

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
**Université A. MIRA - Béjaia**

*Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie*  
*Département de microbiologie*  
*Spécialité : Ecologie microbienne*



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

**MASTER**

*Thème*

**Contribution à l'étude des bactéries symbiotiques  
originaires de sols pollués par les métaux lourds**

Présenté par :

**BOUSSEKINE Massinissa**

Soutenu le : **16 Septembre 2021**

Devant le jury composé de :

SAIDANI Karima  
SALMI Adouda  
BENSAID Karim

MCB  
MCB  
MAA

Présidente  
Encadreuse  
Examineur

**Année universitaire : 2020/2021**

# Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

À la mémoire de ma chère grand-mère Yemma Zahwa ;

À la mémoire de tous les êtres chers à moi qui ne sont plus de ce monde ;

À mes parents qui sont à l'origine de ma réussite,  
Qui ont cru en moi et qui m'ont soutenu avec amour, patience et énormément de  
sacrifices tout au long de mon parcours.

À mes deux chers frères Yanis et Jugurtha ;

À toute ma famille ;

À mes chers ami(e)s et camarades.

# Remerciements

Je tiens en premier lieu à présenter l'expression de ma profonde gratitude et mes remerciements les plus sincères à ma promotrice **Mme SALMI Adouda** pour son dévouement, sa disponibilité et pour la qualité d'encadrement dont j'ai bénéficié.

Je tiens à exprimer également mes plus chaleureux remerciements à tout le personnel du Laboratoire d'Ecologie Microbienne (LEM) de l'université de Bejaia pour le bon accueil et la bonne atmosphère de travail qu'ils m'ont réservé.

Je remercie également l'ensemble des membres du jury : **Mme SAIDANI Karima**, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury ainsi que **Mr BENSAID Karim** pour avoir accepté d'évaluer ce travail et de me faire part de ses fructueuses remarques.

Mes sincères remerciements vont à tous les enseignants de l'Université de Bejaia qui ont contribué à ma formation durant les deux cycles universitaires et à toutes celles et tous ceux, de près ou de loin, ont contribué à ma réussite, plus particulièrement Mr Barache Nacim.

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

**Introduction.....1**

## **Synthèse bibliographique**

**I. Métaux lourds ..... 3**

I.1. Généralités..... 3

I.2. Origines de contamination des sols par les métaux lourds..... 3

I.2.1. Origine naturelle ..... 3

I.2.2. Origine anthropique ..... 3

I.3. Impact des métaux lourds..... 4

**II. Stratégies conventionnelles de la remédiation des sols pollués par les métaux lourds.....5**

II.1. La bioremédiation ..... 6

II.1.1. La phytoremédiation ..... 6

II.1.2. La rhizoremediation..... 9

**III. La symbiose rhizobium-légumineuse dans la bioremediation..... 9**

III.1. Symbiose rhizobium-légumineuse ..... 9

III.2. Application des symbioses rhizobium-légumineuse dans la bioremediation des sols contaminés par des métaux lourds ..... 9

## **Matériel et Méthodes**

**I. Matériel biologique..... 12**

**II. Méthodes..... 12**

II.1. Revivification des deux souches conservées..... 12

**III. Effet du mercure et du plomb sur les souches étudiées..... 13**

III.1. Etude de la résistance des souches au mercure et au plomb : détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) ..... 13

III.2. Effet du mercure sur la croissance des souches bactériennes ..... 14

<b>IV.</b>	<b>Recherche de caractéristiques promotrices de la croissance des plantes (PGP)</b>	<b>14</b>
IV.1.	Production d'acide indole acétique (AIA)	14
IV.2.	Production de sidérophores	15
IV.3.	Solubilisation de phosphate tricalcique	15
<b>V.</b>	<b>Effet du mercure sur les caractéristiques promotrices de la croissance des plantes (PGP) retrouvées</b>	<b>16</b>
V.1.	Effet du mercure sur la production de l'acide indole acétique (AIA)	16
V.2.	Effet du mercure sur la production des sidérophores	16
<b>VI.</b>	<b>Recherche des activités enzymatiques</b>	<b>16</b>
VI.1.	Recherche de l'activité réduction des nitrates	16
VI.2.	Recherche de l'activité uréasique	17
VI.3.	Recherche de l'activité pectinolytique	18
VI.4.	Recherche de l'activité cellulasique (CMCase)	18
VI.5.	Recherche de l'activité gélatinase	18
VI.6.	Recherche de l'activité chitinasique	18
<b>Résultats et Discussion</b>		
<b>I.</b>	<b>Caractérisation morphologique des colonies</b>	<b>19</b>
<b>II.</b>	<b>Effet du mercure et du plomb sur les souches étudiées</b>	<b>20</b>
II.1.	Etude de la sensibilité des souches vis-à-vis du Mercure (Hg) et du plomb (Pb) : Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)	20
II.2.	Effet du mercure sur la croissance des souches bactériennes	22
<b>III.</b>	<b>Recherche de caractéristiques promotrices de la croissance des plantes (PGP)</b>	<b>24</b>
III.1.	Production d'acide indole acétique (AIA)	24
III.2.	Production de sidérophores	25
III.3.	Solubilisation de phosphate tricalcique	26
<b>IV.</b>	<b>Effet du mercure sur les caractéristiques promotrices de la croissance des plantes (PGP) retrouvées</b>	<b>26</b>

IV.1.	Effet du mercure sur la production de l'acide indole acétique (AIA).....	26
IV.2.	Effet du mercure sur la production des sidérophores.....	29
<b>V.</b>	<b>Recherches des activités enzymatiques.....</b>	<b>30</b>
V.1.	Recherche de l'activité réduction des nitrates.....	30
V.2.	Recherche de l'activité uréasique.....	30
V.3.	Recherche de l'activité pectinolytique.....	30
V.4.	Recherche de l'activité cellulasique (CMCase).....	30
V.5.	Recherche de l'activité gélatinasiq.....	30
V.6.	Recherche de l'activité chitinasique.....	30
	<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>32</b>

### Références bibliographiques

### Annexes

<b>Tableau I</b> : Les différents types de procédés de phytoremédiation.....	8
<b>Tableau II</b> : Caractères cultureux des deux souches csM08 et csG12.....	19
<b>Tableau III</b> : Résultats du test de la sensibilité des souches csM08 et csG12 vis-à-vis des différentes concentrations du mercure sur milieu YMA. ....	20
<b>Tableau IV</b> : Résultats du test de la sensibilité des souches csM08 et csG12 vis-à-vis des différentes concentrations du plomb sur milieu YMA.....	20
<b>Tableau V</b> : Temps de génération et le taux de croissance de la souche csM08 sous différentes concentrations du mercure. ....	23
<b>Tableau VI</b> : Temps de génération et le taux de croissance de la souche csG12 sous différentes concentrations du mercure.....	23
<b>Tableau VII</b> : Récapitulatif des tests de la mise en évidence de quelques Activités enzymatiques chez les souches csM08 et csG12. ....	31

<b>Figure 1</b> : Origines de la contamination des sols par les métaux lourds. ....	4
<b>Figure 2</b> : Comparaison entre les différentes méthodes de décontamination des sols .....	6
<b>Figure 3</b> : revivification des souches bactériennes sur milieu YMB et vérification de leurs pureté sur milieu YMA. ....	13
<b>Figure 4</b> : Mise en évidence de la production des sidérophores. ....	15
<b>Figure 5</b> : Recherche de l'activité réduction des nitrates. ....	17
<b>Figure 6</b> : Aspect morphologique des cultures formées par les souches csM08 et csG12 sur milieu YMA. ....	19
<b>Figure 7</b> : exemple de croissance et d'absence de croissance des souches sur milieu YMA..	20
<b>Figure 8</b> : courbe de croissance de la souche csM08 pendant 240 heures (10 jours) sous l'effet de différentes concentrations du mercure inférieures à la CMI.....	22
<b>Figure 9</b> : courbe de croissance de la souche csG12 pendant 240 heures (10 jours) sous l'effet de différentes concentrations du mercure inférieures à la CMI. ....	23
<b>Figure 10</b> : apparition d'une coloration rose indiquant la production de l'AIA par les deux souches. ....	24
<b>Figure 11</b> : Production d'AIA ( $\mu\text{g/ml}$ ) par les deux souches csM08 et csG12. ....	25
<b>Figure 12</b> : Les résultats obtenus du test de la production de sidérophore.....	26
<b>Figure 13</b> : apparition d'une coloration rose sur les différents milieux des deux souches bactériennes en présences des concentrations du (Hg) inférieures à la CMI. ....	27
<b>Figure 14</b> : les concentrations d'Acide Indole Acétique produites par les deux souches en présence de concentrations distinctes du mercure.....	27
<b>Figure 15</b> : Analyse de corrélation entre les concentrations d'AIA produites par les deux souches avec les concentrations du mercure ajoutées. ....	28

**YMA:** Yeast-mannitol-agar

**YMB:** Yeast-mannitol-broth

**LB:** Luria Bertani

**PGPR:** Plant Growth Promoting Rhizobacteria

**CMI:** Concentration Minimale Inhibitrice

**AIA:** Acide Indole Acétique

**Hg:** Mercure

**Pb:** Plomb

**DO:** Densité Optique

**PGP:** Plant Growth-Promoting

# **Introduction**

« A Azzaba, on meurt lentement mais sûrement du mercure » rapporte le quotidien El-Watan dans un article paru le : 08 Mai 2015. Le journal évoque dans cet article les souffrances de la population du village Bouzra à 7 km du chef-lieu d'Azzaba (Nord-Est de l'Algérie) qui se situe entre l'usine de transformation et la mine d'extraction de pierres de mercure qui attend depuis des années que le site soit décontaminé. « La majorité des personnes qui habitent autour de l'usine sont malades ...Il y a des gens qui meurent chaque année à cause des maladies liées à l'intoxication au mercure...» affirment des riverains dans des témoignages accordés au journal. Le même quotidien avait publié le : 12 Septembre 2011, une enquête « Du mercure à l'air libre à Azzaba » où il rapporte selon des travaux d'universitaires algériens que le site est hautement pollué enregistrant des concentrations mercurielles qui dépassent de 40 fois la norme selon le journal.

Cette catastrophe n'est qu'un échantillon d'une tragédie écologique planétaire. La pollution est devenue une préoccupation majeure du monde contemporain. L'activité économique génératrice de la richesse et du progrès humain est également la principale cause d'un marasme environnemental qui ne cesse de s'amplifier.

La contamination des sols par des polluants organiques et inorganiques suscite de vives inquiétudes et l'introduction intentionnelle ou accidentelle de ces substances provoque de graves répercussions sur la santé publique et sur l'environnement (Ali et Khan, 2018 ; Tangahu *et al.*, 2011). Les métaux lourds constituent l'une des principales catégories de ces polluants. Ce sont des éléments non dégradables (Cristaldi *et al.*, 2017) et leur accumulation dans l'environnement engendre la déstabilisation des écosystèmes en menaçant la santé humaine, animale et végétale (Salmi et Boulila, 2021).

Pour la réhabilitation des sols contaminés par des métaux lourds, certaines méthodes physico-chimiques sont utilisées, sauf que ces procédés peuvent eux aussi engendrer des dommages écologiques en provoquant une forte diminution de la fertilité et de la productivité du sol. D'où la nécessité de faire recours à des techniques biologiques (Vavasseur, 2014).

La Bioremédiation constitue une alternative prometteuse. C'est une technologie rentable, efficace, écologique et respectueuse de l'environnement (Sumiahadi et Acar, 2018). La phytoremediation est l'une des branches de la bioremediation, elle consiste à l'utilisation de différentes espèces de plantes capables d'accumuler les contaminants (Cristaldi *et al.*, 2017) à l'instar des légumineuses qui ont été proposées comme des espèces pertinentes pour la bioremédiation, principalement en raison de leur capacité à coloniser les terres marginales

et les sols pauvres en nutriments ainsi que leurs performances hyper-accumulatrices de métaux lourds (Fagorzi et *al.*, 2018).

Les rhizobiums présentant une tolérance aux métaux lourds forment une relation symbiotique avec les légumineuses en augmentant la productivité et le rendement des plantes dans les sols contaminés par ces polluants. Ces rhizobia résistants aux métaux lourds possèdent des caractéristiques favorisant la croissance des plantes, notamment la fixation de l'azote, la solubilisation du phosphore, la synthèse des phytohormones, la production et la libération de sidérophores...ce qui stimule la croissance des légumineuses tout en réduisant la toxicité des métaux (Brígido et Glick, 2015).

Ce présent travail s'inscrit dans cette optique en contribuant à l'étude de deux souches bactériennes appartenant au genre *Bradyrhizobium* isolées à partir des nodules racinaires de *Calicotome spinosa* originaire des mines de mercure de Azzaba au Nord-Est de l'Algérie ; une étude qui peut servir éventuellement dans un projet de bioremédiation de ce site contaminé ainsi mettre fin à ce drame environnemental.

Cette étude s'articule principalement sur 3 parties : la première partie est consacrée à la synthèse bibliographique en rapportant l'essentiel de la littérature scientifique sur la thématique. La deuxième partie est celle de matériels et méthodes en exposant les protocoles utilisés pour la réalisation des différents tests. La troisième partie est consacrée à la présentation des résultats obtenus ainsi que leur interprétation et discussion.

Enfin, une conclusion résumant les principaux résultats obtenus dans le travail mené a été faite et des perspectives ont été proposées afin de faire avancer cette étude.

**Synthèse**  
**bibliographique**

## **I. Métaux lourds**

### **I.1. Généralités**

Les métaux lourds est un terme attribué aux éléments métalliques ayant une masse volumique supérieure à 5 g/cm<sup>3</sup>. De ce fait, 53 éléments chimiques sont considérés comme des métaux lourds tels que le mercure (Hg), le plomb (Pb), le chrome (Cr), le cadmium (Cd), l'arsenic (As) (Li et *al.*, 2019).

Les métaux lourds sont des éléments non dégradables (Cristaldi et *al.*, 2017) et leur accumulation dans l'environnement provoque la déstabilisation des écosystèmes en menaçant la santé humaine, animale et végétale (Salmi et Boulila, 2021).

Selon l'agence pour les substances toxiques et le registre des maladies (ATSDR) et l'agence de protection de l'environnement des États-Unis (US EPA), quatre métaux lourds à savoir : l'arsenic (As), le plomb (Pb), le cadmium (Cd) et le mercure (Hg), figurent parmi les vingt substances les plus nocives pour la santé publique en raison du niveau élevé de leur toxicité (Khalid et *al.*, 2017).

### **I.2. Origines de contamination des sols par les métaux lourds**

Les sources des métaux lourds présents dans les sols peuvent être naturelles ou générer par des activités anthropiques (Figure 1) (Oves et *al.*, 2012).

#### **I.2.1. Origine naturelle**

L'activité volcanique, le transport des poussières et l'altération des roches contenant des métaux lourds sont des sources naturelles de la contamination des sols par ces polluants (Ernst, 1998).

#### **I.2.2. Origine anthropique**

Les activités anthropiques dans les sols comme l'exploitation des mines et des fonderies, l'utilisation de pesticides et de boues d'épuration enrichies en métaux dans l'agriculture, la combustion de combustibles fossiles, les industries métallurgiques et électroniques (fabrication, utilisation et élimination), les entraînements militaires... (Alloway, 1995).

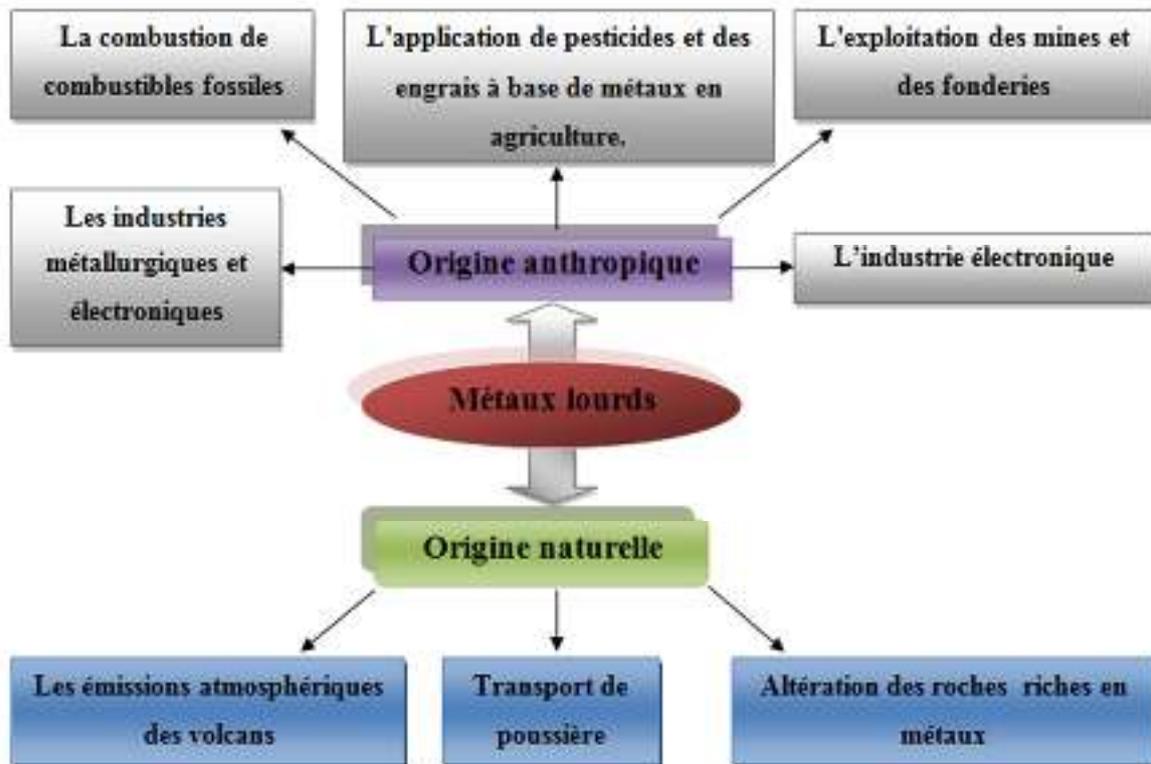


Figure 1 : Origines de la contamination des sols par les métaux lourds (Oves et *al.*, 2012).

### I.3. Impact des métaux lourds

#### ➤ Impact sur la santé humaine

Les métaux lourds seraient à l'origine de plusieurs maladies chez l'Homme, notamment des troubles cardiovasculaires, des cancers, des troubles cognitifs, une anémie chronique, des dommages aux reins, au système nerveux, au cerveau, à la peau et aux os (Khalid et *al.*, 2017).

#### ➤ Impact sur la plante

L'absorption des métaux lourds polluant le sol par les plantes engendre l'accumulation de ces substances dans les tissus végétaux provoquant ainsi des effets phytotoxiques comme : la chlorose, la nécrose, le flétrissement, le brunissement des extrémités des feuilles et l'inhibition de la croissance (Ghnaya et *al.*, 2015).

Les métaux lourds affectent également le processus de la fixation de l'azote chez les bactéries rhizosphériques ; des fournisseurs importants de l'azote pour les plantes, ce qui implique la réduction des performances symbiotiques de ces microorganismes ce qui influence systématiquement sur la plante (Koomen et *al.*, 1990).

➤ **Impact des métaux lourds sur les microorganismes telluriques**

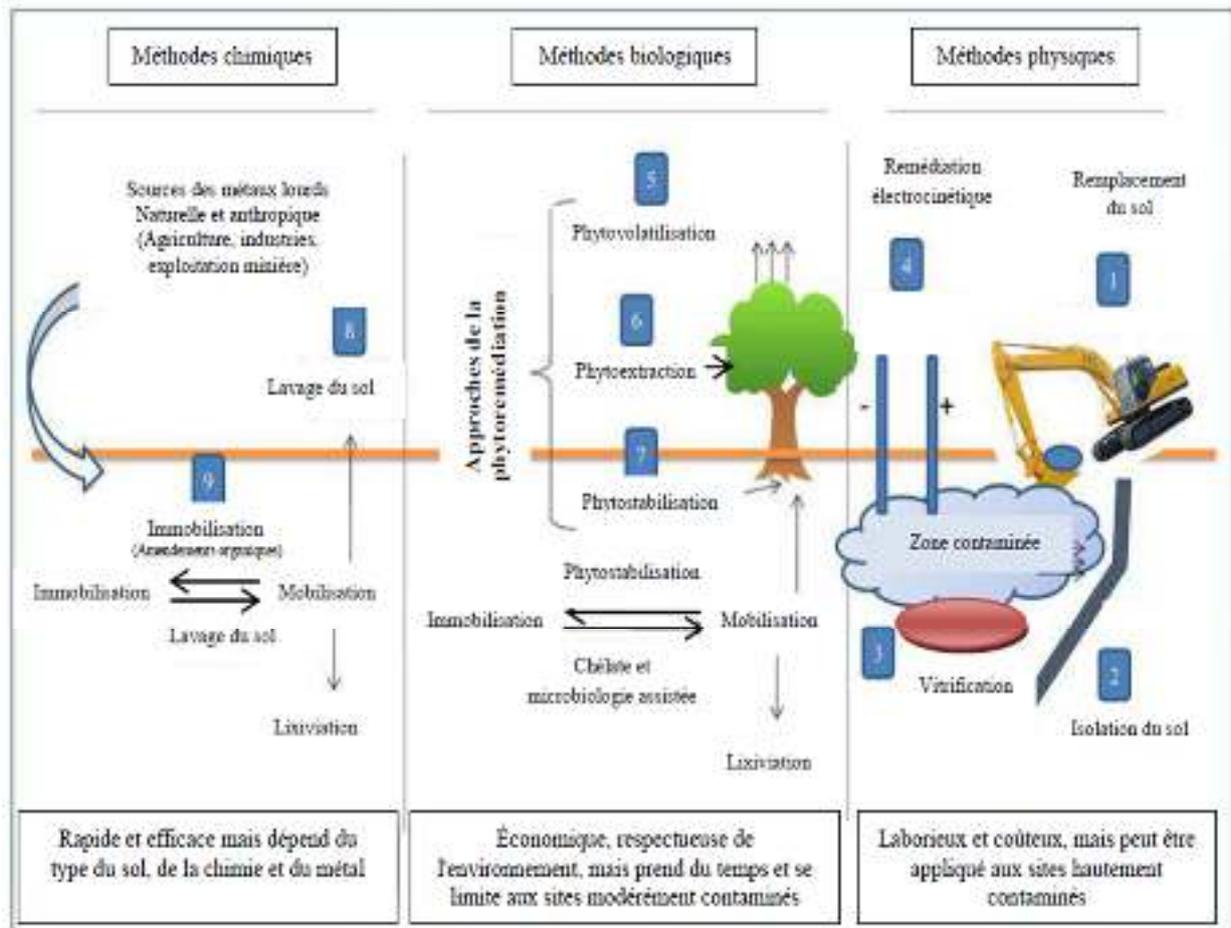
Les métaux lourds provoquent des effets néfastes sur les microorganismes, plus particulièrement sur la flore tellurique, en affectant leur croissance, leur morphologie et leurs activités. Les métaux peuvent également exercer une pression sélective sur les organismes, ce qui se traduit par des populations microbiennes présentant une plus grande tolérance aux métaux (Pereira et *al.*, 2006).

De nombreux microorganismes du sol possèdent une résistance aux métaux. Des gènes situés sur des chromosomes, des plasmides ou des transposons codent une résistance spécifique à une variété d'ions métalliques. Ces microorganismes ont développés plusieurs mécanismes de résistance à l'égard des métaux :

- L'exclusion par la barrière de perméabilité (Résistance par imperméabilité) : Par la modification de la structure de la paroi cellulaire ou de la membrane des microorganismes (Bruins et *al.*, 2000).
- La séquestration intracellulaire et extracellulaire : elle sert à l'immobilisation rapide des métaux (Monchy, 2007).
- Le transport actif des pompes d'efflux (système d'efflux): il sert à l'évacuation des métaux toxiques du cytoplasme (Bruins et *al.*, 2000).
- La détoxification enzymatique et la réduction de la sensibilité des cibles cellulaires aux ions métalliques : La conversion enzymatique consiste à convertir le métal en une forme moins toxique ou en d'autres formes qui peuvent être évacuées rapidement de la cellule (Monchy, 2007).

**II. Stratégies conventionnelles de la remédiation des sols pollués par les métaux lourds**

La pollution par les métaux lourds constitue une menace sérieuse pour toutes les formes de vie dans l'environnement en raison de la toxicité que présentent ces polluants ainsi que leur persistance dans l'environnement (non dégradables). Pour la réhabilitation de ces environnements pollués, les méthodes physiques et chimiques classiques ont démontrées leurs limites (Medfu Tarekegn et *al.*, 2020). Ces procédés engendrent des répercussions négatives sur l'environnement en provoquant une forte diminution de la fertilité et de la productivité des sols, d'où la nécessité de faire recours à des techniques biologiques appelées la bioremediation (Figure 2) (Vavasseur, 2014).



**Figure 2** : Comparaison entre les différentes méthodes de décontamination des sols (Khalid et *al.*, 2017).

## II.1. La bioremédiation

La bioremédiation désigne un ensemble de techniques utilisées pour la remédiation des sites naturels pollués (sol, eaux de surface ou souterraines, sédiments) en utilisant des bactéries, des champignons, des végétaux ou d'enzymes qu'ils produisent (Jørgensen et *al.*, 2000). Cette méthode biologique est efficace et prometteuse grâce à son approche écologique et rentable pour éliminer ou stabiliser les contaminants de l'environnement (Abdelkrim, 2018).

### II.1.1. La phytoremédiation

La phytoremédiation est une technique prometteuse pour l'assainissement des sols contaminés par les métaux lourds, elle constitue une véritable alternative aux méthodes physico-chimiques. C'est une technologie rentable, efficace, écologique et respectueuse de

l'environnement (Sumiahadi et Acar, 2018). Elle consiste à l'utilisation de différentes espèces de plantes capables d'accumuler ou de dégrader les contaminants (Cristaldi et *al.*, 2017).

Cette technique est utilisée pour éliminer, dégrader ou séquestrer les polluants des sols et de l'eau et elle est généralement considérée comme une option de gestion écologique pour les sols pollués (Rajkumar et *al.*, 2010). La phytoremediation est l'aboutissement de plusieurs processus tels que la phytodégradation, la phytovolatilisation, la phytoaccumulation, la phytoextraction et la rhizoremediation (Tableau I). Ces méthodes sont efficaces, écologiques et économiques (Muthusaravanan et *al.*, 2018).

**Tableau I** : Les différents types de procédés de phytoremédiation (Praveen et *al.*, 2019)

Type	Définition	Contaminant
<b>Phytoextraction</b>	Il s'agit d'un type de phytoremédiation qui implique la translocation des polluants par les racines depuis le sol ou l'eau vers la biomasse aérienne de la plante. Les sites impliqués dans la phytoextraction incluent : (1) La phytoextraction à l'aide de chélateurs, qui implique l'application de chélateurs de métaux (EDTA, AGTA, DTPA) pour mobiliser et améliorer l'absorption des polluants. (2) La phytoextraction continue dépend du potentiel inhérent de la plante.	Métaux lourds
<b>Phytostabilisation</b>	Connue également sous le nom de phytoimmobilisation. Elle consiste à l'utilisation de plantes potentielles pour immobiliser les contaminants dans le sol lui-même. Le métal lourd est immobilisé en étant adsorbé, précipité, et par transformation de la valence du métal dans la rhizosphère.	Métaux lourds
<b>Phytodégradation et rhizodégradation</b>	Dans la rhizodégradation, les polluants organiques sont décomposés dans la région de la rhizosphère par la dynamique microbienne. La phytodégradation est un type de phytoremédiation qui fait intervenir des enzymes végétales pour dégrader ou minéraliser les composés organiques.	Combustibles et solvants
<b>Phyto-volatilisation</b>	Cela implique l'absorption de métaux lourds par le système racinaire ensuite les convertir en volatils puis libérés dans l'atmosphère par les stomates dans l'atmosphère. Il s'agit d'une remédiation temporaire.	Les métaux lourds, comme le Hg et le Se.
<b>Rhizoremediation</b>	La dégradation rhizosphérique des contaminants du sol par les racines des plantes en association avec des microorganismes est appelée rhizoremediation. Les exsudats des racines stimulent la disponibilité des microorganismes dans le sol qui dégradent ensuite les polluants.	Les métaux lourds, pesticides produits pétroliers, herbicides...

### **II.1.2. La rhizoremediation**

La rhizoremédiation implique le processus d'une relation mutuelle dans la rhizosphère, entre la partie racinaire de la plante et les microorganismes du sol qui y sont présents (Simon et *al.*, 2014). Le site racinaire d'une plante libère certaines substances qui sont utilisées par les microorganismes pour dégrader les polluants, en contrepartie certains microorganismes aident à la fixation de l'azote dans les racines tandis que d'autres aident à prévenir les attaques des organismes pathogènes. Ce processus ne nécessite littéralement aucun investissement, car il suffit de fournir des microorganismes efficaces (Saravanan et *al.*, 2020).

La rhizoremediation intervient sur divers types de contaminants comme : les métaux lourds, les pesticides, produits pétroliers, cendres volantes et herbicides (Praveen et *al.*, 2019).

## **III. Symbiose rhizobium-légumineuse dans la bioremediation**

### **III.1. Symbiose rhizobium-légumineuse**

D'un point de vue étymologique le mot symbiose provient du grec, composés de : sym (avec) et bio (vie), d'où sa définition vague : vie en commun (Lefèvre, 2004).

Les légumineuses sont une famille de plantes qui sont capables d'établir une interaction symbiotique avec des bactéries du sol ; les Rhizobia. Cette interaction conduit à la formation d'un nouvel organe appelé nodule racinaire dans lequel les bactéries rhizosphériques fixent l'azote atmosphérique au profit de la plante hôte (Laloum, 2013).

Au cours de la formation des nodules, une reconnaissance spécifique se produit entre les partenaires procaryotes et eucaryotes. L'invasion des cellules végétales par les bactéries entraîne de nombreux changements dans la structure et la biochimie des deux organismes au cours du développement du nodule (Appelbaum, 2018).

### **III.2. Application des symbioses rhizobium-légumineuse dans la bioremediation des sols contaminés par des métaux lourds**

L'application simultanée de plantes et de microorganismes de la rhizosphère (rhizoremédiation) améliore l'efficacité de la biorémédiation. Pour que cette technique soit efficace, une attention particulière doit être portée sur la sélection des microorganismes de la rhizosphère présentant un potentiel de biorémédiation et des propriétés PGP.

Dans ce contexte, de nombreuses expériences ont été accomplies en utilisant différentes symbioses légumineuses-rhizobium pour la remédiation des sols contaminés par des métaux lourds. La plupart de ces recherches ont cependant été effectuées en pots ou en serres (Pajuelo et *al.*, 2011).

Dans certains cas, les résultats ne se sont pas avérés cohérents et reproductibles lorsqu'ils ont été testés sur le terrain (Vangronsveld *et al.*, 2009).

Par conséquent, la disponibilité des métaux dans le sol, la viabilité des inoculants et la sélection des pratiques agronomiques les plus adéquates doivent être prises en considération lors de la conception d'une stratégie de rhizoremédiation in situ. Dans les cas où des rhizobiums symbiotiques efficaces et résistants aux métaux ont été utilisés, les résultats obtenus ont été positifs :

D'une part, ils ont augmenté les rendements en grains, la biomasse végétale et la teneur en N par le biais de la production de N<sub>2</sub> et en synthétisant des substances régulatrices de croissance (Dary *et al.*, 2010 ; González et González-Chávez, 2006). L'effet positif des inoculants sélectionnés sur le rendement et la biomasse des plantes améliore la qualité de la végétation et contribue à la régénération des sols pollués et dégradés (Dary *et al.*, 2010).

D'autre part, l'inoculation avec des inoculants résistants aux métaux affecte également la solubilité et la biodisponibilité des métaux pour permettre leur absorption par les plantes. Dans la plupart des cas, une diminution de l'accumulation de métaux dans les pousses des plantes inoculées est signalée (Frérot *et al.*, 2006), bien que dans certains cas, une augmentation de l'accumulation de métal se produit, lorsque des inoculants mobilisant des métaux sélectionnés sont utilisés en combinaison avec des plantes hyperaccumulatrices (Ma *et al.*, 2009). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la diminution de la teneur en métaux dans les légumineuses inoculées. Ces mécanismes comprennent la biosorption du métal à la surface des cellules bactériennes ou dans les racines, la chélation des métaux, la sécrétion de substances par les racines des plantes ou par les bactéries qui immobilisent le métal dans le sol... Tous ces processus peuvent agir ensemble et donc peuvent améliorer la phytostabilisation des métaux (Khan *et al.*, 2009).

Dans une étude réalisée dans ce contexte, des plants de *Lupinus luteus* inoculés avec un consortium bactérien résistants aux métaux lourds ont été utilisés dans la phytostabilisation des sols affectés par un déversement minier. Ce consortium comprenait *Bradyrhizobium*, *Ochrobactrum* indigène et *Pseudomonas* résistant aux métaux lourds. Le mélange de bactéries a augmenté les rendements des plantes, la biomasse et la teneur en azote tout en réduisant de 2 à 4 fois la concentration de métaux dans les pousses. Dans d'autres travaux, l'inoculation de plantes de greengram avec l'espèce *Bradyrhizobium sp.* RM8, PGPR et résistante aux métaux, a protégé les plantes de la toxicité du Ni et du Zn, et de l'exposition aux métaux, par conséquent, a augmenté la croissance des plantes (Wani *et al.*, 2007).

Ces études suggèrent donc que les rhizobia résistants aux métaux pourraient être utilisés pour compenser la toxicité des métaux lourds pour les légumineuses cultivées dans des sols contaminés par les métaux lourds (Pajuelo et *al.*, 2011).

# **Matériel & méthodes**

Afin de pouvoir étudier et caractériser les bactéries symbiotiques nodulant *Calicotome spinosa* originaires des sols miniers plusieurs tests ont été menés. Cette étude s'inscrit dans la contribution à la sélection de souches présentant des potentialités pour une éventuelle utilisation dans un projet de bioremediation des sols contaminés par des métaux lourds.

Dans cette partie, la méthodologie de travail adoptée pour répondre à l'objectif de cette étude sera décrite depuis la détermination des seuils de tolérance au mercure et au plomb jusqu'à l'évaluation de leurs impacts sur les souches étudiées. De plus, cette étude s'étale sur la recherche de quelques activités enzymatiques chez des souches provenant d'un tel environnement pollué.

L'ensemble des manipulations a été effectué au niveau du Laboratoire d'Ecologie Microbienne de l'Université de Bejaia (LEM), réalisé durant la période allant du 15 Avril au 25 juin 2021.

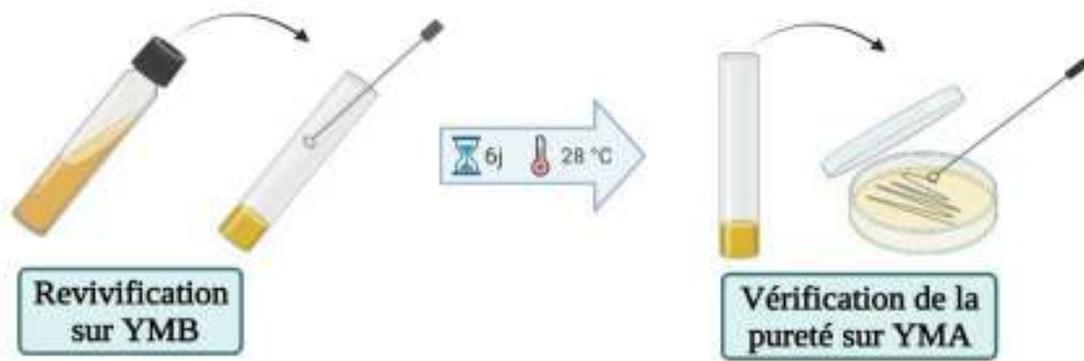
## **I. Matériel biologique**

Deux souches bactériennes csM08 et csG12 appartenant à la collection du Laboratoire de l'Ecologie Microbienne de l'Université de Bejaia ont fait l'objet de cette étude. Elles ont été isolées à partir des nodules racinaires de *Calicotome spinosa* originaire des mines de mercure situées à Azzaba (Skikda) au Nord-Est de l'Algérie, et identifiées comme appartenant au genre *Bradyrhizobium* par Salmi et Boulila (2021).

## **II. Méthodes**

### **II.1. Revivification des deux souches conservées**

Les souches de *Bradyrhizobium* csM08 et csG12, conservées à -80°C ont été revivifiées par ensemencement sur milieu liquide YMB (Yeast-mannitol-broth) (Annexe I) à partir d'un tube de conservation suivi d'une incubation à 28°C pendant 06 jours. La pureté de ces souches a été vérifiée par ensemencement par stries sur milieu solide YMA (Yeast-mannitol-agar) (Annexe I) suivi d'une incubation à 28°C pendant 10 jours (Figure 3). Ensuite, une étude macroscopique a été faite par observation à l'œil nu et elle a porté sur divers critères définissant les colonies des deux souches : diamètre, couleur, aspect, présence des EPS, la forme, le contour des colonies ainsi que le temps d'apparition.



**Figure 3** : revivification des souches bactériennes sur milieu YMB et vérification de leurs pureté sur milieu YMA.

### III. Effet du mercure et du plomb sur les souches étudiées

#### III.1. Etude de la résistance des souches au mercure et au plomb : détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Un test évaluant la résistance des deux souches csM08 et csG12 aux différentes concentrations du mercure et du plomb (allant de 5  $\mu\text{g/ml}$  à 300  $\mu\text{g/ml}$  et de 25  $\mu\text{g/ml}$  à 600  $\mu\text{g/ml}$  respectivement) et permettant de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de ces deux métaux a été réalisé sur milieu YMA (Yeast-mannitol-agar) (Annexe I). Le choix des concentrations de métaux a été fait suivant les concentrations de ces deux éléments dans les sites miniers étudiés qui sont des 1 mg/kg pour le mercure et de 800 mg/kg pour le plomb (Salmi et Boulila, 2021).

Des volumes déterminés ont été prélevés à partir des solutions mères de sels de Chlorure de Mercure ( $\text{HgCl}_2$ ) et d'Acétate du Plomb ( $\text{Pb}(\text{OOCCH}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) (Annexe II) stérilisées par filtration (Millipore 0.20  $\mu\text{m}$ ), et additionnés à la gélose YMA pour obtenir les concentrations souhaitées (Annexe III). Les milieux préparés ont été coulés dans des boites de Pétri, puisensemencés par des spots de 10  $\mu\text{l}$  contenant  $10^7$ UFC/ml. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque métal et pour toutes les concentrations étudiées. Un témoin négatif a été réalisé dans les mêmes conditions expérimentales sans l'addition de métal.

Après incubation à 28°C pendant 10 jours, la présence ou l'absence d'une croissance sur le milieu ; visible à l'œil nu, a été retenue comme résultat positif. Ainsi, les CMI correspondant aux plus faibles concentrations des deux métaux lourds capables d'inhiber toute croissance bactérienne ont été déterminées.

### III.2. Effet du mercure sur la croissance des souches bactériennes

Sachant que les deux souches étudiées sont originaires d'un sol contaminé par le mercure et vu l'objectif recherché par la présente étude, nous avons opté pour la focalisation de la suite de notre étude sur l'effet du mercure sur la croissance et les activités biochimiques des deux bactéries *Bradyrhizobium*.

Compte tenu du test de détermination des CMI, la croissance des souches a été suivie sur milieu YMB (Yeast-mannitol-broth) avec des concentrations de mercure inférieures à la CMI. Des volumes déterminés ont été prélevés à partir de la solution mère des sels de Chlorure de mercure (HgCl<sub>2</sub>) et additionnés à des volumes du milieu liquide YMB (Yeast-mannitol-broth) pour obtenir des volumes finaux de 10 ml à différentes concentrations du mercure (Annexe IV).

Les différents milieux préparés ont été inoculés avec 10<sup>7</sup> UFC/ml. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque souche à toutes les concentrations ainsi qu'un témoin négatif sans inoculation. Les milieux ont été incubés à 28°C pendant 6 jours et une lecture périodique ; chaque 24 H, au spectrophotomètre à une longueur d'onde  $\lambda=630$  nm, a été faite pour mesurer et suivre la croissance des deux souches bactériennes pendant 10 jours. Les temps de génération et les taux de croissance sont déterminés par l'équation suivante :

$$G = t \log 2 / (\log X - \log X_0)$$

$$D'où : T = 1/G$$

**G** : temps de génération (h).

**T** : taux de croissance (h<sup>-1</sup>).

## IV. Recherche de caractéristiques promotrices de la croissance des plantes (PGP)

### IV.1. Production d'acide indole acétique (AIA)

La production de l'acide indole acétique (AIA) par les deux souches csM08 et csG12 est déterminée selon la méthode de Malik & Sindhu (2011).

Des tubes contenant 10 ml du milieu LB additionné de 0.1g/l de tryptophane préalablement stérilisé par filtration, ont été inoculés par les deux cultures bactériennes fraîches (10<sup>7</sup>UFC/ml). Après incubation à 28°C pendant 6 jours, les cultures ont été centrifugées à 10000 tr/min pendant 5 minutes.

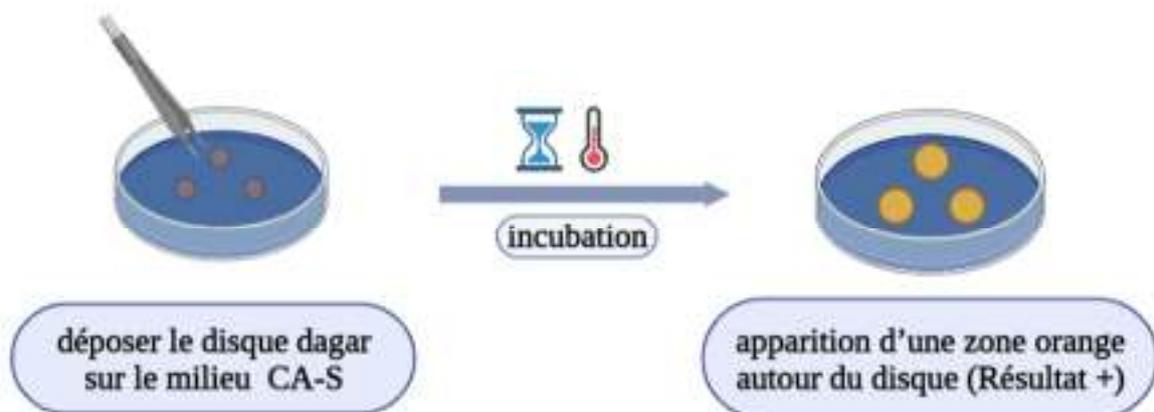
Pour chaque milieu, 1 ml du surnageant a été récupéré et mélangé avec le même volume du réactif de Salkowski (Annexe I).

Après agitation et incubation dans l'obscurité à une température ambiante pendant 30 min, la production de l'auxine AIA se manifeste par l'apparition d'une coloration rose. Dans le cas positif marqué par une coloration rose, l'absorbance des milieux est mesurée au spectrophotomètre à 500 nm pour déterminer la DO. La concentration en AIA est déterminée par la réalisation d'une courbe d'étalonnage (Annexe V) (DO à 500 nm en fonction de la concentration de l'AIA (Sigma-Aldrich) pur en µg/ml).

#### IV.2. Production de sidérophores

L'aptitude des deux souches de *Bradyrhizobium* csM08 et csG12 à produire des sidérophores a été révélée sur le milieu Chrom Azurol S Agar (CAS) (Annexe I), préparé en suivant le protocole élaboré par Schwyn et Neilands (1987) et enrichi par Alexander Zuberer (1991) (Figure 4).

Le milieu préparé a été coulé dans des boîtes de Pétri puisensemencé par la méthode des disques d'agar ; des disques qui ont été prélevés soigneusement des pré-cultures bactériennes sur milieu YMA et déposés sur les boîtes. La production de sidérophores se manifeste par l'apparition d'un halo orange autour des disques après une incubation à 28°C pendant 10 jours.



**Figure 4 :** Mise en évidence de la production des sidérophores.

#### IV.3. Solubilisation de phosphate tricalcique

La solubilisation du phosphate tricalcique par les deux souches a été évaluée sur milieu Piskovskaya solide (1948) (Annexe I). Les boîtes ont étéensemencées par la méthode des disques d'agar ; des disques qui ont été prélevés soigneusement d'une pré-culture bactérienne sur milieu YMA et déposés sur les boîtes.

L'aptitude des bactéries à solubiliser le phosphate tricalcique est indiquée par la formation d'un halo transparent autour des disques après une incubation à 28°C pendant 10 jours.

## **V. Effet du mercure sur les caractéristiques promotrices de la croissance des plantes (PGP) retrouvées**

### **V.1. Effet du mercure sur la production de l'acide indole acétique (AIA)**

Pour évaluer la capacité des souches étudiées à produire de l'acide indole acétique en présence de concentrations de mercure inférieures à la CMI, un autre test a été réalisé suivant la méthode de Malik et Sindhu (2011) préalablement décrite.

Cependant, le milieu de culture a été additionné de concentrations croissantes de mercure inférieures à la CMI (Annexe VI).

Les concentrations en AIA dans les milieux ont été déterminées par la réalisation d'une courbe d'étalonnage (Annexe V) (DO à 500 nm en fonction de la concentration de l'AIA (Sigma-Aldrich) pur en µg/ml).

### **V.2. Effet du mercure sur la production des sidérophores**

Pour évaluer la capacité des souches étudiées à produire les sidérophores en présence de concentrations de mercure inférieures à la CMI, un autre test a été réalisé sur le milieu Chrom Azurol S Agar (CAS) suivant la méthode préalablement décrite. Sauf que des volumes différents de la solution mère du mercure ont été ajoutés aux milieux pour avoir au final des cultures contenant les concentrations du mercure inférieures aux CMI préalablement déterminées. Puis, les milieux obtenus ont été incubés pendant 10 jours à 28°C. L'apparition de halos orange autour des colonies indique la production de sidérophores.

## **VI. Recherche des activités enzymatiques**

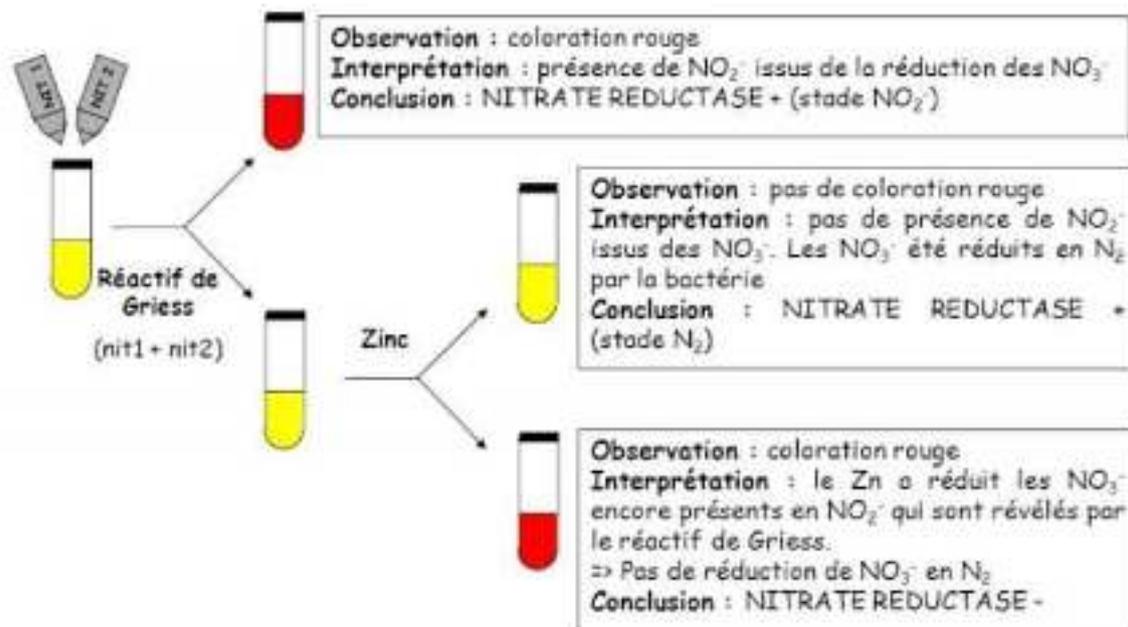
### **VI.1. Recherche de l'activité réduction des nitrates**

Au cours de ce test, la recherche de la production de l'enzyme nitrate réductase par les deux souches bactériennes a été réalisée. L'enzyme nitrate réductase réduit les nitrates en nitrites. Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction, jusqu'à la dénitrification. Ce test consiste à mettre en évidence le métabolite nitrite ou la disparition des nitrates initiaux. Pour déterminer l'aptitude des deux souches csM08 et csG12 de produire une nitrate réductase, les cultures ont été menées sur un bouillon nitraté contenant des ions nitrate mais dépourvu de nitrite. Après incubation de 6 jours à 28°C, quelques gouttes du réactif de

Griess ont été ajoutées aux milieux. La réduction des nitrates en nitrites se manifeste par l'apparition d'une coloration rouge.

L'absence d'une coloration sur les milieux signifie d'absence de nitrite dans les milieux. Dans ce cas deux hypothèses sont suggérées : soit les bactéries ne produisent pas la nitrate réductase, ou elle a en plus, une nitrite réductase qui transforme les nitrites en azote dès leur apparition.

Pour trancher entre ces deux suppositions, il suffit juste d'ajouter une pincée de poudre de zinc ; une poudre très réductrice, qui réduit en quelques minutes les nitrates en nitrites. Cette réduction est accompagnée par l'apparition d'une coloration rouge. La bactérie est donc nitrate réductase négative (NR-). Dans le cas où aucune coloration n'est apparue, cela signifie qu'il ne reste plus de nitrates dans le bouillon, donc la bactérie est (NR+) ; nitrate réductase positive (Figure 5) (Guiraud, 2003).



**Figure 5 :** Recherche de l'activité réduction des nitrates.

## VI.2. Recherche de l'activité uréasique

La capacité des deux souches bactériennes étudiées d'hydrolyser l'urée a été testée sur le milieu YMA additionné de rouge de phénol comme indicateur du pH. Le milieu a été ajusté à pH 6,8 puis autoclavé. Ensuite, 50 ml d'une solution d'urée à 40% préalablement stérilisée par filtration (porosité 0.22  $\mu\text{m}$ ) a été ajoutée au milieu. Après homogénéisation, le milieu a été coulé dans des boîtes de Pétri qui ont été ensuite ensemencées et incubées à 28°C

pendant 10 jours. L'activité uréasique se manifeste par le changement de la couleur du milieu vers le rose (Kumari et *al.*, 2010).

### **VI.3. Recherche de l'activité pectinolytique**

La mise en évidence de l'activité pectinolytique a été réalisée sur un milieu YMA contenant 0.5 % de pectine. Le milieu réalisé a été coulé dans des boîtes Pétri puisensemencé par la méthode des spots. Après une incubation à 28°C/10 jours, les boîtes ont été inondées avec une solution d'iodure de potassium. L'apparition des zones claires autour des spots indique une activité pectinolytique (Soares et *al.*, 1999).

### **VI.4. Recherche de l'activité cellulasique (CMCase)**

La recherche de l'activité cellulasique est faite sur milieu de Carder (1986) (Annexe I).

Le milieu a été coulé dans des boîtes qui ont été ensuiteensemencées par la méthode des spots et incubées à 28°C. Après 10 jours d'incubation, une solution aqueuse de rouge de Congo (1%) est ajoutée à la surface (Nermeen et *al.*, 2010). Après 20 min, la surface a été inondée par une solution de NaCl à 1M puis gardé pendant 15 min dans une température ambiante (Jaradat et *al.*, 2008). L'activité cellulasique se distingue par l'apparition d'un halo clair autour des spots.

### **VI.5. Recherche de l'activité gélatinase**

Pour la détermination de l'hydrolyse de la gélatine par les bactéries étudiées, un test a été réalisé en se référant à la méthode de (Frazier, 1926) en utilisant une gélose à base de gélatine contenant : gélatine (10g/l) ; extrait de levure (1g/l); agar (18g/l). Le milieu a été coulé dans des boîtes qui ont été ensuiteensemencées par la méthode des spots. Après incubation à 28°C pendant 10 jours, le milieu a été additionné du réactif de Frazier [HgCl<sub>2</sub> à 15% (p/v), dans du HCL concentré à 20% (v / v)] pour la révélation de l'hydrolyse de la gélatine. La présence de la gélatinase se manifeste par l'apparition des zones claires autour des spots.

### **VI.6. Recherche de l'activité chitinasique**

Le test de la mise en évidence de l'activité chitinasique par les souches bactériennes étudiées a été réalisé sur un milieu YMA (Yeast-mannitol-agar) additionné de 1 % de chitine. Le milieu réalisé a été coulé dans des boîtes Petri puisensemencé par la méthode des spots.

La production de la chitinase se traduit par l'apparition d'une zone claire autour des spots après 10 jours d'incubation à 28°C.

# **Résultats & discussion**

Cette partie comporte les résultats des différents tests réalisés au cours de la partie pratique. Les résultats de chaque test ont été interprétés et discutés en se référant à des études scientifiques antérieures traitant la même thématique. Le choix des travaux scientifiques objet de cette comparaison a été fait en se basant sur la similarité du matériel et des méthodes utilisées ainsi que l'objectif recherché de ces études.

### I. Caractérisation morphologique des colonies

Le Tableau II comporte l'ensemble des résultats de la caractérisation morphologique des deux souches étudiées et la Figure 6 illustre l'aspect des cultures qu'elles ont formées sur milieu YMA.

**Tableau II :** Caractères cultureux des deux souches csM08 et csG12.

Caractères Souches	Diamètre des colonies (mm)	Couleur des colonies	Aspect des colonies	Présence des EPS	Forme et contour des colonies	Temps d'apparition
csM08	> 2 mm	Beige	Opaque	+	Ronde et contour régulier	10 jours
csG12	< 2 mm	Blanchâtre	Translucide	-	Punctiforme et contour régulier	10 jours



**Figure 6 :** Aspect morphologique des cultures formées par les souches csM08 et csG12 sur milieu YMA.

En observant la Figure 6, la souche csM08 a formé des colonies opaques, d'un diamètre supérieur à 2 mm, de couleur beige et d'une forme ronde avec un contour régulier et elle sécrète des exopolysaccharides. Quant à la souche csG12, les colonies formées sont également opaques, cependant leur diamètre est inférieur à 2 mm et elles sont d'une couleur blanchâtre et d'une forme punctiforme avec un contour régulier et elle ne sécrète pas des exopolysaccharides.

L'apparition des colonies après 10 jours d'incubation à 28°C permet de classer ces souches comme bactéries à croissance lente caractérisant les espèces du genre *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982 ; 1984). L'aspect morphologique et les caractères cultureux des souches de *Bradyrhizobium* csM08 et csG12 observés sont en concordances avec les résultats obtenus par Salmi et Boulila (2021).

## II. Effet du mercure et du plomb sur les souches étudiées

### II.1. Etude de la sensibilité des souches vis-à-vis du Mercure (Hg) et du plomb (Pb) : Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les résultats du test réalisé sur milieu YMA (Yeast-mannitol-agar) pour étudier la sensibilité des deux souches bactériennes csM08 et csG12 aux différentes concentrations du mercure et du plomb ainsi que la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de ces deux métaux lourds, sont indiqués dans les Tableaux III et IV.

La Figure 7 illustre les résultats obtenus après 10 jours d'incubation à 28°C.

**Tableau III** : Résultats du test de la sensibilité des souches csM08 et csG12 vis-à-vis des différentes concentrations du mercure sur milieu YMA.

Souches bactériennes	Concentrations du (Hg) (µg/ml)							
	5	10	25	50	100	150	200	300
csM08	+	+	+	+	+	+	-	-
csG12	+	+	+	+	+	-	-	-

Croissance : (+) Absence de croissance : (-)

**Tableau IV** : Résultats du test de la sensibilité des souches csM08 et csG12 vis-à-vis des différentes concentrations du plomb sur milieu YMA.

Souches bactériennes	Concentrations du (Pb) (µg/ml)							
	25	50	100	200	300	400	500	600
csM08	+	+	+	+	+	+	+	-
csG12	+	+	+	+	+	+	-	-

Croissance : (+) Absence de croissance : (-)



**Figure 7** : exemple de croissance et d'absence de croissance des souches sur milieu YMA.

Ces résultats montrent que la souche csM08 se développe en présence de concentrations allant jusqu'à 150 µg/ml de mercure et 500 µg/ml de plomb. Quant à la souche csG112, elle a pu croître dans des milieux contenant des concentrations allant jusqu'à 100 µg/ml de mercure et 400 µg/ml de plomb.

Selon Abou-Shanab et al. (2007), les concentrations critiques exprimant la résistance ou la sensibilité des rhizobia sont de 20,06 µg/ml pour le mercure et de 207,20 µg/ml pour le plomb. En se basant sur ces résultats, les deux souches csM08 et csG12 sont considérées résistantes au mercure et plomb. La souche csM08 est plus résistante au mercure et au plomb par rapport à la souche csG12.

En effet, l'appartenance des souches à la même espèce n'induit pas forcément le même niveau de résistance aux différents métaux lourds (Kinkle et al., 1987).

Il est à noter que, les résultats de ce test concordent avec ceux obtenus par Bedouhene et Ait Haddad (2015) ; Ponmurugan et al. (2012) qui ont étudié la résistance de quelques *Bradyrhizobium* au mercure. Mais aussi que ceux des CMI du plomb rapportés par Carrasco et al. (2005).

Cependant, ils diffèrent de ceux cités dans des études réalisées par Ruiz-Díez et al (2012) ; Abou-Shanab et al (2007) traitant la résistance des *Bradyrhizobium* au mercure, rapportant des concentrations minimales inhibitrices (CMI) moins importantes relativement aux CMI du mercure qui ont affectées les souches csM08 et csG12 (200 µg/ml et 150 µg/ml respectivement).

Les travaux de Monchy (2007) indiquent que les ions mercuriques sont extrêmement toxiques pour les bactéries à cause de leurs interactions avec les groupes thiol (-SH) des protéines.

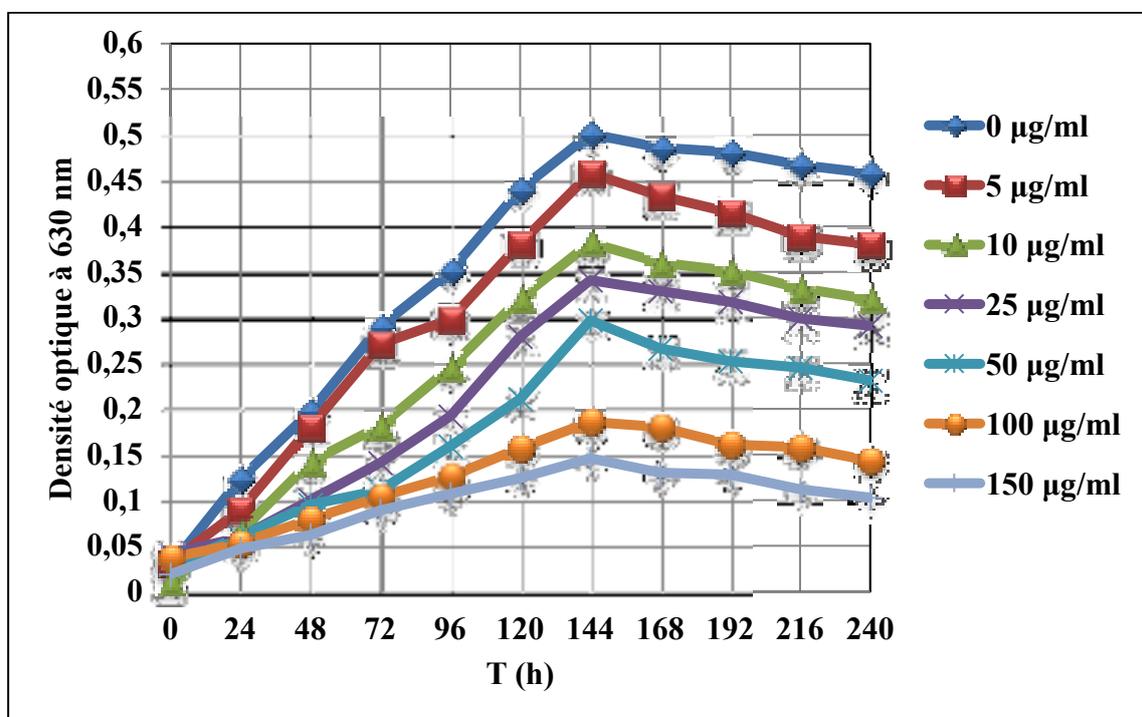
D'après Angle et al. (1993) et Tong et Sadowsky (1994), les souches de *Bradyrhizobium* comparées à *Rhizobium* sont plus résistantes aux métaux lourds grâce à leur capacité à alcaliniser le milieu rendant ainsi les métaux lourds moins actifs.

L'effet des métaux lourds dépend de la durée de l'exposition, de la dose et du type de métal utilisé (Giller et al., 1998). Les bactéries peuvent développer des mécanismes de résistance qui immobilisent, mobilisent ou transforment les métaux lourds, et donc elles peuvent influencer la solubilité des métaux lourds par l'altération de leurs propriétés chimiques (Gremion, 2003). Elles synthétisent des protéines ou de polymères extracellulaires qui adhèrent au métal, ou le compartimentent à l'intérieur des cellules ou encore diminuent l'assimilation par activation de l'exportation (Tomsett, 1993).

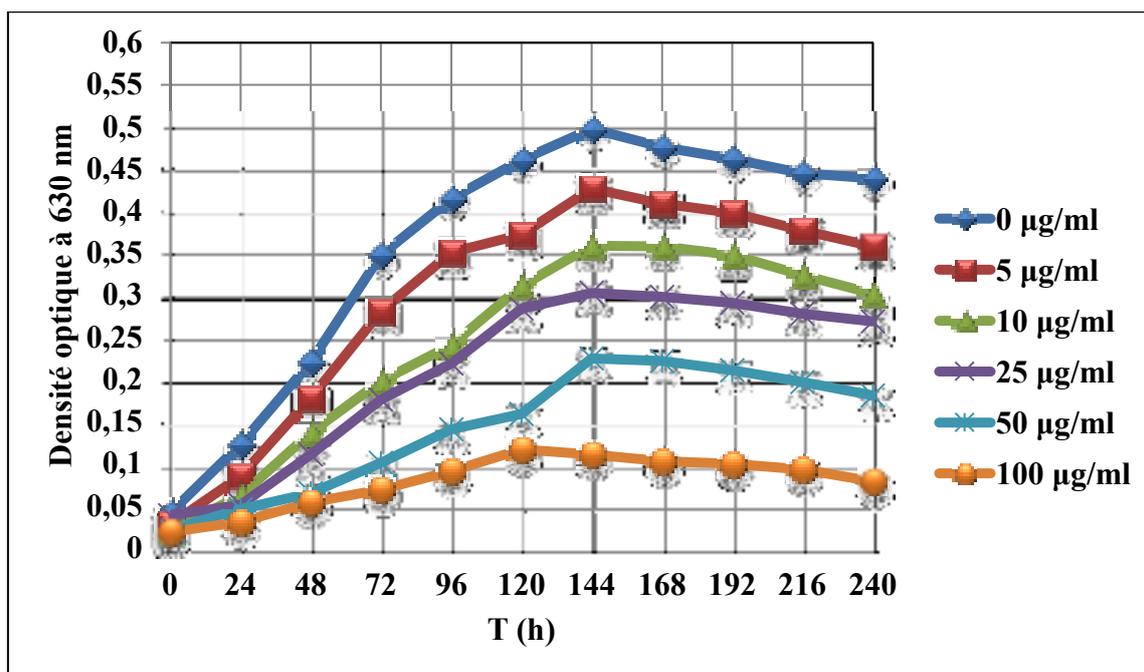
## II.2. Effet du mercure sur la croissance des souches bactériennes

Etant donné que les deux souches de *Bradyrhizobium* csM08 et csG12 étudiées sont originaires d'un sol pollué par le mercure et vu l'inscription de notre étude dans l'optique de contribuer à un éventuel projet de bioremediation de ce site, nous avons opté pour la focalisation de la suite de notre travail sur l'effet du mercure sur les deux souches bactériennes, leur croissance et leurs activités biochimiques.

En effet, après la détermination des concentrations minimales inhibitrices du mercure qui affectent la croissance des deux souches bactériennes sur milieu YMA, le test effectué sur milieu YMB pour suivre la croissance des deux souches csG12 et csM08 sous l'effet des concentrations du mercure inférieures à la CMI, a généré les résultats notés dans l'annexe VII. Ces résultats ont été représentés graphiquement sous forme de courbes (Figure 8 et Figure 9).



**Figure 8** : courbe de croissance de la souche csM08 pendant 240 heures (10 jours) sous l'effet de différentes concentrations de mercure inférieures à la CMI.



**Figure 9** : courbe de croissance de la souche csG12 pendant 240 heures (10 jours) sous l'effet de différentes concentrations du mercure inférieures à la CMI.

A partir des courbes réalisées (Figure 8 et 9), les temps de génération et les taux de croissance des souches bactériennes ont été calculés. Les résultats obtenus sont indiqués dans les tableaux V et VI.

**Tableau V** : Temps de génération et le taux de croissance de la souche csM08 sous différentes concentrations du mercure.

Milieu avec différentes concentrations [Hg <sup>2+</sup> ]	0	5	10	25	50	100	150
Temps de génération (h)	80.27	68.11	60.16	42.47	38	72.2	90.25
Taux de croissance (h <sup>-1</sup> )	0.012	0.015	0.017	0.024	0.027	0.014	0.012

**Tableau VI** : Temps de génération et le taux de croissance de la souche csG12 sous différentes concentrations du mercure.

Milieu avec différentes concentrations [Hg <sup>2+</sup> ]	0	5	10	25	50	100
Temps de génération (h)	36.1	36.1	65.64	72.2	48.13	65.64
Taux de croissance (h <sup>-1</sup> )	0.028	0.028	0.015	0.014	0.021	0.015

Les résultats obtenus montrent que les deux souches et à toutes les concentrations testées ont affiché des absorbances inférieures à celle du témoin ce qui suggère que l'augmentation des concentrations du mercure dans les milieux a induit la diminution de la croissance. Ceci permet de conclure que la croissance des souches est inversement proportionnelle aux concentrations du mercure.

Les temps de génération obtenus démontrent que la souche csM08 a une croissance plus lente par rapport à la souche csG12.

Il est constatable également à partir des courbes réalisées (Figure 8 et 9) que la phase de latence s'allonge en fonction de l'augmentation des concentrations du mercure dans le milieu. L'optimum de croissance a été atteint au bout du sixième jour (144h) pour les deux souches et à toutes les concentrations étudiées, suivi d'une phase de déclin à partir de 144h jusqu'à 240h.

Les résultats obtenus au cours de ce test sont en accord avec ceux révélés par Ruiz-Díez et *al.* (2012). Bien que les espèces appartenant au genre *Bradyrhizobium* aient des temps de génération supérieur à 5 heures (Jordan, 1982 ; 1984). Cependant la présence des métaux lourds exercent un effet négatif sur la croissance de ces bactéries, considéré proportionnel et graduel avec l'augmentation des concentrations en métaux (Dahlin et *al.*, 1997).

En effet, l'augmentation des concentrations des métaux lourds perturbe de nombreuses activités biochimiques et physiologiques chez *Bradyrhizobium japonicum*, notamment sa croissance (Seneviratne et *al.*, 2016). Cet effet dépend de la durée de l'exposition, de la dose et du type de métal utilisé (Giller et *al.*, 1998).

### III. Recherche de caractéristiques promotrices de la croissance des plantes (PGP)

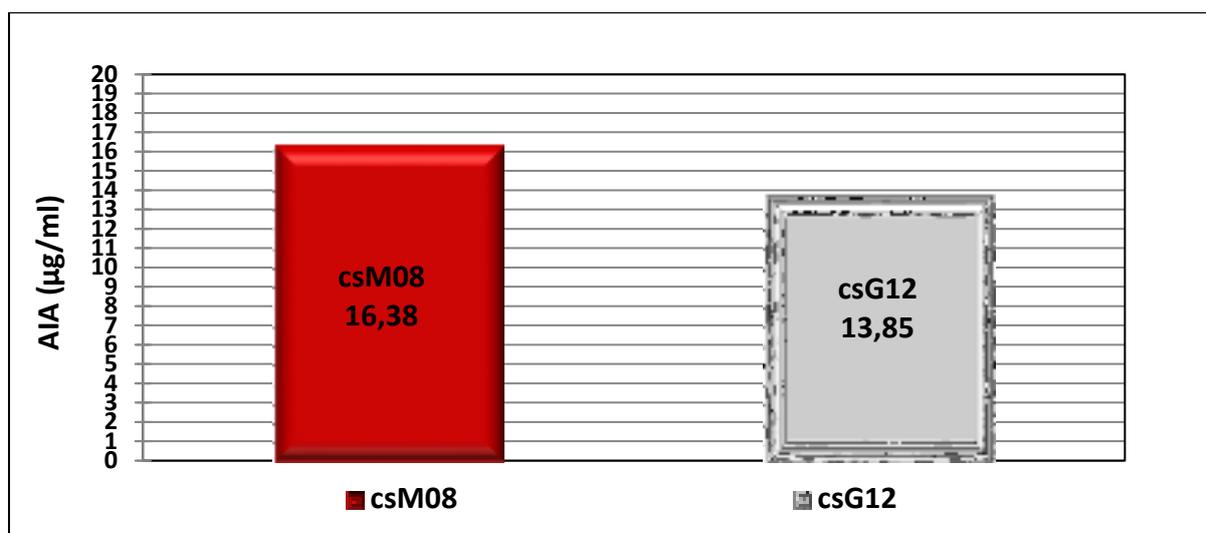
#### III.1. Production d'acide indole acétique (AIA)

Le résultat du test a été l'apparition d'une coloration rose (Figure 11) ce qui signifie la production de l'auxine acide indole acétique (AIA) par les deux souches csM08 et csG12.



**Figure 10** : apparition d'une coloration rose indiquant la production de l'AIA par les deux souches.

Les résultats obtenus ont été représentés graphiquement (Figure 11).



**Figure 11** : Production d'AIA (µg/ml) par les deux souches csM08 et csG12.

La concentration de l'AIA produite par la souche csM08 (16.38 µg/ml) est supérieure à celle de csG12 (13.85 µg/ml).

En effet, la production de l'acide indole acétique est une caractéristique partagée avec d'autres souches du genre *Bradyrhizobium* étudiées par (S. Kumar et al., 2021), toutefois, une variation significative (8,22 à 52,81 µg/ml) a été observée également dans la production d'AIA par ces souches.

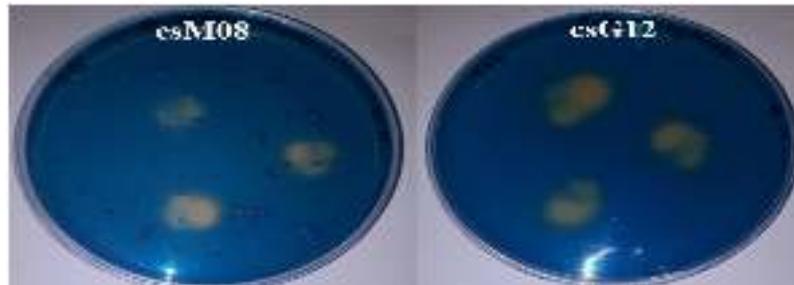
Selon Chen et al. (2017), les *Bradyrhizobium* ont attirées l'attention pour leur stimulation de la croissance des plantes ainsi que leur contribution remarquable dans la phytoremédiation grâce à leur aptitude à produire de l'acide indole acétique.

L'AIA favorise l'absorption de l'eau et des minéraux en stimulant le développement du système racinaire des plantes. Également, elle stimule la germination des graines, elle contrôle les processus de la croissance végétative et elle contribue activement dans la résistance aux conditions stressantes (Ahemad et Kibret, 2014).

### III.2. Production de sidérophores

Après une incubation pendant 10 jours à 28 °C, l'apparition d'un halo orange autour des disques de gélose contenant les cultures des souches étudiées a été constatée (Figure 12) ce qui signifie l'aptitude des deux souches de *Bradyrhizobium* csM08 et csG12 à produire les sidérophores. Cette potentialité a déjà été rapportée chez des souches de *Bradyrhizobium* (Abd-Alla, 1998). Néanmoins, la production des sidérophores n'est pas tellement répondue chez les

bactéries ce qui suggère que les souches étudiées seraient intéressantes notamment pour une inoculation dans un sol carencé en fer.



**Figure 12 :** Les résultats obtenus du test de la production de sidérophore.

Il est à rappeler que les sidérophores sont des composés organiques de faible masse moléculaire produits par des microorganismes et des plantes dans des conditions de faible teneur en fer. Ce dernier, est présent principalement sous forme de  $Fe^{3+}$  et il est susceptible de former des hydroxydes et des oxyhydroxydes insolubles le rendant généralement inaccessible aux plantes et aux microorganismes (Rajkumar *et al.*, 2010).

Ainsi, les sidérophores peuvent chélater le fer ferrique et le rendent disponible pour les cellules microbiennes et végétales (Sharma *et al.*, 2013).

### III.3. Solubilisation de phosphate tricalcique

L'observation des résultats du test réalisé sur le milieu de Pikovskaya, n'a révélé aucune zone claire autour des disques, ce qui signifie l'inaptitude des deux souches étudiées csG12 et csM08 à solubiliser le phosphate tricalcique.

Bien que ce résultat soit à l'opposé de ce qui est relaté dans la littérature concernant la capacité des rhizobia à solubiliser le phosphate organique et inorganique (Alikhani *et al.*, 2007), cependant, beaucoup d'études ont démontré que ce caractère n'est pas toujours présent chez les rhizobia (Halder et Chakrabartty, 1993), indiquant par conséquent que la solubilisation du phosphate n'est pas un caractère largement répandu parmi les rhizobia (Kumar et Ram, 2014).

## IV. Effet du mercure sur les caractéristiques promotrices de la croissance des plantes

### (PGP) retrouvées

#### IV.1. Effet du mercure sur la production de l'acide indole acétique (AIA)

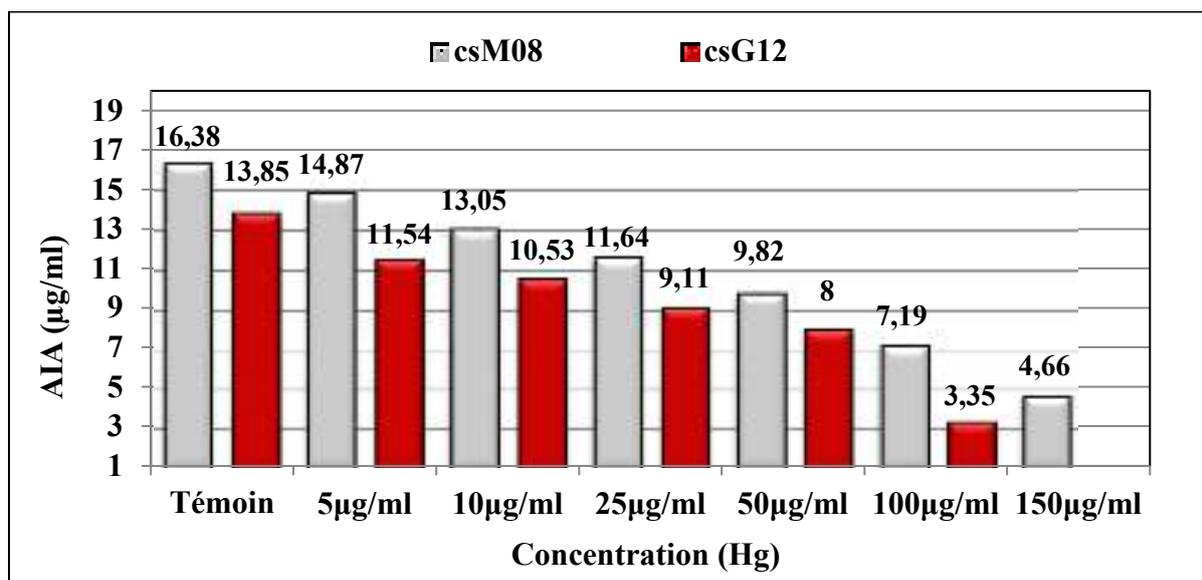
Après la mise en évidence de la production de l'acide indole acétique par les deux souches étudiées, l'effet des concentrations mercuriques sur cette production a été déterminé dans ce test. L'apparition d'une coloration rose à toutes les concentrations étudiées (Figure

13) signifie la production d'acide indole acétique par les deux souches en présence des concentrations du mercure inférieures à la CMI.



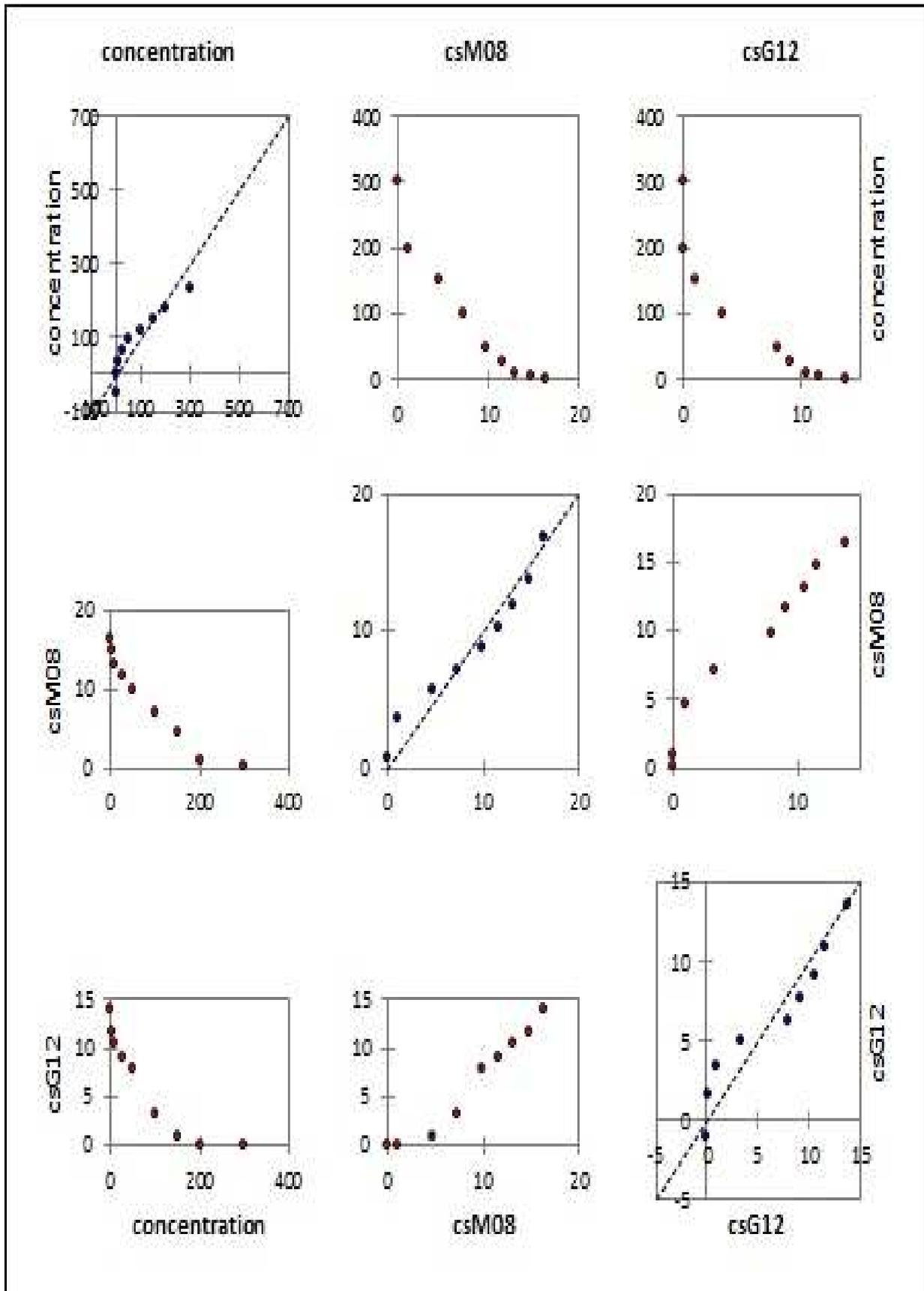
**Figure 13 :** apparition d'une coloration rose sur les différents milieux des deux souches bactériennes en présences des concentrations du (Hg) inférieures à la CMI.

L'absorbance a été mesurée au spectrophotomètre à 500 nm (Annexe VIII) et les concentrations d'AIA produites ont été déterminées (Annexe IX) puis représentées graphiquement (Figure 14).



**Figure 14 :** les concentrations d'Acide Indole Acétique produites par les deux souches en présence de concentrations distinctes du mercure.

Selon le test de corrélation réalisé et illustré par la (Figure 15), dans le cas des deux souches testées la production de l'AIA a montré une corrélation négativement significative ( $p < 0,05$ ) avec les concentrations ascendantes du mercure ajouté aux milieux. Quant à la production de l'AIA par les deux souches, elle est positivement significative ( $p < 0,05$ ), ce qui peut indiquer que les concentrations du mercure ont eu le même effet sur ces dernières.



**Figure 15 :** Analyse de corrélation entre les concentrations d'AIA produites par les deux souches avec les concentrations du mercure ajoutées.

Pour les deux souches étudiées, la production de l'AIA diminue en fonction de l'augmentation des concentrations du mercure dans le milieu ce qui implique que la production de l'AIA est affectée par le mercure et elle est inversement proportionnelle aux concentrations de ce dernier.

A toutes les concentrations étudiées, les quantités d'AIA produites par la souche csM08 sont supérieures à celles de csG12.

Au-delà de 20 µg/ml de mercure, admis comme le seuil de résistance au Hg, peu de souches bactériennes rhizosphériques ont la capacité de produire de l'AIA (Amin et Latif, 2017).

Dahlin et al. (1997) affirme que l'effet des métaux sur les rhizobia est proportionnel et graduel avec l'augmentation des concentrations des métaux.

Selon Chen et al. (2017), les *Bradyrhizobium* ont attiré l'attention pas uniquement pour leur rôle dans la fixation d'azote mais aussi pour leur capacité à stimuler la croissance des légumineuses en produisant de l'AIA, et donc augmentant leur efficacité dans la phytoremédiation. En plus de stimuler le développement du système racinaire des plantes favorisant l'absorption de l'eau et des minéraux, l'AIA intervient activement dans la régulation de l'expression des gènes clés putatifs d'absorption et de transport des métaux lourds pour améliorer leur accumulation par les plantes (Mérigout, 2006).

#### **IV.2. Effet du mercure sur la production des sidérophores**

Suite aux résultats positifs indiquant la production des sidérophores par les deux souches étudiées, un autre test a été réalisé pour étudier l'aptitude de ces *Bradyrhizobium* à produire des sidérophores en présence du Hg à des concentrations ascendantes inférieures à la concentration minimale inhibitrice.

Après une incubation pendant 10 jours à 28 °C, des halos de différents diamètres autour des disques ont été constatés. Les diamètres des halos observés variaient en fonction des concentrations du mercure ce qui signifie que la production des sidérophores est affectée par les concentrations du mercure.

Remarquablement, l'importance de ce résultat réside dans le fait que les sidérophores ont la capacité de se lier à une variété de métaux en plus du fer (Ahmed et Holmström, 2014) Dimkpa, 2016). On pense par conséquent, que les microbes producteurs de sidérophores jouent un rôle important dans la phytoextraction des métaux lourds (Rajkumar et al., 2010).

## **V. Recherches des activités enzymatiques**

### **V.1. Recherche de l'activité réduction des nitrates**

Après 6 jours d'incubation à 28°C, l'ajout de quelques gouttes du réactif de Griess a révélé une couleur rouge traduisant la réduction des nitrates en nitrites ; ainsi les deux souches bactériennes produisent une nitrate réductase.

### **V.2. Recherche de l'activité uréasique**

Un changement de la couleur des milieux vers le rose a été constaté après 10 jours d'incubation à 28°C ce qui indique l'hydrolyse de l'urée par les des deux souches csM08 et csG12.

### **V.3. Recherche de l'activité pectinolytique**

Après 10 jours d'incubation à 28°C, des zones claires autour des spots de la souche csG12 ont été apparues ce qui indique l'aptitude de cette dernière à produire de la pectinase tandis que le résultat a été négatif pour la souche csM08.

### **V.4. Recherche de l'activité cellulasique (CMCase)**

Le résultat du test a été négatif ; aucun changement n'a été constaté sur le milieu. Les deux souches csM08 et csG12 ne produisent pas de la cellulase.

### **V.5. Recherche de l'activité gélatinasiq**

Des zones claires autours des spots de la souche csG12 ont été apparues après 10 jours d'incubation à 28°C ce qui indique la production de la gélatinase, quant à la souche csM08 aucun résultat n'a été observé.

### **V.6. Recherche de l'activité chitinasique**

Aucune zone claire autour des spots n'a été constatée après 10 jours d'incubation à 28°C ce qui signifie l'inaptitude des deux souches *Bradyrhizobium* à produire de la chitinase.

Le Tableau VII est un récapitulatif des tests des activités enzymatiques qui ont été réalisés au cours de cette étude :

**Tableau VII** : Récapitulatif des tests de la mise en évidence de quelques Activités enzymatiques chez les souches csM08 et csG12.

Souches	Activités Enzymatiques					
	Nitrate réductase	Activité Uréasique	Activité pectinolytique	Activité cellulasique	Activité gélatinasiq	Activité chitinasique
csM08	+	+	-	-	-	-
csG12	+	+	+	-	+	-

Compte tenu des six tests réalisés, la souche csM12 possède un potentiel enzymatique plus important que la souche csG08.

Les deux souches étudiées ont pu hydrolyser l'urée. Le même résultat a été obtenu chez des *Bradyrhizobium* dans les études de Chahboune et al (2012) et Guerrouj et al. (2013).

Concernant nitrate réductase, les deux souches étudiées ont montré une capacité de réduire le nitrate en nitrite. Ce résultat concorde avec ceux de Bourebaba et al. (2016) ou il a été noté que 92% des souches étudiées sont capables de réduire le nitrate au stade de nitrite et seulement 8% des souches ont l'aptitude de réduire les nitrates au-delà du stade nitrite.

La capacité de produire différentes enzymes pour utiliser divers substrats organiques est une caractéristique biochimique importante chez les bactéries rhizosphériques. Les enzymes comme l'uréase, la gélatinase jouent un rôle important dans la formation des nodules et l'activité nitrate réductase rentre dans le métabolisme de fixation de l'azote. Ainsi, les rhizobia qui produisent ces enzymes sont considérés comme les plus avantageux pour la nodulation et la fixation de l'azote (Kumari et al., 2010).

Selon Sherwood et al. (1984), l'aptitude à hydrolyser l'urée et à réduire le nitrate est une caractéristique écologiquement importante dont il faut tenir compte pour la sélection d'une souche. Ainsi, les deux souches étudiées ; s'avèrent très intéressantes pour être utilisées comme inoculum. Cependant, les sols contaminés par les métaux lourds peuvent affecter le bon fonctionnement et donc une étude en présence de mercure est indispensable avant la proposition dans une bioremediation.

**Conclusion  
&  
Perspectives**

Des études scientifiques antérieures ont rapporté l'apport considérable des bactéries symbiotiques dans la réhabilitation des sols contaminés par les métaux lourds. Ce présent travail a été réalisé dans l'optique de contribuer à cette dynamique scientifique qui consiste à substituer les techniques physico-chimiques ; traditionnellement utilisées pour la réhabilitation des sols pollués, par la bioremediation qui est un ensemble de procédés biologiques.

Au cours de ce travail nous avons étudié deux souches bactériennes symbiotiques appartenant au genre *Bradyrhizobium* originaires d'un sol minier contaminé par le mercure.

Sur la base de divers tests effectués, les deux souches étudiées ont montré une résistance importante au mercure et au plomb. Les concentrations minimales inhibitrices du mercure qui ont affecté les souches csM08 et csG12 sont de 150 et 100 µg/ml respectivement. Quant au plomb, les CMI sont de 500 µg/ml pour la souche csM08 et de 400 µg/ml pour csG12.

Également, l'évaluation de la croissance des deux souches en présence de concentrations inférieures aux CMI a démontré l'effet du mercure sur l'allongement du temps de latence et de génération et de la diminution de l'optimum de croissance.

En outre, les deux souches bactériennes ont exhibé des caractéristiques PGP essentielles pour la croissance des plantes et pour la dégradation des polluants. Les deux *Bradyrhizobium* ont montré une aptitude à produire l'auxine acide indole acétique et les sidérophores en absence et en présence du mercure cependant l'augmentation des concentrations du mercure dans les milieux a provoqué la diminution de la production.

Enfin, plusieurs activités enzymatiques ont été recherchées et les résultats ont démontré la possession des deux souches d'un potentiel enzymatique important.

Les résultats des tests qu'on a pu réaliser durant cette étude, et en s'appuyant sur les études précédentes dans ce domaine, démontrent que ces deux *Bradyrhizobium* et ceux étudiés en particulier possèdent des caractéristiques très importantes qui pourraient servir éventuellement dans des projets de bioremediation des sols contaminés par les métaux lourds et plus particulièrement par le mercure.

À terme de ce travail, nous émettons quelques réflexions et recommandations sous forme de perspectives :

- Évaluer le potentiel enzymatique des deux souches étudiées en présence du mercure.
- Tester les potentialités des deux souches en association avec leur partenaire végétal.
- Rechercher les mécanismes de résistance au mercure chez les deux souches étudiées.

# **Références bibliographiques**

**A**

- Abd-Alla, M. H. (1998). Growth and siderophore production in vitro of *Bradyrhizobium* (Lupin) strains under iron limitation. *European journal of soil biology* 34, 99-104.
- Abou-Shanab, R.I., Angle, J.S., Delorme, T.A., Chaney, R.L., van Berkum, P., Moawad, H., Ghanem, K., Ghazlan, H.A. (2003). Rhizobacterial effects on nickel extraction from soil and uptake by *Alyssum murale*. *N. Phytol* 158, 219–224.
- Abou-Shanab, R. A. I., van Berkum, P., & Angle, J. S. (2007). Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere* 68, 360-367.
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria : Current perspective. *Journal of King saud University-science* 26, 1-20.
- Ahmed, E., & Holmström, S. J. (2014). Siderophores in environmental research : Roles and applications. *Microbial biotechnology* 7, 196-208.
- Alikhani, H. A., Saleh-Rastin, N., & Antoun, H. (2007). Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. *First international Meeting on microbial phosphate solubilization* 35-41.
- Alloway, B. J. (1995). Soil processes and the behavior of heavy metals. *Heavy metals in soils* 11-37.
- Amin, A., & Latif, Z. (2017). Screening of mercury-resistant and indole-3-acetic acid producing bacterial-consortium for growth promotion of *Cicer arietinum* L. *Journal of basic microbiology* 57, 204-217.
- Appelbaum, E. (2018). The *Rhizobium/Bradyrhizobium*-legume symbiosis. In *Molecular biology of symbiotic nitrogen fixation* (p. 131-158).

**B**

- Bedouhene, M., & Ait Haddad, D. (2015). Impact des métaux lourds sur la croissance des bactéries nodulant quelques légumineuses.
- Bourebaba, Y., Durán, D., Boulila, F., Ahnia, H., Boulila, A., Temprano, F., Palacios, J. M., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T., & Rey, L. (2016). Diversity of *Bradyrhizobium* strains nodulating *Lupinus micranthus* on both sides of the Western Mediterranean : Algeria and Spain. *Systematic and applied microbiology* 39, 266-274.
- Brígido, C., & Glick, B. R. (2015). Phytoremediation using rhizobia. In *Phytoremediation* (p. 95-114).
- Bruins, M. R., Kapil, S., & Oehme, F. W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and environmental safety* 45, 198-207.

## C

Carrasco, J. A., Armario, P., Pajuelo, E., Burgos, A., Caviedes, M. A., López, R., Chamber, M. A., & Palomares, A. J. (2005). Isolation and characterisation of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcóllar pyrite mine. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 1131-1140.

Chahboune, R., Carro, L., Peix, A., Ramírez-Bahena, M.-H., Barrijal, S., Velázquez, E., & Bedmar, E. J. (2012). *Bradyrhizobium rifense* sp. Nov. Isolated from effective nodules of *Cytisus villosus* grown in the Moroccan Rif. *Systematic and applied microbiology* 35, 302-305.

Chen, B., Luo, S., Wu, Y., Ye, J., Wang, Q., Xu, X., Pan, F., Khan, K. Y., Feng, Y., & Yang, X. (2017). The effects of the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* Sasm05 and IAA on the plant growth and cadmium uptake of *Sedum alfredii* Hance. *Frontiers in microbiology* 8, 2538.

Cristaldi, A., Conti, G. O., Jho, E. H., Zuccarello, P., Grasso, A., Copat, C., & Ferrante, M. (2017). Phytoremediation of contaminated soils by heavy metals and PAHs. A brief review. *Environmental Technology & Innovation* 8, 309-326.

## D

Dahlin, S., Witter, E., Mårtensson, A., Turner, A., & Bååth, E. (1997). Where's the limit? Changes in the microbiological properties of agricultural soils at low levels of metal contamination. *Soil Biology and Biochemistry* 29, 1405-1415.

Dary, M., Chamber-Pérez, M. A., Palomares, A. J., & Pajuelo, E. (2010). "In situ" phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *Journal of Hazardous Materials* 177, 323-330.

Dimkpa, C. (2016). Microbial siderophores: Production, detection and application in agriculture and environment. *Endocytobiosis & Cell Research* 27.

## E

El-Hilali, I. (2006). La symbiose *Rhizobium*-LUPIN : biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *lupinus luteus*. Thèse de Doctorat en Microbiologie et Biologie Moléculaire. Université du Rabat. 206p.

Ernst, W. H. O. (1998). The origin and ecology of contaminated, stabilized and non-pristine soils. *Metal-Contaminated Soils: In Situ Inactivation and Phytoremediation* 17-29.

## F

Fagorzi, C., Checcucci, A., DiCenzo, G. C., Debiec-Andrzejewska, K., Dziewit, L., Pini, F., & Mengoni, A. (2018). Harnessing rhizobia to improve heavy-metal phytoremediation by legumes. *Genes* 9, 542.

Fahr, M., Laplaze, L., Bendaou, N., Hocher, V., El Mzibri, M., Bogusz, D., Smouni, A. (2013) Effect of lead on root growth.

Frazier, W. C. (1926). A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. The Journal of Infectious Diseases 302-309.

Frérot, H., Lefèbvre, C., Gruber, W., Collin, C., Dos Santos, A., & Escarré, J. (2006). Specific interactions between local metalcolous plants improve the phytostabilization of mine soils. Plant and Soil 282, 53-65.

## G

Ghnaya, T., Mnassri, M., Ghabriche, R., Wali, M., Poschenrieder, C., Lutts, S., & Abdelly, C. (2015). Nodulation by *Sinorhizobium meliloti* originated from a mining soil alleviates Cd toxicity and increases Cd-phytoextraction in *Medicago sativa* L. Frontiers in plant science 6, 863.

González, R. C., & González-Chávez, M. C. A. (2006). Metal accumulation in wild plants surrounding mining wastes. Environmental Pollution 144, 84-92.

Guerrouj, K., Ruíz-Díez, B., Chahboune, R., Ramírez-Bahena, M.-H., Abdelmoumen, H., Quiñones, M. A., El Idrissi, M. M., Velázquez, E., Fernández-Pascual, M., & Bedmar, E. J. (2013). Definition of a novel symbiovar (*sv. Retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp. Nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. Systematic and applied microbiology 36, 218-223.

## H

Halder, A. K., & Chakrabartty, P. K. (1993). Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. Folia microbiologica 38, 325-330.

## J

Jaradat, Z., Dawagreh, A., Ababneh, Q., & Saadoun, I. (2008). Influence of culture conditions on cellulase production by *Streptomyces* sp.(strain J2). Jordan Journal of Biological Sciences 1, 141-146.

Jordan, D. C. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. Nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 32, 136-139.

Jordan, D. C. (1984). *Bradyrhizobium*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1, 242-244.

## K

- Khalid, S., Shahid, M., Niazi, N. K., Murtaza, B., Bibi, I., & Dumat, C. (2017). A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Geochemical Exploration* 182, 247-268.
- Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A. Oves, M. (2008). Role of plant growth promoting rhizobacteria in the Remediation of metal contaminated soils. *In: Organic Farming, Pest control and remediation of soil pollutants. Sustainable Agriculture Reviews*. Ed. E .Lichtfouse. pp.319-350.
- Khan, M. S., Zaidi, A., Wani, P. A., & Oves, M. (2009). Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environmental chemistry letters* 7, 1-19.
- Kinkle, B. K., Angle, J. S., & Keyser, H. H. (1987). Long-term effects of metal-rich sewage sludge application on soil populations of *Bradyrhizobium japonicum*. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 315-319.
- Koomen, I., McGram, S. P., & Giller, K. E. (1990). Mycorrhizal infection of clover is delayed in soils contaminated with heavy metals from past sewage sludge applications. *Soil Biology and Biochemistry* 22, 871-873.
- Kumar, G. K., & Ram, M. R. (2014). Phosphate solubilizing rhizobia isolated from *Vigna trilobata*. *Am J Microbiol Res* 2, 105-109.
- Kumar, S., Singh, R. K., Kumar, S. C., Banjare, U., & Patel, A. K. (2021). Estimation of plant growth hormone (iaa) production ability by *Bradyrhizobium* strains isolated from root nodules of *Pigeon pea (Cajanus cajan)*. *plant archives* 21, 1567-1570.
- Kumari, B. S., Ram, M. R., & Mallaiiah, K. V. (2010). Studies on nodulation, biochemical analysis and protein profiles of *Rhizobium* isolated from Indigofera species. *Malaysian Journal of Microbiology* 6, 133-139.

## L

- Laloum, T. (2013). Étude du rôle des facteurs de transcription MtNF-YA1 et MtNF-YA2 dans les étapes précoces de la symbiose rhizobienne chez *Medicago truncatula* [PhD Thesis]. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
- Lefèvre, C. (2004). Caractérisation et phylogénie des bactéries symbiotiques intracellulaires des charançons de la famille des *Dryophthoridae*. These de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.
- Li, C., Zhou, K., Qin, W., Tian, C., Qi, M., Yan, X., & Han, W. (2019). A review on heavy metals contamination in soil : Effects, sources, and remediation techniques. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 28, 380-394.

## M

- Ma, Y., Rajkumar, M., & Freitas, H. (2009). Isolation and characterization of Ni mobilizing PGPB from serpentine soils and their potential in promoting plant growth and Ni accumulation by *Brassica spp.* *Chemosphere* 75, 719-725.
- Malik, D. K., & Sindhu, S. S. (2011). Production of indole acetic acid by *Pseudomonas sp.* : Effect of coinoculation with *Mesorhizobium sp.* Cicer on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*). *Physiology and Molecular Biology of Plants* 17, 25-32.
- Medfu Tarekegn, M., Zewdu Salilih, F., & Ishetu, A. I. (2020). Microbes used as a tool for bioremediation of heavy metal from the environment. *Cogent Food & Agriculture* 6, 1783174.
- Mérigout, P. (2006). Étude du métabolisme de la plante en réponse à l'apport de différents fertilisants et adjuvants cultureux. Influence des phytohormones sur le métabolisme azoté. [Phdthesis, INAPG (AgroParisTech)].
- Monchy, S. (2007). Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez *Cupriavidus metallidurans* CH34. Thèse de doctorat à l'Université Libre de Bruxelles.
- Muthusaravanan, S., Sivarajasekar, N., Vivek, J. S., Paramasivan, T., Naushad, M., Prakashmaran, J., Gayathri, V., & Al-Duaij, O. K. (2018). Phytoremediation of heavy metals : Mechanisms, methods and enhancements. *Environmental chemistry letters* 16, 1339-1359.

## O

- Oves, M., Khan, M. S., Zaidi, A., & Ahmad, E. (2012). Soil contamination, nutritive value, and human health risk assessment of heavy metals : An overview. *Toxicity of heavy metals to legumes and bioremediation* 1-27.

## P

- Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I. D., Lafuente, A., & Caviedes, M. Á. (2011). Legume–rhizobium symbioses as a tool for bioremediation of heavy metal polluted soils. In *Biomangement of metal-contaminated soils* (p. 95-123).
- Patten, C. L., & Glick, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian journal of microbiology* 42, 207-220.
- Pereira, S. I. A., Lima, A. I. G., & Figueira, E. M. de A. P. (2006). Heavy metal toxicity in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* isolated from soils subjected to different sources of heavy-metal contamination : Effects on protein expression. *Applied Soil Ecology* 33, 286-293.
- Ponmurugan, K., Sankaranarayanan, A., & Al-Dharbi, N. A. (2012). Biological activities of plant growth promoting *Azotobacter sp.* Isolated from vegetable crops rhizosphere soils. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 6, 1-10.
- Praveen, A., Pandey, V. C., Marwa, N., & Singh, D. P. (2019). Rhizoremediation of Polluted Sites. In *Phytomanagement of Polluted Sites* (p. 389-407).

## R

Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M. N. V., & Freitas, H. (2010). Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in biotechnology* 28, 142-149.

Ruiz-Díez, B., Quiñones, M. A., Fajardo, S., López, M. A., Higuera, P., & Fernández-Pascual, M. (2012). Mercury-resistant rhizobial bacteria isolated from nodules of leguminous plants growing in high Hg-contaminated soils. *Applied microbiology and biotechnology* 96, 543-554.

## S

Salmi, A., & Boulila, F. (2021). Heavy metals multi-tolerant *Bradyrhizobium* isolated from mercury mining region in Algeria. *Journal of Environmental Management* 289, 112547.

Saravanan, A., Jeevanantham, S., Narayanan, V. A., Kumar, P. S., Yaashikaa, P. R., & Muthu, C. M. M. (2020). Rhizoremediation – A promising tool for the removal of soil contaminants : A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 8, 103543.

Seneviratne, M., Gunaratne, S., Bandara, T., Weerasundara, L., Rajakaruna, N., Seneviratne, G., & Vithanage, M. (2016). Plant growth promotion by *Bradyrhizobium japonicum* under heavy metal stress. *South African Journal of Botany* 105, 19-24.

Simon, Z., Mtei, K., Gessesse, A., & Ndakidemi, P. A. (2014). Isolation and characterization of nitrogen fixing rhizobia from cultivated and uncultivated soils of northern Tanzania. *American Journal of Plant Sciences* 5, 4050.

Soares, M. M., Silva, R. da, & Gomes, E. (1999). Screening of bacterial strains for pectinolytic activity : Characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus sp.* *Revista de Microbiologia* 30, 299-303.

Sumiahadi, A., & Acar, R. (2018). A review of phytoremediation technology : Heavy metals uptake by plants. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 142, 012023.

## T

Tangahu, B. V., Sheikh Abdullah, S. R., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., & Mukhlisin, M. (2011). A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering*, 2011.

## V

Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., & Nehnevajova, E. (2009). Phytoremediation of contaminated soils and groundwater : Lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research* 16, 765-794.

Vavasseur, A. (2014). Bioremédiation des sols et des eaux : Application aux pollutions chimique et nucléaire Bioremediation of soil and water: application to chemical and nuclear. Pollution atmosphérique, 80.

**W**

Wani, P. A., Khan, M. S., & Zaidi, A. (2007). Effect of metal tolerant plant growth promoting *Bradyrhizobium sp.*(vigna) on growth, symbiosis, seed yield and metal uptake by greengram plants. Chemosphere 70, 36-45.

# **Annexes**

## **Annexe I : Composition des milieux de culture.**

### **Composition du milieu Yeast-mannitol-agar (YMA) (Vincent, 1970)**

Mannitol.....	10g
Extrait de levure.....	0,35g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	0,2g
NaCl.....	0,1g
Agar .....	15g
H <sub>2</sub> O.....	1000ml

Ajuster le pH à 7 et stériliser à 120°C pendant 20min.

### **Composition du milieu Yeast-mannitol-broth (YMB) (Vincent, 1970)**

Mannitol.....	10g
Extrait de levure.....	0,35g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	0,2g
NaCl.....	0,1g
H <sub>2</sub> O.....	1000ml

Ajuster le pH à 7 et stériliser à 120°C pendant 20min.

### **Composition du milieu Lysogeny Broth ou Luria Broth (Luria Bertani)**

Tryptone.....	10g
Extrait de levure.....	5g
NaCl.....	5g
H <sub>2</sub> O.....	1000ml

Ajuster le pH à 7 et stériliser à 120°C pendant 20min.

### **Composition du milieu Pikovskaya's (PKA)**

Extrait de levure .....	0.5g
Glucose.....	10g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0.1g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	0.5g
NaCl.....	0.2
KCl .....	0.2g
MnSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	0.002g
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O .....	0.002g
Agar.....	15g

H<sub>2</sub>O.....1000ml

Après autoclavage du milieu, 20 ml d'une solution stérile de phosphate tricalcique (10%) sont rajoutés, le mélange est ensuite coulé dans des boites de pétri et laissé se solidifier.

**Composition du milieu Carder (1986) :**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....6g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....3g  
NaCl.....0,5g  
NH<sub>4</sub>Cl.....1g  
Extrait de levure.....3g  
CMC.....5g  
Agar.....15 g  
H<sub>2</sub>O.....1000ml

**Composition du réactif de Salkowski:**

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98%..... 150ml  
FeCl<sub>3</sub> 0.5 M..... 7.5 ml  
H<sub>2</sub>O.....250 ml

**Annexe II :**

Méthode de calcul de la solution mère (exemple de mercure) :

MM HgCl<sub>2</sub> = 271,52 g/mol  
MM Zn = 200,59 g/mol

$$\left. \begin{array}{l} 271,52 \text{ g/mol} \longrightarrow 100 \% \\ 200,59 \text{ g/mol} \longrightarrow X \end{array} \right\} X = 73,88 \%$$

Préparation de la solution initiale :

C = 100 mg/ml

$$\left. \begin{array}{l} 1 \text{ g ZnSO}_4 \longrightarrow 0,74 \text{ g Hg} \\ X \longrightarrow 0,1 \text{ g} \end{array} \right\} X = 0,135 \text{ g}$$

Pour 10 ml on mesure 1,35 g Hg

### Annexe III :

Préparation des milieux de culture YMA à différentes concentrations du Mercure (Hg) pour le test de la CMI.

[Hg]µg/ml	5	10	25	50	100	150	200	300
SM (ml)	0,05	0,1	0,15	0,25	0,5	0,75	1	1,5
YMA(ml)	99,95	99,9	99,85	99,75	99,5	99,25	99	98,5

**SM (ml) :** Volume de la solution mère du métal.

Préparation des milieux de culture YMA à des concentrations différentes en sels du plomb (Pb) pour le test de la CMI.

[Pb <sup>2+</sup> ]µg/ml	25	50	100	200	300	400	500	600
SM (ml)	0,083	0,166	0,333	0,666	0,999	1,333	1,666	1,999
YMA(ml)	99,917	99,844	99,667	99,334	99	98,667	98,34	98

**SM (ml) :** Volume de la solution mère du métal.

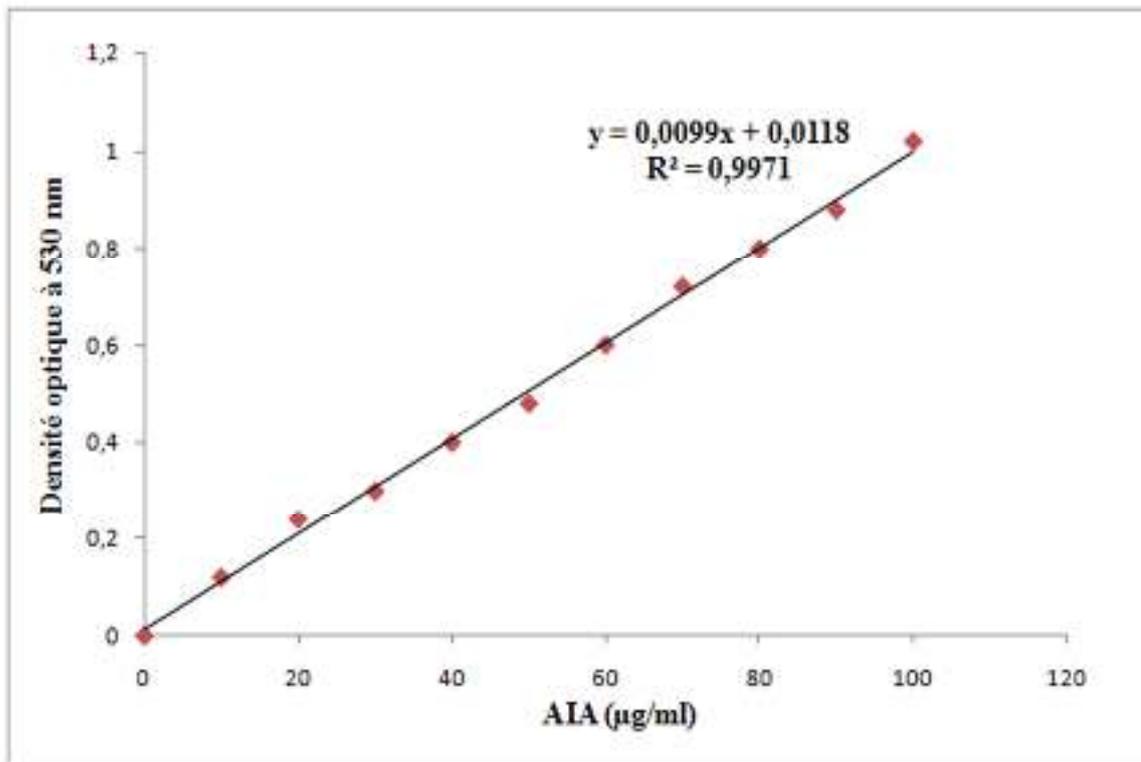
### Annexe IV :

Préparation des milieux de culture YMB à des concentrations différentes en sels du Chlorure du Mercure (HgCl<sub>2</sub>) pour le test de croissance.

[Hg <sup>2+</sup> ]	5	10	25	50	100
SM (ml)	0,005	0,01	0,015	0,025	0,05
YMB(ml)	9,995	9,99	99,85	99,975	99,95

**SM (ml) :** Volume de la solution mère du métal.

## Annexe V :



Courbe d'étalonnage d'Acide Indole Acétique.

## Annexe VI :

Préparation des milieux de culture LB à des concentrations différentes en sels du Chlorure du Mercure ( $\text{HgCl}_2$ ) pour le test de l'AIA.

[Hg]	5	10	25	50	100	150
SM (ml)	0,005	0,01	0,015	0,025	0,05	0,075
LB (ml)	9,995	9,99	9,985	9,975	9,95	9,925

**SM (ml) :** Volume de la solution mère du métal.

## Annexe VII :

Suivi de la croissance des deux souches csG12 et csM08 pendant 10 jours sous le stress de différentes concentrations du mercure (Hg) inférieures aux CMI.

Souche	[Hg]	0h	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h	192h	216h	240h
csG12	0	0,042	0,123	0,221	0,348	0,415	0,461	0,498	0,476	0,462	0,445	0,439
	5	0,028	0,085	0,178	0,281	0,351	0,372	0,427	0,409	0,398	0,377	0,358
	10	0,025	0,062	0,137	0,198	0,241	0,311	0,359	0,358	0,348	0,324	0,302
	25	0,025	0,051	0,111	0,176	0,219	0,284	0,303	0,298	0,291	0,278	0,269
	50	0,022	0,046	0,065	0,101	0,141	0,159	0,225	0,222	0,211	0,197	0,181
	100	0,019	0,031	0,054	0,069	0,091	0,117	0,111	0,103	0,1	0,093	0,079
csM08	0	0,038	0,123	0,197	0,29	0,351	0,44	0,501	0,486	0,481	0,467	0,458
	5	0,032	0,089	0,18	0,271	0,298	0,381	0,458	0,433	0,415	0,389	0,38
	10	0,028	0,065	0,142	0,181	0,245	0,321	0,382	0,36	0,351	0,332	0,32
	25	0,027	0,059	0,1	0,141	0,192	0,279	0,341	0,329	0,317	0,299	0,291
	50	0,022	0,06	0,095	0,111	0,159	0,211	0,297	0,266	0,252	0,245	0,231
	100	0,02	0,053	0,079	0,104	0,126	0,157	0,186	0,18	0,161	0,158	0,143
	150	0,019	0,047	0,062	0,089	0,107	0,124	0,146	0,13	0,128	0,112	0,103

## Annexe VIII :

Densité optique (DO) des différents milieux contenant des concentrations mercuriques distinctes.

Souches bactériennes	Concentrations du (Hg) (µg/ml)						
	T	5	10	25	50	100	150
A (csM08)	0,174	0,159	0,141	0,127	0,109	0,083	0,058
A (csG12)	0,149	0,126	0,116	0,102	0,091	0,045	

## Annexe IX :

Les concentrations d'Acide Indole Acétique produites par les deux souches en présence de concentrations distinctes du mercure Hg.

Souches Bactériennes	Concentrations du Mercure (Hg) (µg/ml)						
	T	5	10	25	50	100	150
[AIA](csM08)	16,38	14,87	13,05	11,64	9,82	7,19	4,66
[AIA](csG12)	13,85	11,54	10,53	9,11	8	3,35	

**Résumé :**

Ce travail a été réalisé dans l'objectif de contribuer à l'étude de deux souches bactériennes du genre *Bradyrhizobium* ; isolées à partir des nodules racinaires de *Calicotome spinosa* originaire des mines de mercure situées à Azzaba (Skikda) au Nord-Est de l'Algérie, dans l'optique de les utiliser dans un projet de Bioremediation.

Le test de la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) réalisé sur milieu YMA a mis en évidence une forte résistance des deux souches au mercure et au plomb.

L'évaluation de la croissance de ces bactéries sur milieu YMB en présence des concentrations ascendantes du mercure a confirmé les résultats trouvés auparavant. Les deux *Bradyrhizobium* ont pu maintenir leur croissance en présence des concentrations du mercure inférieures à la CMI.

Les deux souches ont démontré leur aptitude à produire de l'acide indole acétique (AIA) et à sécréter des sidérophores en présence et en absence du mercure. Elles ont également un bagage enzymatique très important.

**Mots clés :** métaux lourds, bioremediation, résistance, *Bradyrhizobium*, activité enzymatique.

**Abstract:**

This work was carried out with the objective of contributing to the study of two bacterial strains of the genus *Bradyrhizobium*; isolated from the root nodules of *Calicotome spinosa* native to the mercury mines located in Azzaba (Skikda) in the North-East of Algeria, with a view to their possible use in a Bioremediation project.

The minimum inhibitory concentration (MIC) test performed on YMA medium showed a strong resistance of both strains to mercury and lead.

The evaluation of the growth of the two bacteria on YMB medium in the presence of ascending concentrations of mercury confirmed the results found previously. Both *Bradyrhizobium* were able to maintain their growth in the presence of mercury concentrations below the MIC.

Both strains demonstrated the ability to produce indole acetic acid (IAA) and secrete siderophores in the presence and absence of mercury. They also have a very important enzymatic background.

**Keywords:** heavy metals, bioremediation, resistance, *Bradyrhizobium*, enzymatic activity.