

République Algérienne Démocratique et Populaire

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



جامعة عبد الحميد بن باديس  
مستغانم  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

**M<sup>lle</sup> HAMMOU Iness Badra**

**M<sup>lle</sup> REZOUG Nadia**

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN BIOLOGIE**

**Spécialité: MICROBIOLOGIE APPLIQUEE**

THÈME

**Usage des sidérophores produits par  
*Pseudomonas* dans la bioremédiation des sols  
pollués par les métaux lourds**

DEVANT LE JURY

Président :	M. BEKADA Ahmed Mohmed Ali	Professeur	U. Mostaganem
Encadreur :	M. DJIBAOUI Rachid	Professeur	U. Mostaganem
Examineur :	M. BOUZNED Ahcene	MCB	U. Mostaganem
Co-Encadreur :	M <sup>lle</sup> Mazari Hibat Errahmen	Doctorante	U. Mascara

# Remerciement

*Avant tous, nous tenons à remercier **DIEU** de nous avoir orienté durant ce travail vers le bon chemin, nous donné la force, le courage, la santé, la puissance et la persistance à accomplir ce modeste travail, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.*

*Nous voudrions présenter tout particulièrement nos remerciements à **Mr. DJIBAOUI Rachid** Professeur à l'université de Mostaganem, pour avoir encadré ce travail, pour ces orientations et sa patience, ainsi que ses suggestions et ses conseils fournis à améliorer la qualité de ce mémoire.*

*Nous tenons à remercier très chaleureusement notre co-encadreur **M<sup>me</sup> MAZARI Hibat Errahmen**, pour son aide précieuse, ses conseils judicieux, ses critiques constructives, son temps et sa patience ainsi que son suivie tout au long de notre travail.*

*Nous n'oublions pas aussi d'exprimer nos remerciements à nos Parents, nos Frère, nos Famille, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury, qui ont bien voulu examiner ce travail et de l'enrichir par leurs propositions.*

*Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous les enseignants de notre cursus universitaire qui ont contribué à notre Formation.*

*En fin, nos remerciements vont à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*Iness & Nadia*

# Dédicace

*Je dédie ce modeste travail*

*A mes très chers parents, J'ai toujours attendu avec une grande impatience ce jour où de manière solennelle et devant l'ensemble de mes maîtres, condisciples et amis, je vous témoignerai toute la gratitude d'une fille qui s'est toujours vanté de vous avoir comme père et mère. Aucune dédicace n'est susceptible de vous exprimer la profondeur de mon amour, de mon estime et l'infinie reconnaissance pour tous les sacrifices consentis avec dévouement pour mon éducation et mes longues années d'études. Vous avez guetté mes pas et vous m'avez couvé de tendresse, vos prières et vos bénédictions m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Je serai votre dévouée pour tout le restant de mon existence et nulle déclaration ne m'allégerais de la lourde responsabilité dont je me sens investie à votre égard. Ce travail, et ce que je suis aujourd'hui sont le fruit de toutes les peines et tous les sacrifices que vous n'avez cessé de déployer. Que Dieu le tout puissant, vous comble de santé, de prospérité et vous accorde une longue vie afin que je puisse vous combler à mon tour...*

*A mon très cher frère Madjid, Aucun mot ne saurait exprimer mes sentiments les plus profonds envers toi. Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égale, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études.*

*A ma très chère sœur Imène, tes conseils m'ont suivi et m'ont permis d'atteindre le bout du bon chemin. Je t'assure que sans ton aide, tes conseils et tes encouragements ce travail n'aurait vu le jour. Que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance.*

*A ma très chère sœur Douâa, Ma merveille, t'es mon plus grand bonheur et ma plus grande fierté, que ce travail t'incite à faire mieux et aller plus loin. Tu peux toujours compter sur moi.*

*A mes chers(es) et bien aimé grands-parents, par leurs prières et leurs encouragements j'ai pu surmonter tous les obstacles ; A mes oncles et tantes ; A mes chers cousins et cousines.*

*A tous mes amis de la promotion master II microbiologie appliquée, et à Tous ceux qui ont connus, aimés appréciés, encouragés de près ou de loin pendant tous notre cursus.*

**HAMMOU INESS**

# *Dédicace*

*Je dédie ce mémoire*

*A mes chers parents, que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments, pour leur patience illimitée, leur encouragement contenu, leur aide, en témoignage de mon profond amour et respect pour leurs grands sacrifices*

*A mes frères, surtout Mohammed les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour, l'affection et le respect que je porte pour vous*

*A mes cousines surtout Karima, Hanane et Wissam je vous remercie, pour vos appuis, conseils et encouragements qui m'ont été d'un grand soutien au cours de ce long parcours, et pour tous les moments de joie et de plaisanteries qu'on a pu partager ensemble.*

*A mes amies Aïcha, Nabila, Amina et Mehdjouba pour leur encouragement et leur soutien contenu.*

*A la mémoire de mes grands-parents, J'aurais tant aimé que vous soyez présents. Que Dieu ait vos âmes dans sa sainte miséricorde.*

*REZOUG Nadia*

## المخلص :

إن مشكلة التربة الملوثة بالمعادن الثقيلة هي نتيجة لمخلفات الماضي وغالبا ما تكون بسبب حاضرات النشاط الصناعي، الذي لا يهتم بآليات صرف مخلفاته السامة في التربة، مما يجعل العديد من المجموعات البيئية ملوثة وخطيرة على صحة الكائنات الحية. وهناك عدة تكنولوجيات للتخلص من المعادن الثقيلة في التربة، بما في ذلك تلك التي تطرقنا إليها في هذا التحليل النظري عن المعالجة البيولوجية.

تمت دراسة مقاومة بكتيريا *Pseudomonas* للنحاس، الزنك، الكاديوم باستخدام ثلاث أوساط مختلفة TMM و LB و GN مع مراقبة مناطق التثبيط . و كانت تراكيز المعادن الثقيلة القصوى التي يتحملها *P. aeruginosa* هي (M1800 و 1600M و M 1400) بالنسبة إلى Cu، Zn و CD على التوالي. تعتبر السيدروفورات جزيئات مثيرة للاهتمام لتعبئة المعادن السامة من التربة، حيث أن آليات إنتاجها و نقل المركب السيدروفور- معدن هي الأكثر دراسة.

تم كشف وتقدير السيدروفورات باستخدام اختبار CAS. وقد أفرزت *Pseudomonas sp* 43.22% من السيدروفورات بينما أنتجت *P. putida* و *P. fluorescens* 87% و 83% وحدة من السيدروفورات في الوسط SM على التوالي. تمت مراقبة المعالجة البيولوجية للمعادن وتقييم المركب السيدروفور - معدن باستخدام الوسط CAS الذي يحتوي على أيونات معدنية مختلفة (1 mM من المعدن في 10 mM من حمض الهيدروكلوريك HCl). يشير التغيير في لون CAS أجار من الأزرق إلى البرتقالي إلى إستخلابه لهذه الأيونات المعدنية. امتصت *P. aeruginosa* أكثر من 90% من أيونات المعادن الثقيلة المضافة كما امتصت 90.16% من كلوريد الزنك، و تم تقييم فعالية السيدروفورات في إزالة أيونات المعادن الثقيلة من التربة باستخدام وسط succinate و جهاز الطيف للإمتصاص الذري، وقد انخفضت تراكيز المعادن الثقيلة بشكل كبير في العينات السائلة حيث قللت *P. fluorescens* 37% من  $Cu^{2+}$  و 32% من  $Zn^{2+}$  و 29% من  $Cd^{2+}$  ، وبالتالي كانت فعالة للغاية في هذه إزالة المعادن الثقيلة.

الكلمات المفتاحية: المعالجة الحيوية - المعادن الثقيلة - *Pseudomonas* - sidérophores - التربة

## **Résumé :**

Le problème des sols pollués par les métaux lourds est la conséquence d'un passé, et trop souvent encore d'un présent industriel, peu soucieux des rejets d'éléments toxiques dans les sols, rendant de nombreux sites potentiellement pollués et dangereux pour la santé publique et animale. Il existe plusieurs technologies de décontamination des sols contaminés par les métaux lourds, notamment celle qu'on a choisie dans cette analyse théorique : la bioremédiation.

La résistance des *Pseudomonas* au Cd, Zn et Cu, a été étudiée en utilisant trois milieux différents TMM, LB et GN solide par observation des zones d'inhibition. Les concentrations maximales tolérables de métaux lourds pour *P. aeruginosa* était de (1800 M, 1600 M et 1400 M) pour le Cu, Zn et Cd respectivement. Les sidérophores représentent des molécules intéressantes pour mobiliser les métaux toxiques dans les sols ou les mécanismes de production de sidérophores et de transport de complexes sidérophore-métaux sont les mieux connus. La détection et l'estimation de sidérophore a été étudiée en utilisant le test CAS. *Pseudomonas sp.* a excrété une quantité de 43,22 % de sidérophore, tandis que *P. fluorescens* et *P. putida* ont produit 87 et 83% unités de sidérophores respectivement dans le milieu SM. La bioremédiation des métaux et l'évaluation du complexe métal-sidérophore ont été suivies en utilisant la gélose CAS contenant divers ions métalliques (1mM de métal en 10mM HCl). Le changement de la couleur du CAS modifié du bleu à l'orange a indiqué la chélation de ces ions métalliques. *P. aeruginosa* a adsorbé plus de 90% des ions de métaux lourds ajoutés, et une absorption de 90,16 % de  $ZnCl_2$ , les sidérophores ont été évalués pour leur efficacité à éliminer les ions de métaux lourds de la matrice du sol en utilisant le milieu succinate ou l'estimation a été faite par un spectrophotomètre d'absorption atomique, les concentrations de métaux lourds ont été considérablement réduites dans un échantillon d'effluents où *P. fluorescens* a réduit 37% de  $Cu^{2+}$ , 32 % de  $Zn^{2+}$  et 29% de  $Cd^{2+}$  et s'est donc avéré très efficace pour éliminer ces métaux lourds.

**Mots-clés :** bioremédiation-métaux lourds-*Pseudomonas*-sidérophores-sols.

**Abstract:**

The issue of soils contaminated by heavy metals is the result of the past, and as well frequently still of an industrial present, small concerned around the release of toxic components within the soil, making many sites potentially contaminated and unsafe to public and animal health. There are several technologies for disinfecting of soils contaminated with heavy metals, including the one chosen in this theoretical analysis: bioremediation.

The resistance of *Pseudomonas* to Cd, Zn and Cu, was studied using three different media TMM, LB and nutrient agar (NA) by observing the zones of inhibition. The maximum tolerable heavy metal concentrations for *P. aeruginosa* were (1800 M, 1600 M and 1400 M) for Cu, Zn and Cd respectively. Siderophores represent interesting molecules for mobilizing toxic metals in soils where the mechanisms for the production of siderophores and the transport of siderophore-metal complexes are the best known. The detection and estimation of siderophore was studied using the CAS test. *Pseudomonas* sp. excreted 43.22% siderophore, while *P. fluorescens* and *P. putida* produced 87 and 83% siderophore units respectively in SM medium. Metal bioremediation and evaluation of the metal-siderophore complex were studied using CAS agar containing various metal ions (1mM metal in 10mM HCl). The change in color of the modified CAS from blue to orange indicated the chelating of these metal ions. *P. aeruginosa* adsorbed over 90% of the added heavy metal ions, and absorbing 90.16% of  $ZnCl_2$ , the siderophores were evaluated for their efficiency in removing heavy metal ions from the soil matrix using the succinate medium where the estimation was made by atomic absorption spectrophotometer, heavy metal concentrations were significantly reduced in an effluent sample where *P. fluorescens* reduced 37%  $Cu^{2+}$ , 32% of  $Zn^{2+}$  and 29% of  $Cd^{2+}$  and therefore proved to be very effective in removing these heavy metals.

**Keywords:** Bioremediation- heavy metals - *Pseudomonas*- siderophores- soils.

## Liste des abréviations :

**Ar** : Absorbance de référence

**As** : Absorbance de l'échantillon

**BGN** : Bacilles à Gram Négatifs

**CA** : Acide Citrique

**CAS** : Chrome Azurol Sulphonate

**CHAO** : *P. fluorescens* CHAO

**COD** : Carbone Organique Dissous

**DMPS** : Sulfonate de Dimécaptopropane

**DMSA** : Acide chélateur Méso-2,3-dimécaptosuccinique

**DOM** : Matière Organique Dissoute

**DPA** : D-pénicillamine

**DTPA** : Acide diéthylène triamine penta acétique

**EDDHA** : Acide Ethylenediamine-N,N'-bis(2-hydroxyphenylacetic)

**EDDS** : Acide Ethylène Diamine Disuccinique

**EDTA** : Acide Ethylène Diamine Tétracétique

**EGTA** : Acide Ethylene glycol-bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic

**FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O** : solution de chlorure ferrique

**GSH** : (Le glutathion;  $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl-glycine)

**GST** : Glutathion S-transférase

**HBED** : Acide N, N'-bis (2-hydroxybenzyl) éthylènediamine-N, N'-diacétique

**HCL** : Acide chlorhydrique

**HDTMA** : Bromure d'Ammonium Triméthyle Hexadécyle

**HEDTA** : Acide Hydroxyéthyl éthylènediaminetriacétique

**HEIDA** : Acide 2-hydroxyéthyliminodiacétique

**HPLC** : Chromatographie Liquide à Haute Performance

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène

**KD** : Kilo Dalton

**MGDA** : acide methyl glycine diacétique

**MSM** : Milieu Sel minéral

**MTs** : Méthallothionéines

**NTA** : Acide nitrilo-tri-acétique

**PCs** : Phytochélatines

**ppm** : Partie Par Million

**Psu** : Pourcentage d'unité de sidérophore

**Pvds** : Les pyoverdines

**RT** : Temps de Rétention

**SM** : Milieu Succinate

**Tiron** : Acide 4,-dihydroxy-1,3-benzène disulfonique

**TMM** : Milieu tris-minimal

**tr/min** : Tour par Minute

**UFC** : Unité formant colonie

## Sommaire

Résumé, ملخص

Abstract

Liste des abréviations

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

**Introduction**..... 1

### Analyse bibliographique

**I- La Bioremédiation des sols polluée par les métaux lourds**..... 3

1- Les métaux lourds..... 3

2- Classification des métaux lourds ..... 4

2-1 Les métaux essentiels ..... 4

2-2 Les métaux toxiques ..... 4

3- La Bioremédiation ..... 4

3- 1La Bioremédiation par les micro-organismes ..... 5

4- Les sidérophores ..... 5

**La problématique liée aux métaux lourds** ..... 7

II- Justification scientifique du choix des métaux lourds ..... 7

II-1 La toxicité des métaux lourds ..... 7

II-2 Exposition aux métaux lourds sur la santé humaine ..... 8

II-3 Impact des métaux lourds ..... 10

II-3-1 Impact sur l'être humain ..... 10

II-3-2 Impact sur les plantes et les animaux ..... 10

II-4 La biodisponibilité des métaux lourds dans le sol, les facteurs influençant cette

biodisponibilité ..... 11

III- Justification de choix des chélateurs microbiens .....	12
III-1 Les substances chélatrices naturelles .....	12
a- Les chélateurs externes .....	12
b- Les chélateurs internes .....	12
1- Les méthallothionéines (MTs).....	12
2- Les phytochélatines (PCs) .....	13
3- Le glutathion (GSH ; $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl-glycine).....	13
4- Les acides organiques .....	13
5- Les acides aminés .....	14
6- Les algues .....	14
III-2 Les inconvénients des chélateurs naturels .....	14
III-3 Les substances chélatrices chimiques .....	15
1- DMSA et surtout le DMPS .....	15
2- EDTA .....	15
3- Malate de magnésium .....	16
4- DTPA.....	16
5- DPA et DMSA.....	16
6- Desferrioxamine .....	17
7- Rac-2,3-dimercaptopropanol .....	17
8- EDDS et MGDA .....	17
III-4 Les inconvénients des chélateurs chimiques .....	18
IV- Les chélateurs naturels microbiens.....	19
IV-1 Les sidérophores bactériens.....	20
IV-2 Les types des sidérophores produits par Pseudomonas .....	20

IV-2 -1 Pyoverdine (pseudobactine) .....	20
IV-2 -2 Pyochéline .....	20
IV-2 -3 Pseudomonine (Isoxazolidone) .....	20
IV-2 -4 Quinolobactine .....	21
IV-2 -5 L'acide salicylique .....	21

### **Analyse expérimentales**

<b>1- Objectif du travail</b> .....	22
<b>2- Isolement des bactéries résistantes aux métaux lourds</b> .....	22
2-1 Échantillonnage du sol.....	22
2-2 Isolement des souches bactériennes.....	22
<b>3- Identification des isolats</b> .....	23
3-1 Caractérisations culturale et morphologique .....	23
3-2 Caractérisation physiologique et biochimique.....	23
3-2-1 Tests d'orientation.....	23
3-2-2 Identification par galeries API 20NE .....	23
<b>4- Résistance aux métaux lourds sur différents milieux</b> .....	24
<b>5- la production des sidérophores</b> .....	25
5-1 La détection et l'estimation du sidérophore.....	25
5-1-a Méthode qualitative .....	26
5-1-b Méthode quantitative.....	26
i-Méthode traditionnelle .....	26
ii-Méthode de microplaque modifiée .....	27
<b>6- Extraction et évaluation du complexe métal-sidérophore</b> .....	27
6-1 Évaluation du sidérophore dans la bioremédiation vis-à-vis des chélateurs	

chimiques .....	28
<b>7- Caractérisation des Sidérophores .....</b>	<b>28</b>
7-1 Caractérisation par des méthodes chimiques .....	28
7-2 Caractérisation par spectrophotométrie .....	29
7-3 Identification des types de Sidérophores par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) .....	29
<b>Résultats et Discussion.....</b>	<b>31</b>
<b>Conclusion et Perspectives .....</b>	<b>43</b>
<b>Références Bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	

## Liste des figures

<b>Figure N°1</b> : Observation microscopique des isolats après coloration de Gram (X1000) .....	<b>32</b>
<b>Figure N°2</b> : Résultat de l'oxydase .....	<b>32</b>
<b>Figure N°3</b> : Galerie d'identification API20NE, d'un <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	<b>34</b>
<b>Figure N°4</b> : Galerie d'identification API20NE, d'un <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	<b>34</b>
<b>Figure N°5</b> : Estimation de la production de sidérophore par la méthode des microplaques .....	<b>39</b>
<b>Figure N°6</b> : Effet du lavage séquentiel des sols contaminés par des métaux lourds par agents de lavage.....	<b>41</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau N°1</b> : Sources de certains des métaux lourds les plus toxiques.....	<b>09</b>
<b>Tableau N°2</b> : Paramètres biochimiques des isolats sur la galerie API 20 NE.....	<b>33</b>
<b>Tableau N°3</b> : Les résultats de la résistance de <i>P. aeruginosa</i> . ....	<b>34</b>
<b>Tableau N°4</b> : Les résultats de la résistance de <i>P. fluorescens</i> .....	<b>35</b>
<b>Tableau N°5</b> : Analyse comparative entre les méthodes traditionnelles et sur microplaques d'estimation des sidérophores .....	<b>39</b>

# ***Introduction***

### Introduction

Les sols constituent l'un des écosystèmes les plus complexes de la nature, et l'un des habitats les plus diversifiés sur terre: ils abritent des milliers d'organismes (**Anonyme, 2015**) Où un gramme de sol renferme jusqu' à  $10^{11}$  de bactéries (**Horner et al., 2003**). Cet écosystème à pouvoir tampon peut aussi autoréguler ça populations microbiennes par les différentes interactions, et faire face aux produit xénobiotiques, aux éléments toxiques et aux différentes formes de stress.

Dans un milieu comme le sol dans des conditions aérobies à pH neutre ou alcalin, le fer inorganique est extrêmement insoluble et sa concentration est moins qu'optimale pour la croissance bactérienne (**Schwyn et Neilands, 1987**). Cependant, les micro-organismes possèdent une stratégie pour obtenir cet élément rare.

Parmi ces microorganismes nous trouvons les espèces de *Pseudomonas* saprophytes qui forment un large groupe colonisant le sol (**Bossis et al., 2000**). Ces espèces sont parmi les bactéries qui sécrètent des sidérophores pour subvenir à leur besoins en fer très peu disponible dans les conditions physiologiques. Ces biomolécules de faibles poids moléculaires possèdent une haute affinité envers le Fe (III). Les sidérophores chargés de fer sont internalisés à travers la membrane externe et interne après fixation sur des récepteurs spécifiques.

D'autres métaux comme le cuivre peuvent être chélater par les sidérophores (**Castaneda et al., 2005**). Plusieurs travaux de recherches ont signalé aussi le rôle des siderophores dans la biorémediation des sols pollués par les métaux lourds (**Mench et Fargues, 1995 ; Dell et al., 2005 ; Schalk et al., 2011**). Cette capacité des sidérophores dépend principalement de leurs fonctionnalités ligand, par lesquelles les sidérophores peuvent avoir une forte affinité ou sélectivité pour un métal particulier autre que le Fer (Hernlem et al., 1999 ; Neubauer et al., 2000 ; Wichard et al., 2009 ; Rajkumar et al., 2010 ; Huo Y et al., 2019) ont tous affirmé l'utilisation des sidérophores dans la bioremediation de différends métaux lourds. Braud et al., (2009) ont signalé aussi que la pyochéline produite par *Pseudomonas aeruginosa* pourrait chélater une large gamme de métaux.

Le thème de recherche proposé dans cette présente étude est d'actualité auquel un grand nombre de chercheurs s'intéresse de plus en plus. Son objectif principale et de montrer les risques liés à cette pollution par les métaux lourds et de mettre en lumière par des travaux de recherche cités dans la littérature la résistance des *Pseudomonas* à ces métaux et de mettre en valeurs leurs sidérophores et leurs rôle dans la séquestration des métaux autre que le fer.

Pour atteindre cet objectif, nous avons suivi les étapes suivantes:

- Tout d'abord nous a étoffé le thème abordé par une recherche bibliographique. Dans un premier temps cette recherche est focalisée sur la bioremédiation des sols polluée par les métaux lourds. en deuxième lieu nous proposons des rappels succincts sur les problématiques liées aux métaux lourds.
- La partie pratique est consacrée aux principaux matériel et méthodes utilisés afin de concrétiser l'expérimentation réalisés par des chercheurs.
- Dans la conclusion, nous présentons les résultats jugés intéressants et les perspectives pour la poursuite des travaux de recherches liés à cette thématique.

*Analyse*  
*Bibliographique*

### I- La Bioremédiation des sols polluée par les métaux lourds :

#### 1- Les métaux lourds :

La définition de « métaux lourds », selon le dictionnaire d'Oxford la plus ancienne définition est écrite par Bjerrum, est fondée sur la densité de la forme élémentaire du métal, et il classe les « métaux lourds » comme des métaux dont la densité élémentaire est supérieure à  $7 \text{ g/cm}^3$ . Au fil du temps, cette définition a été modifiée par différents auteurs, et sans uniformité (**Duffus, 2002**).

À un moment donné dans l'histoire du terme, toutes les anciennes définitions ont été rejetées, car elles n'ont pas judicieusement filtré les métaux essentiels des métaux toxiques.

Et donc de façon générale, les métaux lourds peuvent être définis en fonction des propriétés physiques, de la réactivité chimique et de la toxicité pour les organismes vivants (**Das et Osborne, 2018 ; Ashita et al., 2016**).

- Sur la base des propriétés physiques, les métaux lourds ont la capacité de conduire la chaleur et d'avoir une résistance électrique directement proportionnelle à la température, la malléabilité et la ductilité et même le lustre (**Appenroth, 2010**).
- Sur la base de la réactivité chimique, certaines autres définitions étaient basées sur la réactivité des métaux. Les métaux qui sont très réactifs sont étiquetés comme étant « lourds ». A fait remarquer que certains métaux peuvent avoir une faible toxicité à l'état élémentaire, mais peuvent s'avérer très toxiques sous forme de composés. Les métaux qui réagissent avec les biomolécules et forment des ligands avec le soufre et les composés contenant de l'azote sont considérés comme toxiques. Sur la base de la réactivité, nous pouvons enrôler des espèces de métaux très réactifs comme des métaux lourds toxiques (**Ashita et al., 2016**).
- En fonction de la toxicité vis à vis les organismes vivants, un bon nombre des métaux énumérés dans la série de métaux à haute densité ne sont toxiques pour l'humanité qu'au-delà d'une certaine concentration ou après une exposition prolongée (**Ashita et al., 2016**). Plusieurs métaux lourds, comme le cuivre, le zinc et le fer, sont essentiels au fonctionnement physiologique des organismes vivants mais ils deviennent tous toxiques à des concentrations élevées (**Ravindra et al., 2018**). Ils ont une propriété semi- ou non-dégradable chimiquement ou biologiquement et peuvent s'accumuler dans la chaîne

alimentaire, causant un danger pour l'homme. Outre leur toxicité, ils jouent un rôle central dans les activités domestiques et industrielles (**Hosam El-Din et Refaat, 2018**).

### 2- Classification des métaux lourds :

On distingue deux types des métaux lourds en fonction de leurs effets physiologiques et toxiques : métaux essentiels et métaux toxiques (**Belabed, 2018**).

#### 2-1 Les métaux essentiels :

Les métaux essentiels 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 (**Hosam El-Din et Refaat, 2018**). Certains peuvent devenir toxiques lorsque la concentration dépasse un certain seuil (**Belabed, 2018**).

#### 2-2 Les métaux toxiques :

Les métaux toxiques ou les éléments traces non essentiels. Certains métaux ne participent à aucun processus vital ou physiologique et sont connus seulement pour leurs effets purement toxiques sur l'organisme, ont un caractère polluant avec des effets toxiques pour les organismes vivants même à faible concentration (**Belabed, 2018 ; Hosam El-Din et Refaat, 2018**). Les métaux précieux et les radionucléides (**Jobby et Desai, 2017**), peuvent présenter une grave menace pour la santé humaine et animale en raison de l'intensification de ses persistances dans l'environnement (**Das et Osborne, 2018**).

Ces métaux lourds ne sont pas biodégradables et peuvent persister dans les sols pendant des années. Ces caractères obligent la société humaine à mettre en place des moyens pour dépolluer les sols (Bioremédiation) (**Alaboudi et al., 2016**).

### 3- La Bioremédiation:

Le terme de Bioremédiation est composé de deux parties: «bios» signifie la vie et se réfère aux organismes vivants et «remédier» signifie résoudre un problème. «Bioremédier » signifie utiliser des organismes biologiques pour résoudre un problème environnemental tel que le sol ou les eaux souterraines contaminés (**Sardrood, 2013**), à l'aide d'agents biologiques comme les bactéries, les champignons, les algues et les plantes (**Kumar et Gunasundari, 2018**).

### 3-1 La Bioremédiation par les micro-organismes :

IL s'agit d'utiliser des microorganismes (majoritairement des bactéries) pour modifier la forme chimique des polluants afin de les extraire du sol ou les immobiliser. Ils sont impliqués dans les cycles biogéochimiques des métaux par une variété de processus biochimiques qui influencent la spéciation et la mobilité des métaux (**Redon, 2009**).

Les bactéries font partie des organismes vivants qui utilisent généralement pour traiter les contaminants de métaux lourds. Les bactéries ont la capacité de résister et de réduire les métaux lourds à certaines concentrations. Cette capacité se compose de plusieurs processus tels que l'adsorption, l'absorption, l'accumulation et transformation à l'intérieur de sa cellule (**Purwanti et al., 2017**).

La présence des métaux toxiques induisent la production de certains siderophores par les bactéries suggère que ces chélateurs peuvent jouer un rôle dans l'absorption, la mobilisation des métaux lourds ou le développement de la résistance des métaux (**Gaonkar et Bhosle, 2013**). C'est le cas des *Pseudomonas* fluorescents sont très fréquentes et joue des rôles clés dans les sols en tant qu'agent de biocontrôle mais aussi dans la stimulation de la croissance végétale ainsi que dans la bioremédiation (**Ferret, 2012**).

#### 4- Les sidérophores :

Le mot sidérophore, issu du grec, signifie sidêros : fer et phore : porteur (**Mezaache, 2012**) sont des composés chélatants du fer de faible poids moléculaire (< 10 KD) synthétisés par de nombreuses bactéries *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Azospirillum* et *Rhizobium*, en grande quantité dans des conditions d'aérobiose et de carence en fer (**Syed et Vidhale, 2013**). Ils peuvent être aussi synthétisés par les champignons et les plantes (monocotylédones) (**Ferret, 2012**).

Les siderophores sont riche en hétéro-atomes oxygénés et azotés susceptibles d'entrer en interaction avec les ions métalliques (**Meliani, 2012**). Et forme un complexe avec le fer libre et le transporte dans la cellule par les molécules réceptrices de la membrane, ces molécules sont encodées par cinq gènes dans l'opéron qui est éteint lorsque suffisamment de fer a été pris dans la cellule. Certaines bactéries produisent un ou plusieurs siderophores qui peuvent être utilisés par d'autres microorganismes pour l'acquisition de fer et d'autres métaux. Cette propriété de siderophore a augmenté leur application, aussi les siderophore ont été liés aux mécanismes de

virulence dans les microorganismes pathogènes pour les animaux et les plantes. De plus, ils ont des applications dans les domaines cliniques, agricole et environnemental (**Syed et Vidhale, 2013**).

La constante d'affinité du complexe Fe-sidérophores est de l'ordre de  $10^{23}$  à  $10^{52}$   $M^{-1}$  selon la nature chimique des sidérophores. Cette affinité est bien plus importante que celle déterminée pour l'EDTA ( $10^{20}$   $M^{-1}$ ) ou les acides organiques de faible poids moléculaire tel que l'acide oxalique ( $10^{7,5}$   $M^{-1}$ ) (**Hazotte, 2016**).

Les sidérophores peuvent être libérés par les bactéries dans l'environnement tel que la rhizosphère où les concentrations peuvent atteindre  $10^{-7}$  à  $10^{-8}$  M. De même, dans les solutions de sol, les concentrations sont non négligeables, variant de  $10^{-6}$  M à  $10^{-3}$  M par litre. Néanmoins, Dans l'environnement, la production de sidérophores par les bactéries, notamment les *Pseudomonas* fluorescents, très présents dans les sols (**Ferret, 2012**), est fortement influencée par une grande variété de facteurs, tels que la concentration et la spéciation du fer, la nature et la concentration en source de carbone et d'azote, les teneurs en phosphate, le taux d'aération, la température, le pH, la lumière ainsi que la présence d'éléments traces comme le magnésium, le zinc ou le molybdate et d'autres métaux jouent un rôle important (**Gaonkar et Bhosle, 2013; Ferret, 2012**).

### **La problématique liée aux métaux lourds :**

La contamination des écosystèmes naturels par les métaux lourds en raison des différentes activités naturelles ou anthropiques est devenue aujourd'hui une des préoccupations et des problèmes écologiques majeurs, en raison de leur toxicité, abondance en croûte terrestre, biodisponibilité et de leur nature non-biodégradable, ainsi, ils peuvent persister pendant de longues périodes, leur présence dans le sol même sous forme de traces, peut causer de graves problèmes à tous les organismes.

Il s'est avéré que les processus physico-chimiques de la remédiation étaient trop coûteux, écologiquement non compatible et complexes pouvant causer la destruction des caractéristiques des sols. Actuellement, l'alternative semble être la bioremédiation présentant des avantages certains concernant la rentabilité, le respect de l'environnement, la simplicité technologique et un coût économique réduit. Cette technologie qui fait appel à des processus biologiques naturels utilisant des plantes, des champignons, des microorganismes, ou leurs métabolites pour détoxifier l'environnement contaminé.

En relation avec cette problématique, ce travail mettait en lumière les risques liés à cette pollution métallique du sol jusqu'au dérèglement de la chaîne alimentaire en proposant des processus biologiques pour finalité de diminuer la biodisponibilité de ces polluants tout en évitant une contamination secondaire.

### **II- Justification scientifique du choix des métaux lourds :**

Quelle que soit l'origine des métaux présents dans le sol, des niveaux excessifs de nombreux métaux peuvent entraîner la privation de la qualité du sol, du rendement des cultures et des produits agricoles et peuvent être très dangereux pour la santé des humains, des animaux et des écosystèmes (Das et Osborne, 2018).

#### **II-1 La toxicité des métaux lourds :**

La toxicité d'un métal dépend du métal lui-même, de sa concentration totale, de la disponibilité du métal pour l'organisme et de l'organisme lui-même. Selon l'organisme et le métal, différents modes d'action sont reconnus : liaison aux macromolécules (protéines, ADN, ARN), perturbation des fonctions enzymatiques, catalyse de la formation radicale, etc. (Ravindra *et al.*, 2018).

Certaines métaux lourds ont des effets toxiques pour les organismes vivants même à faible concentration l'arsenic (As), le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le cuivre (Cu), le plomb (Pb), le mercure (Hg), le nickel (Ni), le sélénium (Se), l'argent (Ag) et le zinc (Zn) (**Das et Osborne, 2018**). Les métaux précieux (tels que Pd, Pt, Ag, Au, Ru, etc.) et les radionucléides (Tels que U, Th, Ra, Am, etc.) (**Jobby et Desai, 2017**), peuvent présenter une grave menace pour la santé humaine et animale en raison de l'intensification de sa persistance dans l'environnement (**Das et Osborne, 2018**).

La directive européenne 99/45/CE 1999 a défini dans son article les catégories de danger des substances. Celles s'appliquant à la toxicité des métaux lourds :

- **Irritantes** : si, n'étant pas corrosives, par contact immédiat, prolongé ou répété avec la peau ou les muqueuses, elles peuvent provoquer une réaction inflammatoire.
- **Nocives** : si, par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée, elles peuvent entraîner la mort ou nuire à la santé de manière aiguë ou chronique.
- **Mutagènes** : si, par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée, elles peuvent entraîner des défauts génétiques héréditaires ou en augmenter la fréquence (**Das et Osborne, 2018**).
- **Cancérogènes** : si, par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée, elles peuvent induire le cancer ou en augmenter la fréquence.
- **Toxiques pour la reproduction** : si, par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée, elles peuvent produire ou augmenter la fréquence d'effets nocifs non héréditaires dans la progéniture (substances tératogènes) ou porter atteinte aux fonctions ou capacités reproductives mâles ou femelles.
- **Très toxiques** : si, par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée en très petites quantités, elles entraînent la mort ou nuisent à la santé de manière aiguë ou chronique (**Sirven, 2006**).

### II-2 Exposition aux métaux lourds sur la santé humaine:

Les métaux lourds sont présents dans de nombreux aspects de la vie moderne, nombreux d'entre eux sont utilisés dans les produits ménagers courants, comme les poêles antiadhésives, les céramiques émaillées, les pesticides, les savons, les jouets en plastique, le fard à paupières et le rouge à lèvres. D'autres sont utilisés dans de nombreuses industries, par exemple dans les voitures, les plastiques, les antiseptiques, les ustensiles, les peintures, les batteries, les panneaux solaires, les

## Analyse bibliographique

---

téléphones mobiles et les accélérateurs de particules, la production de produits chimiques, les dispositifs antipollution, les fours autonettoyants, les sècheurs, certains d'autres sont utilisés comme catalyseurs dans le traitement des combustibles (**Badr et El-Habit, 2018**).

**Tableau 01** : Sources de certains des métaux lourds les plus toxiques (**Jobby et Desai, 2017**).

Métal	Industrie
Chrome (Cr)	Extraction minière, réfrigérants industriels, fabrication de sels Cr, tannage du cuir, ruissellement routier.
Plomb (Pb)	Extraction minière, fusion, batteries au plomb-acide, peintures, déchets électroniques, céramique, industrie des bracelets, ruissellement routier.
Mercure (Hg)	Usines de chlore-alcali, centrales thermiques, lampes fluorescentes, amalgames dentaires, déchets hospitaliers (thermomètres endommagés, baromètres, sphymomanomètres), appareils électriques, etc.
Arsenic (As)	Fonderies, centrales thermiques, combustion de combustible, pesticides arsenicaux et produits de préservation du bois.
Cuivre (Cu)	Extraction minière, électrodéposition, opérations de fusion, eaux de ruissellement.
Nickel (Ni)	Opérations de fusion, métallisation, combustion de combustibles fossiles, galvanoplastie, centrales thermiques, industrie des batteries, ruissellement routier.
Cadmium (Cd)	Batteries Ni/Cd, déchets électroniques, boues de peinture, incinérations et combustion de combustible, ruissellement routier.
Zinc (Zn)	Fusion, électrodéposition, écoulement routier.

### **II-3 Impact des métaux lourds sur les êtres humain, animaux, environnement, microorganismes:**

#### **II-3-1 Impact sur l'être humain:**

Pour l'homme, la problématique des métaux lourds est majeure car elle affecte toutes les caractéristiques de la vie. En effet, la cellule est l'unité biologique fondamentale la plus petite or les métaux lourds peuvent entraîner sa dégénérescence. Les métaux lourds s'accumulent dans l'organisme et provoquent des effets toxiques à court et/ou à long terme. Ils peuvent affecter le système nerveux, les fonctions rénales, hépatiques, respiratoires, ou autres .Plus précisément, la plupart des métaux lourds, suite à une absorption importante, provoquent des troubles respiratoires et digestifs (diarrhées, vomissements, douleurs abdominales) pouvant être extrêmement graves, jusqu'à entraîner la mort. Les dysfonctionnements rénaux sont également fréquents. En cas d'intoxication chronique, le plomb et le mercure se distinguent par le fait que le système nerveux central est leur cible privilégiée, entraînant des troubles moteurs (coordination des mouvements, tremblements), du comportement, de la mémoire et une altération des capacités intellectuelles. Le plomb perturbe également la synthèse de l'hémoglobine, ce qui provoque l'anémie (défaut de globules rouges). Enfin, certains métaux sont toxiques pour la reproduction, soit parce qu'ils engendrent des malformations ou des troubles chez les enfants, soit parce qu'ils sont responsables d'une diminution de la fertilité (**Ghali, 2008**).

#### **II-3-2 Impact sur les plantes et les animaux :**

**Sur les plantes:** Les plantes réagissent différemment aux différents métaux lourds présents dans le sol, la toxicité des métaux lourds varie selon les géotypes, l'âge et le stade de développement des plantes (**Zaidi et al., 2012**). Le cobalt, le fer et le chrome ont une toxicité moyenne sur plusieurs plantes, le cuivre est très toxique sur les plantes aquatiques, il inhibe la croissance de ces plantes à des concentrations inférieures à 0.1 mg/l, la réduction de la désorption du carbone à partir d'environ 0.003– 0.03 mg/l. le zinc diminue la production cellulaire, perturbe la croissance des végétaux par détérioration de l'appareil chlorophyllien.

**Sur les poissons :** Le cobalt augmente le glycogène du muscle, provoque l'hyperlactacidémie et nécrose des cellules d'épithéliums des ouïes suivi par un manque d'oxygène. Le cuivre inhibe l'activité de l'acétylcholinestérase, le changement cellulaire dans le foie et la réduction de l'immunité. Le zinc réduit la désorption minérale, la calcification squelettique, des effets

tératogènes dans l'étape d'embryogénèse et une réduction de la croissance. Le fer étouffe les ouïes de ces poissons. Le chrome endommage les tissus, affecte le foie, les reins et la rate.

**Sur les invertébrés :** Le cuivre augmente l'acide lactique dans les tissus, diminue le triglycéride et la nécrose du tissu épithélial. Le zinc diminue la progression de la capacité de la régulation osmotique. Le chrome inhibe le développement de bactéries des sols à partir d'une concentration de 10 à 12 mg/l, altère le matériel cellulaire, le métabolisme et les réactions physiologiques (Amrane, 2018).

### **II-4 La biodisponibilité et l'accessibilité des métaux lourds dans le sol, les facteurs influençant leur biodisponibilité :**

La proportion entre les quantités des métaux lourds présentes dans les fractions solides du sol et la solution de sol détermine la quantité des métaux lourds biodisponible. Toutefois, la réserve de métaux solubles dans le sol représente habituellement une très petite fraction de la quantité totale de métaux lourds. La concentration soluble de métaux lourds dans la solution de sol diminuée par la plante ou absorbée par d'autres biotes est remplacée par leur désorption de la surface des constituants solides du sol. La désorption, un processus important affectant la concentration de métaux lourds dans la solution de sol, dépend fortement du pH du sol. La forme de nitrate appliquée aux plantes peut également influencer de façon significative le pH du sol. On a constaté que la biodisponibilité du Cu (mesurée comme concentration de Cu dans la plante) était 2,4 à 4,2 fois plus élevée pour le  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  nourri et augmentait avec la baisse du pH. La matière organique, principalement le carbone organique dissous (COD), est un autre facteur important du sol qui régule la réserve de métaux lourds biodisponible. La matière organique dissoute (DOM) peut mobiliser les métaux lourds en formant un complexe stable soluble, tandis que la matière organique solide immobilise les métaux lourds (Zaidi *et al.*, 2012).

La distribution des métaux lourds entre la phase solide et la phase liquide ou leur solubilisation constitue la clé pour mieux comprendre leur sort et leur transport dans le sol (Otmani, 2018). La forme chimique (espèce) sous laquelle un métal se trouve dans le système environnemental récepteur peut le rendre plus biodisponible (Asrari, 2014). Enfin, la biodisponibilité et la mobilité des métaux lourds varient en fonction de plusieurs facteurs du sol (Otmani, 2018).

### III- Justification de choix des chélateurs microbiens :

#### III-1 Les substances chélatrices naturelles :

La présence intracellulaire de ligands organiques, qui assurent une complexation et donc la détoxification de nombreux ions métalliques constitue un aspect fondamental de la résistance aux métaux lourds (Esteban, 2006).

Dans le cas où l'ion métallique entre, libre, dans la plante, il est pris en charge par des molécules qui s'apparentent à des chélateurs internes. En effet, la complexation des ions métalliques par des ligands de haute affinité spécifiques réduit la concentration des ions métalliques libres dans les cellules, réduisant ainsi leur phytotoxicité ou on peut distinguer :

##### a- Les chélateurs externes :

Certains chélateurs sont naturellement synthétisés par la plante en réponse aux déficiences en nutriments tel que les phytosidérophores, les acides organiques, les acides phénoliques, l'acide caféique (Abdelkrim, 2018).

Les chélateurs externes, en liant le métal dans le milieu extracellulaire, le sidérophore diminue la concentration en métaux libres, affectant sa diffusion dans la bactérie et ainsi sa toxicité (Ferret, 2012).

##### b- Les chélateurs internes :

###### 1- Les méthallothionéines (MTs) :

Sont des protéines de faible poids moléculaire riches en cystéines. Plusieurs espèces végétales incluant *Arabidopsis* contiennent des gènes qui codent pour les quatre types de MTs (Usman *et al.*, 2018). De plus, des études récentes, qui ont analysé les effets de la surexpression des MTs chez *Arabidopsis thaliana* et le tabac ont montré que les plantes transformées ont présenté une tolérance accrue à la contrainte due au Cd, qui s'est accompagnée d'une plus faible accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chez *A. thaliana* et d'une plus forte activité de piégeage des radicaux libres chez le tabac. De même, l'introduction d'un gène de la méthallothionéine dans le tabac a amélioré la tolérance de la plante au Cd, au Zn et au Ni (Abdelkrim, 2018).

Un certain nombre d'études démontrent le rôle des MTs dans la protection des plantes contre la toxicité des métaux lourds dans le sol, les sédiments et l'eau (Usman *et al.*, 2018).

### 2- Les phytochélatines (PCs) :

Les phytochélatines sont des peptides de faible poids moléculaire qui présentent une forte affinité pour les métaux lourds. La phytochélatine séquestre les métaux solubles dans le cytoplasme avant de les transporter dans les vacuoles et les chloroplastes, réduisant ainsi l'effet délétère des ions métalliques sur les cellules. La production des PCs est immédiatement induite par l'exposition aux métaux lourds et positivement corrélée avec l'accumulation des métaux dans les tissus. En effet, Estrella-Gomez *et al.* (2009) ont montré que l'accumulation des PCs par *Salvinia minima* est une réponse directe à l'accumulation de  $Pb^{2+}$ . Les phytochélatines, en tant que voie d'homéostasie et de désintoxication des métaux, ont été identifiées dans une grande variété d'organismes vivants (Abdelkrim, 2018).

### 3- Le glutathion (GSH ; $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl-glycine) :

Le glutathion est un tri-peptide synthétisé, dans le cytosol et les chloroplastes, à partir de molécules de cystéine et de glutamate. Le GSH peut former des complexes avec les ions métalliques comme le Pb ou le Cd. Cette réaction de conjugaison se fait grâce à une enzyme la glutathionS-transférase (GST). En raison de son pouvoir réducteur, le GSH joue un rôle important dans divers processus biologiques, la synthèse des phytochélatines pour la chélation des métaux, la détoxification (Abdelkrim, 2018).

### 4- Les acides organiques :

Les acides organiques représentent un autre groupe de chélateurs naturels, Les bactéries sont également capables de synthétiser des acides organiques tels que l'acide citrique, oxalique, malique, lactique, gluconique, formique et succinique. Ou encore des acides forts tels que l'acide hydrocyanique. C'est le cas de *Pseudomonas fluorescens* qui peut produire plusieurs acides organiques à des concentrations allant jusqu'à  $14 \text{ mg.mL}^{-1}$  d'acides organiques total dont l'acide citrique, gluconique ou encore l'acide formique et de l'acide hydrocyanique. Ces acides sont capables, comme les sidérophores d'altérer un minéral en acidifiant le milieu, en solubilisant le K, Al, Fe et Si contenus dans ces minéraux. Ces acides ont aussi des propriétés complexantes mais bien plus faibles que celles des sidérophores. La constante d'affinité du fer avec l'acide oxalique et l'acide citrique est de  $10^8$  et  $10^{12}$  respectivement, et varie en fonction du minéral et des autres composés présents. Lorsque les sidérophores et les acides organiques sont présents dans le même milieu, alors l'altération est plus importante (Hazotte, 2016).

Les bactéries peuvent également interagir directement avec les contaminants inorganiques pour réduire leur toxicité et/ou moduler leur biodisponibilité (**Ferret, 2012**).

### 5- Les acides aminés :

Les acides aminés libres, comme la proline, l'histidine et la cystéine, s'accumulent lors d'un stress métallique et pourraient être eux aussi impliqués dans la chélation de divers métaux lourds (**Abdelkrim, 2018**), conférant ainsi une résistance à la plante. Une concentration accrue en histidine semble responsable de la tolérance au Ni chez *Alyssum lesbiacum* (**Ferret, 2012**).

### 6- Les algues :

La biomasse algale peut servir de moyen écologiquement plus sûr, moins cher et efficace pour éliminer les métaux lourds. L'accumulation de métaux lourds par les algues n'a retenu l'attention que ces dernières années en raison de son potentiel d'application dans la protection de l'environnement et la récupération de certains métaux importants (**Das et Osborne, 2018**). Cette capacité d'accumulations est comparable ou parfois plus élevée que les absorbants chimiques (**Mehta et Gaur, 2005**). La constitution biochimique est responsable de cette amélioration des performances parmi les biomatériaux. Plus précisément, il est les propriétés des constituants de la paroi cellulaire, tels que l'alginate et le fucoïdane, qui sont principalement responsables de la chélation des métaux lourds (**Davis et al., 2002**).

### III-2 Les inconvénients des chélateurs naturels :

Les chélateurs naturels, dites faibles car ne sont pas vraiment efficace et les liaisons chimiques établis avec les métaux sont fragiles. Bien que sont peu coûteuses, nécessitent des temps d'action relativement longs, pouvant atteindre plusieurs dizaines d'années (**Ferret, 2012**).

Les inconvénients de l'utilisation des algues comme substance chélatrice naturel :

- Il n'y a aucune possibilité d'amélioration de la biosorption.
- La récupération du métal peut être limitée car elle est liée de manière intracellulaire et les produits extracellulaires métaboliques peuvent interagir avec les métaux (**Das et Osborne, 2018**).

### III-3 Les substances chélatrices chimiques :

À côté des chélateurs naturels, il existe des chélateurs chimiques qui ont fait la preuve de leur efficacité, mais aussi de leur innocuité s'ils sont bien utilisés. Ce sont des chélateurs forts (plusieurs centaines de fois plus que les chélateurs naturels), ce qui fait que lorsqu'ils ont fixé des métaux, ils ne les lâchent plus jusqu'à leur élimination ! Cette caractéristique les rend donc finalement plus sûrs que leurs homologues naturels. Classiquement, certains chélateurs agiraient sur le milieu extracellulaire, d'autres traverseraient les membranes et pourraient ainsi capturer les toxines intracellulaires (Lallement, 2017).

Un moyen de rendre possible le processus de phytoextraction peut également être l'utilisation de plantes à haut rendement de la biomasse dans lesquelles l'accumulation de métal est induite par l'utilisation d'additifs chimiques qui augmentent la fraction de métal phytodisponible contenue dans la solution de sol. Cette technique est connue sous le nom de phytoextraction assistée. L'utilisation d'agents chélatants a été appliquée efficacement pour cet objectif. On utilise des agents chélatants persistants (EDTA, HEDTA, DTPA, EGTA, EDDHA, HEIDA, HBED, etc.) et facilement biodégradables (EDDS, NTA, etc.) ainsi que des acides organiques de faible poids moléculaire (Cao *et al.*, 2008).

#### 1- Le DMSA et surtout le DMPS :

Ce sont les plus puissants chélateurs du mercure, du plomb et de l'arsenic, le DMPS étant difficile à trouver (Lallement, 2017). L'utilisation de chélateurs est la stratégie thérapeutique commune pour éliminer le mercure de l'organisme. Il a été déterminé que les deux chélateurs les plus efficaces dans un ensemble clinique sont l'acide dimécaptosuccinique (DMSA) et le sulfonate de dimécaptopropane (DMPS). Il y a également eu des recherches pour étudier les chélateurs non testés pour leur efficacité contre le mercure. Par exemple, le déférasirox et la déféripone ont été combinés et testés sur des rats. On a observé que cette combinaison était capable de chélater avec succès le mercure et de réduire les effets toxiques du mercure. Un chélateur expérimental unique était nanoporeux modifié au thiol (Austin et Vincent, 2018).

#### 2- L'EDTA :

L'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) a été pratiqué plus intensivement chez les chélateurs synthétiques. L'EDTA se lie aux ions métalliques lourds et les rend non calcinés. Un ion non calciné est d'une grande mobilité et il est beaucoup plus facile de passer à travers la membrane plasmique. L'application de l'EDTA a amélioré l'absorption de Pb dans le *Brassica juncea* (L.)

*Czern*, 1000 à 10 000 fois plus que dans les usines témoins. Dans certains cas, le disuccinate d'éthylènediamine (EDDS) (un isomère structural de l'EDTA) a récemment été utilisé pour améliorer l'absorption des métaux par phytoextraction (**Kumar et Aery, 2016**).

L'EDTA fixe le cadmium, le plomb, mais aussi le calcium il est principalement proposé en cas de pathologie cardiovasculaire, car les dépôts de calcium participent aux lésions des vaisseaux (**Lallement, 2017**). Il y a eu des recherches sur l'utilisation de chélateurs pour enlever le nickel de l'environnement. Par exemple, on a observé que l'EDTA induit l'absorption de nickel provenant de sols contaminés à *Arundo donax L.* Cela offre un potentiel énorme d'utilisation dans les régions où le nickel est présent à des concentrations dangereuses. (**Austin et Vincent, 2018**). Les études réalisées sur l'utilisation de l'EDTA pour améliorer la phytoextraction ont démontré différentes capacités à augmenter le transport des métaux qui atteint 100 fois l'accumulation de métaux et dépendent des espèces de métaux, de la teneur en métaux dans le sol, du sol lui-même, ainsi que de la quantité d'EDTA appliquée (**Cao et al, 2008**).

### 3- Le malate de magnésium :

Le malate de magnésium a une affinité préférentielle pour l'aluminium. Le principe actif en est l'acide malique (**Lallement, 2017**).

### 4- Le DTPA :

Le DTPA est peu utilisé ; il capte préférentiellement le cadmium, le fer, le plomb et les métaux radioactifs (**Lallement, 2017**).

### 5- Le DPA et DMSA :

Les chélateurs sont des formes courantes de thérapie utilisées pour éliminer le béryllium de l'organisme et réduire ses effets toxiques. Les chélateurs pertinents comprennent le sel disodique d'acide 4,-dihydroxy-1,3-benzène disulfonique (Tiron) et la D-pénicillamine (DPA), qui se sont révélés efficaces lors d'essais sur des animaux. De plus, l'acide chélateur méso-2,3-dimécaptosuccinique (DMSA) a été utilisé dans une étude de cas pour sauver un enfant souffrant d'intoxication par les métaux lourds (**Austin et Vincent, 2018**).

### 6- La desferrioxamine :

Le chélateur commun utilisé à des fins thérapeutiques après empoisonnement à l'aluminium est la desferrioxamine. Ce chélateur s'est révélé efficace pour éliminer l'aluminium de l'organisme; toutefois, un certain nombre d'effets secondaires toxiques sont associés à son utilisation (**Austin et Vincent, 2018**).

### 7- Rac-2,3-dimercaptopropanol :

Le Rac-2,3-dimercaptopropanol, ou anti-lewisite britannique, contient deux groupes fonctionnels de thiol, et c'est un chélateur proéminent pour ce métal. En l'absence de données cliniques à ce stade, le 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonate a été utilisé chez une personne intoxiquée à l'arsenic de façon aiguë. Cette thérapie a permis de traiter avec succès des effets secondaires limités, ce qui suggère l'importance d'études futures (**Austin et Vincent, 2018**).

### 8- EDDS et MGDA :

Les EDDS S-S et MGDA sont des exemples de chélateurs facilement biodégradables utilisés efficacement dans la phytoextraction assistée. Les complexes métalliques EDDS et MGDA se sont révélés facilement biodégradables dans le sol. L'utilisation de EDDS S-S avec une dose de 10 mmol EDDS kg<sup>-1</sup> a montré une augmentation des métaux dans la solution de sol jusqu'à un facteur de 840 - 4260 pour le Cu et de 100 à 315 pour le Pb, et dans une moindre mesure pour le Zn (facteur 23 - 50) et le Cd (facteur 2.5 - 38).

L'agent chélatant facilement biodégradable MGDA a démontré son efficacité dans la mobilisation du Zn et du Pb, même si elle était inférieure à celle du S-S EDDS et de l'EDTA, dans les essais de lavage du sol Cao *et al.* (2007) ont vérifié l'efficacité de la MGDA dans le processus de phytoextraction assistée et sa faible toxicité pour les plantes.

Les EDDS S-S et la MGDA semblent avoir une influence positive sur les communautés bactériennes dans le sol en vrac et la rhizosphère, tandis que les endophytes sont moins touchés par les traitements. Grman *et al.* (2003) ont démontré que le EDDS S-S est moins toxique pour les champignons que l'EDTA et qu'il cause moins de stress sur les microorganismes du sol (**Cao *et al.*, 2008**).

### III-4 Les inconvénients des chélateurs chimiques :

Malgré leur efficacité mais sont toxiques, dangereuse et non compatibles à l'environnement. Ainsi que ces chélateurs chimiques ne restaurent pas les sols et ont la plupart du temps un effet néfaste sur l'activité biologique et la fertilité des sols traités (**Nouri et Haddioui, 2016**). Néanmoins, certains de ces composés, tels que l'EDTA par exemple apparaissent comme difficilement dégradables, pouvant engendrer des risques de lixiviation ainsi qu'une proportion importante de métaux et de chélatants sous la rhizosphère pouvant s'étendre jusqu'aux eaux souterraines (**Ferret, 2012**), des complexes d'EDTA et de métaux lourds se sont révélés toxiques pour les microorganismes du sol et pour les plantes qui réduisent la production de biomasse végétale et peut provoquer des signes de phytotoxicité chez les plantes cultivées (**Redon, 2009**). De plus, la faible biodégradabilité de cet agent chélatant détermine sa persistance dans l'environnement même après le nettoyage du sol. Même si la biodégradation de l'EDTA a été signalée dans des cultures pures dans des conditions contrôlées, sa dégradation dans des conditions naturelles tant dans le sol que dans l'eau est très faible. Par conséquent, le principal inconvénient lié à son utilisation dans la phytoextraction assistée est la valeur élevée des métaux et des métaux alcalins de la terre comme Ca et Mg qui sont rendus biodisponibles mais non absorbés par la plante. Ces métaux sont rejetés dans le lixiviat et constituent un risque environnemental pour la population (**Cao et al., 2008**).

L'application d'agents chélateurs chimiques a montré des effets positifs en augmentant la solubilité des métaux lourds dans sol mais ils ont laissé plusieurs questions sans réponses vue que leurs inconvénients on peut citer parmi les : le lavage à l'aide d'agents chimiques réducteurs ou chélateurs présente les inconvénients de déstructurer le sol, de l'appauvrir en éléments essentiels (Fe et Ca) et d'utiliser des chélateurs souvent non biodégradables, comme l'EDTA (**Boudenne et al., 2011**) ; une pollution supplémentaire rencontré lorsque des molécules synthétiques sont utilisées; le prix du pétrole augmente depuis quelques années. Étant des molécules à base de pétrole, la le prix des molécules synthétiques augmentera probablement aussi. (**Vandenbossche et al., 2014**), l'efficacité d'extraction dépend de nombreux facteurs tels que la labilité des métaux lourds dans le sol, la force de l'EDTA, des électrolytes et du pH du sol (**Aissaoui, 2012**).

Parmi les solutions proposées, l'EDDS ([S,S]-éthylènediamine disuccinate) a été présenté comme un agent mobilisateur prometteur et plus respectueux de l'environnement, en particulier pour le Cu et le Zn. Une fois que les plantes ont poussé et absorbé les polluants métalliques, elles

sont récoltées et éliminées en toute sécurité. Ce processus est répété plusieurs fois pour réduire la contamination à des niveaux acceptables (Wuana et Okieimen, 2011).

### IV- Les chélateurs naturels microbiens :

Cette méthode peu coûteuse, considérée comme « douce », car peu invasive vis-à-vis de l'environnement, peut être appliquée *in situ* permettant ainsi d'éviter l'excavation du sol qui devient sinon un déchet et de maintenir le plus possible ses fonctions écosystémiques. Certains microorganismes ajoutés au sol peuvent, grâce à leurs propriétés de complexation et d'acidification du milieu par des métabolites comme les sidérophores et les acides organiques, mobiliser les polluants en agissant sur leur spéciation.

Les chélateurs d'origine microbienne sont moins toxiques que les chélateurs chimiques et plus biodégradables comme le NTA (acide nitrilo-tri-acétique) ou encore des acides organiques (acide citrique) ou la pyoverdine purifiée à partir de culture de *Pseudomonas* peuvent également être ajoutés au sol afin d'améliorer les performances de phytoextraction de métaux ou metalloïdes (Hazotte, 2016).

#### IV-1 Les sidérophores bactériens :

La production de siderophore par des bactéries en présence de métaux toxiques implique leur potentiel dans l'absorption, la mobilisation des métaux lourds ou le développement de la résistance des métaux. La liaison des siderophores aux métaux réduit la concentration de métaux libres, affectant sa diffusion dans la bactérie et ainsi sa toxicité, limitant ainsi leur diffusion à travers les porines. Toutefois, dans le cas où le récepteur ne reconnaît pas le complexe réel du fer et des siderophores, il peut entraîner une accumulation de métal intracellulaire. La pollution des sols par les métaux lourds est un grave problème et exige un nettoyage efficace des zones polluées (Gaonkar et Bhosle, 2013). Les siderophores produits par les bactéries influencent également dans certains cas la croissance de la plante par apport de fer et sa capacité à extraire des métaux du sol (Hazotte, 2016), le cas des *Pseudomonas* fluorescents qui sont très fréquentes et jouent des rôles clés dans les sols en tant qu'agent de biocontrôle mais aussi dans la stimulation de la croissance végétale ainsi que dans la bioremédiation. Une souche de *P. aeruginosa* produisant la pyoverdine et la pyochéline apparaît plus résistante aux métaux qu'une souche ne synthétisant pas de siderophore. Les travaux de l'équipe « Dépollution Biologique des Sols » de Colmar ont montré que l'addition de bactéries productrices de siderophores, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Pseudomonas fluorescens*, augmentait l'extraction de chrome par des plants de maïs, les

sidérophores étant des métabolites sécrétés par les micro-organismes lors de carence en fer (**Ferret, 2012**).

### IV-2 Les types des sidérophores produits par *Pseudomonas* :

#### IV-2-1 Pyoverdine (pseudobactine) :

Les Pyoverdines sont une classe hétérogène de sidérophores fluorescents qui définissent les *Pseudomonas* fluorescents et sont considérés comme sidérophores primaires de ces bactéries. Ils ont été caractérisés comme sidérophores en 1978. Différentes souches de *Pseudomonas* sécrètent des pyoverdines chimiquement diversifiées, ils correspondent à un groupe de sidérophores étroitement apparentés et complexes, de par leurs tailles et structure. Les Pvds, de couleur vert jaune fluorescente, sont synthétisées et sécrétée dans le milieu extracellulaire par les *Pseudomonas fluorescent* dans les conditions de carence en fer. Elles sont solubles dans l'eau (**Meliani, 2012**), et présente une très forte affinité pour le fer ( $10^{32} \text{ M}^{-1}$ ) (**Schalk et al, 2011**). À ce jour près de 100 pyoverdines différentes ont été décrites (**Hazotte, 2016**).

Les pyoverdines sont caractérisées par un chromophore quinoléique, dérivé de la 2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline, leur conférant ses propriétés de couleur et de fluorescence. En position C3 du chromophore, une chaîne latérale (acide dicarboxylique, amide ou \_ céto glutarique) est fixée, tandis qu'en position C1, sur la fonction carboxyle est fixée une chaîne peptidique. La longueur et la composition de cette dernière varieront selon la souche étudiée. Cette chaîne peptidique généralement composés de 6 à 12 AA, elle peut être linéaire, cyclique ou partiellement cyclique (**Ferret, 2012; Meliani, 2012**).

#### IV-2-2 Pyochéline:

*P. aeruginosa* produit un autre sidérophore nommé pyochéline son affinité pour le fer est moindre ( $10^{18} \text{ M}^{-1}$ ) (**Meliani, 2012**).

#### IV-2-3 Pseudomonine (Isoxazolidone):

Est un nouveau isoxazolidone similaire à la pyochéline et possédant un fragment histamine (**Meliani, 2012**). Les espèces de *Pseudomonas spp.* fluorescents produisent aussi la pseudomonine (isoxazolidone) comme *P. fluorescens*, *P. stutzeri* et *P. putida* (**Mezaache, 2012**).

### **IV-2-4 Quinolobactine :**

Est le seul sidérophore naturel comportant une structure quinoléine, produit par *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400. Si la Pyoverdine est connue pour sa haute affinité, cette dernière à une affinité moyenne pour le fer. C'est un agent anti-Pythium (**Meliani, 2012**).

### **IV-2-5 L'acide salicylique :**

Est considéré autant que siderophore chez les *P. fluorescens* CHAO, une souche produisant la pyoverdine mais non la Pyocheline (**Meliani, 2012**).

*Analyse*  
*Expérimentales*

### 1- Objectif du travail :

Nous avons commencé à effectuer cette partie expérimentale dans le laboratoire de microbiologie n°1 à l'université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem (UMAB) en fin du mois de février 2020. Notre objectif était de réaliser un isolement des *Pseudomonas* à partir de la rhizosphère des plantes, de mettre en évidence et de caractériser leurs sidérophores et d'effectuer des tests *in vitro* sur le pouvoir chélateur de ces siderophores sur quelques métaux lourds. A cet effet nous avons préparé trois milieux de culture : la gélose nutritive, une gélose King B et une gélose King A. Malheureusement notre étude s'est arrêtée à ce niveau là en raison de la pandémie causée par le Coronavirus Covid-19. Donc le choix était de compléter et achever le travail par une présentation d'une synthèse des travaux scientifiques qui ont déjà abordé le sujet qui ressemble à notre thématique.

### 2- Isolement des bactéries résistantes aux métaux lourds :

#### 2-1 Échantillonnage du sol :

Environ 50g d'échantillons de sol ont été prélevés sur deux sites différents, à savoir la zone industrielle et le champ agricole. Des échantillons de sol ont été prélevés de 1 à 5 pouces sous la surface à différents endroits où l'activité microbienne est plus élevée. Les échantillons de sol ont été prélevés dans des sacs en plastique de polyéthylène stérilisés et transférés aseptiquement au laboratoire pour l'isolement des bactéries. De plus, ces échantillons de sol ont été soumis à la spectroscopie d'absorption atomique pour détecter la quantité de métaux lourds contaminés (Satapute, 2019).

#### 2-2 Isolement des souches bactériennes :

Un gramme de chaque échantillon de sol pollué (sol industriel et sol agricole) a été transféré dans 9 ml d'eau distillée stérile et secoué à 150 tr/min pendant 10 min. Ensuite, 1 ml de la suspension a été ajouté à 49 ml de sel minéral (MSM) contenant 1 ppm de chlorure de cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ), de chlorure de cuivre ( $\text{CuCl}_2$ ) et de chlorure de zinc ( $\text{ZnCl}_2$ ) (Satapute, 2019), qui ont été préparés et stérilisés avec des filtres de 0,22  $\mu\text{M}$  dans des conditions aseptiques (Gaonkar et Bhosle, 2013). Puis incubé à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 48h (Sharma et Kaur, 2016). Après incubation, 1 ml du bouillon de MSM a été transféré à 9 ml d'eau distillée stérile et dilué en série jusqu'à  $10^7$ . 100 $\mu\text{l}$  de suspension ont été étalés sur la gélose nutritive contenant 2 ppm de  $\text{CdCl}_2$ , de  $\text{CuCl}_2$  et de  $\text{ZnCl}_2$  en utilisant dilutions  $10^5$  et  $10^6$  (Satapute, 2019), incubés à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  et des dénombrements

des colonies fluorescentes de *Pseudomonas sp.* ont été effectués après 48h d'incubation (**Sharma et Kaur, 2016**).

### 3- Identification des isolats :

#### 3-1 Caractérisations culturelle et morphologique:

- L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation (la forme des colonies, la couleur des colonies, la taille des colonies par mesure du diamètre)
- L'observation microscopique, nous permet de faire une étude morphologique des cellules bactériennes, par coloration de Gram (le type de Gram, les coques et les bacilles) (**Sebihi, 2016**).

#### 3-2 Caractérisation physiologique et biochimique :

##### 3-2-1 Tests d'orientation :

Ces tests d'orientation sont nécessaires avant de réaliser une identification manuelle par la galerie API. Ils permettent de distinguer des groupes bactériens entre eux (**Tournus, 2016**).

- **Test oxydase :**

Une colonie est étalée sur un disque imprégné de diméthyl-p-phénylène diamine préalablement trempé dans de l'eau distillée stérile. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une couleur rouge violacée (**Mezaache, 2012**).

- **Catalase:**

La catalase a été révélée en déposant sur une lame en verre propre, une colonie bactérienne en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 10 volumes. Une réaction catalase positive se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène (**Mezaache, 2012**).

##### 3-2-2 Identification par galeries API 20NE :

La galerie API 20NE a été conçue pour permettre l'identification des bacilles à gram négatifs (BGN) hormis les entérobactéries et BGN non fastidieux (**Tournus C, 2016**).

Les galeries API comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés dans lesquels on distribue une suspension bactérienne de densité standardisée. Les réactions produites se traduisent par la détection d'une croissance bactérienne ou bien des virages colorés, spontanés ou révélés par

l'ajout de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification (Solbi, 2013).

La galerie API 20NE permet la recherche de:

- Réduction des Nitrates en nitrites ( $\text{NO}_3$ )
- Réduction des Nitrates en azote ( $\text{NO}_3$ )
- Formation d'indole (Tryptophane)
- Fermentation (Glucose)
- Arginine dihydrolase
- La présence d'une uréase
- L'hydrolyse (glucosidase) (Esculine)
- L'hydrolyse (protéase) (Gelatine)
- Galactosidase (Para-NitroPhényl- $\beta$  DGalactopyranosidase)
- L'assimilation de : Glucose, Arabinose, Mannose, Mannitol, N-acétyla
- Glucosamine, Maltose, Potassium Gluconate, acide Caprique, acide Adipique, Malate, trisodium citrate, acide Phénylacétique (Solbi, 2013).

Remarque : le mode opératoire de la galerie est rapporté dans l'Annexe.

#### 4- Résistance aux métaux lourds sur différents milieux :

- Milieu tris-minimal [TMM] :

Les isolats ont été cultivés indépendamment dans le milieu tris-minimal avec différents niveaux (2-4 mg/l) de zinc, cadmium et cuivre et incubés à 28°C et 120 tr/min. la concentration résiduelle de chaque métal a été estimée avec spectrophotomètre d'absorption atomique à la longueur d'onde 480nm (Patel *et al.*, 2016).

- Milieu Luria Broth [LB] :

0,1M de zinc, cuivre, cadmium a été préparé. Chacune de ces solutions de métaux a été ajoutée au milieu Luria Broth avec des concentrations de 5%, 10% et 15 % (Awasthi *et al.*, 2015) incubé à 28°C (Arora et Verma, 2017) pour observer la croissance et l'absorption de l'organisme. Après un intervalle de 24 heures, le bouillon a été centrifugé la biomasse a été pesée et le surnageant a été traité à l'ammoniaque pour obtenir une couleur spécifique. L'absorbance du surnageant traité a été enregistrée à 480 nm de longueur d'onde dans le spectrophotomètre UV (Awasthi *et al.*, 2015).

- **Milieu gélose nutritive [GN] :**

Pour tester la résistance aux métaux lourds, les métaux cuivre, zinc et cadmium utilisés comme  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnCl}_2$  et  $\text{CdCl}_2$  ont été ajoutés à milieu gélose nutritive en concentration variant de 0,1mM à 5mM. Les plaques ont été ensuite inoculées et incubé à 30°C pendant 2 jours (Sevgi *et al.*, 2009).

### **5- la production des sidérophores :**

Les souches obtenu ont été vérifiés pour leur capacité à produire des sidérophores, dans un erlenmeyer de 500 ml contenant 100 ml de milieu succinate (SM), la croissance et la production de sidérophore réalisées à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  à 120 tr/min pendant 24 à 48h, suivi en mesurant la densité cellulaire à 620 nm (Patel *et al.*, 2016 ; Sayyed *et al.*, 2013). à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible à double faisceau (Sayyed *et al.*, 2013).

#### **5-1 La détection et l'estimation du sidérophore:**

Après 48h, 100 ml de succinate inoculé ont été centrifugé (5,000 g×cm pendant 15 min), et le pH du surnageant acellulaire a été ajusté à pH 6,0 où le HCl était concentré et maintenu pendant une nuit à 4°C (Sayyed *et al.*, 2013) et le surnageant libre de cellules a été soumis à la détection et à l'estimation de sidérophore en utilisant le test Chrome Azurol Sulphonate (CAS) et un Dosage sur gélose CAS. La navette CAS dosage a été utilisée pour quantifier la quantité de sidérophore produit par les souches de *Pseudomonas sp.* (Patel *et al.*, 2016 ; Sayyed *et al.*, 2013).

Les souches bactériennes ont été vérifiées pour leur capacité de production des sidérophores par essai CAS universel. Avant de commencer l'expérience, la verrerie a été rincée avec de l'acide chlorhydrique (HCl) de 3 mol/L pour enlever le fer et ensuite lavée dans de l'eau désionisée (Arora et Verma, 2017).

Des méthodes qualitatives et quantitatives ont été utilisées pour estimer la production de sidérophore par les souches bactériennes. Pour ces deux méthodes, le réactif CAS a été préparé selon Schwyn et Neilands (1987). Brièvement, 121 mg de CAS ont été dissous dans 100 ml d'eau distillée et 20 ml de solution de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) de 1 mM préparée dans 10 mM de HCl. Cette solution a été ajoutée à une solution de 20 ml de bromure d'ammonium triméthyle hexadécyle (HDTMA) sous agitation. La solution HDTMA a été préparée en mélangeant 729mg HDTMA dans 400 ml d'eau distillée. La solution CAS-HDTMA a été stérilisée avant utilisation (Kumar *et al.*, 2017 ; Arora et Verma, 2017).

### 5-1-a Méthode qualitative :

Cet essai a été effectué selon la méthode modifiée donnée par Hu et Xu (2011). Les géloses CAS ont été préparées en mélangeant 100 ml de réactif CAS dans 900 ml de gélose LB (Arora et Verma, 2017). Les souches bactériennes ont été inoculées sur chaque plaque. Une plaque non inoculée a été prise comme témoin. Après inoculation, les plaques ont été incubées à 28°C pendant 5 à 7 jours dans l'obscurité et observées pour la formation de la zone orange autour des colonies bactériennes, l'apparition de zones orange confirme la production de siderophore (Kumar *et al.*, 2017 ; Arora et Verma, 2017).

### 5-1-b Méthode quantitative :

L'estimation quantitative de la production de sidérophore par souche bactérienne a été effectuée selon deux méthodes : (i) méthode traditionnelle et (ii) méthode de microplaque modifiée (Arora et Verma, 2017).

#### i- Méthode traditionnelle :

L'estimation quantitative du sidérophore a été effectuée en prenant le surnageant de cultures bactériennes cultivées dans un milieu de bouillon LB. Pour cela, 1 ml de bouillon a été pris dans un tube à centrifuger de 1,5 ml (un pour chaque culture bactérienne) et après stérilisation, inoculé avec 10 ml de culture bactérienne fraîchement cultivée ( $10^8$  unités formant des colonies (ufc) par ml). Quatre répétitions (tubes) ont été prises pour chaque souche. À part cela, le tube témoin (bouillon non inoculé) a également été maintenu. Après une incubation à 28°C pendant 48 heures, les cultures bactériennes ont été centrifugées à 10,000 tr/min pendant 10 minutes, les culots cellulaires ont été jetés et le surnageant a été utilisé pour estimer le sidérophore (Arora et Verma, 2017). Le surnageant (0,5 ml) de chaque culture bactérienne a été mélangé avec 0,5 ml de réactif CAS et après 20 min, la densité optique a été prise à 630 nm (Kumar *et al.*, 2017). Le sidérophore produit par les souches a été mesuré en pourcentage d'unité de sidérophore (psu), calculé selon la formule suivante : Production de sidérophore (psu) =  $\frac{(Ar-As) \times 100}{Ar}$ ,

Où Ar = absorbance de référence (solution CAS et bouillon non oculaire) et As = absorbance de l'échantillon (solution CAS et surnageant de l'échantillon exempt de cellules) (Arora et Verma, 2017 ; Sayyed *et al.*, 2005).

### ii- Méthode de microplaque modifiée :

La méthode modifiée pour estimer la production de sidérophore a été réalisée à l'aide de microplaques. Le surnageant a été obtenu à partir d'un bouillon de 0,5 ml inoculé (5  $\mu$ l inoculum contenant  $10^8$  ufc/ml) dans un tube à microcentrifugeuse. Le surnageant (100  $\mu$ l) de chaque culture bactérienne a été ajouté dans des puits séparés de microplaque suivi de l'ajout de 100  $\mu$ l réactif CAS. Après incubation, la densité optique de chaque échantillon (placé dans des puits de microplaques) a été enregistrée à 630 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. Quatre répliques ont été prises pour chaque souche dans 96 puits plaque et sidérophore estimées par la même formule que celle mentionnée ci-dessus (Arora et Verma, 2017).

La production de sidérophore par tous les isolats a été détectée en observant les halos orange produits sur les géloses CAS après 72 heures (Sharma et Kaur, 2016).

### 6- Extraction et évaluation du complexe métal-sidérophore :

Après 48h, 100 ml de succinate inoculé le milieu a été centrifugé (5,000  $g \times cm$  pendant 15 min), Ce produit a été extrait trois fois avec des volumes égaux d'acétate d'éthyle. L'extrait d'acétate a ensuite été évaporé et le sidérophore brut ainsi obtenu a été quantifié gravimétriquement; le rendement subséquent du sidérophore a été signalé en mg/100 ml. Détection de complexation du sidérophore avec des ions métalliques lourds, Sur la base du principe de la méthode CAS, une méthode modifiée a été développée pour filtrer la capacité du sidérophore à complexer avec divers ions métalliques. Chaque gélose CAS contenant divers ions métalliques (1mM de métal en 10mM HCl) comme le  $CdCl_2$ ,  $CuCl_2$  et le  $ZnCl_2$  a été inoculée séparément avec la souche de *Pseudomonas sp.* et incubé à  $28 \pm 2^\circ C$  pendant 24 heures et observé un changement de couleur du CAS du bleu au orange/jaune/rouge (Sayed et al., 2013).

Selon Patel et al et Sayyed et al, les sidérophores ont été évalués pour leur efficacité à éliminer les ions de métaux lourds de la matrice du sol, 10g de sol contaminé par des métaux lourds a été mélangé avec 100 ml de sidérophore, en tant que solution de lavage et moyen de contrôle du succinate, et le pH de tous les agents de lavage a été réglé à  $7,0 \pm 0,05$ . L'extraction de métaux lourds à partir de sols contaminés implique la dissolution de la liaison métal-minéral suivie de la dispersion du métal polluant dans le liquide de lavage. Après trois lavages successifs de sol contaminé par des métaux lourds avec des extracteurs qui comprenaient du sidérophore avec SM comme témoin, les échantillons ont été secoués à 120 tr/min et retirés après 24h, puis centrifugés à 5,000 tr/min pendant 10 min. La concentration de métaux lourds dans le surnageant a été estimée par un spectrophotomètre d'absorption atomique (Patel et al., 2016 ; Sayyed et al., 2013).

Pour détecter l'influence de différents métaux lourds sur les cultures en succinate chacun des 100 ml de SM a été complété avec 10  $\mu$ M de différents métaux lourds, comme le chlorure de cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ), le chlorure de cuivre ( $\text{CuCl}_2$ ) et le chlorure de zinc ( $\text{ZnCl}_2$ ). À la suite de l'incubation à 29°C et 120 tr/min, la teneur en sidérophore a été estimée selon le salaire (Sayed *et al.*, 2005).

### 6-1 Évaluation du sidérophore dans la bioremédiation vis-à-vis des chélateurs chimiques :

Sidérophore, EDTA (chélateur chimique) et l'acide citrique (chélateur organique) ont été évalués pour leur efficacité à éliminer les ions de métaux lourds de la matrice du sol à l'échelle des lots. Les échantillons du sol prélevés auparavant ont été secoués pendant 3 jours sur l'agitateur rotatif, étalé dans des plateaux pour séchage à l'air et tamisé après son affinage pendant 45 jours. Chaque sol contaminé par des métaux lourds (100 g) a été mélangé séparément avec 100 ml de sidérophore, d'EDTA (0,01 M) et de CA (0,01 M) comme solution de lavage et de SM comme témoin. Le pH de tous les agents de lavage était réglé sur  $7,0 \pm 0,05$ . Après trois lavages successifs de sol contaminé par des métaux lourds avec un agent d'extraction qui comprenait du sidérophore, de l'acide citrique 0,01 M et du 0,01 M d'EDTA et SM comme témoin, les échantillons ont été secoués à 120 tr/min et retirés après 24h, et centrifugé à 5000 tr/min pendant 10 min. La concentration de métaux lourds dans le surnageant a été estimée par spectrophotomètre d'absorption atomique (Patel *et al.*, 2016).

## 7- Caractérisation des Sidérophores :

Les Sidérophores impliquent de l'hydroxamate, du catécolate, du phénolate, de l'hydroxycarboxylate ou des groupes à fonctions mixtes capables de former complexes de coordination a une très affinité et sélectivité pour les ions ferriques. Il existe nombreuses techniques analytiques pour caractériser les sidérophores (Pluhacek *et al.*, 2014).

### 7-1 Caractérisation par des méthodes chimiques :

- **Hydroxamate :**

Le type de sidérophores a été déterminé par hydrolysant 1 ml de surnageant de culture d'une nuit avec 1ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  6N dans un bain d'eau bouillante pendant 6h ou 130°C pendant 30 min. de plus, cet échantillon hydrolysé a été tamponné en ajoutant 3ml de solution d'acétate de sodium. 0,5 ml d'iode a été ajouté et laissé réagir pendant 3 à 5 min. une la réaction termine, l'iode en excès était détruit avec 1ml de solution d'arsénite de sodium. Enfin 1ml d'une solution de  $\alpha$ -naphtylamine

a été ajouté. La formation de couleur rouge vin indique production de sidérophores de type Hydroxamate (Syed et Vidhale, 2011).

- **Caecholate :**

Le type de sidérophores caecholate a été déterminé en prenant 1ml de surnageant dans un tube à bouchon vissé pour ce 1ml de réactif nitrite-molybdate avec 1ml de solution de NaOH a été ajoutée. Enfin 1ml de HCl 0,5N a été ajouté et laissé réagir. La formation de couleur jaune indique production de sidérophore de type catécholates (Syed et Vidhale, 2011).

### 7-2 Caractérisation par spectrophotométrie :

- **Hydroxamate:**

1 ml de surnageant a été mélangé avec 1 à 5 ml de solution aqueuse de  $FeCl_3$  à 2% fraîchement préparée, et l'absorbance a été mesurée entre 400 et 600 nm. Un pic entre 420-450 nm a indiqué la nature Hydroxamate des sidérophores (Colombowala et Aruna, 2018).

- **Catécholates:**

1 ml de surnageant a été mélangé avec 1 à 5 ml de solution aqueuse de  $FeCl_3$  à 2% fraîchement préparée, et l'absorbance a été mesurée entre 400 et 600 nm. La formation d'un complexe de couleur vin et l'occurrence d'un pic à 495 nm ont indiqué la nature catécholates des sidérophores (Colombowala et Aruna, 2018).

### 7-3 Identification des types de Sidérophores par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) :

Les cultures liquides ont été cultivées pendant 3 jours. La culture a été agitée pendant 20 min et les bactéries ont été éliminées par centrifugation (22 min, 10 000 tr/min) et filtration à travers un filtre à membrane de 0,2  $\mu m$  de taille de pore. Les analyses HPLC ont été réalisées en utilisant les milieux de culture filtrés, la production de pyoverdine a été estimée en mesurant l'absorbance à 403 nm afin de déterminer le volume d'injection pour la souche. Le but était de détecter, par HPLC, le temps de rétention (RT) des pics de hauteurs comparables. Les analyses HPLC ont été effectuées avec des colonnes Nucleosyl C18 et un système Waters 2190. La différence de RT ( $\Delta RT$ ) (longueur d'onde, 403 nm) du milieu de culture de la souche a été injectée pour un maximum de trois analyses avant ou après chaque souche étudiée. Lorsque les hauteurs des pics se sont révélées trop

différentes, les analyses ont été refaites après réajustement des volumes injectés. La détection de la pyoverdine a été effectuée en utilisant les spectres des molécules entre 200 et 500 nm obtenus avec un détecteur à réseau de photodiodes Waters PDA 996. Deux programmes HPLC ont été utilisés, dans lesquels la solution A était un tampon NaOH-acide acétique 17 mM (pH 5,3) et la solution B était de l'acétonitrile. Le programme HPLC 1 était le suivant (débit, 1 ml/min): solution A à 100%, 1 min; de 100% de solution A à 97% de solution A, 2 min; 97% solution A, 9 min; et de 97% de solution A à 30% de solution A, 25 min. Le programme HPLC 2 (débit, 0,9 ml / min) était le suivant: solution à 100% A, 8 min; de 100% de solution A à 98% de solution A, 2 min; 98% solution A, 10 min; de 98% de solution A à 95% de solution A, 5 min; de la solution A à 95% à la solution A à 30%, 15 min; et 30% solution A, 5 min. Une production de pyoverdine par *P. fluorescens* (G) a été initialement réalisée en milieu King B en utilisant le programme HPLC 1 (El-Sheikh *et al.*, 2011).

# *Résultats et Discussion*

### 1- Isolement des bactéries résistantes aux métaux lourds :

La bioremédiation a été largement acceptée comme stratégie plus sûre pour l'élimination des métaux des sols pollués. Dans cette étude, 11 bactéries au total ont été isolées des deux échantillons de sol pollués. Parmi ces 11 bactéries examinées pour leur capacité de croissance, seuls quelques isolats ont pu croître dans un milieu supplémenté de 2 ppm de cadmium (Cd), de cuivre (Cu) et de zinc (Zn). Par conséquent, ils ont été sélectionnés pour d'autres études d'identification (Satapute, 2019).

Les souches bactériennes productrices de sidérophore prises dans le cadre de l'étude appartiennent à divers genres de *Pseudomonas*, notamment *P. aeruginosa*, *P. fluorescence* et *Pseudomonas sp.*. Tous ces genres bactériens sont bien connus et les habitants communs de la rhizosphère (Arora et Verma, 2017 ; Kumar *et al.*, 2017).

#### 1-1 la tolérance des souches isolées aux métaux lourds :

Les concentrations maximales tolérables de métaux lourds pour *P. aeruginosa* était de 1800 M pour  $\text{CuCl}_2$  et 1600 M pour  $\text{ZnCl}_2$ , et 1400 M pour  $\text{CdCl}_2$ . Des ions métalliques comme  $\text{HgCl}_2$  et  $\text{AgNO}_3$  ont inhibé la croissance des de l'isolat. La sensibilité de *P. aeruginosa* vers  $\text{HgCl}_2$  et  $\text{AgNO}_3$  est attribuée aux effets antimicrobiens de ces ions (Sayyed *et al.*, 2013). Le même résultat a été signalé par Adhikary *et al.*, (2019) dans le cas de *Pseudomonas sp.* ou huit isolats de *Pseudomonas* ont été testés contre des métaux lourds. Ces isolats présentaient des niveaux de tolérance variables contre  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Cd}^{2+}$ . Les isolats présentaient une tolérance maximale et une tolérance minimale à  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Cd}^{2+}$ , respectivement (Adhikary *et al.*, 2019).

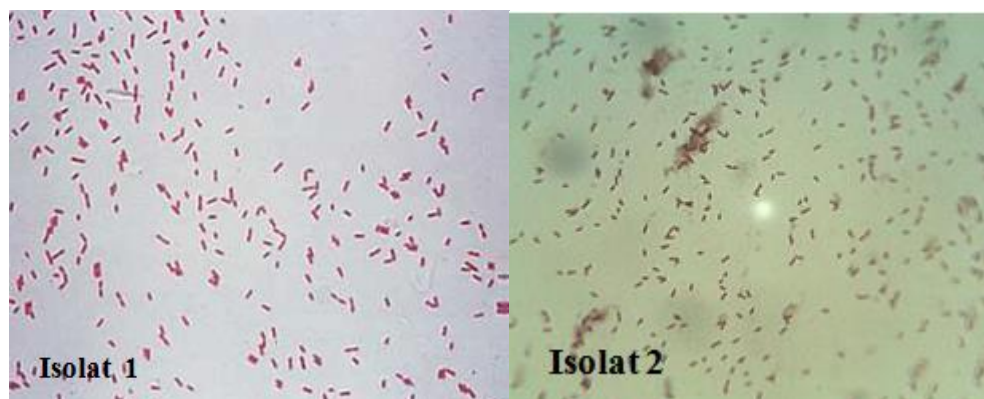
### 2- Identification des isolats :

#### 2-1 Caractérisations culturelle et morphologique:

La caractérisation morphologique de souches a montré 2 types de colonies:

- Des colonies jaune verdâtres avec formes rondes bords irréguliers des reliefs bombés et avec taille réduite. La coloration de Gram, a fait ressortir des souches de forme bacillaire et à Gram négatif (Solbi, 2013). Ces mêmes caractéristiques ont été constatées chez *Pseudomonas aeruginosa* par Embaby *et al.*, (2016).

- Des colonies crème à blanchâtres avec formes rondes, bords réguliers, des reliefs bombés et des surfaces lisses et avec taille de 1 à 3mm. La coloration de Gram, a fait ressortir des souches de forme bacillaire et à Gram négatif (Sebihi, 2016).



**Figure 01:** Observation microscopique des isolats après coloration de Gram (X1000) isolat 1 (Khalilzadeh, 2009) ; isolat 2 (Sebihi, 2016).

### 2-2 Caractérisation physiologique et biochimique:

- **Test oxydase et catalase :**

La réaction positive du cytochrome oxydase et du catalase est un caractère indispensable dans l'identification des espèces de *Pseudomonas*. (Sebihi, 2016) ces résultats ont été obtenus aussi par Hassan *et al.*, (2007).



**Figure 02:** résultat de l'oxydase (Sebihi, 2016).

- **Identification par galeries API 20NE :**

Des galeries biochimiques de type API 20NE ont été utilisées pour identifier les deux isolats. Les résultats de ces examens biochimiques obtenus (tableau 02) permettent d'identifier les deux

## Résultats et Discussion

---

isolats étudiés comme *Pseudomonas aeruginosa* pour isolat 1 et *Pseudomonas fluorescens* pour isolat 2. Ces mêmes caractéristiques biochimiques ont été révélées par Larbi daouadji (2015) et Sefraoui (2015) respectivement.

**Tableau 02 :** Paramètres biochimiques des isolats sur la galerie API 20 NE (Solbi, 2013).

Tests	Isolat 1	Isolat 2
NO3	+	+
TRP	-	-
GLU	-	-
ADH	-	+
UREE	-	-
ESC	-	-
GEL	+	+
PNPG	-	-
GLU	+	+
ARA	-	+
MNE	-	+
MAN	+	+
NAG	+	+
MAL	-	-
GNT	+	+
CAP	+	+
ADI	+	-
MLT	+	+
CIT	+	+
PAC	-	-

(+): réaction positive, (-): réaction négative



Figure 03: Galerie d'identification API20NE, d'un *Pseudomonas fluorescens* (Meliani, 2012).

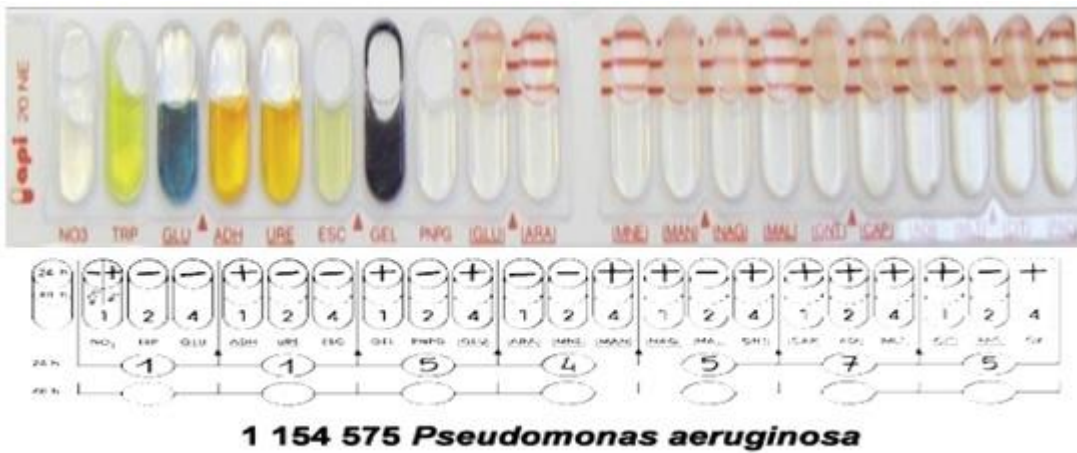


Figure 04: Galerie d'identification API20NE, d'un *Pseudomonas aeruginosa* (Tournus, 2016).

### 3- Résistance aux métaux lourds sur différents milieux :

Les résultats de la résistance de *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* vis-à-vis les métaux lourds dans différents milieux de culture sont présentés dans les tableaux 03 et 04 respectivement.

Tableau 03 : Les résultats de la résistance de *P. aeruginosa*.

Métal	Milieu TMM			Milieu LB			Milieu GN		
	Zn	Cu	Cd	Zn	Cu	Cd	Zn	Cu	Cd
Résistance %	90%	90%	90%	46,7%	41%	28,9%	43%	26%	12%
Référence	(Patel et al., 2016)			(Awasthi et al., 2015)			(Sevgi et al., 2009)		

**Tableau 04:** Les résultats de la résistance de *P. fluorescens*.

	Milieu TMM			Milieu Mueller–Hinton		
Métal	Zn	Cu	Cd	Zn	Cu	Cd
Résistance%	80%	80%	80%	33,9%	87,1%	69,3%
Référence	(Choudhary et Sar, 2009)			(Matyar <i>et al.</i> , 2009)		

Tous les isolats dans les différents milieux ont pu croître et survivre en présence de zinc, cuivre et cadmium avec des différences en taux de résistance. Des facteurs tels que les conditions de croissance, la période d'incubation, les diverses formes et concentrations possibles de métaux utilisées et les milieux de culture utilisés dans les tests de tolérance peuvent influencer la toxicité des métaux. (Lima *et al.*, 2011) souvent, les milieux minimums sont utilisés, en effet les milieux complexes sont inadéquats en raison de la concentration élevée des composants organiques qui absorbent les ions métalliques. La gélose nutritive contenant des composés organiques peut chélater les métaux et les rendre indisponibles pour les micro-organismes testés. (El baz *et al.*, 2014) les niveaux élevés de tolérance aux métaux signalés par les bactéries pourrait être due à l'indisponibilité des métaux dans le milieu (Rathnayake *et al.*, 2012) donnant une fausse indication d'un comportement de tolérance des bactéries (Kumar *et al.*, 2013). Dans l'ordre de minimiser le problème de complexation des métaux lourds avec le phosphate le milieu Tris minimal est utilisé où le phosphate est remplacé par le tris (Akkermans *et al.*, 2008).

#### 4- la production des sidérophores:

Dans les études sur les flacons à secouer, le passage de la couleur du milieu succinate du vert incolore au vert fluorescent après 24 heures a montré une production de sidérophore par les isolats. Cela a été confirmé par un essai CAS, où l'ajout de CAS à un surnageant exempt de cellules a changé la couleur du CAS de bleu à orange. Le changement de couleur du réactif CAS est attribuable au fait que les sidérophores présents dans le surnageant chélatent le fer du réactif CAS, ce qui entraîne un changement de couleur (Sayed *et al.*, 2013). Il a été observé que toutes les souches bactériennes prises dans l'étude étaient positives pour la production de siderophore. *P. aeruginosa* a montré une capacité de production de siderophore maximale sur gélose CAS (Kumar *et al.*, 2017 ; Arora et Verma, 2017). La production de siderophore a été estimée

approximativement sur la base de la taille de la formation de halo orange autour des colonies bactériennes sur gélose CAS. La méthode CAS agar peut seulement donner une idée approximative et n'est pas une méthode parfaite pour la quantification de la production de siderophore. Par conséquent, l'estimation quantitative du siderophore est effectuée à l'aide de milieux de culture liquides et de réactifs CAS (Kumar *et al.*, 2017 ; Arora et Verma, 2017). *Pseudomonas sp.* a excrété une quantité de 43,22 % de sidérophore (Sayyed *et al.*, 2013). Tandis que les travaux de Sayyed *et al.*, (2005) ont montré que après 24 à 36h d'incubation, le développement de pigments de couleur verte et rouge en SM par *P. fluorescens* et *P. putida*, respectivement indiqué la production de sidérophores ceci a été confirmé par un test qualitatif de CAS où une décoloration instantanée du réactif de CAS du bleu au rouge orange a été observée avec les deux cultures *P. fluorescens* et *P. putida* a produit 87 et 83% unités de sidérophores (type d'hydroxamate) en SM respectivement (Sayyed *et al.*, 2005).

Les résultats étaient sensiblement similaires, que ce soit par spectrophotométrie contrôlée ou par lecteur de microplaques. Cela prouve la similitude des deux méthodes. Les résultats obtenus par les deux méthodes ont indiqué que les différentes souches présentaient des capacités variables de production de sidérophore. La présente étude a également prouvé que les *P. fluorescentes* étaient les producteurs de sidérophore les plus compétents en comparaison avec d'autres souches. De nombreux chercheurs ont signalé que les *P. fluorescentes* étaient des producteurs prolifiques de sidérophores. En effet, *P. aeruginosa* compte parmi les producteurs de sidérophores les plus efficaces rapportés de la rhizosphère ou d'autres habitats comme le montrent également ces travaux. Les souches de *P. aeruginosa* se sont révélées être les producteurs de sidérophore les plus efficaces par rapport aux autres (Kumar *et al.*, 2017 ; Arora et Verma, 2017).

### 5- évaluation du complexe métal-sidérophore :

Le rendement du sidérophore a été estimé par extraction au solvant, et la production de sidérophore brut a été estimée à 0,9 mg/100 ml pour *P. fluorescentes* de milieu d'acide succinique. Criblage pour la complexation de siderophore avec des ions de métaux lourds sidérophore, bien que sélective pour la complexation avec Fe (III), également liée à des métaux divalents comme Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> et Cd<sup>2+</sup> avec des capacités variables. Le changement de la couleur du CAS modifié du bleu à l'orange a indiqué la chélation de ces ions métallique à partir de la plaque gélose CAS, confirmant la capacité des sidérophores de *P. fluorescentes* pour chélater/liier des ions métalliques autres que

Fe (III). *P. aeruginosa* a adsorbé plus de 90% des ions de métaux lourds ajoutés, et une absorption de 90,16 % de  $ZnCl_2$  (Sayed *et al.*, 2013).

Selon d'autres études menées par Satapute (2019), la bioabsorption des métaux par la souche de *P. aeruginosa*. La bactérie isolée utilise des suppléments nutritionnels minimales comme source d'énergie pour se maintenir contre les métaux toxiques supplémentés de l'extérieur. Une observation similaire a été rapportée dans la présente expérience dans laquelle nous avons pu isoler avec succès des bactéries tolérantes aux métaux lourds sur le milieu MSM. La croissance de la souche de *P. aeruginosa* était à son maximum en de Cu et de Cd. Il a été révélé que le potentiel de bioaccumulation du Cd était de 22,54 ppm et celui du Cu de 32,74 ppm. La bioaccumulation du Cu était de 20 % supérieure à celle du Cd. Cette observation a confirmé que le taux d'absorption de Cu est supérieur à celui du Cd dans des conditions contrôlées (Satapute, 2019).

Les résultats expérimentaux mené par Naz *et al.*, (2016) montrent que toutes les souches isolées ont joué un rôle important dans la réduction des métaux lourds. On a observé que l'échantillon d'effluent contenait 0,85 mg/l (Zn), 0,27 mg/l (Cu) et 0,93 mg/l (Cd). Après traitement avec des isolats bactériens, les concentrations de métaux lourds ont été considérablement réduites dans l'effluent échantillon. *P. fluorescentes* réduit 37% ( $Cu^{2+}$ ), 32 % ( $Zn^{2+}$ ) et 29% ( $Cd^{2+}$ ) et s'est donc avéré très efficace pour éliminer les métaux lourds (Naz *et al.*, 2016). Ces résultats révèlent que l'utilisation de bactéries résistantes aux métaux pour la biorémediation est une approche réussie pour l'élimination des métaux lourds.

### 6- La détection et l'estimation du sidérophore:

#### 6-1 Méthode traditionnelle :

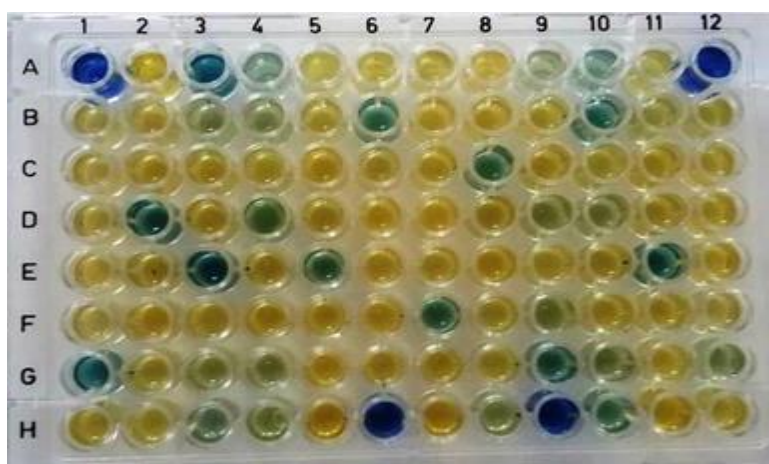
Dans la méthode traditionnelle, après la croissance, le surnageant exempt de cellules (0,5 ml) est pris pour l'estimation spectrophotométrique en cuvette. Toutefois, dans la méthode proposée, le surnageant (100 litres seulement) a été versé dans des puits de plaque de microtitrage. Bien que 0,5 ml de réactif CAS a été utilisé par tube dans la méthode traditionnelle, seulement 100 l ont été utilisés dans le cas de la méthode par microplaque. Par conséquent, la quantité de réactifs et de bouillon utilisés a considérablement diminué. En fait, il y a une réduction de 80 % du besoin de réactif CAS et une diminution de 50 % de la quantité de bouillon utilisée. À part cela, la méthode proposée exigeait beaucoup moins de temps. Selon notre calcul du temps total nécessaire pour quantifier le sidérophore produit (après incubation et centrifugation pour obtenir un surnageant

exempt de cellules), il y a eu une réduction de 91,7 % (Arora et Verma, 2017 ; Kumar *et al.*, 2017).

### 6-2 Méthode de microplaque modifiée :

Selon la méthode de la microplaque à 96 puits, la quantification du sidérophore peut être effectuée pour plusieurs souches en une seule fois (Fig. 05). Bien que d'autres travailleurs aient également signalé que la méthode de la microplaque permet de gagner du temps et est efficace, il s'agit du premier rapport démontrant l'efficacité de la méthode de la microplaque à 96 puits pour l'estimation de la sidérophore en termes de temps, l'argent et être encore plus efficace que la méthode spectrophotométrique traditionnelle. La quantité de siderophore produite par les deux souches a été vérifiée et comparée pour les méthodes traditionnelles et proposées afin de déterminer l'efficacité. Absorbance de référence (Ar) ou témoin (bouillon non inoculé et réactif CAS) était sensiblement similaire dans le cas de la méthode traditionnelle et de la méthode modifiée de microplaque. La concentration de sidérophore produite par les souches bactériennes variait de  $7,97 \pm 0,58$  à  $69,16 \pm 0,71$  psu lorsqu'elle était mesurée selon la méthode traditionnelle, tandis que lorsqu'elle était quantifiée selon la méthode proposée par microplaque, elle était de  $8,33 \pm 0,08$  à  $69,81 \pm 0,16$  psu. Quantitativement également, *P. aeruginosa* a produit une quantité maximale de sidérophore et les lectures étaient sensiblement similaires, que ce soit par spectrophotomètre (méthode traditionnelle) ou par le lecteur de microplaques (méthode proposée).

Par conséquent, la méthode proposée est non seulement plus économique, mais permet également de gagner du temps (tableau 05) (Arora et Verma, 2017 ; Kumar *et al.*, 2017).



**Figure 05 :** Estimation de la production de sidérophore par la méthode des microplaques (Arora et Verma, 2017).

Diverses souches bactériennes produisant différentes quantités de sidérophore.

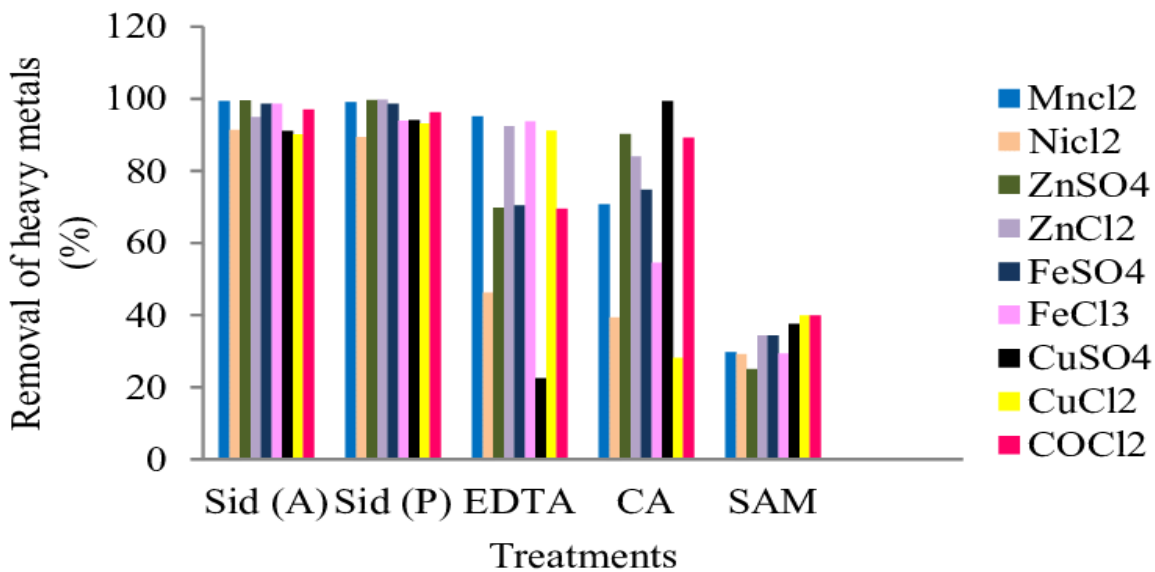
**Tableau 05 :** Analyse comparative entre les méthodes traditionnelles et sur microplaques d'estimation des sidérophores (Arora et Verma, 2017 ; Kumar *et al.*, 2017).

Analyse comparative	Méthode traditionnelle	Méthode sur microplaques
<b>La main-d'œuvre</b>	Nécessite un apport de main-d'œuvre élevé	Nécessite moins de main-d'œuvre
<b>Milieu</b>	96 ml	48 ml
<b>Réactifs (pour 23 souches plus contrôle en quadruple)</b>	48 ml	9,6 ml
<b>Précision</b>	Moins précise car plusieurs échantillons sont traités individuellement ce qui peut provoquer une erreur de manipulation élevée	Plus précis car plusieurs échantillons (96) peut être géré collectivement en un seul plaques qui réduit l'erreur de manipulation
<b>Durée</b>	180 min (3 h)	15 min

### 7- Évaluation du sidérophore dans la bioremédiation vis-à-vis des chélateurs chimiques :

Évaluation du siderophore dans la bioremédiation du sol enrichi en métaux lourds. Parmi les divers lavages appliqués pour éliminer les ions métalliques lourds du sol enrichi, le lavage de sidérophore a permis une chélation efficace des ions métalliques lourds démontrant leur supériorité (élimination de  $ZnCl_2$  à 99,52 et à 99,76 %) sur les chélateurs d'ions chimiques tels que l'EDTA (élimination de  $ZnCl_2$  à 92,40 %) et l'AC (élimination de  $ZnCl_2$  à 83,98 %) (fig. 06) (Sayyed *et al.*, 2013 ; Patel *et al.*, 2016).

Ces résultats sont en concordance avec les études Wuana *et al.*, (2010) une concentration courante de chélateurs de 0,01 M a été utilisé dans toutes les expériences de lavage du sol parce que la présence de ces acides organiques, en particulier le citrate à de très faibles concentrations, inhibe la désorption des métaux lourds, alors que leur présence à des concentrations élevées favorise la désorption des métaux. En outre, Tejuwulan et Hendershot (1998) ont constaté que le taux d'élimination des métaux avec l'EDTA dépendait uniquement de la concentration de chélateurs et non du temps de lavage. Par conséquent, un temps de lavage commun de 6h a été choisi puisque la complication de ces ions métalliques divalents par des chélateurs s'avère presque instantanée. La concentration de chélateurs choisie visait également à maintenir le pH du mélange de chélateurs du sol suffisamment bas pour que Cu, Zn et Cd existent sous forme d'ions. Les concentrations de métaux lourds extractibles et les rendements d'extraction variaient considérablement selon la nature des chélateurs organiques. À la fin du temps de lavage de 6 h, CA a éliminé 50,30 % de Cu, 43,50 % de Zn, 38,40 % de Cd. Les rendements d'extraction de l'EDTA étaient de 70,30 % Cu, 60,40 % Zn, 56,70 % Cd. Pour les trois chélateurs organiques, les rendements d'extraction variaient dans l'ordre suivant : Cu > Zn > Cd (Wuana *et al.*, 2010).



**Figure 06 :** Effet du lavage séquentiel des sols contaminés par des métaux lourds par agents de lavage (Sayed *et al.*, 2013).

La biomasse microbienne préconise une option économique pour éliminer les métaux lourds par le phénomène de biosorption. Parmi les isolats bactériens, *Pseudomonas sp.* a montré une réduction notable de la concentration de métaux lourds dans l'échantillon d'effluent, comme indiqué précédemment. Il a été rapporté que les parois cellulaires de bactéries gram négatif sont relativement plus minces que les grams positifs et ne sont pas non plus fortement réticulées en raison de la présence de lipopolysaccharides, de phospholipides et de protéines. Ces résultats sont conformes à ceux d'Adour *et al.* (1999) qui ont déclaré que *Pseudomonas sp.* présente un fort potentiel de biosorption pour les métaux lourds. On a observé qu'à forte concentration, les microbes présentaient une forte réduction des métaux. Le potentiel d'élimination des métaux des souches isolées a été observé à des concentrations extrêmes de métaux élevés. À de faibles concentrations de métaux dans les effluents, le potentiel de biodégradation de la bactérie n'était pas pleinement utilisé.

Le même type de résultats a été signalé précédemment dans le cas de *Pseudomonas sp.* pour  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ . Un tel comportement des isolats bactériens pourrait dépendre de la concentration disponible des métaux (Naz *et al.*, 2016). Tous ces résultats démontrent clairement le potentiel des bactéries résistantes aux métaux lourds, en particulier *Pseudomonas sp.*, pour l'assainissement de l'environnement contaminé.

### **8- Caractérisation des Sidérophores :**

Le types de sidérophore a été déterminé par le test de Csaky et Arnow, où tous les isolats ont montré la production de deux types de sidérophore c'est-à-dire la formation de couleur rouge vin dans le surnageant indique que le sidérophore est de type hydroxamate (pyoverdine) tandis que la formation de couleur jaune dans le surnageant a montré présence de sidérophores de type catécholate (Syed et VidhaleI, 2011) la caractérisation des sidérophores devient difficile en utilisant des protocole conventionnels. D'autres études ont également suggéré l'incapacité de caractériser les sidérophores. Due à l'incapacité d'extraire. Le sidérophore du surnageant de culture dans aucun des solvants organiques examinés par conséquent, la nature chimique du sidérophore n'a pas pu être détectée. En revanche, l'analyse spectrophotométrique a révélé la nature hydroxamate du sidérophore chez *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* (Colombowala et Aruna, 2018), les mêmes résultats sont révélés par Zawadzka *et al.*, (2006).

La méthode HPLC d'analyse de la production de sidérophores présentée s'est révélée être une méthode très puissante pour une détermination rapide, où elle indique que la production de sidérophore de type pyoverdine. Ce résultat a été révélé aussi par Bultreys *et al.*, (2002) (El-Sheikh *et al.*, 2011).

*Conclusion et  
Perspectives*

### Conclusion

Parmi les contaminants les plus répandus du sol, on retrouve les métaux lourds dont la toxicité varie en fonction de leur nature. Donc dans cette synthèse il est primordial de connaître la tolérance de certains microorganismes contre certains métaux lourds. A la lumière des résultats obtenus, l'utilisation des sidérophores produits par *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens* dans la bioremédiation des sols pollués par les métaux lourds a un impact positif sur l'environnement, ou la bioremédiation s'est révélée être une technologie innovante et prometteuse pour l'élimination des métaux lourds de sols pollués qui comporte de multiples avantages, notamment la viabilité économique, l'acceptation sociale et l'absence d'effets dommageables. L'objectif de ce travail a été d'isoler à partir d'un sol rhizosphérique des *Pseudomonas* qui sont connus par leur grande capacité à synthétiser les sidérophores pour les utiliser comme un moyen d'une évaluation *in vitro* de la bioremédiation, de faire une analyse comparative entre les différentes méthodes d'estimation des sidérophores et de comparer la résistance aux métaux lourds sur les différents milieux. Tout d'abord, il a été intéressant de remarquer, qu'en présence de différentes concentrations des métaux les deux isolats *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens* ont montré une résistance à ces métaux et que le type de milieu de culture utilisé joue un rôle important dans la résistance des *Pseudomonas*. Les résultats de laboratoire ont également montré qu'en présence de métaux toxiques, les bactéries produisent des quantités plus importantes de sidérophores. Ces sidérophores sont capables de complexer de nombreux métaux toxiques tels que le cuivre, le cadmium ou le zinc, s'est donc avéré très efficace pour éliminer les métaux lourds des sols pollués.

A la base des résultats obtenus précédemment, nous pouvons à la fois tirer quelques recommandations et des mesures prioritaires à mettre en avant, et souligner un nombre de perspectives pour la suite de notre étude.

- Une approche moléculaire par le séquençage du gène codant l'ARN 16S pour la souche *Pseudomonas* sp., aiderait à déterminer de façon précise l'affiliation de l'espèce microbienne.
- L'identification de l'ensemble des gènes fonctionnels impliqués dans la bioremédiation des sols pollués par les métaux lourds chez les souches sélectionnées afin de mettre en évidence des mécanismes adaptatifs mis en place par certains microorganismes en réponse à la contamination.

## *Conclusion et Perspectives*

---

- Il serait intéressant de caractériser les sidérophore produites par les souches étudiées qui ont un grand pouvoir dans la bioremédiation des métaux lourds et l'accélération de leur biodégradation.
- Il est important de développer, optimiser et d'essayer d'appliquer au niveau national les microorganismes dégradants les métaux lourds dans le traitement des sols contaminés par les métaux lourds et d'améliorer l'efficacité du traitement par bioremédiation (*in situ*).

*Références*  
*Bibliographiques*

## Références Bibliographiques

---

A

- Abdelkrim S, (2018). Identification d'une association *Lathyrus sativus*-bactéries pour la dépollution biologique des sols contaminés par le plomb. Thèse pour l'obtention diplôme de doctorat. Ecole Doctorale de Sciences et Techniques de L'Agronomie et de l'Environnement. Université INAT Tunis, Tunisie.
- Adhikary A, Kumar R, Pandir R, Bhardwaj P, Wusirika R, and Kumar SB, (2019). *Pseudomonas citronellolis*; a multi-metal resistant and potential plant growth promoter against arsenic (V) stress in chickpea. *Plant Physiology and Biochemistry*. Elsevier Masson SAS. Vol 142:179–192.
- Aissaoui H, (2012). Effet des produits phytosanitaires et les engrais, sur l'abondance des métaux lourds (Cu, Zn) dans le sol et le végétal dans la région de Biskra. Thèse pour l'obtention de diplôme de Magister. Université Mouhamed Kheider Biskra. Biskra, Algérie.
- Akkermans AD, Elsas JDV and Bruijin FJ, (2008). Basic principle for the design of a medium to assay the growth of bacteria in the presence of heavy metals. *Molecular microbial ecology*.
- Alaboudi K, Berhan A and Graham B, (2019). Soil Washing Technology for Removing Heavy Metals from a Contaminated Soil: A Case Study. *Pol. J. Environ. Stud.* Vol. 29, No. 1 (2020), 1029-1036.
- Amrane C, (2018). Analyse et traitement des métaux lourds des rejets industriels : développement de méthodes chimiques électrochimiques et membranaires. Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat. Université El-Hadjar Lakhder –Batna1. Batna, Algérie.
- Anonyme: FAO, (2015). A healthy soil is a living soil.
- Appenroth KJ, (2010). What are “heavy metals” in Plant Sciences? pour la définition physique. Article *in Acta Physiologiae Plantarum* 32(4):615-619.
- Arora NK and Verma M, (2017). Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria. Vol : 3 7:381.

## Références Bibliographiques

---

- Ashita S, Jatinder KK, Mandeep k and Avinash KN, (2016). Heavy Metal Pollution: Chapter1 a global pollutant of Rising Concern.
- Asrari E, (2014). Heavy Metal : contamination of water and soil analysis, assessment, and remediation strategies. International Standard Toronto, Canada.
- Austin C and Vincent SG, (2018). Heavy Metals and Cancer : Cancer causing substances. Licensee IntechOpen. Ca
- Awasthi G, Chester A, Chaturvedi R, and Prakash J, (2015). Study on role of *Pseudomonas aeruginosa* on heavy metal bioremediation. Int. J. Pure App. Biosci, 3(4), 92-100.

### B

- Badr MF and El-Habit O, (2018). Heavy Metal Toxicity Affecting Fertility and Reproduction of Males. 1Suez Canal University, Ismailia, Egypt; 2Helwan University, Cairo, Egypt pp : 294-295.
- Belabed S, (2018). Contribution à l'Etude de la Pollution Métallique du Sol et de la Végétation au Niveau des Décharges publiques non Contrôlées à Mostaganem. Thèse pour l'obtention diplôme de doctorat. Université Abdelhamid Ibn-Badis Mostaganem, Algérie.
- Berdoulay M, (2008). Analyses physico-chimiques et microbiologique de façades en pierre exposées aux embruns marins du Golfe de Gascogne. Thèse pour l'obtention diplôme de doctorat. Université de Pau et des Pays de l'Adour. France.
- Boudenne J, Coulomb B and Prudent P, (2011). Technologies avancées de remédiation in situ des sols pollués par les métaux lourds. Bulletin de veille scientifique no 13.
- Braud A, Jézéquel K, Bazot S and Lebeau T, (2009). Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. *Chemosphere*, vol 74: 280– 286.
- Bultreys A, Gheysen I, Wathelet B, Maraite H and Hoffmann E, (2002). High-Performance Liquid Chromatography Analyses of Pyoverdin Siderophores Differentiate among Phytopathogenic Fluorescent *Pseudomonas* Species. Applied and environmental microbiology. Vol: 69, No 2: 1143–1153.

### C

- Cao A, Carucci A and Lai T, (2008). Causes and effects of heavy metal pollution. Nova Science Publishers, Inc New York. Université de Cagliari, Cagliari, Italy, vol 407: 129-130.
- Castaneda GC, Munoz JJ and Peralta-Videa JR, (2005) A spectrophotometric method to determine the siderophore production strains of fluorescent *Pseudomonas* in the presence by of copper and iron. *Microchemical Journal*. Vol81: 35– 40.
- Choudhary S and Sar P, (2009). Characterization of a metal resistant *Pseudomonas* sp. isolated from uranium mine for its potential in heavy metal (Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, and Cd<sup>2+</sup>) sequestration. *Bioresource Technology*. Vol 100: 2482–2492.
- Colombowala A and Aruna K, (2018). Studies on optimization of siderophores production by *Pseudomonas aeruginosa* Azar 11 isolated from aquatic soil and its antibacterial activity. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. Vol 8(4) : 714-731.

### D

- Das A and Osborne JW, (2018). *Bioremediation of Heavy Metals*, Springer International Publishing AG vol 302: 279-280.
- Davis TA, Volesky B and Mucci A, (2002). A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research*, vol 37: 4311–4330.
- Dell Amico E, Cavalca L and Andreoni V, (2005). Analysis of rhizobacterial communities in perennial Gramineae from polluted water meadow soil, and screening of metal-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria *FEMS Microbiology Ecology*, vol 52: 153–162.
- Duffus JH, (2002). Heavy metals : a meaningless term? *Pure Appl. Chem.*, Vol : 74, No. 5 :793–807.

## Références Bibliographiques

---

### Æ

- El Baz S, Baz M, Barakate M, Hassani L, El Gharmali A and Imzilin B, (2014). Resistance to and accumulation of heavy metals by actinobacteria isolated from abandoned mining areas. *The Scientific World Journal*.
- El-Sheikh MA, El-Kazzaz AS, Hafez EE, Madkour SA and El-Gayya SM, (2011). Detection, purification, and identification of siderophores produced by *Pseudomonas fluorescens* isolates using SDS-PAGE and HPLC. *J. Plant Prot. and Path.*, Mansoura Univ. Vol. 2 (7): 691 – 705.
- Embaby A, Heshmat Y and Hussein A, (2016). Unusual non-fluorescent broad spectrum siderophore activity (SID EGYII) by *Pseudomonas aeruginosa* strain EGYII DSM 101801 and a new insight towards simple siderophore bioassay. *AMB Express*. Vol 6: 26.

### F

- Fasim F, Ahmed N, Parsons R and Gadd G, (2002). Solubilization of zinc salts by a bacterium isolated from the air environment of a tannery. *FEMS Microbiology Letters*. Vol 213.
- Ferret C, (2012). Rôle des *Pseudomonas* fluorescents dans la biodisponibilité des métaux contaminant les minéraux du sol : application à la phytoremédiation. Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat. Université de Strasbourg Biotechnologies et Signalisation Cellulaire. Strasbourg, France.

### G

- Gaonkar T and Bhosle S, (2013). Effect of metals on a siderophore producing bacterial isolate and its implications on microbial assisted bioremediation of metal contaminated soils. Elsevier Ltd. All rights reserved. University, Taleigao Plateau, Goa 403 206, India.
- Ghali S, (2008). Étude de la carbonisation d'un précurseur végétal, les noyaux d'olive utilisation dans le traitement des eaux. Thèse pour l'obtention diplôme de doctorat. Université de 20 août 1955 Skikda. Skikda, Algérie.

### H

- Hassan SHA, Abskharon RNN, Gad El-Rab SMF and Shoreit AAM, (2007). Isolation, characterization of heavy metal resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from polluted sites in Assiut city, Egypt. *Journal of Basic Microbiology*. Vol 48: 168–176.
- Hazotte A, (2016). Rôle de métabolites bactériens dans la mobilisation du césium d'une illite dopée : étude mécaniste et application à la phytoextraction. Thèse pour l'obtention diplôme de doctorat. Université de Nantes Angers Le Mans. Nantes, France
- Hernlem BJ, Vane LM, and Sayles GD, (1999). The application of siderophores for metal recovery and waste remediation: examination of correlations for prediction of metal affinities. *Water Res*, vol 33: 951– 960.
- Hosam El-Din MS and Refaat FA, (2018). Heavy metals Edited by First published in London, United Kingdom vol: 383.
- Horner-Devine MC, Leibold MA, Smith VH and Bohannon BJM, (2003). Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology Letters*, vol 6 : 613-622
- Huo Y, Kang JP, Ahn CY, Kim J, Piao CH, Yang DU and Yang DC, (2020). Siderophore-producing rhizobacteria reduce heavy metal-induced oxidative stress in *Panax ginseng* Meyer, *Journal of Ginseng Research*, <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2019.12.008>

### J

- Jobby R and Desai N, (2017). Bioremediation of Heavy Metals. *Environmental Sci. & Eng. Mumbai, Bhatan, Inde Panvel* vol : 819 :503

### K

- Khalilzadeh P, (2009). Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*: évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing. Thèse pour l'obtention diplôme de doctorat. Université de Toulouse. France.
- Kumar A and Aery NC, (2004). Impact, Metabolism, and Toxicity of Heavy Metals in Plants. Springer Nature Singapore. University of Rajasthan, Jaipur 302004, Rajasthan, India.

## Références Bibliographiques

---

- Kumar R, Nongkhlaw M, Acharya C and Joshi SR, (2013). Growth media composition and heavy metal tolerance behaviour of bacteria characterized from the sub-surface soil of uranium rich ore bearing site of Domiasiat in Meghalaya. *Indian journal of biotechnology*. Vol 12 : 115-119.
- Kumar V S, Menon S, Agarwal H, and Gopalakrishnan D, (2017). Characterization and optimization of bacterium isolated from soil samples for the production of siderophores. Published by Elsevier.
- Kumar PS and Gunasundari E, (2018). Bioremediation of Heavy Metals. *Bioremediation: Applications for Environmental Protection and Management, Energy, Environment, and Sustainability*.

### L

- Lallement M, (2017). Métaux lourds : la pollution invisible qui « plombe » votre santé. Centre Anticancéreux. *Project. Nutrients*. Vol 29: 9 (9).
- Larbi Daouadji K, (2015). Isolement et caractérisation des souches productrices de lipase. Thèse pour l'obtention diplôme de doctorat. Université Djillali Liabes. Algérie.
- Limae Silva A, Carvalho M, Souza S, Teixeira D P, Silva F R, Meirelles S C, Bento C and Hofer E, (2011). Heavy metal tolerance (Cr, Ag AND Hg) in bacteria isolated from sewage. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol (2012): 1620-1631.

### M

- Matyar F, Akkan T, Uçak Y and Eraslan B, (2009). *Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). *Environ Monit Assess*. Vol 167: 309–320.
- Mehta SK and Gaur JP, (2005). Use of Algae for Removing Heavy Metal Ions From Wastewater: Progress and Prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*, vol 25:113–152.
- Meliani A, (2012). Contribution à l'étude de la diversité écologique et fonctionnelle des *Pseudomonas fluorescens*. Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat. Université d'Oran. Oran, Algérie.

## Références Bibliographiques

---

- Mench MJ and Fargues S, (1994). Metal uptake by iron-efficient and inefficient oats . Plant soil. Vol 165: 227–258.
- Mezaache S, (2012). Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de pseudomonas isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. Thèse pour l'obtention diplôme de doctorat. Université Ferhat Abbas Sétif. Sétif, Algérie.

### N

- Naz T, Khan MD, Ahmed I, Rehman S, Rha ES, Maloo I and Jamil M, (2016). Biosorption of heavy metals by Pseudomonas species isolated from sugar industry. Toxicology and Industrial Health, vol 32(9): 1619–1627.
- Neubauer U, Nowak B, Furrer G, and Schulin R, (2000). Heavy metal sorption on clay minerals affected by the siderophore desferrioxamine B. *Environ Sci Technol*, vol 34: 2749–2755.
- Nouri M and Haddioui A, (2016). Les techniques de dépollution des sols contaminés par les métaux lourds: une revue. Maghrebien Journal of Pure and Applied Science, vol 2 (2) : 47-58.

### O

- Otmani H, (2018). Evaluation de la toxicité de quelques métaux lourds sur le comportement d'un modèle animal du groupe des Coelomates. Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat. Université Badji Mokhtar. Annaba, Algérie.

### P

- Patel PR, Shaikh SS and Sayyed RZ, (2016). Dynamism of PGPR in bioremediation and plant growth promotion in heavy metal contaminated soil. Indian Journal of Experimental Biology. Vol 54 : 286-290
- Pluhacek T, Lemr K, Ghosh D, Milde D, Novak J, and Havlicek V, (2014). Characterization of microbial siderophores by mass spectrometry. Wiley Online Library.

## Références Bibliographiques

---

- Purwanti IF, Putri TP, Budi S and Kurniawan SB, (2017). Treatment of chromium contaminated soil using bioremediation. Proceedings of the 3rd international conference on construction and building engineering.

### R

- Rajkumar M, Ae N, Prasad MNV and Freitas H, (2010). Potential of siderophore producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol* vol 28: 142– 149.
- Rathnayake IVN, Megharaj M, Krishnamurti GSR, Bolan NS and Naidu R, (2012). Heavy metal toxicity to bacteria – Are the existing growth media accurate enough to determine heavy metal toxicity. *Chemosphere*. Vol 90: 1195–1200.
- Ravindra S, Narendra KA, Jagrati T and Jyotsana P, (2018). Review on sources and effect of heavy metal in soil : Its bioremediation. *International Journal of Research in Applied, Natural and Social* vol : 1-22
- Redon P, (2009). Rôle de champignons mycorhiziens à arbuscules dans le transfert du cadmium (Cd) du sol à la luzerne (*Medicago truncatula*). Thèse pour l'obtention diplôme de doctorat en Sciences du Sol. Université Henri Poincaré, Nancy I. France.

### S

- Sardrood BP, Goltapeh ME, and Varma A, (2013). An introduction to bioremediation. In : *Fungi as bioremediators*. Springer, Berlin, Heidelberg, vol 32 p: 3-27.
- Satapute P, Paidi MK, Kurjogi M and Jogaiah S, (2019). Adaptation and spectral annotation of Arsenic and Cadmium heavy metal-resistant and susceptible strain *Pseudomonas taiwanensis*. *Environmental Pollution* 251.
- Sayyed RZ, Badgujar MD, Sonawane HM, Mhaske MM and Chincholkar SB, (2005). Production of microbial iron chelators Siderophores by fluorescent *Pseudomonads*. *Indian Journal of Biotechnology*. Vol: 4 pp 484-490.
- Sayyed RZ, Patel PR and Reddy MS, (2013). Role of PGPR in the bioremediation of heavy metal ions and plant growth promotion of wheat and peanut grown in heavy metal contaminated soil. Chapter 7 :106-120.

## Références Bibliographiques

---

- Sa-uth C, Rattanasena P, Chandrapatya A and Bussaman P, (2018). Modification of medium composition for enhancing the production of antifungal activity from *Xenorhabdus stockiae* PB09 by using response surface methodology. International Journal of Microbiology.
- Schalk IJ, Hannauer M and Braud A, (2011). New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance Environmental Microbiology. Université de Strasbourg-CNRS, ESBS, Blvd Sébastien Brant, Strasbourg, France. Vol 13(11) : 2844–2854.
- Schwyn B and Neilands JB, (1987). Universal chemical assay for detection and determination of siderophores. Anal. Biochem. Vol 160: 40–47.
- Sebihi FZ, (2016). Effet PGPR des souches de *Pseudomonas fluorescens* isolées de la rhizosphère du blé cultivé dans la région de Constantine. Thèse pour l'obtention diplôme de doctorat. Université des frères Mentouri. Constantine, Algérie.
- Sefraoui I, (2015). Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau de différents hôpitaux de l'ouest algérien. Thèse pour l'obtention diplôme de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid. Algérie.
- Sevgi E, Gokhan C, Gizr M and Sang-n K, (2009). Investigation of heavy metal resistance in some bacterial strains isolated from industrial soils. Turk J Biol. Vol 34: 423-431.
- Sharma P and Kaur M, (2016). Siderophore production from Fluorescent *Pseudomonas* sp. isolated from apple rhizosphere. Advances in Life Sciences. Vol : 5(23).
- Sirven JB, (2006). Détection de métaux lourds dans les sols par spectroscopie d'émission sur plasma induit par laser (LIBS). Université des Sciences et de la Technologies Bordeaux I de Physique et de l'ingénieur France.
- Solbi S, (2013). Effet de repiquage de *Pseudomonas Aeruginosa* sur caractères morphologiques, biochimiques et sensibilité aux antibiotiques. Université Mohammed V. Maroc.
- Syed SA and Vidhale NN, (2011). Evaluation of siderophores produced by *Pseudomonas aeruginosa*. International Journal of Microbiology Research. Vol 3(3): 131-135.

## Références Bibliographiques

---

- Syed SA and Vidhale NN, (2013). Bacterial Siderophore and their Application: A review International Journal of Current Microbiol and Applied Sciences. Vol 2(12): 303-312.

### T

- Tournus C, (2016). Validation de l'identification des *Pseudomonas* sp. par spectrométrie de masse type MALDI-TOF via la caractérisation d'une collection de souches environnementales et cliniques. Thèse pour l'obtention diplôme de doctorat. Université de Roue. France.

### U

- Usman K, Al-Ghouthi MA and Abu-Dieyeh MH, (2018). Phytoremediation: Halophytes as Promising Heavy. College of Arts and Sciences, Qatar. Université de Doha. Doha, Qatar.

### V

- Vandebossche M, Jimenez M, Casetta M and Traisnel M, (2014). Remediation of Heavy Metals by Biomolecules. A review. Critical Reviews in Environmental Science and Technology.

### W

- Wichard T, Bellenger JP, Morel FM, and Kraepiel AM, (2009). Role of the siderophore azotobactin in the bacterial acquisition of nitrogenase metal cofactors. *Environ Sci Technol*, vol 43: 7218– 7224.
- Wuana RA, Okieimen FE and Imborvungu JA, (2010). Removal of heavy metals from a contaminated soil using organic chelating acids. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* Vol 7 (3): 485-496.
- Wuana RA and Okieimen FE, (2011). Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. Copyright journal. Université de Makurdi 970001, Nigeria.

## *Références Bibliographiques*

---

### Z

- Zaidi A, Wani PA and Khan MS, (2012). Editors toxicity of heavy metals to legumes and bioremediation. Aligarh Muslim University Aligarh, India.
- Zawadzka AM, Vandecasteele FPJ, Crawford RL and Paszcynsk AJ, (2006). Identification of siderophores of *pseudomonas stutzeri*. Can j microbiol. Vol 52: 1164-1176.

# *Annexes*

### **Annexe N° 01 : Mode opératoire de la galerie API NE 20.**

#### **Préparation, inoculation et incubation de la galerie :**

Les alvéoles du support de la galerie doivent être remplis d'eau pour former une chambre humide, dans laquelle notre galerie est déposée, le remplissage des microtubes avec une suspension d'opacité égale à 0,5 de McFarland suit des règles bien précises :

- Pour les substrats dont le sigle est encadré, la cupule doit être totalement remplie de manière à créer un ménisque.
- Pour les substrats dont le sigle est souligné, la cupule doit être remplie d'huile de paraffine pour créer l'anaérobiose (absence d'oxygène), et pour maintenir en solution les ions volatils produits par la réaction et ainsi assurer le virage de l'indicateur coloré de pH.

La galerie est incubée à une température de  $29^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures ( $\pm 2$  heures).

- **La révélation et la lecture :**

Après addition des réactifs nécessaires à la révélation de différents tests, la galerie est lue conformément aux indications du fabricant.

## Annexe N°02 : Lecture de la galerie miniaturisée API 20 NE (Tournus, 2016).

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO <sub>3</sub>	potassium nitrate	0,136	réduction des Nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 min	
			réduction des Nitrates en azote	incolore	rose-rouge
TRP	L-tryptophane	0,2	formation d'indole (TRYPTOPHANE)	Zn / 5 min	
				incolore vert pâle / jaune	rose incolore
GLU	D-glucose	1,92	fermentation (GLUCOSE)	bleu à vert	jaune
ADH	L-arginine	1,92	Arginine DiHydrolase	jaune	orange / rose / rouge
URE	urée	0,76	UREase	jaune	orange / rose / rouge
ESC	esculine citrate de fer	0,56 0,072	hydrolyse (β-glucosidase) (ESCULINE)	jaune	gris / marron / noir
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl-β-D-galactopyranoside	0,22	β-galactosidase (Para-NitroPhényl-β-D-Galactopyranosidase)	incolore	jaune
GLU	D-glucose	1,56	assimilation (GLUCOSE)	transparence	trouble
ARA	L-arabinose	1,4	assimilation (ARABINOSE)	transparence	trouble
MNE	D-mannose	1,4	assimilation (MANNOSE)	transparence	trouble
MAN	D-mannitol	1,36	assimilation (MANNITOL)	transparence	trouble
NAG	N-acétyl-glucosamine	1,28	assimilation (N-ACÉTYL-GLUCOSAMINE)	transparence	trouble
MAL	D-maltose	1,4	assimilation (MALTose)	transparence	trouble
GNT	potassium gluconate	1,84	assimilation (potassium GLUCONATE)	transparence	trouble
CAP	acide caprique	0,78	assimilation (acide CAPrique)	transparence	trouble
ADI	acide adipique	1,12	assimilation (acide ADIrique)	transparence	trouble
MLT	acide malique	1,56	assimilation (MaLaTe)	transparence	trouble
CIT	trisodium citrate	2,28	assimilation (trisodium CITrate)	transparence	trouble
PAC	acide phénylacétique	0,8	assimilation (acide PhénylACétique)	transparence	trouble

**Annexe N° 03** : les compositions des principaux milieux de culture (g/ litre).

Milieu tris minimantl ( <b>Fasim et al.,2002</b> )	Luria Bertani (LB) ( <b>Sa-uth et al., 2018</b> )
Tris-HCl .....6.06 g	Tryptone.....10.0 g
NaCl .....4.68 g	Extrait de levure.....5.0g
KCl.....1.49 g	NaCl .....10.0g
NH <sub>4</sub> Cl.....1.07 g	
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....0.43 g	
MgCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....0.2 g	
D-glucose.....1.0 g	
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O..... 0.03g	
Gélose nutritive ( <b>Berdoulay, 2008</b> )	Milieu Sel minéral (MSM) ( <b>Edi, 2006</b> )
Extrait de viandes.....1g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....4.0 g
Extrait de levures.....2g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....1.5g
Peptone.....5g	NH <sub>4</sub> Cl.....1.0g
Chlorure de sodium .....5g	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O .....0.2g
Agar.....15g	Eau distillée.....1000ml
	Ajuster à un PH= 7.