). L'importance écologique des bactéries du sol ne se limite pas à leur nombre ou à leur biomasse, même si ces paramètres y contribuent grandement. En effet, leur atout principal réside dans leur grande diversité génétique et fonctionnelle.

La diversité bactérienne dans le sol est en effet plus importante que celle des environnements aquatiques (**Torsvik et Ovreås, 2002**). Cette diversité est à l'origine d'un très large éventail de propriétés physiologiques mais aussi d'activités métaboliques et de fonctions que les bactéries peuvent accomplir dans le sol.

La diversité métabolique couplée à leur imposante biomasse font que les bactéries du sol sont capables de métaboliser tous les composés naturels disponibles mais aussi la majorité des composés d'origine anthropique présents dans le sol, après un délai nécessaire à la mise en place des voies métaboliques.

Les bactéries sont en effet les acteurs principaux des grands processus de transformation de la matière et des flux d'énergie dans le sol. Certaines étapes clé du cycle des éléments ne peuvent d'ailleurs être réalisées que par les bactéries. Leur disparition ne permet donc plus de garantir à long terme la fertilité du sol. C'est pourquoi, l'impact écologique des métaux lourds sur les communautés bactériennes telluriques a fait l'objet de très nombreuses études dans ces vingt dernières années. Il est généralement admis que les microorganismes sont plus sensibles aux métaux lourds que les plantes ou les animaux vivant dans les sols pollués (**Giller et al. 1998**).

Les impacts des métaux lourds sur les communautés microbiennes peuvent être abordés de diverses façons : la densité (colonie forming units, CFU), la taille, la structure des communautés (génétique et fonctionnelle) et également l'activité enzymatique.

II.3.1 Biomasse :

Les métaux lourds sont réputés pour leur toxicité sur la plupart des microorganismes telluriques. Leurs effets de dénaturation des protéines ou de destruction de l'intégrité de la membrane cellulaire affectent la croissance, la morphologie et le métabolisme de ces microorganismes telluriques (**Leita et al. 1995**). Ces altérations conduisent à des réductions de biomasse microbienne. De nombreuses études montrent que la biomasse bactérienne d'un sol a tendance à diminuer suite à une contamination par un métal (**Kandeler et al. 1996 ; Smit et al. 1997, Bååth et al. 1998 ; Konopka et al. 1999 ; Kuperman ; Kelly et al. 1999 ; Ekelund et al. 2003**). D'ailleurs, **Giller et al. (1998)** estiment que, même à long terme et pour des faibles teneurs en métaux lourds, les microorganismes ne sont pas capables de maintenir une biomasse équivalente à celle d'un sol non pollué.

II.3.2. Activité enzymatique :

D'autres propriétés biologiques largement étudiées dans les études d'impact concernent les activités enzymatiques, dont les activités respiratoires. L'effet néfaste des métaux lourds sur les activités enzymatiques du sol a souvent été souligné (**Renella et al. 2003 ; Kandeler et al. 1996 ; Kuperman et Carreio, 1997 ; Hattori, 1992**).

La sensibilité des activités vis-à-vis des métaux peut dépendre du type d'enzyme (**Renella et al., 2003**). Dans une étude portant sur l'impact de différents métaux sur 13 enzymes impliquées dans les cycles du carbone (C), de l'azote (N), du phosphore (P) et du soufre (S), **Kandeler et al., (1996)** ont montré que la réduction de leurs activités était plus ou moins sévère : celles impliquées dans le cycle du carbone étaient moins affectées que celles liées aux cycles du N, P, et S.

Les sols contaminés par les métaux lourds peuvent donc perdre certaines de leurs propriétés biochimiques indispensables au bon fonctionnement de l'écosystème. Par exemple, il a été montré que l'activité déshydrogénase était réduite lors d'une contamination par un métal. Cet effet, parfois sévère, peut aller jusqu'à une réduction de 95% de l'activité (**Kelly et al. 1999**).

Des milliers de sites contaminés sont répertoriés dans le monde. Afin de réhabiliter ces terrains dont certains présentent des risques pour l'environnement et la population environnante, diverses technologies sont offertes (**Bonnard, 2010**). Avant de choisir une technologie de réhabilitation, en effet, les caractéristiques du terrain et de la contamination influent sur l'efficacité des procédés disponibles. Par exemple, la nature du polluant permettra de préciser si ce dernier se volatilise facilement ou s'il se dissout facilement dans l'eau. Également, si le sol du terrain contaminé est principalement constitué d'argile, la technique de décontamination privilégiée sera différente que s'il s'agit plutôt d'un sable grossier. D'autres contraintes, tels la superficie du site, l'emplacement des installations ou encore le temps disponible pour les travaux, devront être considérées dans le choix de la technologie (**Vidali, 2011**).

En fonction des caractéristiques et des exigences particulières reliées à une situation de réhabilitation, la décontamination pourra être effectuée directement dans le sol du site de l'étude :

Ce chapitre récapitule les techniques employées pour décontaminer un sol pollué par les métaux lourds. Sur l'ensemble des méthodes décrites, on constate qu'un bon nombre d'entre elles se contentent de fixer les métaux (**Bonnard, 2010**)

III.1. Les techniques chimiques :

Anderson, (1995) définit l'extraction chimique comme étant un procédé d'extraction et de concentration des contaminants d'un milieu source à un milieu récepteur. Les agents de lixiviation peuvent être des acides, des bases, des surfactants, des solvants, des agents chélatants et des agents réducteurs. Le choix de l'agent de lixiviation est basé sur la nature des contaminants et la nature du lien entre les contaminants et le sol. Après le traitement chimique, le sol est rincé à l'eau pour enlever la contamination résiduelle. Le sol peut ensuite être valorisé, enfoui ou retourné sur le site. Les agents de lixiviation, quant à eux, peuvent être recyclés ou nettoyés par des étapes de précipitation et de clarification pour enlever les contaminants dissous ou en suspension. Des filtres au charbon activé peuvent être utilisés pour enlever les contaminants organiques (**Mulligan et al., 2001; wuana and Okieimen, 2011**).

III.2. Les traitements thermiques :

Parmi les traitements thermiques existants, on compte la vitrification, la pyrolyse et la thermolyse. Ces procédés ne sont toutefois pas encore assez développés pour que leur utilisation soit préférable à celle de la désorption thermique ou de l'incinération. Les traitements thermiques utilisent la chaleur pour dégrader les contaminants présents dans les sols contaminés (**Len et Gawel, 2001**).

III.3. Les traitements physiques :

Ils utilisent des fluides (eau, gaz), présents dans les sols ou injectés, comme vecteur pour transporter la pollution vers des points d'extraction ou pour l'immobiliser. La susceptibilité magnétique et les propriétés de surface des particules sont également exploitées pour réaliser la séparation (**Mulligan et al., 2001; Wuana and Okieimen, 2011**).

III.4. Les techniques biologiques :

Ce sont des techniques alternatives de réhabilitation à bas coût, respectueuses de l'environnement, protectrices de la santé humaine et préservatrices des caractéristiques du sol. Elles font l'objet de travaux de recherche et développement, l'intérêt de ces techniques réside essentiellement dans le fait qu'elles ne nécessitent ni excavation, ni transport, ce qui rend leur mise en œuvre bien moins coûteuse (**ADEME, 2006**). Il s'agit des biotechnologies qui exploitent les propriétés d'un organisme vivant pour réaliser l'opération de dépollution. L'organisme vivant peut être soit un végétal on parle de la phytoremédiation, soit un microorganisme on parle alors de la bioremédiation.

III.4.1 La bioremédiation :

C'est une des options les plus valables pour l'assainissement de sols contaminés par les composés organiques et inorganiques considérés comme nuisibles à la santé et l'environnement.

Le procédé de la bioremédiation consiste à exploiter la capacité naturelle que possèdent de nombreux organismes, la plupart des temps microscopiques (bactéries, micro algues, champignons), à dégrader les polluants en composés inertes, comme l'eau et le gaz carbonique (**Vidali, 2001**). Ces organismes peuvent être indigènes (déjà présents dans la zone polluée), ou exogènes (ajoutés au milieu), ou encore être prélevés sur le site contaminé, cultivés au laboratoire puis réintroduits dans le sol (**Mulligan and Yong, 2004**).

La bioremédiation se déroule généralement en condition d'aérobie, cependant l'application de systèmes de bioremédiation en condition d'anaérobie permet la dégradation d'un certain nombre de molécules récalcitrantes (**Charissou et Lejeune, 2009**).

La bioremédiation peut utiliser des plantes: on la nomme alors phytoremédiation, Cette technique est déjà utilisée pour éliminer les métaux contaminant les sols et l'eau de la nappe phréatique; on cherche à la développer dans la décontamination biologique d'autres polluants. L'utilisation combinée de plantes et de bactéries pourrait aussi être possible. Des bactéries vivent en étroite association avec les racines de certaines plantes et dépendent de substances excrétées par les racines. Ces rhizobactéries, qui dépassent en nombre les autres bactéries du sol, pourraient être génétiquement transformées de manière à dégrader des substances polluantes (**Vidali, 2001**).

Tableau 02 : Les principales technologies utilisées dans la bioremédiation

(El-Fantroussi et Agathos, 2005)

Technique	Procédé
La bioaugmentation	Cette technologie consiste à introduire des cultures de microorganismes à la surface du milieu contaminé. les microorganismes sont sélectionnés sur la base de leur aptitude à dégrader les composés organiques présents dans le site à dépolluer.
La biofiltration	consiste à l'utilisation d'un biofiltre pour traiter les émissions gazeuses : Le principe consiste à utiliser des microorganismes pour dégrader les polluants contenus dans l'air à traiter la phase aqueuse (l'air contaminé) est mise en contact avec une phase aqueuse dans laquelle se développe la population microbienne.
La biostimulation	Cette technologie consiste à stimuler l'activité des populations microbiennes indigènes (présentes dans le sol ou dans les eaux souterraines) par apport de nutriments et par ajustement des conditions du milieu (potentiel d'oxydo-réduction, humidité).
Le compostage	peut être défini comme un procédé biologique contrôlé qui assure la transformation et la valorisation des matières organiques (sous produits de la biomasse, déchets organiques d'origine biologique) en un produit stabilisé, hygiénique, semblable à un terreau riche en composés humiques le compost.
La biolixiviation	C'est la lixiviation favorisée par la voie biologique (généralement bactérienne). Elle correspond à une méthodologie de solubilisation des métaux lourds grâce à des bactéries acidophiles fonctionnant en présence ou en l'absence d'oxygène. Deux facteurs sont importants pour la biolixiviation : la température qui doit être comprise entre 25 et 35 °C. La taille des particules qui doivent être très proches de celle des bactéries.

III.4.1.1. Les microorganismes utilisés en bioremédiation :

Ils proviennent de milieux très variés et peuvent vivre dans des conditions extrêmes : des températures en dessous de 0°C ou au contraire, très élevées, dans des milieux inondés ou en plein désert, en présence d'un excès d'oxygène ou milieu anaérobie. En raison de leur pouvoir d'adaptation, ces microorganismes sont utilisés pour éliminer les composés xénobiotiques (**Salano et al., 2001, Soltani et al., 2001, Marchal et al., 2003**). Parmi les bactéries aérobies reconnues pour leur pouvoir de dégradation, nous pouvons citer celles appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas* et *Mycobacterium*. Elles peuvent dégrader les pesticides, les hydrocarbures, les alcanes et les composés polyaromatiques. Souvent, elles utilisent le polluant comme source de carbone et d'énergie. Les bactéries anaérobies sont moins fréquentes que les aérobies. Cependant, elles présentent un grand intérêt dans la bioremédiation des polyphényles polychlorés, du trichloroéthylène et le 1,2 dichloroéthane. Dans tous les cas, l'opération implique le contrôle non seulement de la disponibilité des dépollueurs mais aussi l'ajustement en permanence des conditions de leur efficacité: quantité et type de nutriments, concentration en oxygène, pH, température et salinité (**Salano et al., 2001, Soltani et al., 2001, Marchal et al., 2003**).

III.4.2 La phytoremédiation :

La phytoremédiation est un procédé technologique biologique qui utilise un processus végétal naturel pour améliorer la dégradation et l'élimination des contaminants dans le sol ou dans les eaux souterraines (**Kamath et al., 2004**). Dans la phytoremédiation on fait intervenir les plantes afin d'augmenter la décontamination, peu importe la stratégie utilisée.

Les plantes peuvent transporter le contaminant, les dégrader ou encore améliorent les conditions de vie d'autres dégradeurs. Cette technologie est surtout utilisée pour traiter les contaminations de la grande surface. En raison de l'utilisation de plantes, la contamination doit être de toxicité faible à modéré. L'augmentation de la biomasse des plantes poussant dans un sol contaminé est généralement moindre qu'en sol propre (**Gao et Zhu 2005**). Plusieurs mécanismes permettant aux plantes l'élimination des polluants. Les principaux mécanismes sont détaillés ci-dessous (**Figure 05 et Tableau 03**) (**Sxhwitzguél et al., 2011**).

Tableau 03: Les principales technologies utilisées dans la phytoremédiation
(Sxhwitzguél et al, 2011).

Technique	Procédé
la rhizofiltration	correspond à l'utilisation des racines pour absorber et accumuler les polluants (métaux) des eaux usées,
la phytoextraction	utilisation des plantes pour extraire du sol les polluants organiques et les métaux et les concentrer dans les organes de la plante destinés à la récolte
la phytostabilisation	utilisation des plantes pour limiter l'érosion et immobiliser les polluants dans les couches superficielles évitant en particulier leur migration vers les eaux de surface et souterraines,
la phytovolatilisation	utilisation des plantes pour extraire les polluants du sol et les transformer en composés volatils
la phytodégradation	utilisation de l'association plantes/microorganismes pour dégrader les polluants organiques du sol

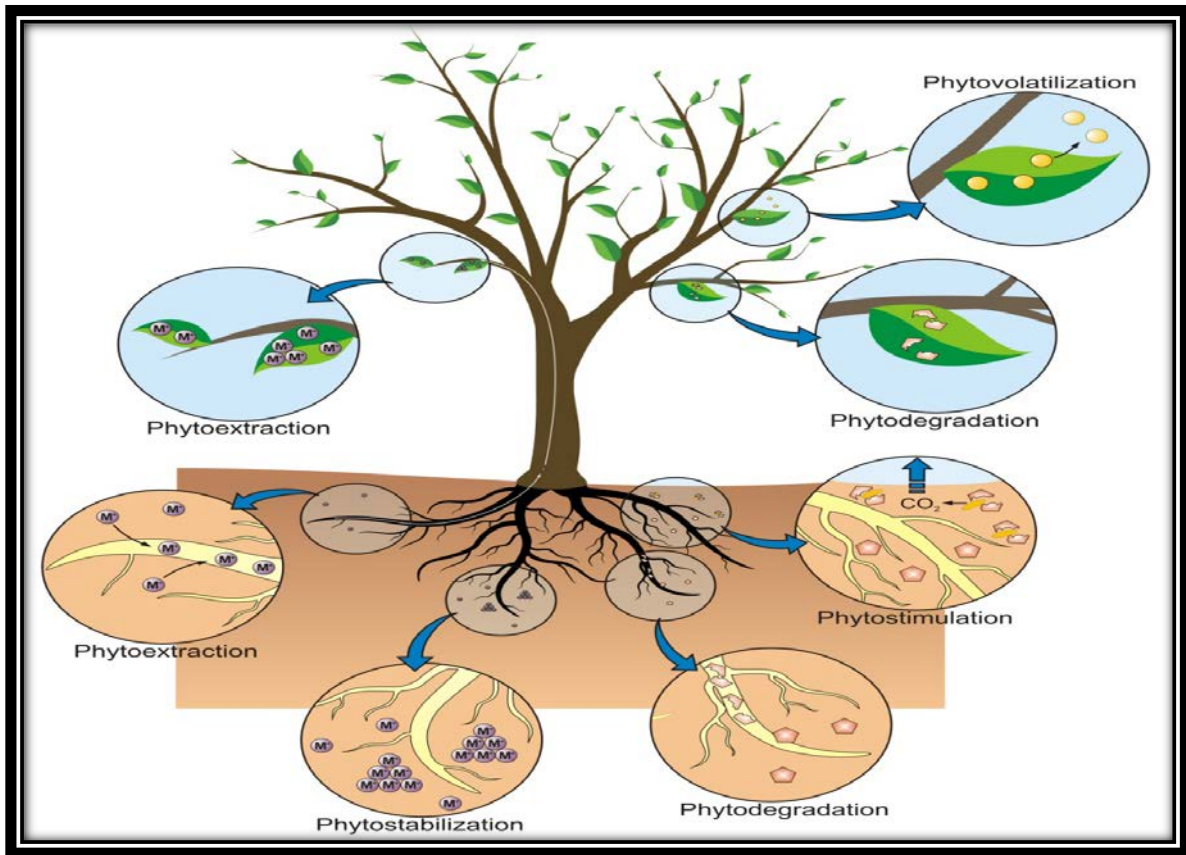


Figure 05 : représentation schématique des différentes stratégies de phytoremédiation

(Favas et al., 2014)

III.5. Mécanismes de résistance des bactéries aux métaux lourds :

A vue de la grande variété des métaux lourds et de leurs effets opposés, les microorganismes doivent contrôler de façon stricte la concentration intracellulaire en métaux lourds, réguler et maintenir l'homéostasie (Nies, 1999) et développer des stratégies de résistance contrebalançant l'effet des hautes concentrations en métaux. En effet, différents mécanismes cellulaires existent et sont mis en œuvre dans la résistance aux métaux. Ils sont résumés ci – après (Figure 6).

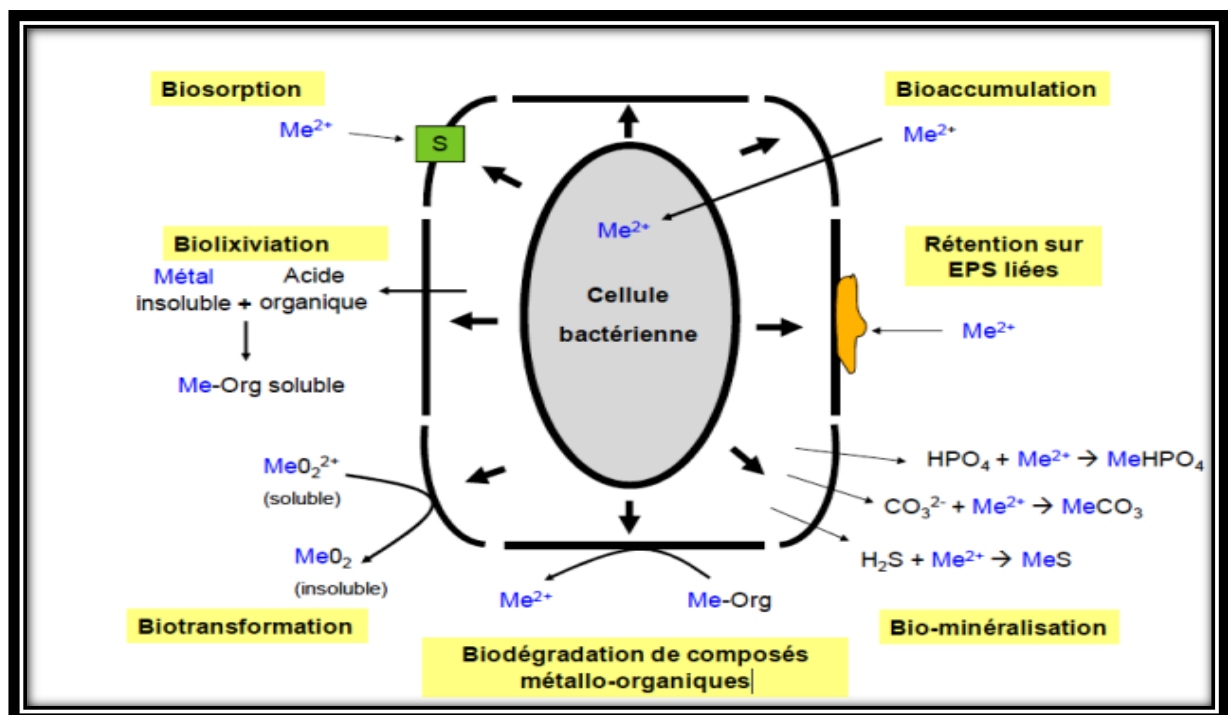


Figure 06 : Schématisation des interactions entre les métaux et les bactéries (extrait de la thèse de Desaunay, 2011).

IV.1. Le matériel biologique :

La capacité de tolérance des bactéries aux métaux lourds a été estimée par la culture de quatre souches microbiennes différentes obtenues auprès du laboratoire de recherche de microbiologie et biologie végétale de l'université de Mostaganem. Ces bactéries ont été isolées de la rhizosphère de certaines plantes cultivées dans des sols salins de la wilaya de Relizane.

IV.2. Estimation de la tolérance des bactéries aux métaux lourds:

IV.2.1. Préparation des milieux de culture à concentrations variables en métaux lourds :

Pour cette étude quatre métaux lourds différents ont été sélectionnés en état de sel : Cadmium, Cobalt, Cuivre et Plomb. Pour la préparation des concentrations variables (50 µg/ml ; 100 µg/ml et 200 µg/ml) ; des masses ont été mesurées 1,5 (mg), 3 (mg) et 6 (mg) successivement pour chaque métal (**Figure7**) en appliquant la formule $C_1V_1=C_2V_2$.

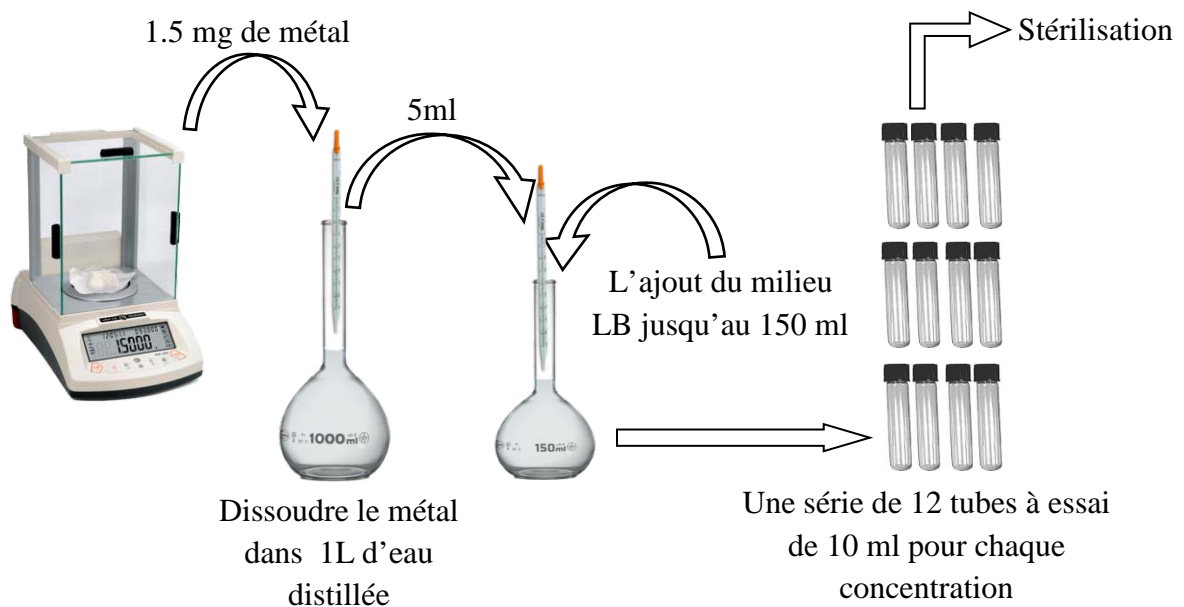


Figure 07 : Etapes de la Préparation du milieu de culture à différentes concentrations.

IV.2.2. Préparation de l'inoculum :

Des tubes à essai contenant 10 ml de milieu LB (annexe 1) ont été inoculés par quelques colonies bactériennes préalablement réactivées (culture jeune de 18h).

IV.2.3. Ensemencement et incubation :

10 ml de milieu de culture traités avec chaque métal à différentes concentrations, ont été inoculés avec 1 ml de l'inoculum. Les cultures bactériennes ont été incubées à 30 °C pendant 72h (3 jours).

Trois répétitions pour chaque concentration ont été effectuées.

La croissance bactérienne a été suivie par la mesure de la densité optique (DO) des cultures bactériennes à une longueur d'ondes de 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.



Figure 08 : Les étapes d'ensemencement des isolats

V.1.Effet de variation de la concentration du cadmium sur la croissance des bactéries à effet PGP :

Les résultats de l'effet de la variation de la concentration du cadmium dans le milieu de culture montrent une légère variation entre les différentes souches testées. C'est ainsi que la souche B a montré une croissance maximale supérieure à 0.8 en présence de 50 µg/ml de cadmium (**Figure 9**). Tandis que chez les différents autres isolats la croissance microbienne apparaît moins affectée par l'augmentation de la concentration du métal même en présence de 200µg/ml.

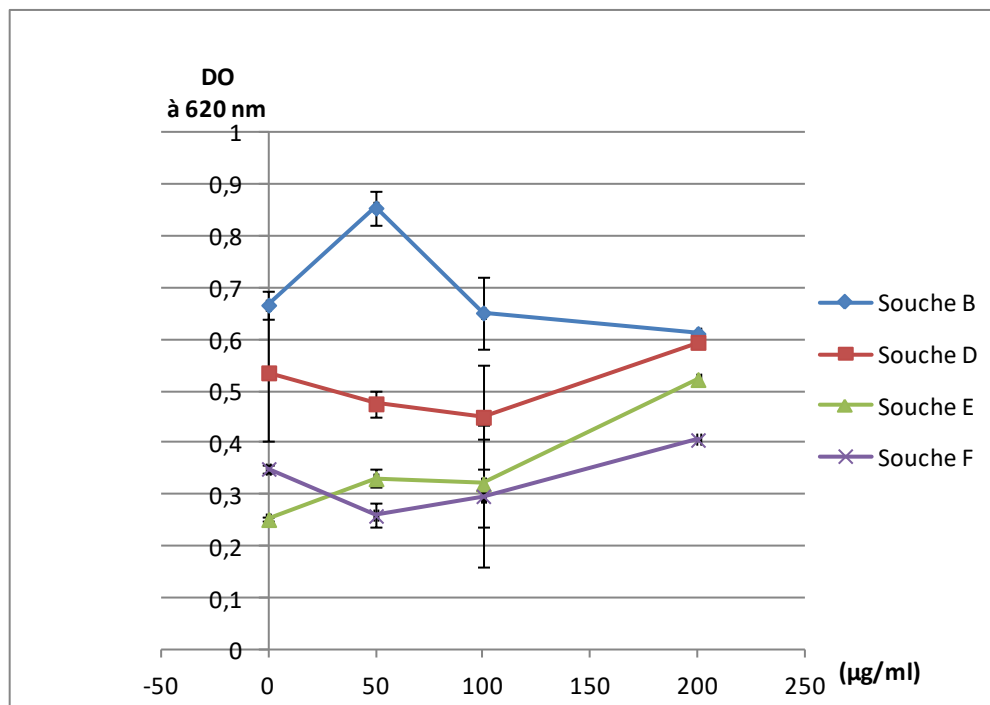


Figure 09: Effet de variation de la concentration du Cadmium sur la croissance des bactéries à effet PGP.

V.2. Effet de variation de la concentration du Cobalt sur la croissance des bactéries à effet PGP :

Pour le cobalt (**Figure10**); les quatre bactéries B, D, E et F ont montré une diminution de la biomasse microbienne notable à 50 µg/ml jusque 200µg/ml.

Bien qu'avec un effet significatif aussi sur la densité de culture finale après 72 h d'incubation, le Co a été l'élément le plus toxique, car il a pu nuire à la croissance bactérienne à des concentrations plus faibles.

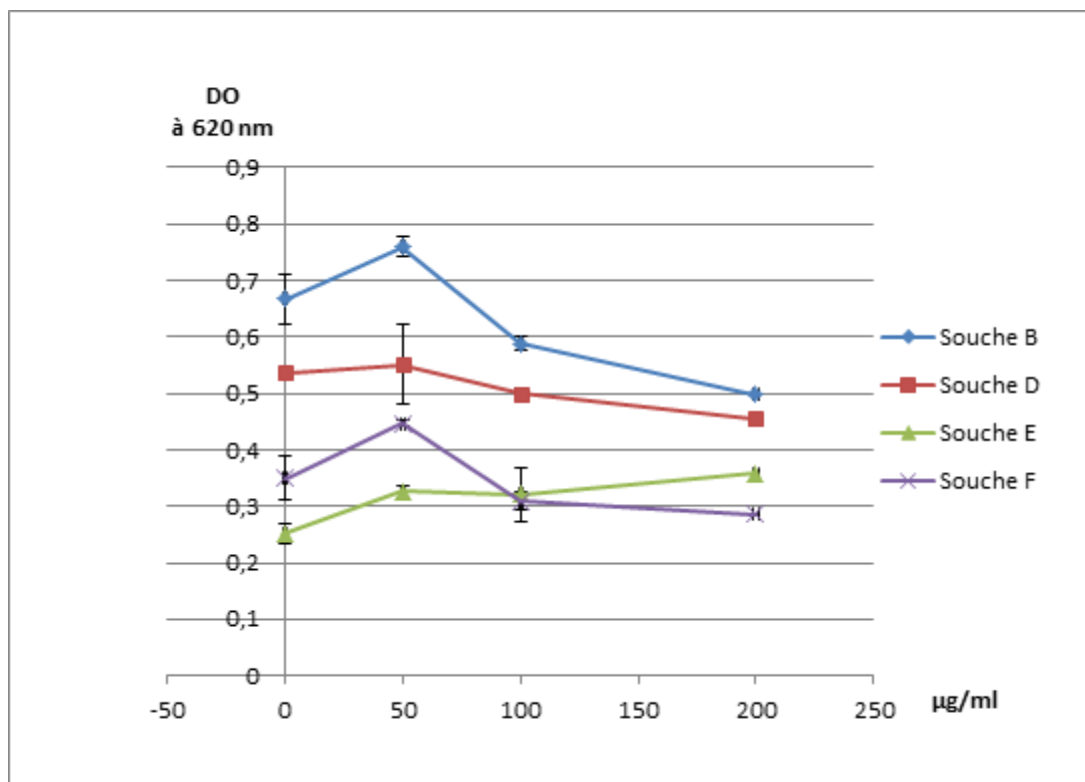


Figure10 : Effet de variation de la concentration du Cobalt sur la croissance des bactéries à effet PGP.

V.3. Effet de variation de la concentration du Plomb sur la croissance des bactéries à effet PGP :

La cinétique de croissance (**Figure11**), des souches D et F en milieu liquide contenant le Pb a été démontré. La croissance a été légère à 50µg/ml de Pb, puis diminue progressivement jusqu'à 200µg/ml.

Cependant, la croissance de la souche E a été capable de croître à 50et 100 µg/ml tandis que leur tolérance diminue à une concentration de 200µg/ml de Pb. La souche B, ne possède aucune activité microbienne.

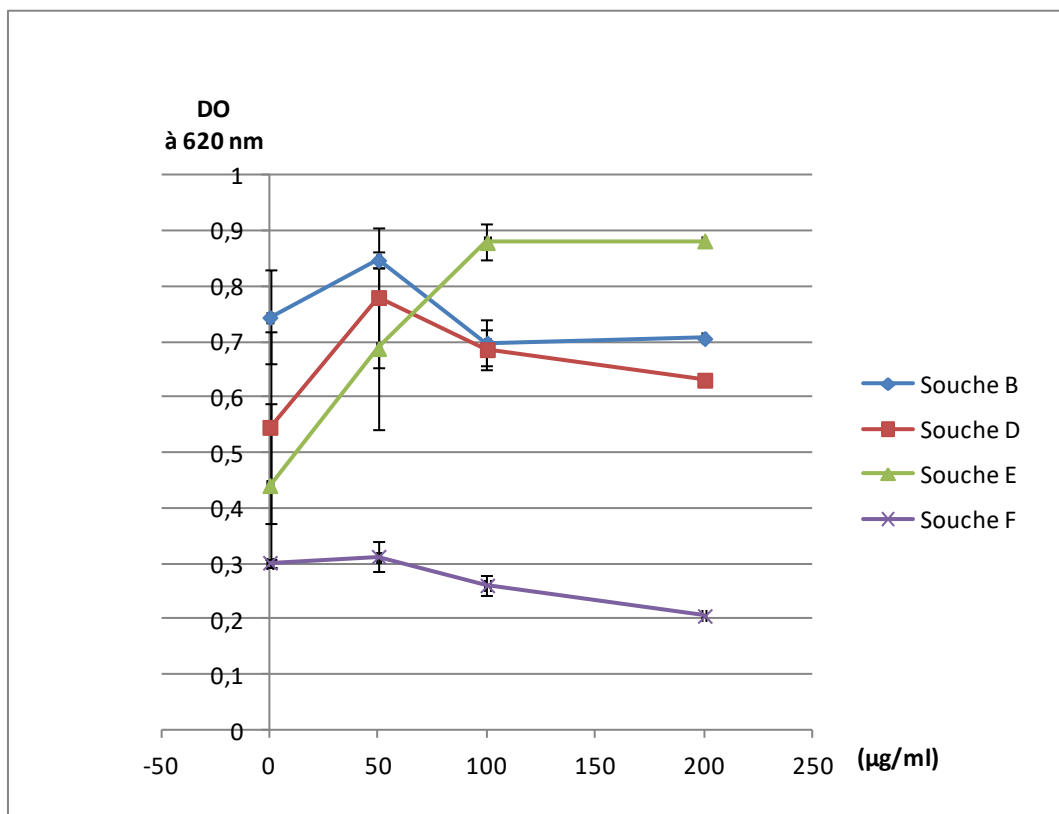


Figure 11: Effet de variation de la concentration du Plomb sur la croissance des bactéries à effet PGP.

V.4. Effet de variation de la concentration du Plomb sur la croissance des bactéries à effet PGP :

La croissance bactérienne des souches D et F a diminué à la concentration 50 $\mu\text{g/ml}$. Pour la souche E, elle ne présente aucune activité importante. La souche B est la seule qu'a montrée une notable croissance jusqu'à la concentration de 200 $\mu\text{g/ml}$.

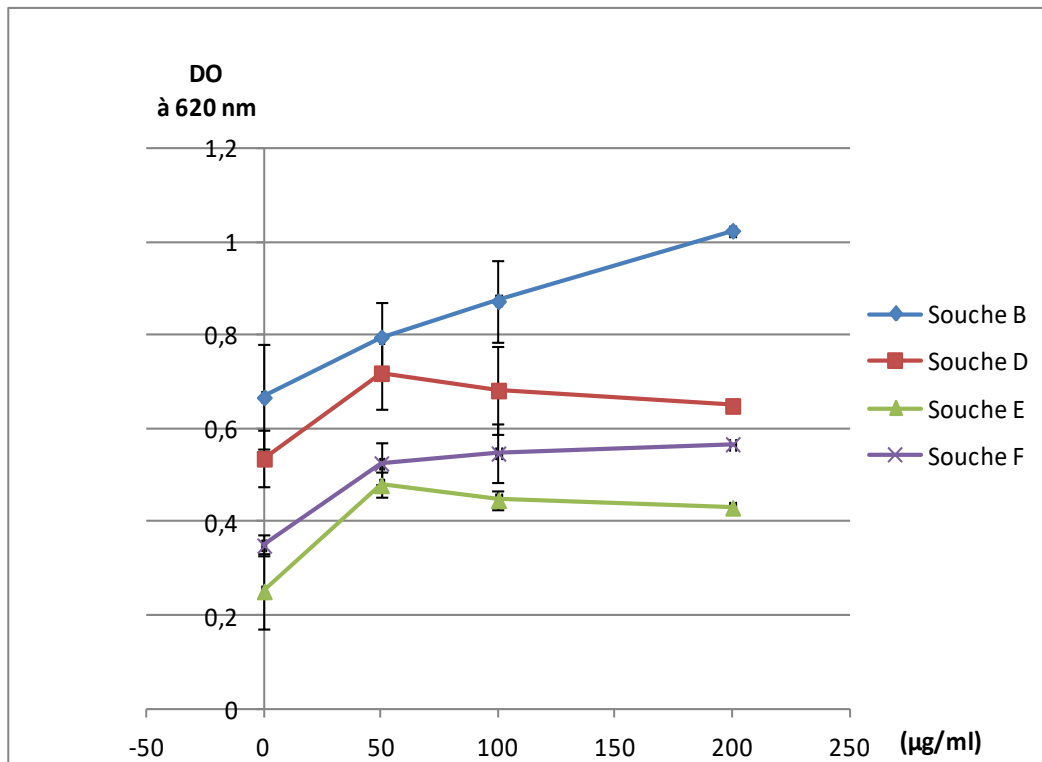


Figure 12: Effet de variation de la concentration du Cuivre sur la croissance des bactéries à effet PGP.

Discussion :

Les souches de PGPR ont une croissance bénéfique sur la promotion des plantes. La présence des métaux lourds dans le sol perturbent la population microbienne, en effet peu de microorganismes du sol sont résistants aux métaux lourds. De faibles concentrations de ces derniers sont bénéfiques pour la croissance des microorganismes, Mais une concentration plus élevée est nocive. La présente étude a montré que le métal lourd a la capacité de réduire la croissance ainsi que l'activité PGPR (**Deepthi et al., 2014**).

En absence de métal, la croissance des souches B, D, E et F est caractérisée par une activité bactérienne intéressante (témoin).

En présence de faible concentration de Cu, Pb et cd à (50µg/ml), la croissance ne semble pas être affectée et se caractérise par une DO finale qui diffère de celle obtenue pour le témoin, sauf deux souches (la souche E pour Pb et la souche B pour le Cu et le cd) qui possèdent une tolérance notable aux métaux lourds.

En présence de concentration (100µg/ml) de Cu et de Pb, la croissance des souches B, D et F pour le Pb et D, E, et F pour le Cu et le Cd est légèrement affectée par rapport à la concentration (50µg/ml). En effet, la croissance n'augmente pas et la souche s'adapte aux concentrations métalliques existantes dans le milieu de culture. Elle dépend de la nature et de la concentration du métal, ainsi que de l'état physiologique des cellules inoculées (**Deshwal and Kumar ,2013**)

Cependant, en présence de concentrations plus fortes en métaux dans le milieu de culture (200 µg/ml), la croissance est très affectée. Une densité optique finale de la culture est très affectée en présence de Cu, Pb, et de Cd. Par ailleurs, la cinétique de croissance des souches diminue en fonction de la concentration de métal présente dans le milieu de culture. Plus la concentration en métal augmente plus la vitesse maximale de croissance de la souche ralentit. **Zeroual (2006)** a obtenu des résultats similaires en étudiant la cinétique de croissance de plusieurs bactéries en présence de différents métaux. En outre, le niveau de résistance des souches était spécifique pour

chaque métal, on remarque que c'est le Co qui inhibe le plus la croissance de la bactérie suivi du Cd du Pb et du Cu. Ces trois éléments sont donc les éléments les plus toxiques, car ils ont été capables de nuire à la croissance bactérienne à de faibles concentrations (**Varghese et al., 2012**).

L'ordre de toxicité des métaux utilisés pour les souches est : $Co > Cd > Cu > Pb$. Par contre les résultats de **Zai'di (2006)**, qui a rapporté que le Cd suivi du Cu sont les métaux qui nuisent le plus aux bactéries. Le fait que les souches étaient encore capables de croître à de fortes concentrations en métaux $200\mu\text{g/ml}$ montre que cette bactérie a la capacité de survivre et de se multiplier en présence de fortes doses d'éléments toxiques. Ces résultats suggèrent que ces souches posséderaient un potentiel intéressant d'utilisation dans des essais appliqués d'inoculation dans des endroits extrêmement contaminés par les métaux lourds.

Conclusion et perspectives

Parmi les contaminants les plus répandus du sol, on retrouve les métaux lourds dont la toxicité varie en fonction de leur nature. Il est donc primordial de connaître la tolérance de certains microorganismes contre certains métaux lourds afin de mieux évaluer les impacts potentiels des contaminations sur ces microorganismes d'importance environnementale. L'objectif de ce travail a été d'étudier la tolérance de quatre souches de PGPR face à la présence des métaux. Une méthode de criblage en milieu liquide (LB) à différentes concentrations de métaux a été élaborée. Le dosage quantitatif de la viabilité des souches à été effectuée permettait une lecture spectrophotométrique directe de la viabilité des bactéries. , la tolérance est mesurée de manière semi-quantitative puisque le paramètre évalué est l'abondance de la croissance des souches ou l'absence de croissance.

Ces résultats ont démontré que certaines souches avaient une tolérance assez élevée contre les métaux lourds (grandes concentrations des MICs). Et d'autres souches avaient une sensibilité MICs (minimal inhibition concentration) aux Co, Cu et au Cd, mais globalement elle est plutôt résistante à la présence des métaux, ces derniers sont ceux ayant une toxicité aigue (Cd, Co, Cu et Pb).

Tout dépendant de la tolérance relative des organismes employés, il pourrait être bénéfique de sélectionner certaines souches ou encore de développer des souches plus tolérantes. Malgré les réponses apportées par les résultats décrits ci-haut, plusieurs questions demeurent toujours sans réponse et devraient faire l'objet de travaux futurs. Il serait intéressant de déterminer lequel des organismes impliqués est la plus tolérante aux métaux.

ADEME, (l'Agence De l'Environnement de la Maîtrise de l'Energie), 2006. Traitement biologique des sols pollués : recherche et innovation, Etude réalisée pour le compte de l'ADEME par l'ADIT – Société Nationale d'Intelligence Stratégique, Coordination technique : Frédérique CADIÈRE - Département Sites et Sols Pollués – Direction Déchets et Sols - ADEME (Angers). ADEME. www.ademe.fr Sites pollués et sols.

Akpor OB, Ohiobor GO & Olaolu TD, 2014. Heavy metal pollutants in wastewater effluents: Sources, effects and remediation. *Advances in Bioscience and Bioengineering*. 2(4): 37-43.

Ali H, Khan E & Sajad MA, 2013. Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. *Chemosphere*. 91: 869–881.

Anderson TA, Guthrie EA, Walton(1993). bioremediation in the Environmental Science & Technology 27 :2630-2636.

ASTDR, 2004. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Department of Health and Human Services Public Health Service U.S. Toxicological Profile for Copper. doi: <http://www.astdr.com> (2004).

Bååth, E., Díaz-Raviña, M., Frostegård, Å., Campbell, C.D. 1998. Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 238- 245.

Baize D, 1997. Teneurs en éléments traces métalliques dans les sols (France), INRA Editions, Paris,- ISSN : 1250-5218 – ISBN : 2-7380-0747-3, pages 408.

Ballerini D, Gatellier C & Vogel T, 1998. Techniques de traitement par voie biologique. Ademe Editions. Angers. 247p.

Bashan Y., Holguin G. And de-Bashan L. E (2004). Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can J Microbiol.* 50:521-577.

Bonnard M. (2010).relations (biodisponibilité-genotoxicité-écotoxicité) des hydrocarbures aromatiques polycycliques (hap) dans les sols de friches industrielles.Thèse de doctorat de l'université Paul Verlaine-Metz, 175p.

Bourellier PH and Berthelin J, 1998. Contamination des sols par les éléments traces: les risques et leur gestion, CR. . Rapport de l'Académie des sciences n°42, 440 p. Ed. Lavoisier, Paris.

Callahan DL, Baker AJM, Kolev SD & Wedd AG, 2006. Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *J. Biol. Inorg. Chem.* 11: 2-12.

Cambier P et Mench M, 1998. Contamination des sols par les métaux lourds. Sol interface fragile, Stengel P, Gelin S, coord. INRA. Eds. pp 161-172.

Charest. MH, Beauchamp. CJ, Antoun.H(2005). Effects of the humic substances of deinking paper sludge on the antagonism between two compost bacteria and *Pythium ultimum*. *FEMS Microbiology Ecology.*52: 219-227.

Charissou A-M., Lejeune PH (2009). Etat de l'art sur les potentialités des techniques de bioaugmentation dans le traitement des déchets, sédiments et sols pollués, 100p.

Cinnirella S, Hedgecock IM & Sprovieri F, 2014. Heavy metals in the environment: sources, interactions and human health. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21(6).

Coïc Y and Coppenet M, 1989. Les oligo-éléments en agriculture et en élevage. INRA Editions, Paris.

Deepthi, M.S, Reena. T, and Deepu, M.S 2014 In vitro study on the effect of heavy metals on PGPR microbes from two different soils and their growth efficiency on *Oryza sativa* (L.). *JBiopest* 7(1):64-72.

Delorme, T.A., Gagliardi, J.V., Angle, J.S., and Chaney, R.L. 2001 Influence of the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl. and the nonmetal accumulator *Trifolium pratense* L. on soil microbial populations. *Canadian Journal of Microbiology* 47: 773-776.

Desaunay A, 2011. Etude et modélisation de la biosorption des métaux par les bactéries. Application au transfert du cadmium et du zinc, seuls ou en mélange, par *Escherichia coli* et *Cupriavidus metallidurans* en colonnes de sable d'Hostun. Thèse de Doctorat. Université de Grenoble.

Deshwal, V.K. and Kumar, P. 2013. Production of Plant growth promoting substance by Pseudomonads. *J. Acad. Indus. Res.* 2(4): 221-225.

Dey R., Pal K.K., Bhatt D.M. and Chauhan S.M. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbio.Res.* 159: 371-394.

Downie, JA (2005) .Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Curr Biol.* 15: 6.

Dushenkov V, Kumar PBAN, Motto H & Raskin I, 1995. Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environmental Science and Technology.* Vol. 29, p. 1239-1245.

Ekalund, F., Olsson, S., and Johansen, A. 2003. Changes in the succession and diversity of protozoan and microbial populations in soil spiked with a range of copper concentrations. *Soil Biol. Biochem.,* 35, 1507-1516.

El Fantroussi S and Agathos SN, 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation ? *Current Opinion in Microbiology* 8: 268-275.

Fergusson JE, 1990. The heavy elements:chemistry, environmental impact and health effects, 1. Pergamon Press, Oxford, 614 pp.

Gadd, G.M. 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156: 609-643.

Gao Y Z., Zhu L.Z. (2005). Pyhtoremediation foe phenanthrene and pyrene contaminated soils, *journal of environemental sciences*, vol.17,No 1: 14-18.

Gaur N, Flora G, Yadav M & Tiwari A, 2014. A review with recent advancements on bioremediationbased abolition of heavy metals. *Environ Sci Process Impacts*, 16(2):180-93.

Giller, E., K., Witter, Ernst. and Mcgrath, P.S. (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils. *Soil. Biol. Biochem.* 30, 1389-1414.

Glick BR. (2007). Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Crit. Rev. Plant Sci.* 26 :227–242.

Gobat, J.M., Aragno, M., Matthey, W. (1998). Le sol vivant – Base de pédologie – Biologie des sols. Presses polytechniques et universitaires romandes. Collection gérer l'environnement, p 14.

Grant CA, Buckley WT, Bailey LD & Selles F, 1998. Cadmium accumulation in crops. Can. J. Plant Sci.78: 1–17.

Haguenoer JM and Furon D, 1981. Toxicologie et hygiène industrielle, Tome 1: Les dérivés minéraux, Techniques et documentation – Lavoisier, Paris.

Hattori, H. 1992. Influence of heavy metals on soil microbial activities. Soil Sci. Plant Nutr. 38, 93-100.

Herman MAB, Nault BA, Smart CD (2008). Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on bell pepper production and green peach aphid infestations in New York. Crop. Protect. 27: 996-1002.

Hoft.M et Vos.P (2006). Plant pathogenic Pseudomonas species. Dans Plant Association Bacteria PART 3. Springer, Pays-Bas. 507-533.

Hopkin, S.P. (1989). Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. Pollution monitoring series. Elsevier Applied sciences. London & New York.

Jacobs JA and Foreman C, 2005. Groundwater and Cadmium: Chemical Behavior and Treatment. Water Encyclopedia. 613–619.

Juste C, Chassin P, Gomez A, Linères M & Mocquot B, 1995. Les micro-polluants métalliques dans les boues résiduaires des stations d'épuration urbaines. Convention Ademe / I.N.R.A. (contrat INRA n° 22/92.039-contrat Ademe n° 2750007). P.

Kabata-Pendias A (2011). *Trace Elements in Soils and Plants, 4th ed.* CRC Press LCL, Boca Raton, Floride, USA, 505 p.

Kandeler, E., Kampichler, C., and Horak, O. 1996. Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. Soil Fertil. Of Soils 23, 299-309.

Kelly, J.J., Häggblom, M., Tate III R.L. 1999. Changes in soil microbial communities over time resulting from one time application of zinc: a laboratory microcosm study. Soil Biol. Biochem. 31, 1445-1465.

Khan MA, Ahmad I & Ur Rahman I, 2007. Effect of environmental pollution on heavy metals content of *Withania somnifera*. J. Chin. Chem. Soc. 54, 339–343.

Kamath R., Rentz J.A., Schnoor J.L., Alvarez P. J. J (2004). Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils: principles and application. In: R. Vazquez-Duhalt and R. Quintero-Ramirez (Eds). Petroleum Biotechnology, 1.

Konopka, A., Zakharova, T., Bischoff, M., Olivier, L., Nakatsu, C., Turco, R.F. 1999. Microbial biomass and activity in lead-contaminated soil. Appl. Environ. Microbiol. 65, 2256-2259.

Kopittke PM, Asher CJ, Blamey FP & Menzies NW, 2009. Toxic effects of Cu(2+) on growth, nutrition, root morphology, and distribution of Cu in roots of Sabi grass. Sci Total Environ. 407(16):4616-421.

Kopittke, PM, Dart PJ & Menzies NW, 2007a. Toxic effects of low concentrations of Cu on nodulation of cowpea (*Vigna unguiculata*). Environ. Pollut. 145: 309-315.

Kuperman, R.G., Carreiro, M.M. 1997. Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. Soil Biol. Biochem. 29, 179-190.

Leita, L., De Nobili, M., Muhlbachova, G., Mondini, C., Marchiol, L., and Zerbi, G. 1995. Bioavailability and effects of heavy metals on soil microbial biomass survival during laboratory incubation. Biol. Fertil. Soils. 19, 103-108.

Len J., Gawel Ph.D. (2001). A guide for remediation of salt-hydrocarbon impacted soil.

North Dakota Industrial Commission Department of Mineral Resources Bismarck, ND 58505 0840.

Loué, A. 1993. Oligo-éléments en agriculture. Ed. Nathan (ed), 45-177.

Mateos-Naranjo E, Redondo-Gómez S, Cambrollé J, Enrique Figueroa M, 2008. Growth and photosynthetic responses to copper stress of an invasive cordgrass, *Spartina densiflora*. Mar Environ Res. 66(4):459-465.

Minorsky PV 2008. On the inside. Plant. Physiol. 146: 323-324.

Mizra S, Gedamu L (1989). Heavy-metal tolerant transgenic *Brassica napus* L and *Nicotiana Tabacum* L plants. Theoretical And Applied Genetics 78 : 161-168.

Mulligan, C.N., Yong, R.N., and Gibbs, B.F. 2001 Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. Engineering Geology 60: 193-207.

Nagorska.K, Bikowski.M, Obuchowski.M (2007). Multicellular behavior and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. Acta Biochimica Polonica, 54: 495-508.

Nieboer, E. and Richardson, D.H.S. (1980) .The replacement of the nondescript term « heavy metal » by a biologically & chemically significant classification of metal ions. Environ. Pollut. 1B: 3-26.

Nies DH, 1999. Microbial heavy metal resistance. Appl. Microbiol. Biotechnol., 51, 730-750.

Opkin, S.P. 1989. Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. Pollution monitoring series. Elsevier Applied sciences. London & New York.

Palleroni, N.J (1984). Family 1. Pseudomonas. In Bergey`s manual of systematic bacteriology. Volume 1. Biol. Technol. 33: 193-203.

Pardo, F., Jordán, M., Sanfeliu, T., and Pina, S. 2011. Distribution of Cd, Ni, Cr, and Pb in amended soils from Alicante province (SE, Spain). Water, Air, and Soil Pollution 217: 535-543.

Pearson R. G. 1963. Acids and bases. Science, 191: 172-177.

Pedersen MB, Kjaer C & Elmegaard N,(2000). Toxicity and bioaccumulation of copper to black bindweed (*Fallopia convolvulus*) in relation to bioavailability and the age of soil contamination. Arch Environ Contam Toxicol. 39(4):431-439.

Peñarrubia L, Andrés-Colás N, Moreno J & Puig S, 2010. Regulation of copper transport in *Arabidopsis thaliana* : a biochemical oscillator, Journal of Biological Inorganic Chemistry, 15, 29–36.

Perronnet K, Schwartz C, Gerard E & Morel JL., 2000. Availability of cadmium and zinc accumulated in the leaves of *Thlaspi caerulescens* incorporated into soil, Plant and soil, 227:257-263.

Pilon-Smits E, 2005. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:15-39.

Probanza.A, Lucas Garcia.JA, et al (2002). Pinus pineal seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR Bacillus. *Applied Soil Ecology*, 20: 75-84.

Ramos-Solano B, Barriuso-Maicas J, Gutierrez-Mañero J 2009. Biotechnology of the Rhizosphere. In: Kirakosyan A, Kaufman PB (eds.) *Recent Advances in Plant Biotechnology*. 137, Springer Science & Business Media. pp. 137-162.

Renella, G., Mench, M., van der Lelie, D., Pietramellara, G., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Nannipieri, P. 2003. Hydrolase activity, microbial biomass and community structure in long-term Cd-contaminated soils. *Soil Biol. Biochem.* 36, 443-451.

Reyes. M.E.Q, Rohrbach.K.G and Paull. R.E (2004). Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. *Postharvest Biology and Technology* 33, 193–203 Books (Author and Editor).

Robert M. and Juste C, 1999. Enjeux environnementaux et industriels - Dynamique des éléments traces dans l'écosystème sol. In: *Spéciation des métaux dans le sol. Les Cahiers du Club Crin*, Paris, pp. 15-37.

Robert, M. and Juste, C. 1999. Dynamique des éléments traces de l'écosystème sol. In *Club CRIN Environnement et Ministère de l'environnement. Spéciation des métaux dans le sol.* Paris: CRIN.

Sahgal.M, Johri.B.N (2006). Taxonomy of Rhizobia: current status.*Current science* .90: 488.

Sayler GS and Ripp S, 2000. Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes. *Current Opinion in Biotechnology* 11: 286-289.

Schnoor, JL, 1997. Phytoremediation Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center (GWRTAC), Pittsburgh, PA, Technology Evaluation Report, E Series: TE-98-01.37p.

Schwitzguébel JP., Comino E., Plata N., Khalvati M. (2011). Is phytoremediation a sustainable and reliable approach to clean-up contaminated water and soil in Alpine areas?*Environ Sci Pollut Res* 18:842-852.

Singh, O. V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R., and Jain R. K. 2003. Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 405-412.

Smith, E., Leeflang, P., and Wernars, K. 1997. Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23, 249-261.

Soltani M (2004). Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de doctorat de l'université paris 6.284 p.

Torsvik, V., and Øvraås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 240-245.

Verma, J.P., J. Yadav and K.N. Tiwari, 2010. Application of *Rhizobium* sp. BHURC01 and plant growth promoting rhizobacteria on nodulation, plant biomass and yields of Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Agric. Res.*, 5: 148-156.

Vidali M. (2001).bioremediation.An overview. *Pure Appl. Chzm.*, vol.73, No. 7, pp. 1163-1172.

Weissenhorn I, 1994. Les Mycorhizes à arbuscules dans les sols pollués par les métaux lourds : Tolérance aux métaux et rôle dans leur transfert aux plantes. Thèse de Doctorat, Université Nancy I, France.

Welch RM, 1995. Micronutrient nutrition of plants. *Critical Reviews in Plant Science*, 14 : 49-82.

White, C., Sharman, A.K., Gadd, G.M. 1998. An integrated microbial process for the bioremediation of soil contaminated with toxic metals. *Nat. Biotechnol.* 16, 572-575.

Withman, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. 1998. Procaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6578-6583.

Wuana RA and Okieimen FE, 2011. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources.

Young RN, 1992. Principles of contaminant transport in soils, Elsevier, Netherland, 3-48.

Zaidi S, Usmani S, Singh BR & Musarrat J, 2006. Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. *Chemosphere* 64: 991-997.

Zeroual Y, 2006. Utilisation de bactéries et d'algues marines pour le traitement des eaux chargées en métaux lourds : études microbiologique, étude biochimique, et application biotechnologique. Thèse de doctorat nationale en sciences biologiques. Casablanca.