

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département Microbiologie
Filière : Science biologique
Option : Écologie microbienne



Réf :.....

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

MASTER

Thème

**Isolement de bactéries rhizosphériques
résistantes aux métaux lourds**

Présenté par :

**MEHENNA Fares et
MEZHOUD Hamanou**

Soutenu le : **19 Juin 2017**

Devant le jury composé de :

M. BENSAID K.	MAA	Président
M. NABTI El-Hafid	Professeur	Encadreur
Mlle BENSIDHOUM L.	Docteur	Co-promotrice
Mlle DJINNI I.	MCB	Examinatrice

Année universitaire : 2016 / 2017

Remerciements

Nous tenons à remercier infiniment Monsieur NABTI El-Hafid de nous avoir accordé la chance de travailler au sein de son laboratoire et de nous avoir fait profiter de ses connaissances. Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.

Nous remercions Monsieur BENSAID K. de nous avoir fait l'honneur de présider le jury. Nos remerciements vont également à M^{lle} DJINNI I. d'avoir pris le temps d'examiner notre mémoire et d'avoir accepté de participer à ce jury.

Nous tenons à remercier plus particulièrement M^{lle} BENSIDHOUM Leila qui nous a régulièrement suivis dans la réalisation pratique de ce travail. On la remercie pour son soutien, ses conseils, sa simplicité, sa générosité scientifique et ses qualités humaines.

Nous remercions M. RAI Abdelouaheb et Mme KHELOUFI Nouria de nous avoir aidés et encouragés pendant tout notre travail.

Nous remercions également toute l'équipe du laboratoire LMER, particulièrement l'équipe de Biomasse et Environnement. Merci à M. ABBACI Hocine pour ses conseils pertinents, merci à M^{me} TABLI Nassira et M^{lle} BELKEBLA Nadia et M^{lle} AIT BESSAI Silia pour leur disponibilité, leur aide et leur patience.

Merci également à nos camarades de la promotion Ecologie Microbienne, Amera, Dahbia, Fatiha et Hachemi

Enfin, nos profonds remerciements s'adressent à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.



DÉDICACES

Je dédie ce modeste travail

À mes chers parents qui m'ont tant soutenu tout au long de mon parcours. Aucun hommage ni remerciement ne pourrait être suffisant

À mes frères : Fatah, Djebar et Samir

À toute la famille Mehenna

À mon cher binôme et toute sa famille

À tous mes amis

À tous mes enseignants et mes camarades de l'université

À tous les étudiants de la promotion M2 Ecologie

Microbienne 2016/2017

Fares

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

À la mémoire de mon grand père

À mes chers parents qui m'ont soutenu tout au long de mes études

À mes sœurs Karima, Naima et Hafida

À mon frère Karim et ma belle-soeur Kahina

À tous mes neveux et toutes mes nièces

À mes amis Syphax, Lydia, Farid, Yamine, Saci, Fatah, Kamel, Mehdi, Poutou, Toufik, Naim, Rahim, ...

À mon cher binôme Fares et toute sa famille

À tous mes camarades avec qui j'ai partagé les années de l'université

À tous les étudiants de la promotion M2 Ecologie microbienne 2016/2017

À tous les enseignants de la spécialité

Je le dédie aussi à tous les prolétaires, les opprimés, les damnés, les marginaux, les réfugiés et les insoumis... à Jean Paul SARTRE.

Hamanou

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Représentation schématique des mécanismes d'action directe et indirecte employés par les PGPR.	06
2	Lieu du prélèvement des échantillons	12
3	Graines de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) variété Marmande (Originale).	15
4	Quelques étapes du test <i>in vivo</i>	17
5	Résultats du test de la production de phosphatase	23
6	Production d'AIA (µg/ml) par les isolats sélectionnés	24
7	Influence du Cadmium sur quelques paramètres de la croissance de la tomate	26
8	Effet des consortia bactériens sur la croissance de tomate	27
9	Effet des consortia bactériens sur la croissance de tomate dans un sol pollué (Cadmium 1mM)	28

Liste des Tableaux

<i>N°</i>	Titre	Page
I	Tolérance des 34 isolats au cadmium sur milieu PCA	19
II	Tolérance des 34 isolats au chrome sur milieu PCA	20
III	Identification préliminaire des isolats sélectionnés	21

Liste des abréviations

ABA : acide abscissique

AIA : Acide Indole Acétique

CE3c : Centre d'Ecologie, Evolution et Changements Environnementaux

LB : Luria Bertani

PBS : Phosphate Buffer Solution

PCA: Plat Count Agar

PGPB: Plant Growth Promoting Bacteria

PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria

PSM: Phosphate solubilizing Microorganisms

ROS: Reactive oxygen species

SOD: Superoxyde-dismutase

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction 1

Synthèse Bibliographique

Biologie de la rhizosphère

1. La rhizosphère 3

2. Diversité microbienne de la rhizosphère 3

3. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes 3

3.1. Mécanismes impliqués dans la stimulation de la croissance des plantes 3

3.1.1. Mécanismes directes 4

a. Fixation d'azote 4

b. Solubilisation du phosphate 4

c. Solubilisation du fer 4

d. Production de phytohormone 5

3.1.2. Mécanismes indirectes 5

Métaux lourds

1. les métaux lourds 7

2. Origine de la contamination des sols par les métaux lourds 7

3. Impact des métaux lourds 7

3.1. Impact sur l'environnement 7

3.2. Impact sur la plante 7

3.3. Impact sur les bactéries rhizosphériques 8

4. Mécanismes de défense des plantes et des bactéries du sol	8
4.1 Mécanismes de résistance de la plante	8
4.2. Mécanismes de résistance des bactéries	8
5. La bioremédiation	9
5.1. Définition	9
5.2. Phytoremédiation	9
5.3. La bioremédiation par les microorganismes	10

Matériels et Méthodes

1. Échantillonnage et isolement de bactéries rhizosphériques	11
1.1. Échantillonnage du sol rhizosphérique	11
1.2. Isolement des bactéries.....	12
1.2.1. Préparation des dilutions	12
1.2.2. Ensemencement	12
1.2.3. Purification des bactéries	12
2. Résistance aux métaux lourds	13
3. Identification des bactéries sélectionnés	13
4. Recherche de propriétés d'intérêt agricole	13
4.1. Solubilisation du phosphate	13
4.2. Production d'acide indole acétique (AIA)	13
5. Effet des isolats sélectionnés sur la croissance de la tomate	14
5.1. Préparation du sol pour l'étude <i>in vivo</i>	14
5.2. Origine des graines	14
5.3. Stérilisation des graines.....	15
5.4. Préparation des suspensions bactériennes	15
5.5. Inoculation des graines	16
5.6. Mise en pots	16
5.7. Irrigation des pots.....	16

5.8. Récolte des plants.....	16
6. Analyse statistique.....	17

Résultats et Discussion

1. Échantillonnage du sol rhizosphérique	18
2. Isolement de bactéries rhizosphériques.....	18
3. test de résistance aux métaux lourds	18
4. Identification des bactéries sélectionnées	21
5. Recherche de propriétés d'intérêt agricole	22
5.1. Détermination de l'activité phosphatase	22
5.2. Production de l'AIA	23
6. Effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance des plantes	25
6.1. Le choix de la plante	25
6.2. Le choix des consortia.....	25
6.3. Effet du Cadmium sur la croissance de la tomate	25
6.4. Effet des consortia bactériens sur la croissance de la tomate.....	27
6.5. Effet des consortia bactériens sur la croissance de la tomate dans un sol pollué par le Cadmium	28
Conclusion.....	30
Références Bibliographiques	31
Annexes	

Introduction

La pollution de l'environnement est un phénomène préoccupant. En effet, avec l'accélération du développement économique, l'homme est de plus en plus responsable.

Les métaux lourds constituent une catégorie de polluants. Aujourd'hui, la majorité des métaux lourds libérés dans l'environnement proviennent des émissions de fonderies et d'autres activités industrielles. La contamination par ces métaux provoque une diminution de l'activité microbienne dans les sols et par conséquent la diminution de leurs fertilité, ce qui cause un stress abiotique chez les plantes, provoquant des pertes dans la production végétale (Gao et *al.*, 2010 ; Yuan et *al.*, 2015).

Pour remédier à ce problème, l'homme a eu recours à différents procédés physiques et chimiques. Cependant, malgré leur efficacité, ces méthodes sont coûteuses et peuvent engendrer d'autres types de pollution (Vavasseur, 2014).

La bioremédiation, c'est-à-dire l'emploi de procédés biologiques pour éliminer les polluants industriels, est une option avantageuse pour diminuer la pression exercée sur l'environnement. Cette technique désigne un ensemble de processus utilisé pour dépolluer des sites naturels (sol, sédiments, eaux de surface ou souterraines) en faisant appel à l'utilisation de micro-organismes, de champignons, de végétaux ou d'enzymes qu'ils produisent. Les moyens mis en œuvre sont donc respectueux de l'environnement et de la santé humaine (Jørgensen et *al.*, 2000).

Par ailleurs, l'utilisation de bactéries rhizosphériques pour atténuer l'effet des métaux lourds sur les plantes, offre une possibilité intéressante pour développer une agriculture économique et écologique (Huang et *al.*, 2004).

Beaucoup de travaux ont été publiés ces dernières années sur l'application des rhizobactéries pour restaurer la croissance des plantes et atténuer l'impact sur le milieu (Hussein et *al.*, 2004 ; Pandey et *al.*, 2013 ; Bensidhoum et *al.*, 2016). C'est dans cette optique qu'on s'est assigné les objectifs suivants :

Isolement de quelques bactéries rhizosphériques résistantes aux métaux lourds et étude de leurs effets sur la restauration de la croissance de la tomate sous stress métallique.

Cette présente étude est divisée en 3 parties ; la première est consacrée à la synthèse bibliographique en rapportant l'essentiel de la littérature scientifique sur la thématique. La deuxième partie est celle de matériel et méthodes (isolement et sélection de rhizobactéries métallo-résistantes, recherche de quelques traits PGP et un test *In vivo* sur l'effet des isolats

sélectionnés sur la restauration de la croissance de la tomate). La troisième partie est consacrée à la présentation des résultats obtenus ainsi que leur interprétation et discussion.

Et enfin, une conclusion résumant les principaux résultats obtenus dans le travail mené a été faite, et des perspectives ont été présentées pour une meilleure exploitation des isolats obtenus.

Synthèse
bibliographique

1. La rhizosphère

La rhizosphère, telle que définie par Hiltner en 1904, est le volume du sol soumis à l'influence des racines des plantes, y compris les racines elles-mêmes (Hartmann et *al.*, 2008). Elle est composée de l'endo-rhizosphère, le rhizoplan et l'exo-rhizosphère ou le sol rhizosphérique (Gray et Smith, 2005). La rhizosphère est le lieu d'interactions entre le sol, la plante et les microorganismes. Ces interactions dépendent des conditions physiques du milieu et des organismes mis en jeu (Miah et *al.*, 2000). Cette zone d'interactions s'étend de quelques micromètres à plus de 2 mm en dehors de la surface racinaire (Kennedy et De Luna, 2004). De même, la densité des bactéries est plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol distant des racines, (Whipps, 2001). Cette interface entre les microorganismes et les racines des végétaux peut avoir une grande influence sur l'augmentation des éléments nutritifs et la diminution de la toxicité des métaux (Smith, 1994).

2. Diversité microbienne dans la rhizosphère

La rhizosphère est un micro-écosystème abritant des microorganismes qui sont principalement des : bactéries, champignons, protozoaires, et archées ; certains groupes sont phytopathogènes, d'autres sont bénéfiques à la plante (Raaijmakers, 2009). Les rhizobactéries représentent le groupe le plus important des microorganismes de la rhizosphère, ce sont les bactéries qui se trouvent sur la surface des racines ou dans le sol rhizosphérique (Li et Kremer, 2000), les genres les plus abondants sont notamment *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Aéromonas*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, et *Serratia* (Tripathi et *al.*, 2007)

3. Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR)

Rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes ou Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) est un terme inventé par Kloepper et Schroth (1978). Les PGPR comprennent des bactéries qui colonisent la rhizosphère (Tilak et *al.*, 2005) et améliorent la santé et la croissance des plantes (Vilchez et *al.*, 2016). Elles peuvent également protéger la plante des agents phytopathogènes par divers mécanismes (Murphy et *al.*, 2000).

3.1. Mécanismes impliqués dans la stimulation de la croissance des plantes

Les mécanismes d'action des PGPR ont été regroupés en mécanismes directs et indirects (Fig. 1). Bien que la différence entre les deux ne soit pas toujours évidente, les mécanismes indirects, en règle générale, sont ceux qui se produisent en dehors de la plante, alors que les

mécanismes directs sont ceux qui se produisent à l'intérieur de la plante et affectent directement le métabolisme de la plante (Jørgensen *et al.*, 2000).

3.1.1. Mécanismes directs

a. Fixation d'azote

La grande partie de cet élément se trouve sous forme gazeuse (N₂) qui est inaccessible aux animaux et aux plantes (Pujic et Normand, 2009). Les PGPR sont connus pour leur rôle de stimulation de la croissance des plantes via leur capacité à fixer l'azote atmosphérique (Weyens *et al.*, 2010) et le transformer en ammoniac NH₃ qui est la forme assimilable par les plantes (Cocking, 2003). En effet, la fixation d'azote par les rhizobactéries est importante pour un système agricole durable, les plantes dépendent principalement du processus de fixation d'azote par les bactéries vivant dans la rhizosphère (Mia *et al.*, 2005 ; Martinez-Viveros *et al.*, 2010).

b. Solubilisation du phosphate

Généralement, le contenu du phosphore dans le sol est de l'ordre de 1 à 5%. Cependant, une très faible proportion est disponible aux plantes (Molla *et al.*, 1984). La majeure partie est complexée par l'aluminium, le calcium et le magnésium (Kumar *et al.*, 1999). Il n'est pas requis en grandes quantités mais peut être un facteur limitant de la croissance et de la production végétale (Molla *et al.*, 1984).

Certains microorganismes sont capables de solubiliser le phosphate et sont appelés des microorganismes solubilisant le phosphate (PSM). Les rhizobactéries du genre *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Rhizobium*, sont considérés comme des solubilisatrices principales du phosphate (Rodriguez et Fraga, 1999; Arcand et Schneider, 2006).

c. Solubilisation du fer

Le fer est l'un des éléments essentiels pour toutes les cellules vivantes (Wittenwiller, 2007), il est abondant dans le sol, souvent sous une forme insoluble, le fer ferrique (Fe³⁺) (Compant *et al.*, 2005 ; Siddiqui, 2005). Pour l'acquérir, les bactéries ont recours à la synthèse de sidérophores (Schwyn et Neilands, 1987 ; de Souza *et al.*, 2015). Cette synthèse n'a lieu qu'en situation de carence en fer (Whipps, 2001). Les sidérophores fixent le fer ferrique et le transforment en sa forme soluble qui est le fer ferreux (Fe²⁺), ils sont également utilisés dans la lutte biologique contre les champignons phytopathogènes (Glick et Pasternak, 1998).

d. Production de phytohormones

Les phytohormones sont des substances élaborées en quantités variables par la plante au cours de son développement. Il est bien établi qu'il existe deux sources de phytohormones naturellement disponibles pour les plantes : production endogène par les tissus de la plante et exogène par des micro-organismes associés, y compris de nombreuses bactéries du sol appartenant aux genres *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Erwinia* et *Pseudomonas* spp. (Baca et Elmerich, 2007).

Les phytohormones comprennent 5 groupes de substances majeures : Les auxines (AIA, Acide Indole Acétique), les Cytokinines, les Gibbérelines, l'Acide Abscissique (ABA) et l'éthylène (Vessey, 2003).

L'auxine constitue la phytohormone la plus répandue. Elle est connue par son implication directe dans l'initiation de la croissance des racines, la division cellulaire et l'élargissement de la cellule (Vessey, 2003). L'un des mécanismes directs de promotion de la croissance utilisés par les PGPR est la production de phytohormones, environ 80% des bactéries de la rhizosphère peuvent sécréter de l'AIA (Johri et al., 2003).

3.1.2 Mécanismes indirects

L'effet phyto-bénéfique indirect des bactéries PGPR résulte d'interactions entre les PGPR et les pathogènes et/ou parasites de la plante, à l'occasion desquelles les effets négatifs de ces derniers sont diminués (Ramette et al., 2006 ; Rezzonico et al., 2007). Ces interactions correspondent souvent à :

- La compétition pour l'espace et les éléments nutritifs dont la disponibilité dans le sol est faible (Joshi et al., 2006) ;
- La synthèse d'enzymes hydrolytiques pour le biocontrôle des champignons phytopathogènes (Woo et Lorito, 2007) ;
- L'inhibition des enzymes ou des toxines produites par les phytopathogènes (Harman et Shores, 2007) ;
- L'induction des mécanismes de résistance de la plante (Antoun et Prévost, 2005 ; Kaymak, 2010).

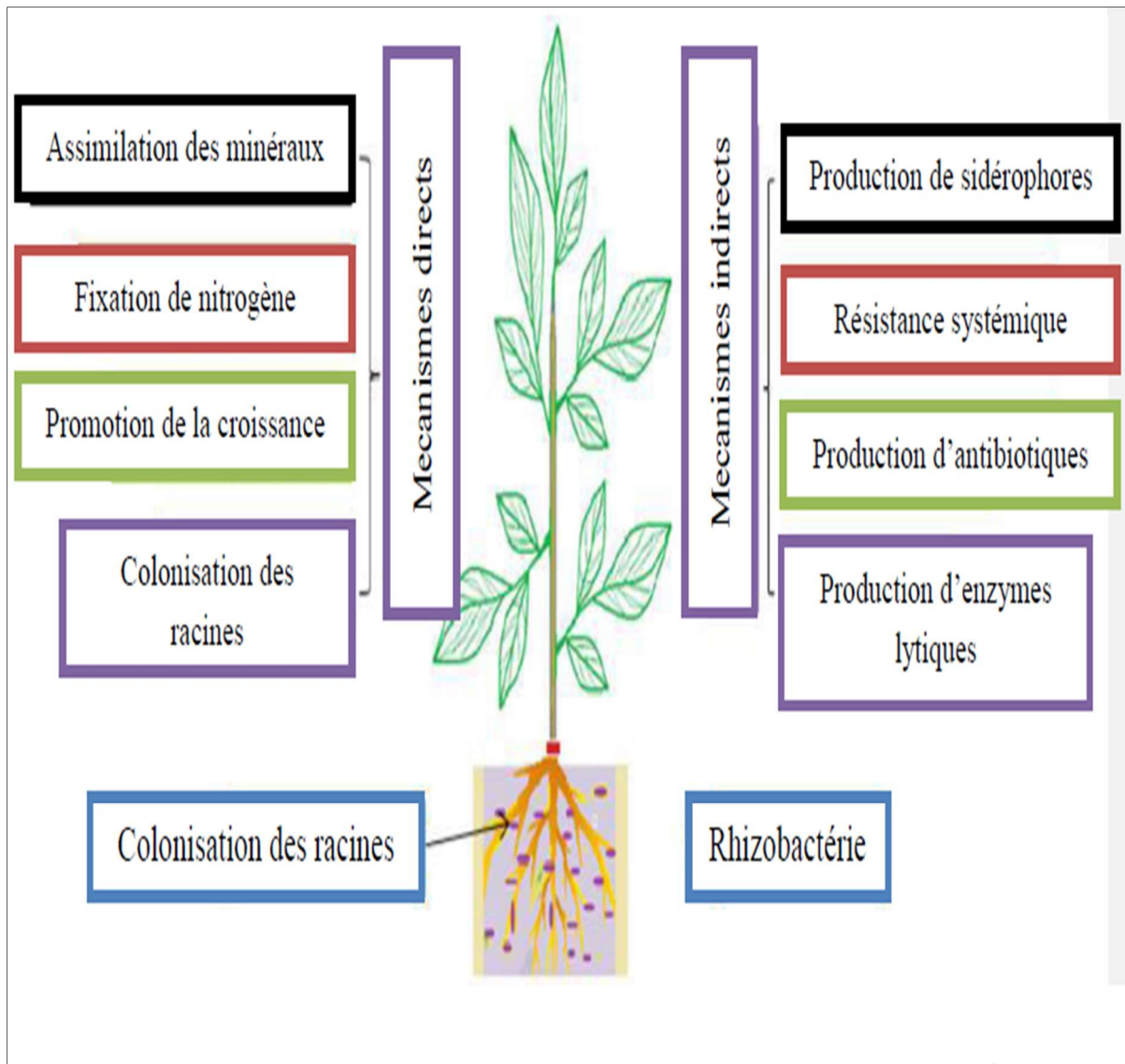


Figure 1 : Représentation schématique des mécanismes d'action directe et indirecte employés par les PGPR (Ngoma et *al.*, 2012).

1. Les métaux lourds

Les métaux lourds est un terme donné aux éléments métalliques ayant une masse volumique supérieure à 5g/cm^3 (Nies, 1999). Ces éléments sont présents dans la biosphère, cependant leur concentration constitue un pourcentage massique inférieur à 1% de la croûte terrestre et environ 0.1% de la matière sèche des organismes (Mirouze, 2005). Certains de ces éléments sont des oligo-éléments rencontrés dans le règne végétal et animal (Chassin et *al.*, 1996). Les autres métaux comme : le cadmium, le plomb et le mercure, sont toxiques car ils présentent des effets néfastes sur les organismes vivants, même à une faible concentration (Gounou, 2008).

2. Origine de la contamination des sols par les métaux lourds

Contrairement aux composés organiques, les métaux lourds, et particulièrement le plomb, le cadmium et le mercure ne sont pas biodégradables, et ils ne disparaissent pas du sol facilement (Brusseau et *al.*, 1997 ; Monteiro et *al.*, 2012). Leur présence dans les sols peut être d'origine naturelle ou anthropogénique

- Origine naturelle : les métaux lourds sont présents naturellement dans les roches, ils sont libérés lors de l'altération de celles-ci pour constituer le fond géochimique (Berthelin et Bourrelier, 1998).

- Origine anthropique : les activités anthropiques dans les sols comme les mines métallurgiques, les fonderies et l'agriculture irrégulière et pratiques horticoles (Application excessive des fertilisants, de pesticides) et l'élimination des déchets (Fahr et *al.*, 2013).

3. Impact des métaux lourds

3.1. Impact sur l'environnement

Le stress dû aux métaux lourds est devenu un sérieux problème environnemental qui touche les vies humaines et celles des plantes (Dikilitas et *al.*, 2016). Etant donné que ces métaux ne peuvent être dégradés, ils peuvent persister dans l'écosystème et s'accumuler dans les différentes parties de la chaîne alimentaire, ce qui peut affecter la santé humaine et de l'environnement (Igwe et *al.*, 2005).

3.2. Impact sur la plante

Les métaux lourds peuvent affecter la plante en plusieurs points. Leur effet phytotoxique génère des espèces réactives (ROS) provoquant une oxydation des protéines et des dommages aux organites cellulaires et subcellulaires (Hayat et *al.*, 2012 ; Ali et *al.*, 2013 ; Qadir et *al.*, 2014). Une fois absorbés par les plantes, ces métaux s'accumulent dans les

parties comestibles, réduisant le rendement et la productivité et contaminant ainsi la chaîne alimentaire (Zhao *et al.*, 2010).

3.3. Impact sur les bactéries rhizosphériques

À l'échelle microscopique, les métaux lourds ont aussi des effets néfastes sur les populations bactériennes. En effet, la présence excessive des métaux lourds dans le sol peut provoquer une diminution de l'activité microbienne et par conséquent la diminution de la fertilité de ce sol (Gao *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2015). Les métaux peuvent aussi exercer une pression sélective sur les microorganismes, induisant une grande tolérance aux métaux lourds chez les populations bactériennes (Smit *et al.*, 1997 ; Wuertz et Mergeay, 1997 ; Kozdroj et van Elsas, 2001).

4. Mécanismes de défense des plantes et des bactéries du sol

4.1. Mécanismes de résistance de la plante

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la résistance des plantes aux métaux lourds, parmi ces mécanismes :

- La modification de la perméabilité membranaire (Meharg, 1993) ;
- La protection de l'intégrité membranaire ou de la fonction des protéines associées au plasmalemme, tels que les transporteurs, les canaux ioniques et les pompes à protons (Briat et Lebrun, 1999) ;
- Le système anti-oxydant qui limite les dégâts des espèces réactives de l'oxygène par la production d'enzymes telles que la superoxyde-dismutase (SOD), la catalase et la peroxydase (Remon, 2006) ;
- La chélation intracellulaire, par des ligands organiques assurant une complexation et donc la détoxification de nombreux ions métalliques (Remon, 2006).

4.2. Mécanismes de résistance des bactéries

La réponse bactérienne aux différentes contaminations du sol varie avec les variations de la biodisponibilité et de l'exposition aux métaux toxiques (Silver, 1996). Les microorganismes résistent aux métaux par :

- L'utilisation de mécanismes de transport actif pour exporter des métaux toxiques du cytoplasme (système d'efflux) (Bruins *et al.*, 2000) ;
- La séquestration du métal, afin de l'immobiliser rapidement (Monchy, 2007).
- La modification de la structure de la paroi cellulaire ou de la membrane des microorganismes (Bruins *et al.*, 2000) ;

- La conversion enzymatique qui 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).

- Adsorption des ions métalliques sur la paroi membranaire des bactéries empêchant leur pénétration dans le cytoplasme cellulaire.

5. La bioremédiation

La nécessité de dépolluer les sites contaminés a conduit au développement de nouvelles techniques qui ont pour objectif d'éliminer les composés xénobiotiques plutôt que de les accumuler dans les décharges.

5.1. Définition

La bioremédiation désigne un ensemble de techniques utilisées pour dépolluer un site naturel (sol, sédiments, eaux de surface ou souterraines) en faisant appel à l'utilisation de micro-organismes, de champignons, de végétaux divers ou d'enzymes qu'ils produisent. Les moyens mis en œuvre sont donc respectueux de l'environnement et de la santé humaine (Jørgensen et *al.*, 2000).

5.2. Phytoremédiation

La phytoremédiation est l'utilisation de plantes pour extraire ou transformer les polluants organiques et inorganiques (Salt et *al.*, 1998).

Par rapport à la remédiation physique et chimique, la phytoremédiation présente plusieurs avantages (Huang et *al.*, 2004) :

- Elle conserve les propriétés naturelles du sol ;
- Elle acquiert de l'énergie principalement de la lumière du soleil ;
- Elle est peu coûteuse ;
- Elle a le potentiel d'être rapide

La phytoremédiation des métaux lourds comprend : La phytoextraction (la plante extrait le polluant du sol et le concentre dans ses tissus) et la phytostabilisation (le chevelu racinaire de la plante bloque les polluants dans le sol et empêche leur migration vers la nappe phréatique) (Glick, 2003). Un certain nombre de plantes qui peuvent tolérer et accumuler une forte concentration de métaux ont été découvertes récemment et ont été définis comme des hyper-accumulatrices (Zhuang et *al.*, 2007). Ces dernières se caractérisent par une croissance rapide et forment une quantité importante de biomasse (Nie et *al.*, 2002).

5.3. La bioremédiation par les microorganismes

La bioremédiation des sols par les microorganismes est basée sur la capacité de ces derniers à tolérer de fortes concentrations de métaux lourds (Patel et *al.*, 2016). Dans le cas des métaux lourds toxiques, les phénomènes de biotransformation mis en jeu incluent : la chimio-sorption, la bio-sorption, la bioaccumulation et la bio-minéralisation (Vavasseur, 2014).

Une haute toxicité cause une diminution de la biomasse microbienne, ce qui réduit considérablement l'efficacité métabolique de ces microorganismes à éliminer la toxicité (Liste et Alexander, 2000).

Matériel
et
Méthodes

La partie pratique de ce travail a été réalisée au niveau du Laboratoire de Maîtrise des Energies Renouvelables (Equipe Biomasse et Environnement). Les expériences ont été menées durant une période de 4 mois (Février-Mai 2017). Elles ont été divisées en deux grandes parties :

- La première partie du travail s'intéresse à l'isolement de bactéries tolérantes aux métaux lourds à partir de 7 échantillons de sols rhizosphériques prélevés d'une région susceptible d'être contaminée en métaux lourds.

- La deuxième partie consiste à étudier le rôle de quelques consortia bactériens dans la restauration de la croissance des plantes de tomate sous stress du Cadmium (Cd).

1. Échantillonnage et isolement de bactéries rhizosphériques

Dans le but de rechercher des bactéries rhizosphériques résistantes aux métaux lourds, des prélèvements de sols rhizosphériques ont été effectués pendant le mois de février 2017.

1.1. Échantillonnage du sol rhizosphérique

7 échantillons d'un sol rhizosphérique ont été collectés au hasard à Merdj Ouamane, commune d'Amizour (36°40'28.6''N4°56'06.4''E) à une distance d'environ 150 mètres d'une ancienne mine. Les échantillons sont prélevés stérilement en utilisant un chalumeau afin de créer une zone stérile autour de la surface de la racine voulue prélever. Les plantes ont été coupées avec un couteau stérilisé à la flamme à chaque utilisation, la partie racinaire a été prélevée et mise aseptiquement dans un bocal préalablement stérilisé à l'autoclave (120°C/ 20 minutes). Les bocaux sont fermés juste après l'échantillonnage. Les échantillons ont été transportés au laboratoire afin de procéder aux isolements bactériens.

Un codage est donné à chacun des 7 échantillons prélevés (A, B, C, D, E, F, G) afin de suivre convenablement les différentes étapes d'isolements bactériens et connaître l'origine de chaque isolat d'intérêt.

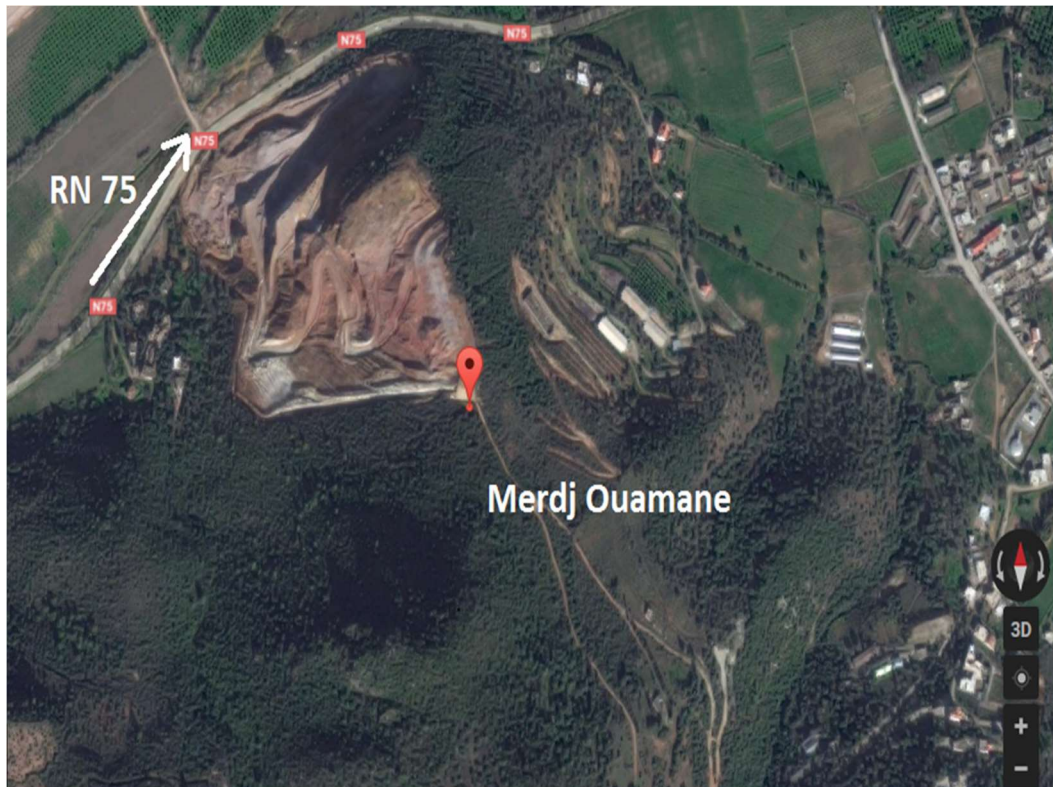


Figure 2 : Lieu de prélèvement des échantillons (Image Google maps)

1.2. Isolement des bactéries

1.2.1. Préparation des dilutions

- Des tubes contenant 9 ml de PBS (Annexe I) sont préalablement préparés et stérilisés ;
- 1 g de chaque échantillon du sol est additionné de 9 ml de PBS puis mélangé ;
- Des dilutions décimales (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5}) sont effectuées.

1.2.2. Ensemencement

1 ml de chacune de ces différentes dilutions a servi à inoculer le milieu PCA (Annexe I) contenu dans des boîtes de pétri préalablement préparées et codées. Les boîtes ensemencées sont incubées à 30°C pendant 72h.

1.2.3. Purification des bactéries

Après incubation, des repiquages successifs de colonies obtenues, sont effectués sur milieu PCA jusqu'à l'obtention de cultures bactériennes pures.

34 isolats bactériens sont sélectionnés puis ensemencés sur milieu PCA additionné du cadmium et/ou du chrome afin de tester leurs résistances à ces métaux lourds. Le test est effectué en duplicata.

2. Résistance aux métaux lourds

Les 34 isolats obtenus ont été testés pour leur résistance aux concentrations 1, 2,3, 4, 4.5 et 5mM de cadmium et de chrome par la méthode de dilution sur gélose.

Pour cela, le milieu PCA est préparé avec différentes concentrations en Cadmium et en Chrome, les boites sont ensemencées par stries et incubées à 30°C / 72h. La résistance aux métaux lourds est déterminée par l'observation de la croissance bactérienne (Hookoom et Puchooa, 2013).

Il est à souligner que les tests de résistance aux métaux lourds ont permis de sélectionner 6 isolats (A1, A2, D3, D4, E4, E5). Ces derniers feront l'objet de quelques tests d'identification bactérienne et de recherche de quelques propriétés d'intérêt agricole.

3. Identification des bactéries sélectionnées

Les six isolats ayant résisté à des concentrations supérieures ou égales à 3 mM de cadmium sont choisis pour une identification préliminaire basée essentiellement sur les caractéristiques morphologiques et certains tests biochimiques (Gram, mobilité et catalase) (Guiraud and Galzy, 1980).

4. Recherche de propriétés d'intérêt agricole

4.1. Solubilisation du phosphate

La solubilisation du phosphate est étudiée sur milieu Pikovskaya agar (Annexe I) selon la méthode de Sonam et *al.* (2011). Des disques de 5 mm de diamètre de chaque isolat sont déposés sur le milieu puis incubés à 30°C/7jours.

La solubilisation du phosphate est révélée par l'apparition d'un halo transparent autour des colonies.

4.2. Production d'acide indole acétique (AIA)

La production d'AIA (auxine) par les isolats bactériens est déterminée selon la méthode de Malik et Sindhu, (2011).

Des cultures jeunes d'isolats sélectionnés sont ensemencées dans des tubes contenant le milieu LB (Annexe I) additionné de 0.1g/l de tryptophane préalablement stérilisé par filtration. Après incubation à 30°C 4 jours, les cultures sont centrifugées à 10000 tr/min pendant 5 minutes.

Pour chaque tube, 1 ml de surnageant de culture est mélangé avec le même volume du réactif de Salkowski (150 ml H₂SO₄ 98% + 250 ml H₂O + 7.5 ml FeCL₃ 0.5 M). Le mélange

est agité puis gardé à l'obscurité à température ambiante pendant 30 min. L'absorbance de la coloration rose apparue est mesurée au spectrophotomètre à 500 nm.

La concentration en AIA est déterminée par établissement d'une courbe d'étalonnage (Annexe II) de la DO à 500 nm en fonction de la concentration de l'AIA (Sigma-Aldrich) pur en µg/ml.

5. Effet des isolats sélectionnés sur la croissance de la tomate

L'effet des isolats sélectionnés (les plus résistants au cadmium) sur la croissance des plants de tomate obtenus après germination, en présence de 1mM de cadmium (stress appliqué dans des solutions d'irrigation) a été réalisé dans cette partie.

5.1. Préparation du sol pour l'étude *in vivo*

Le sol utilisé dans ce test est un sol agricole, provenant de la commune de Semaoun (wilaya de Bejaia) (36°37'46.9''N 4°50'42.8''E), après l'avoir stérilisé à l'autoclave (20 min/120°C) et tamisé, le sol a été mélangé (50% v/v) à la tourbe stérilisée de la même façon que le sol.

5.2. Origine des graines

Les graines de tomate (*Solanum lycopersicum*, variété Marmande) ont été fournies par le centre d'écologie, évolution et changements environnementaux (CE3c) de la faculté des sciences de l'université de Lisbonne. Cette variété est caractérisée par une maturation précoce facilitant les études à courte durée. Elles sont commercialisées sous licence « Vilmorin » (fig. 3).



Figure 3 : Graines de tomate (*Solanum lycopersicum*) variété Marmande (originale).

5.3. Stérilisation des graines

Les graines de tomates ont été stérilisées par la méthode de Götz *et al.* (2006) selon les trois étapes suivantes :

- Les graines sont mises dans une solution d'éthanol 70% pendant une minute avec agitation manuelle ;
- Les graines sont remises dans une solution d'hypochlorite de sodium (Eau de javel) 12% pendant 15 minutes avec une agitation manuelle ;
- Les graines sont lavées avec de l'eau distillée stérile à six reprises pendant 15 minutes, afin de se débarrasser de l'eau de Javel.

5.4. Préparation des suspensions bactériennes

Les isolats sélectionnés ont été ensemencées sur le bouillon LB à 30°C/24h. Les cultures jeunes obtenues ont été centrifugées à 3000 rpm/min pendant 10 minutes afin d'éliminer le surnageant. Le culot est récupéré et lavé deux fois avec une solution d'eau physiologique stérile.

Les suspensions bactériennes utilisées pour l'inoculation des graines de tomate sont préparées dans l'eau physiologique. Enfin, l'absorbance de chaque suspension obtenue a été standardisée à une DO = 0.6 ($\lambda=600$ nm) (Egamberdieva *et al.*, 2010).

• Des consortia bactériens ont été préparés en mélangeant les 6 isolats 2 à 2. Les combinaisons ont été réalisées sur la base de la capacité des isolats à solubiliser ou non le phosphate tricalcique (test précédemment réalisé). Ainsi, l'isolat E4 a été mélangé avec D3, E5 avec A1 et D4 avec A2. La codification de ces consortia est comme suit :

- C1 pour les isolats E4 et D3 ;
- C2 pour les isolats E5 et A1 ;
- C3 pour les isolats D4 et A2.

5.5. Inoculation des graines

Les graines préalablement stérilisées ont été mises dans des tubes Falcon contenant les consortia bactériens préparés puis laissés sous une légère agitation pendant 30 minutes à une température ambiante. Les graines témoins ont été mises dans un tube contenant de l'eau physiologique et laissées dans les mêmes conditions que les graines inoculées (Nabti et *al.*, 2014).

5.6. Mise en pots

40 pots en plastique ont été remplis avec du mélange (Sol/Tourbe) préalablement préparé. Les pots sont organisés et codés afin de différencier les pots contenant les graines inoculées et les graines témoins.

Les graines sont semées à raison de 5 par pot. L'expérience est réalisée dans des conditions naturelles à température 13-22°C /35j.

5.7. Irrigation des pots

Les pots ont été irrigués avec des solutions de cadmium ou de l'eau du robinet. Du premier jour de la mise en pot jusqu'au 20^{ème} jour, les pots sont irrigués régulièrement avec 10 ml d'eau du robinet tous les trois jours.

Au-delà des vingt jours, les pots destinés à l'étude de l'effet de cadmium sur la croissance des plantes sont irrigués par une solution de cadmium (1mM) à raison de 10 ml par pot chaque trois jour pendant 15 jours. Les pots sont irrigués à l'eau de robinet pendant la même période (Gratão et *al.*, 2008 modifié).

5.8. Récolte des plants

À la fin de l'expérience, les paramètres de croissance (Longueur des tiges, poids frais et sec des tiges) de la tomate sont mesurés afin de déterminer l'effet de cadmium et des isolats bactériens sur la croissance de la tomate.



Figure 4 : Quelques étapes du test *In vivo*

6. Analyse statistique

Les données relatives aux paramètres de croissance ont fait l'objet d'une analyse statistique en utilisant le logiciel GraphPad PRISM version 6.01. Le test de l'analyse de la variance MANOVA (Test Fischer LSD) a été appliqué $\alpha=5\%$.

Résultats
et
Discussion

1. Échantillonnage du sol rhizosphérique

Dans cette étude, 7 échantillons de sols rhizosphériques (A, B, C, D, E, F, G) ont été prélevés en toute asepsie dans la région de Merdj Ouamane, commune d'Amizour. Les prélèvements de la rhizosphère ont été faits à partir de différentes plantes choisies d'une manière aléatoire, dans le but d'isoler des bactéries rhizosphériques résistantes aux métaux lourds pour tester ultérieurement leurs effets sur la restauration de la croissance des plants de tomate sous stress métallique.

2. Isolement de bactéries rhizosphériques

34 isolats ont été obtenus à partir des différents échantillons prélevés sur la base de leurs aspects morphologiques (taille des colonies, couleur, surface, et forme).

3. Test de résistance aux métaux lourds

Le test de la résistance aux métaux lourds par la méthode de dilution en gélose a été réalisé dans le but de sélectionner les isolats résistants à des concentrations importantes de cadmium et de chrome.

Les tableaux (Tableaux I et II) montrent les résultats de tolérances aux métaux lourds des 34 isolats obtenus.

Tableau I : Tolérance des 34 isolats au cadmium sur milieu PCA

Isolats	Témoin	1mM Cd	2mM Cd	3mM Cd	4mM Cd	4.5mM Cd	5mM Cd
A1	+	+	+	+	-	-	-
A2	+	+	+	+	-	-	-
A3	+	-	-	-	-	-	-
B1	+	-	-	-	-	-	-
B2	+	-	-	-	-	-	-
B3	+	-	-	-	-	-	-
B4	+	-	-	-	-	-	-
B5	+	-	-	-	-	-	-
B6	+	-	-	-	-	-	-
C1	+	+	-	-	-	-	-
C2	+	+	-	-	-	-	-
C3	+	-	-	-	-	-	-
C4	+	+	-	-	-	-	-
D1	+	-	-	-	-	-	-
D2	+	-	-	-	-	-	-
D3	+	+	+	+	-	-	-
D4	+	+	+	+	+	+	+
D5	+	-	-	-	-	-	-
E1	+	-	-	-	-	-	-
E2	+	-	-	-	-	-	-
E3	+	-	-	-	-	-	-
E4	+	+	+	+	-	-	-
E5	+	+	+	+	-	-	-
F1	+	-	-	-	-	-	-
F2	+	-	-	-	-	-	-
F3	+	-	-	-	-	-	-
F4	+	-	-	-	-	-	-
G1	+	+	+	-	-	-	-
G2	+	-	-	-	-	-	-
G3	+	+	+	-	-	-	-
G4	+	-	-	-	-	-	-
G5	+	+	-	-	-	-	-
G6	+	-	-	-	-	-	-
G7	+	+	-	-	-	-	-

Témoin : 0mM de cadmium

Tableau II : Tolérance des 34 isolats au chrome sur milieu PCA

Isolats	Témoin	1mM Cr	2mM Cr	3mM Cr	4mM Cr	4.5mM Cr	5mM Cr
A1	+	-	-	-	-	-	-
A2	+	+	+	+	+	+	-
A3	+	-	-	-	-	-	-
B1	+	-	-	-	-	-	-
B2	+	-	-	-	-	-	-
B3	+	-	-	-	-	-	-
B4	+	-	-	-	-	-	-
B5	+	-	-	-	-	-	-
B6	+	-	-	-	-	-	-
C1	+	+	-	-	-	-	-
C2	+	+	-	-	-	-	-
C3	+	-	-	-	-	-	-
C4	+	+	-	-	-	-	-
D1	+	-	-	-	-	-	-
D2	+	-	-	-	-	-	-
D3	+	+	+	+	+	+	+
D4	+	+	+	+	+	+	-
D5	+	-	-	-	-	-	-
E1	+	-	-	-	-	-	-
E2	+	-	-	-	-	-	-
E3	+	+	+	+	-	-	-
E4	+	-	-	-	-	-	-
E5	+	+	+	+	+	-	-
F1	+	-	-	-	-	-	-
F2	+	-	-	-	-	-	-
F3	+	-	-	-	-	-	-
F4	+	-	-	-	-	-	-
G1	+	+	+	-	-	-	-
G2	+	-	-	-	-	-	-
G3	+	+	+	-	-	-	-
G4	+	-	-	-	-	-	-
G5	+	+	+	+	-	-	-
G6	+	-	-	-	-	-	-
G7	+	+	+	+	-	-	-

Témoin : 0mM de chrome

Les résultats obtenus montrent qu'il y a une variabilité dans la résistance de ces isolats. En effet, 09 isolats ont montré une résistance jusqu'à 3mM de cadmium et/ou chrome. Les isolats D4 et D3 ont toléré jusqu'à 5mM de cadmium et de chrome respectivement, tandis que les autres isolats sont modérément tolérants.

D'après Daudet *al.* (2009), il est rare de trouver des sols uniquement pollués par du cadmium car ce métal est plus souvent présent dans des milieux contenant aussi d'autres métaux, ce qui peut expliquer la tolérance de certains isolats aux deux métaux, même à des concentrations considérables.

Plusieurs études ont révélé que les fréquences élevées de germes résistants, rencontrés dans un site donné, sont liées à la pression de sélection exercées par les métaux lourds au sein de ce site (Zelibor et *al.*, 1987; Díaz-Raviña et *al.*, 1994). Ces études peuvent expliquer la présence d'isolats multi résistants aux métaux lourds (cadmium et chrome) à des concentrations élevées. Néanmoins, l'existence d'autres facteurs influençant ces résultats n'est pas exclue.

D'après Timoney et *al.* (1978), la résistance des bactéries aux métaux lourds est conditionnée par la présence ou l'absence du métal dans le milieu. En effet, l'absence de métal dans l'environnement bactérien réduit sensiblement son pouvoir de résistance.

Par ailleurs, L'analyse physicochimique de la composition d'un site pollué par les métaux lourds situé à Djebira (Wilaya de Béjaia) a révélé la présence d'une quantité importante de métaux lourds et parallèlement, plusieurs souches bactériennes résistantes à 3 mM de cadmium ont été isolées à partir de ce site (Bensidhoum et *al.*, 2016).

Toutefois, il est très difficile de comparer les données sur la toxicité d'un métal ou le niveau de croissance d'une souche en présence d'un métal donné par rapport à d'autres travaux, car les conditions expérimentales telles que le milieu de culture, la température, le pH, le métal testé peuvent avoir une grande influence sur la croissance bactérienne (Hassen et *al.*, 1998 ; Hussein et *al.*, 2004).

4. Identification des bactéries sélectionnées

Les résultats des tests préliminaires d'identification bactérienne sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau III : Identification préliminaire des isolats sélectionnés

Isolats	Gram	Morphologie	Mobilité	Catalase
A1	G -	Cocci	+	+
A2	G +	Bacille	+	+
D3	G -	Cocci	+	+
D4	G -	Petit bacille	+	+
E4	G -	Petit bacille	+	+
E5	G -	Petit bacille	+	+

Les résultats de l'identification préliminaire obtenus après la réalisation de ces tests révèlent qu'il y a une diversité assez remarquable au niveau de leur morphologie. En effet, l'observation au microscope optique (Gx100) montre une diversité dans les formes et tailles des 6 isolats.

Les résultats du test de la mobilité et de la catalase se sont révélés positifs pour les 6 isolats. Concernant ce dernier test, la présence de cette activité chez les isolats est importante du fait que la catalase participe activement à la dégradation du H₂O₂ généré par les métaux lourds, le cd entre autres (Foyer et *al.*, 1994).

Les résultats obtenus montrent que la plupart des isolats sont des Gram négatifs. Ce résultat est en accord avec l'étude réalisée par Duxbury et Bicknell (1983), révélant que les bactéries du sol à Gram négatif semblent être plus tolérantes aux métaux lourds que les bactéries à Gram positif. Une autre étude a rapporté que parmi les bactéries à Gram négatif, *Pseudomonas* est le genre le plus abondant de la rhizosphère (Patten et Glick, 2002). Par ailleurs Garbeva et *al.* (2003) ont rapporté que 95% des bactéries du sol à Gram positif ayant une forme bacille appartiennent au genre *Bacillus*.

Ces résultats ne peuvent pas préciser la classification exacte de ces isolats, néanmoins, ils peuvent nous permettre de dire qu'il y a une approximation relative aux études mentionnées.

5. Recherche de propriétés d'intérêt agricole

5.1. Détermination de l'activité phosphatase

Le phosphore joue un rôle très important dans le transfert de l'énergie nécessaire à la croissance, l'amélioration de la productivité et le rendement agricole. C'est un élément essentiel pour le développement des plantes (Lindsay, 1979). Dans les sols agricoles, la solubilisation des phosphates inorganiques est étroitement liée à l'activité des microorganismes (Richardson, 2001 ; Przemieniecki et *al.*, 2015). En effet, plusieurs expériences réalisées dans des champs et/ou des serres, ont montré une amélioration remarquable de la production des plantes inoculées avec des microorganismes solubilisant le phosphate (Domey et Lippman, 1989 ; Chabot et *al.*, 1993 ; Wang et *al.*, 1995).

D'autres études ont révélé l'effet bénéfique de l'inoculation des graines par les bactéries solubilisatrices du phosphate seules (Chen *et al.*, 2008; Poonguzhali et *al.*, 2008 ;Ahemad et Khan, 2011 Ahemad et Khan, 2012) ou en combinaison avec d'autres microorganismes rhizosphériques (Zaidi et Khan, 2005; Vikram et Hamzehzarghani, 2008). En plus, de fournir du phosphate soluble aux plantes, les bactéries solubilisatrices du phosphate améliorent le

développent des plantes en stimulant l'efficacité des bactéries fixatrices d'azote et en améliorant la disponibilité d'autres oligo-éléments (Suman et *al.*, 2001; Ahmad et *al.*, 2008; Zaidi et *al.*, 2009).

Cependant, les performances des bactéries solubilisatrices du phosphate sont affectées par de nombreux facteurs environnementaux, particulièrement les conditions de stress (Ahemad et Khan, 2012).

Les résultats du test de l'activité phosphatasique montrent que 3 isolats (D4, E4, E5) ont la capacité de solubiliser le phosphate (Fig. 5). Ces résultats peuvent être exploités suivant ce qui a été rapporté dans les études citées auparavant, notamment par Zaidi et Khan (2005). En effet, en formant des consortia entre les isolats solubilisant le phosphate et ceux qui ne le solubilisent pas, ces derniers peuvent être stimulés par les premiers pour améliorer leur capacité à synthétiser des substances stimulatrices de la croissance des plantes.

Plusieurs études ont rapporté l'effet bénéfique de l'inoculation des graines avec des combinaisons de souches solubilisatrices et non solubilisatrices du phosphate sur la productivité et le rendement des cultures (Kundu et Gaur, 1984 ; Monib et *al.*, 1984 ; Gupta et *al.*, 2012).

Alagawadi et Gaur (1992) ont démontré que la co-inoculation des souches solubilisatrices du phosphate du genre *Pseudomonas* et *Bacillus* avec une souche *Azospirillum brasilense* a amélioré significativement les rendements en graines et en matières sèches, avec une augmentation concomitante de l'absorption de l'azote et du phosphate, par rapport aux inoculations séparées.



Figure 5 : Résultats du test de la production de phosphatase

5.2. Production de l'AIA

L'Acide Indole Acétique (AIA) stimule le développement du système racinaire des plantes, et de ce fait favorise l'absorption de l'eau et des minéraux, ce qui contribue à un meilleur développement de la plante (Mérigout, 2006).

La mise en évidence de la production d'AIA est réalisée sur milieu LB additionné de 0.1g/l du tryptophane. L'apparition de la couleur rose traduit la production d'AIA par l'isolat. Les valeurs d'AIA produites par chaque bactérie sont présentées dans la figure suivante (Fig.6).

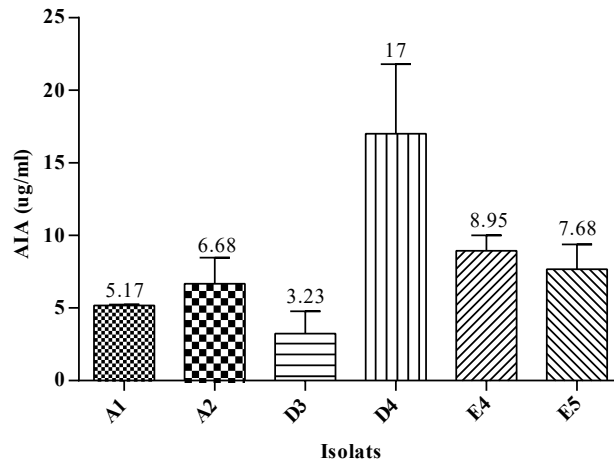


Figure 6 : Production d'AIA (µg/ml) par les isolats sélectionnés

T : écart-type

Les résultats du test de la production de l'AIA ont montré une variabilité dans les niveaux de production de l'Acide Indole Acétique, allant de 3.23µg/ml à 17 µg/ml.

D'après Zakharova et al. (1999), 80% de bactéries rhizosphériques produisent de l'AIA à différentes concentrations. Il a été rapporté que le mécanisme majeur dans la stimulation de la croissance directe des plantes par les PGPR est la production de régulateurs de croissance (Baca et Elmerich, 2007).

Les concentrations d'AIA obtenues avec nos isolats se situent dans la gamme des taux d'AIA produits par les PGPB (Bensidhoum et al., 2016). Selon Beneduzi et Passaglia (2011), une quantité faible d'AIA stimule la croissance des plantes, alors qu'une forte concentration peut inhiber le développement des racines.

D'après Rajkumar et Freitas (2008), l'inoculation d'une souche appartenant au genre *Pseudomonas* PsM6 ayant une production d'AIA de 17.7 µg/ml augmente l'efficacité de la phytoextraction en augmentant l'accumulation des métaux dans les tissus. Cette concentration est égale à la concentration produite par l'isolat D4, ce qui laisse suggérer un éventuel intérêt agricole.

6. Effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance des plantes

Des essais d'inoculation sur diverses plantes sont rapportés dans la littérature. Des effets sur le développement racinaire ont été signalés tels que le développement des poils absorbants, le degré de branchement, l'élongation ou le poids des racines (Okon et Kapulnik, 1986). De nombreuses augmentations de poids de matière sèche des parties aériennes ont été également obtenues sur le blé (Bashan, 1986), le riz (Rinaudo, 1983) et le maïs (Lin et *al.*, 1983). D'après Bashan (1986), le rendement est amélioré par l'inoculation bactérienne, bien que certains résultats négatifs aient été également publiés (Elmerich, 1984 ; Smith et *al.*, 1984).

6.1. Le choix de la plante

Le choix de la tomate (*Solanum lycopersicum*) est justifié par son importance agro-économique. En effet, elle est le légume le plus produit au monde après la pomme de terre, avec une production qui avoisine les 164 millions de tonnes évaluée économiquement à 60 milliards de dollars américains en 2013 (FAO,2014). Les fruits de la tomate sont consommés mondialement, de nombreuses études ont décrit les effets bénéfiques des tomates sur la nutrition humaine et sa santé (Adalid et *al.*, 2010 ; Lin et *al.*, 2014).

6.2. Le choix des consortia

L'expression « Consortium microbien » a été résumée par Panwar et *al.* (2014) en la présentant comme deux ou plusieurs microorganismes vivant en symbiose, et ont rapporté que les microorganismes ayant différents attributs peuvent être utilisés en tant que consortium et peuvent travailler de manière synergique afin de promouvoir les effets bénéfiques de chacun. Les consortia bactériens sont préparés sur la base des différences morphologiques des isolats ainsi que leur aptitude à solubiliser le phosphate (caractère présent chez l'un des isolats du même consortium).

Des études ont démontré l'effet bénéfique de l'inoculation des graines avec des consortia plutôt qu'avec des souches seules (Gupta et Kumar, 2017).

Rodriguez et Fraga, (1999) ont mis en évidence l'avantage des inoculations combinées des souches de PGPR comprenant des bactéries solubilisatrices du phosphate, en fournissant une nutrition plus équilibrée pour les plantes.

6.3. Effet du cadmium sur la croissance de la tomate

Bien que le cadmium ne soit pas un élément essentiel pour la croissance des plantes (Koopmans *etal.*, 2008), cet élément peut être accumulé à des niveaux élevés dans les organes

aériens(Pence et *al.*,2000) et altérer considérablement la structure des feuilles, des tiges, du métabolisme (Siedlecka et *al.*, 1997 ; Jin et *al.*, 2008) ainsi que la production de la biomasse. Ces effets peuvent être liés, entre autres, à la perturbation de l'équilibre de certaines hormones de croissance (Hasenstein et *al.*, 1988).

L'étude de l'effet du cadmium sur la croissance de la tomate a été réalisée sur un sol irrigué par 1mM de ce métal. Les résultats obtenus sont présentés dans les graphes suivants.

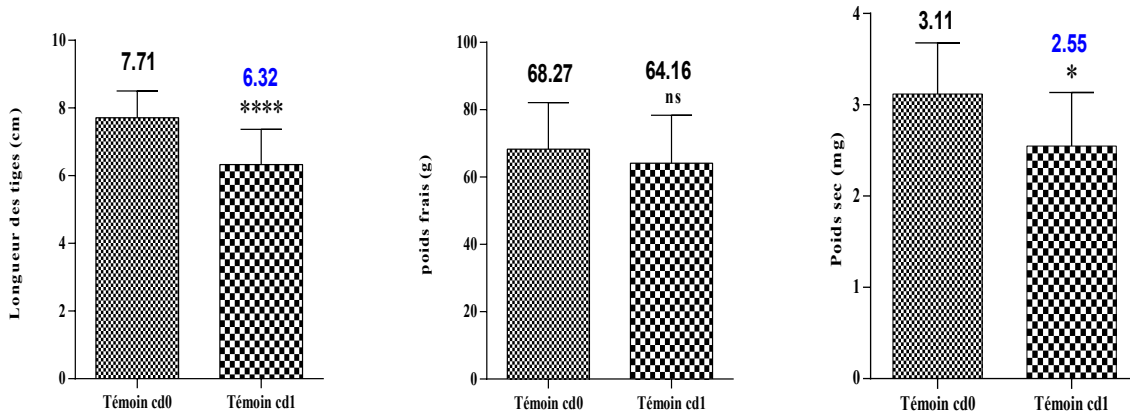


Figure 7 : Influence de 1 mM de cadmium sur quelques paramètres de la croissance de la tomate

* : $p \leq 0.05$, ** : $p \leq 0.005$, *** : $p \leq 0.0005$, **** : $p \leq 0.0001$

T : écart-type

L'analyse statistique des résultats obtenus révèle que le Cadmium affecte très significativement la longueur des tiges ($p \leq 0.0001$) et le poids sec ($p \leq 0.05$). Cependant, un léger effet non significatif ($p > 0.05$) a été constaté sur le poids frais (Fig. 7).

Ces résultats corroborent ceux de Zorrig et *al.* (2010), qui ont décrit que le cadmium induit une réduction significative du poids sec des plantes de laitue. D'après Neelima et Reddy (2003), les concentrations élevées en cadmium et en Mercure, exercent un effet drastique sur la croissance des graines et le métabolisme de *Solanum melongena* L.

L'absence de différence significative du paramètre poids frais pourrait être due à la durée de l'exposition des plants au cadmium. En effet, selon Drażkiewicz et Baszyński (2005) et Djebali et *al.* (2008), l'intensité et la nature des modifications structurales induites par le Cadmium dans les tomates varient selon la nature et l'âge de l'organe. De plus, Gratão et *al.* (2008) n'ont pu observer une inhibition de la croissance des plants de tomate qu'après 20 jours d'exposition à 1 mM de Cadmium.

6.4. Effet des consortia bactériens sur la croissance de la tomate

Le mécanisme le plus important dans la stimulation de la croissance directe des plantes par les PGPR consiste en la production de substances régulatrices de la croissance (Baca et Elmerich, 2007). En effet, la germination des graines, la division, l'élargissement des tissus et l'expansion des feuilles sont stimulés par les bactéries productrices d'AIA (Egamberdieva, 2008 ; Maleki *et al.*, 2010 ; Martinez-Viveros *et al.*, 2010).

Les résultats de l'effet des consortia bactériens sur la croissance de la tomate sont présentés dans les graphes suivants.

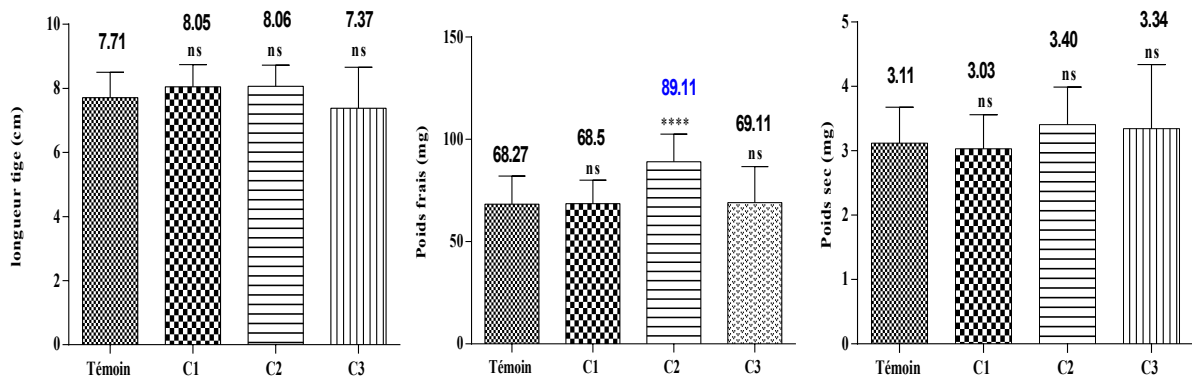


Figure 8 : Effet des consortia bactériens sur la croissance de tomate

C1 : Consortium 1 (isolat E4et D3) ; C2 : Consortium 2 (isolat E5etA1) ; C3 : Consortium 3 (isolat D4et A2)

* : $p \leq 0.05$, ** : $p \leq 0.005$, *** : $p \leq 0.0005$, **** : $p \leq 0.0001$

T : écart-type

Les résultats obtenus montrent que l'inoculation des graines par les consortia bactériens n'a aucun effet significatif sur les paramètres mesurés, excepté l'effet de l'inoculation avec le consortium C2 qui a amélioré très significativement le poids frais des tiges ($P \leq 0.0001$). Les légères différences constatées ne sont, cependant, pas négligeables.

L'effet du C2 sur le poids frais des plants est peut être dû à l'aptitude de l'un des isolats à solubiliser phosphate. En effet, selon Naik et Sakthivel (2006), la capacité des bactéries à solubiliser le phosphate tricalcique peut jouer un rôle très important dans la stimulation de la croissance des plantes. En outre, plusieurs auteurs ont rapporté l'aptitude des rhizobactéries à solubiliser le phosphate (Gull *et al.*, 2004 ; Rivas *et al.*, 2004 ; Qureshi *et al.*, 2012), et par conséquent stimuler les paramètres de croissance des plantes (Rodriguez et Fraga, 1999).

L'effet stimulateur du consortium C2 peut également être dû à la production de l'AIA, en effet, selon Wahyudi *et al.* (2011) et Patten et Glick (2002), la stimulation des paramètres de croissance des plantes par les bactéries est fortement liée à la production d'AIA.

L'absence d'un effet stimulateur visible induit par les autres consortia C1 et C3 est peut être due à la courte durée du test, en effet, davantage de temps pourrait être nécessaire pour pouvoir déceler des différences significatives.

6.5. Effet des consortia bactériens sur la croissance de la tomate dans un sol pollué par le cadmium

Les métaux lourds affectent la croissance des PGPR ainsi que leur aptitude à améliorer la croissance des plantes. Cependant, les PGPR métallo-résistantes ont la capacité d'atténuer la toxicité de ces polluants (Pandey *et al.*, 2013). En effet plusieurs études ont montré l'effet bénéfique de ce groupe bactérien sur la restauration de la croissance des plantes, lorsque ces dernières sont exposées à différents métaux toxiques (Ganesan, 2008 ; Wani et Khan, 2010).

L'effet des consortia bactériens sur la croissance de la tomate sous stress métallique a été réalisé dans un sol irrigué par 1 mM du cadmium. La figure ci-dessous montre les résultats obtenus.

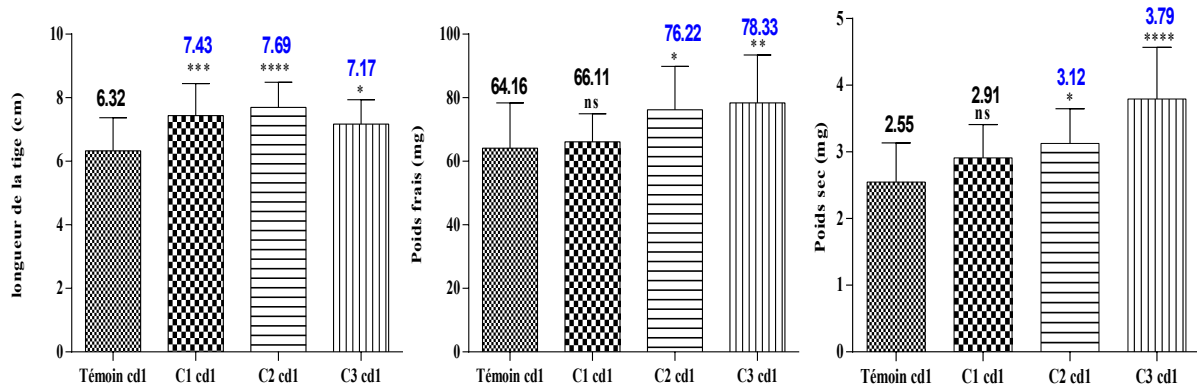


Figure 9 : Effet des consortia bactériens sur la croissance de tomate dans un sol pollué (Cadmium 1mM)

C1 : Consortium 1 (isolat E4 et D3) ; C2 : Consortium 2 (isolat E5 et A1) ; C3 : Consortium 3 (isolat D4 et A2)
 * : p<0.05, ** : p<0.005, *** : p<0.0005, **** : p<0.0001

T : écart-type

L'analyse statistique des résultats montre que les deux consortia C2 et C3 ont significativement restauré la croissance des différents paramètres de croissance de la

tomate. Quant au consortia C1, un effet très significatif ($P \leq 0.0005$) sur le paramètre longueur des tiges a été observé.

D'après Bhatnagar et Kumari (2013), les PGPR compensent la réduction de la croissance des plantes causée par les métaux lourds.

Nos résultats peuvent être liés à l'aptitude de nos isolats à solubiliser le phosphate. D'après Park et al. (2011), l'application de bactéries solubilisatrices du phosphate dans des sols contaminés par des métaux lourds permet d'immobiliser ces derniers. Dans le même contexte, Matusik et al. (2008) ont observé la précipitation de cadmium sous forme de phosphate du cadmium, et les complexes formés étaient relatifs aux conditions de pH. En outre, d'après Belimov et Dietz (2000), des PGPR producteurs d'acide indole acétique et résistants au Cadmium, stimulent la croissance et l'absorption d'éléments nutritifs par l'orge en présence de concentrations toxiques en cadmium.

Le pouvoir de nos isolats à restaurer la croissance de la tomate pourrait également être dû à leur aptitude à produire l'AIA. En effet, d'après Bhattacharyya et Jha. (2012), les rhizobactéries qui sécrètent des phytohormones, AIA entre autres, peuvent atténuer les effets néfastes du cadmium sur la croissance des plantes et leur développement.

Pishchik et al. (2005) ont mis en évidence certaines interactions mutuellement bénéfiques entre les plantes et les bactéries sous un stress de cadmium. Ils ont constaté que sous ce stress, une série d'événements successifs apparaît : Les bactéries synthétisent les phytohormones (AIA) → L'activité excrétrice des racines augmente → Le nombre de bactéries dans le rhizoplan augmente → Le flux de bactéries migrant vers la rhizosphère augmente → Le nombre de bactéries liées au Cd^{2+} dans la rhizosphère augmente → Le nombre d'ions libres entrant dans la plante diminue. Le même constat a été établi par Deepthi et al. (2014) qui ont rapporté que les PGPR tolérants aux métaux lourds peuvent améliorer la recolonisation de la rhizosphère des plantes dans les sols pollués. Dell'Amico et al. (2008) ont révélé que la production d'AIA a augmenté d'environ 25 à 30% sous stress de cadmium chez deux souches appartenant au genre *Pseudomonas* résistantes à 2.5mM de cadmium.

Conclusion

La littérature scientifique a rapporté l'effet des bactéries rhizosphériques sur l'amélioration de la croissance des plantes via une multitude de mécanismes.

Le présent travail avait pour objectif d'isoler des bactéries rhizosphériques résistantes aux métaux lourds et de tester leur effet sur la restauration de la croissance des plantes sous stress métallique (cadmium).

La première partie de ce travail a permis de sélectionner 6 isolats à base de leur tolérance au cadmium (≥ 3 mM).

Les tests ayant pour but de caractériser les isolats sélectionnés ont montré que ces derniers possèdent des traits PGP. En effet, le test de la production d'AIA a révélé l'aptitude de tous les isolats à le produire, et ce, à des taux variables. Quant à la solubilisation du phosphate, trois isolats (D4, E4, E5) ont montré une activité positive.

L'inoculation des graines de tomates avec les consortia bactériens métallo-résistants (E4 et D3 ; E5 et A1 ; D4 et A2) stimule significativement les différents paramètres de croissance (Longueur, poids frais et poids sec des tiges) sous stress métallique.

Les résultats obtenus ont permis de constater que les isolats (A1, A2, D3, D4, E4, E5) ont un potentiel de restauration de la croissance de la tomate, et peuvent ainsi jouer un rôle potentiel dans la bioremédiation des sols agricoles.

À terme de ce travail, nous émettons quelques réflexions et recommandations sous forme de perspectives pour l'amélioration de l'utilisation des isolats métallo-résistants obtenus :

- Identification moléculaire des isolats A1, A2, D3, D4, E4, E5 ;
- Étude de l'effet des isolats sur des stades plus tardifs de la croissance de la tomate ;
- Étude de l'effet des isolats sur d'autres paramètres de croissance de la tomate (la longueur, le poids frais et sec des racines, teneur en chlorophylle, etc.) ;
- Identification des mécanismes de tolérance bactérienne aux métaux lourds et de leurs modes d'action sur la remédiation des sols et la restauration de la croissance des plantes sous stress de cadmium ;
- Étude de l'accumulation des métaux lourds par la tomate inoculée avec les consortia bactériens ;
- Étude de la cytotoxicité des inocula utilisés dans le travail.

Références

A

- Adalid, A.M., Roselló, S., Nuez, F. (2010) Evaluation and selection of tomato accessions (*Solanum* section *Lycopersicon*) for content of lycopene, β -carotene and ascorbic acid. *Journal of food composition and analysis* 23, 613-618.
- Ahemad, M., Khan, M.S. (2011) *Pseudomonas aeruginosa* strain PS1 enhances growth parameters of greengram [*Vignaradiata* (L.) Wilczek] in insecticide-stressed soils. *Journal of pest science* 84, 123-131.
- Ahemad, M., Khan, M.S. (2012) Alleviation of fungicide-induced phytotoxicity in greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] using fungicide-tolerant and plant growth promoting *Pseudomonas* strain. *Saudi journal of biological sciences* 19, 451-459.
- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M. (2008) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research* 163, 173-181.
- Alagawadi, A.R., Gaur, A. (1992) Inoculation of *Azospirillum brasilense* and phosphate-solubilizing bacteria on yield of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] in dry land. *Tropical Agriculture* 69, 347-350.
- Ali, H., Khan, E., Sajad, M.A. (2013) Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. *Chemosphere* 91, 869-881.
- Antoun, H., Prévost, D. (2005) Ecology of plant growth promoting rhizobacteria, PGPR: Biocontrol and biofertilization. Springer, pp. 1-38.
- Arcand, M.M., Schneider, K.D. (2006) Plant-and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 78, 791-807.

B

- Baca, B., Elmerich, C. (2007) Microbial production of plant hormones, Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations. Springer, pp. 113-143.
- Bashan, Y. (1986) Enhancement of wheat root colonization and plant development by *Azospirillum brasilense* Cd. following temporary depression of rhizosphere microflora. *Applied and environmental microbiology* 51, 1067-1071.
- Belimov, A.A. et Dietz K.J. (2000).Effect of Associative Bacteria on Element Composition of Barley Seedlings Grown in Solution Culture at Toxic Cadmium Concentrations, *Microbiol.Res.* 155: 113–121.
- Beneduzi, A., Passaglia, L.M. (2011) Genetic and phenotypic diversity of plant growth promoting bacilli, *Bacteria in Agrobiolology: Plant Growth Responses*. Springer, pp. 1-20.
- Bensidhoum, L., Nabti, E., Tabli, N., Kupferschmied, P., Weiss, A., Rothballer, M., Schmid, M., Keel, C., Hartmann, A. (2016) Heavy metal tolerant *Pseudomonas protegens* isolates from agricultural well water in northeastern Algeria with plant growth promoting, insecticidal and antifungal activities. *European Journal of Soil Biology* 75, 38-46.

Berthelin, J., Bourrelier, P.-H. (1998) Etat des données concernant la contamination des sols par les éléments en traces. Comptes rendus de l'Académie d'agriculture de France 84, 103-115.

Bhatnagar, S. and Kumari, R. (2013) Bioremediation: A Sustainable Tool for Environmental Management—A Review. Annual Review & Research in Biology 3(4), 974-993

Bhattacharyya, P., Jha, D. (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology 28, 1327-1350.

Briat, J.-F., Lebrun, M. (1999) Plant responses to metal toxicity. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie 322, 43-54.

Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme, F.W. (2000) Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicology and environmental safety 45, 198-207.

Brusseau, M.L., Wang, X., Wang, W.-Z. (1997) Simultaneous elution of heavy metals and organic compounds from soil by cyclodextrin. Environmental science & technology 31, 1087-1092.

C

Chabot, R., Antoun, H., Cescas, M.P. (1993) Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. Canadian journal of microbiology 39, 941-947.

Chassin, P., Baize, D., Cambier, P., Sterckeman, T. (1996) Les éléments traces métalliques et la qualité des sols. Impacts à moyen et à long terme. Etude et Gestion des sols 3, 297-306.

Chen, Z., Ma, S., Liu, L.L. (2008) Studies on phosphorus solubilizing activity of a strain of phosphobacteria isolated from chestnut type soil in China. Bioresource technology 99, 6702-6707.

Cocking, E.C. (2003) Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. Plant and soil 252, 169-175.

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., Barka, E.A. (2005) Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Applied and environmental microbiology 71, 4951-4959.

D

Daud, M., Sun, Y., Dawood, M., Hayat, Y., Variath, M., Wu, Y.-X., Mishkat, U., Najeeb, U., Zhu, S. (2009) Cadmium-induced functional and ultrastructural alterations in roots of two transgenic cotton cultivars. Journal of Hazardous Materials 161, 463-473.

de Souza, R., Meyer, J., Schoenfeld, R., da Costa, P.B., Passaglia, L.M. (2015) Characterization of plant growth-promoting bacteria associated with rice cropped in iron-stressed soils. Annals of Microbiology 65, 951-964.

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

Dell'Amico, E., Cavalca, L., Andreoni, V. (2008) Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium-resistant rhizobacteria. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 74-84.

Díaz-Raviña, M., Bååth, E., Frostegård, Å. (1994) Multiple heavy metal tolerance of soil bacterial communities and its measurement by a thymidine incorporation technique. *Applied and environmental microbiology* 60, 2238-2247.

Dikilitas, M., Karakas, S., Ahmad, P. (2016) Effect of lead on plant and human DNA damages and its impact on the environment. *Plant metal interaction: emerging remediation techniques.* Elsevier Inc., Amsterdam, 41-67.

Djebali, W., Gallusci, P., Polge, C., Boulila, L., Galtier, N., Raymond, P., Chaibi, W., Brouquisse, R. (2008) Modifications in endopeptidase and 20S proteasome expression and activities in cadmium treated tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Planta* 227, 625-639.

Domey, S., Lippmann, G. (1989) Stimulation of plant growth by phosphate solubilizing bacteria. *Proc. of Int. Symp. Libric. Czechoslovakia.*

Drażkiewicz, M., Baszyński, T. (2005) Growth parameters and photosynthetic pigments in leaf segments of *Zea mays* exposed to cadmium, as related to protection mechanisms. *Journal of plant physiology* 162, 1013-1021.

Duxbury, T., Bicknell, B. (1983) Metal-tolerant bacterial populations from natural and metal-polluted soils. *Soil Biology and Biochemistry* 15, 243-250.

E

Egamberdieva, D. (2008) Plant growth promoting properties of rhizobacteria isolated from wheat and pea grown in loamy sand soil. *Turkish Journal of Biology* 32, 9-15.

Egamberdieva, D., Berg, G., Lindström, K., Räsänen, L.A. (2010) Co-inoculation of *Pseudomonas* spp. with *Rhizobium* improves growth and symbiotic performance of fodder galega (*Galega orientalis* Lam.). *Eur. J. Soil Biol.* 46, 269-272.

Elmerich, C. (1984) Molecular biology and ecology of diazotrophs associated with non-leguminous plants. *Nature Biotechnology* 2, 967-978.

F

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

FAO, U. (2014) FAOstat. Retrieved Feb 2014.

Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunert, K.J. (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiologia plantarum* 92, 696-717.

G

- Ganesan, V. (2008) Rhizoremediation of cadmium soil using a cadmium-resistant plant growth-promoting rhizopseudomonad. *Current microbiology* 56, 403-407.
- Gao, Y., Zhou, P., Mao, L., Zhi, Y.-e., Shi, W.-j. (2010) Assessment of effects of heavy metals combined pollution on soil enzyme activities and microbial community structure: modified ecological dose–response model and PCR-RAPD. *Environmental Earth Sciences* 60, 603-612.
- Garbeva, P., Van Veen, J., Van Elsas, J. (2003) Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. *Microbial Ecology* 45, 302-316.
- Glick, B.R. (2003) Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology advances* 21, 383-393.
- Glick, B.R., Pasternak, J.J. (1998) Principles and applications of recombinant DNA. ASM, Washington DC 683.
- Götz, M., Nirenberg, H., Krause, S., Wolters, H., Draeger, S., Buchner, A., Lottmann, J., Berg, G. et Smalla, K. (2006). Fungal endophytes in potato roots studied by traditional isolation and cultivation-independent DNA-based methods. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 58, 404–413.
- Gounou, C. (2008) Mobilité des éléments traces métalliques dans les sédiments : couplage et comparaison des approches chimiques et microbiologiques. Thèse, Université Paris 12-Val de Marne.
- Gratão, P., Monteiro, C., Antunes, A., Peres, L., Azevedo, R. (2008) Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) plants to cadmium-induced stress. *Annals of Applied Biology* 153, 321-333.
- Gray, E., Smith, D. (2005) Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 395-412.
- Guiraud, J.P., Galzy, P. (1980) Analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Editions Usine nouvelle, in: Collection genie alimentaire, 236.
- Gull, M., Hafeez, F., Saleem, M., Malik, K. (2004) Phosphorus uptake and growth promotion of chickpea by co-inoculation of mineral phosphate solubilising bacteria and a mixed rhizobial culture. *Animal Production Science* 44, 623-628.
- Gupta, M., Kiran, S., Gulati, A., Singh, B., Tewari, R. (2012) Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of *Aloe barbadensis* Miller. *Microbiological research* 167, 358-363.
- Gupta, P., Kumar, V. (2017) Value added phytoremediation of metal stressed soils using phosphate solubilizing microbial consortium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33, 9.

H

Harman, G.E., Shores, M., (2007) The mechanisms and applications of symbiotic opportunistic plant symbionts, *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*. Springer, pp. 131-155.

Hartmann, A., Rothballer, M., Schmid, M. (2008) Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and soil* 312, 7-14.

Hasenstein, K.H., Evans, M.L., Stinemetz, C.L., Moore, R., Fondren, W.M., Koon, E.C., Higby, M.A., Smucker, A.J. (1988) Comparative effectiveness of metal ions in inducing curvature of primary roots of *Zea mays*. *Plant physiology* 86, 885-889.

Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M., Boudabous, A. (1998) Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresource technology* 64, 7-15.

Hayat, S., Khalique, G., Irfan, M., Wani, A.S., Tripathi, B.N., Ahmad, A. (2012) Physiological changes induced by chromium stress in plants: an overview. *Protoplasma* 249, 599-611.

Hookoom, M., Puchooa, D. (2013) Isolation and identification of heavy metals tolerant bacteria from industrial and agricultural areas in Mauritius. *Current research in microbiology and biotechnology* 1, 119-123.

Huang, X.-D., El-Alawi, Y., Penrose, D.M., Glick, B.R., Greenberg, B.M. (2004) Responses of three grass species to creosote during phytoremediation. *Environmental Pollution* 130, 453-463.

Hussein, H., Ibrahim, S.F., Kandeel, K., Moawad, H. (2004) Biosorption of heavy metals from waste water using *Pseudomonas* sp. *Electronic Journal of Biotechnology* 7, 30-37.

I

Igwe, J., Nnororm, I., Gbaruko, B. (2005) Kinetics of radionuclides and heavy metals behaviour in soils: Implications for plant growth. *African Journal of Biotechnology* 4.

J

Jin, X., Yang, X., Islam, E., Liu, D., Mahmood, Q. (2008) Effects of cadmium on ultrastructure and antioxidative defense system in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator ecotypes of *Sedum alfredii* Hance. *Journal of Hazardous Materials* 156, 387-397.

Johri, B., Sharma, A., Viridi, J. (2003) Rhizobacterial diversity in India and its influence on soil and plant health. *Biotechnology in India* I, 49-89.

Jørgensen, K., Puustinen, J., Suortti, A.-M. (2000) Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental Pollution* 107, 245-254.

Joshi, F., Archana, G., Desai, A. (2006) Siderophore cross-utilization amongst rhizospheric bacteria and the role of their differential affinities for Fe³⁺ on growth stimulation under iron-limited conditions. *Current microbiology* 53, 141.

K

- Kaymak, H.C. (2010) Potential of PGPR in agricultural innovations, Plant growth and health promoting bacteria. Springer, pp. 45-79.
- Kennedy, A., DE Luna, L. (2004) Soil Biology: the Rhizosphere. Encyclopedia of Soil Science, 399-406.
- Kloepper, J., Schroth, M., (1978) Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes, Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria, pp. 879-882.
- Koopmans, G., Römkens, P., Fokkema, M., Song, J., Luo, Y., Japenga, J., Zhao, F. (2008) Feasibility of phytoextraction to remediate cadmium and zinc contaminated soils. Environmental Pollution 156, 905-914.
- Kozdroj, J., van Elsas, J.D. (2001) Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. Journal of Microbiological Methods 43, 197-212.
- Kumar, V., Punia, S., Lakshminarayana, K., Narula, N. (1999) Effect of phosphate solubilizing analogue resistant mutants of *azotobacter chroococcum* on sorghum. Indian journal of agricultural science 69, 198-200.
- Kundu, B., Gaur, A. (1984) Rice response to inoculation with N 2-fixing and P-solubilizing microorganisms. Plant and soil 79, 227-234.

L

- Li, J., Kremer, R.J. (2000) Rhizobacteria associated with weed seedlings in different cropping systems. Weed Science 48, 734-741.
- Lin, T., Zhu, G., Zhang, J., Xu, X., Yu, Q., Zheng, Z., Zhang, Z., Lun, Y., Li, S., Wang, X. (2014) Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. Nature genetics 46, 1220-1226.
- Lin, W., Okon, Y., Hardy, R.W. (1983) Enhanced mineral uptake by Zea mays and Sorghum bicolor roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. Applied and environmental microbiology 45, 1775-1779.
- Lindsay, W.L. (1979) Chemical equilibria in soils. John Wiley and Sons Ltd.
- Liste, H.-H., Alexander, M. (2000) Accumulation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere soil. Chemosphere 40, 11-14.

M

- Maleki, M., Mostafaei, S., Mokhtarnejad, L., Farzaneh, M. (2010) Characterization of *Pseudomonas fluorescens* Strain CV6 Isolated from Cucumber Rhizosphere in Varamin as a Potential Biocontrol Agent. Australian journal of crop science 4, 676.
- Malik, D.K. et 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*). Physiol. Mol. Biol. Plants. 17, 25-32.

- Martínez-Viveros, O., Jorquera, M., Crowley, D., Gajardo, G., Mora, M. (2010) Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of soil science and plant nutrition* 10, 293-319.
- Matusik, J., Bajda, T., Manecki, M. (2008) Immobilization of aqueous cadmium by addition of phosphates. *Journal of Hazardous Materials* 152, 1332-1339.
- Meharg, A.A. (1993) The role of the plasmalemma in metal tolerance in angiosperms. *Physiologia plantarum* 88, 191-198.
- Mérigout, P. (2006) Étude du métabolisme de la plante en réponse à l'apport de différents fertilisants et adjuvants culturels. Influence des phytohormones sur le métabolisme azoté. INAPG (Agro Paris Tech).
- Mia, M.A.B., Shamsuddin, Z.H., Wahab, Z., Marziah, M. (2005) High-yielding and quality banana production through plant growth-promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation. *Fruits* 60, 179-185.
- Miah, M.Y., Kanazawa, S., Chiu, C.-Y., Hayashi, H., Chino, M. (2000) Microbial distribution and function across wheat rhizosphere with oxamide and ammonium sulfate as N sources. *Soil science and plant nutrition* 46, 787-796.
- MIROUZE, M. (2005) Study of the zinc molecular mechanisms in the zinc hyperaccumulator plant *Arabidopsis halleri* (a putative novel role for plant defensins in zinc tolerance).
- Molla, M.A., Chowdhury, A., Islam, A., Hoque, S. (1984) Microbial mineralization of organic phosphate in soil. *Plant and soil* 78, 393-399.
- 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.
- Monib, M., Hosny, I., Besada, Y. (1984) Seed inoculation of castor oil plant (*Ricinus communis*) and effect on nutrient uptake. *Soil Biol Conserv Biosphere* 2, 723-732.
- Monteiro, C.M., Castro, P.M., Malcata, F.X. (2012) Metal uptake by microalgae: underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnology progress* 28, 299-311.
- Murphy, J.F., Zehnder, G.W., Schuster, D.J., Sikora, E.J., Polston, J.E., Kloepper, J.W. (2000) Plant growth-promoting rhizobacterial mediated protection in tomato against Tomato mottle virus. *Plant Disease* 84, 779-784.

N

- Nabti E., Bensidhoum L., Tabli N., Dahel D., Weiss A., Rothballer M., Schmid M. et Hartmann A. (2014). Growth stimulation of barley and biocontrol effect on plant pathogenic fungi by a *Cellulosimicrobium* sp. strain isolated from salt-affected rhizosphere soil in northwestern Algeria. *Eur J Soil Biol.* 61, 20-26.
- Naik, P.R., Sakthivel, N. (2006) Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* sp. strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. *Research in microbiology* 157, 538-546.

Neelima, P., Reddy, K.J. (2003) Differential effect of cadmium and mercury on growth and metabolism of *Solanum melongena* L. seedlings. Journal of environmental biology/Academy of Environmental Biology, India 24, 453-460.

Ngoma, L., Babalola, O.O., Ahmad, F. (2012) Ecophysiology of plant growth promoting bacteria. Scientific Research and Essays 7, 4003-4013.

Nie, L., Shah, S., Rashid, A., Burd, G.I., Dixon, D.G., Glick, B.R. (2002) Phytoremediation of arsenate contaminated soil by transgenic canola and the plant growth-promoting bacterium *Enterobacter cloacae* CAL2. Plant Physiology and Biochemistry 40, 355-361.

Nies, D.H. (1999) Microbial heavy-metal resistance. Applied microbiology and biotechnology 51, 730-750.

O

Okon, Y., Kapulnik, Y. (1986) Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. Plant and soil 90, 3-16.

P

Pandey, S., Ghosh, P.K., Ghosh, S., De, T.K., Maiti, T.K. (2013) Role of heavy metal resistant *Ochrobactrum* sp. and *Bacillus* spp. strains in bioremediation of a rice cultivar and their PGPR like activities. J. Microbiol 51, 11-17

Panwar, M., Tewari, R., Nayyar, H. (2014) Microbial consortium of plant growth-promoting rhizobacteria improves the performance of plants growing in stressed soils: an overview, Phosphate Solubilizing Microorganisms. Springer, pp. 257-285.

Park, J.H., Bolan, N., Megharaj, M., Naidu, R. (2011) Concomitant rock phosphate dissolution and lead immobilization by phosphate solubilizing bacteria (*Enterobacter* sp.). Journal of Environmental Management 92, 1115-1120.

Patel, P.R., Shaikh, S.S., Sayyed, R.Z. (2016) Dynamism of PGPR in bioremediation and plant growth promotion in heavy metal contaminated soil. Indian J. Exp. Biol. 54, 286-296.

Patten, C.L., Glick, B.R. (2002) Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system. Applied and environmental microbiology 68, 3795-3801.

Pence, N.S., Larsen, P.B., Ebbs, S.D., Letham, D.L., Lasat, M.M., Garvin, D.F., Eide, D., Kochian, L.V. (2000) The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Proceedings of the National Academy of Sciences 97, 4956-4960

Pishchik, V., Vorob'ev, N., Provorov, N. (2005) Experimental and mathematical simulation of population dynamics of rhizospheric bacteria under conditions of cadmium stress. Microbiology 74, 735-740.

Poonguzhali, S., Madhaiyan, M., Sa, T. (2008) Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria from chinese cabbage and their effect on growth and phosphorus utilization of plants. Journal of microbiology and biotechnology 18, 773-777.

Przemieniecki, W.S., Kurowski, P.T., Karwowska, A. (2015) Plant growth promoting potential of *Pseudomonas* sp. SP0113 isolated from potable water from a closed water well. Archives of Biological Sciences 67, 663-673.

Pujic, P., Normand, P. (2009) La symbiose racinaire entre la bactérie *Frankia* et les plantes actinorhiziennes. Biofutur, 26-29.

Q

Qadir, S., Jamshieed, S., Rasool, S., Ashraf, M., Akram, N.A., Ahmad, P. (2014) Modulation of plant growth and metabolism in cadmium-enriched environments, Reviews of environmental contamination and toxicology. Springer, pp. 51-88.

Qureshi, M., Ahmad, Z., Akhtar, N., Iqbal, A., Mujeeb, F., Shakir, M. (2012) Role of phosphate solubilizing bacteria (PSB) in enhancing P availability and promoting cotton growth. J. Anim. Plant Sci 22, 204-210.

R

Raaijmakers, J.M., Paulitz, T.C., Steinberg, C., Alabouvette, C., Moënne-Loccoz, Y. (2009) The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. Plant and soil 321, 341-361.

Rajkumar, M., Freitas, H. (2008) Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. Chemosphere 71, 834-842.

Ramette, A., Moënne-Loccoz, Y., Défago, G. (2006) Genetic diversity and biocontrol potential of fluorescent pseudomonads producing phloroglucinols and hydrogen cyanide from Swiss soils naturally suppressive or conducive to *Thielaviopsis basicola*-mediated black root rot of tobacco. FEMS Microbiology Ecology 55, 369-381.

Remon, E. (2006) Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques : vers de nouvelles méthodes de bio-dépollution. Université Jean Monnet-Saint-Etienne.

Rezzonico, F., Zala, M., Keel, C., Duffy, B., Moënne-Loccoz, Y., Défago, G. (2007) Is the ability of biocontrol fluorescent pseudomonads to produce the antifungal metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection? New Phytologist 173, 861-872.

Richardson, A.E. (2001) Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. Functional Plant Biology 28, 897-906.

Rinaudo, G. (1983) Fixation hétérotrophe de l'azote dans la rhizosphère du riz. 218.

Rivas, R., Trujillo, M.E., Sánchez, M., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Velázquez, E. (2004) *Microbacterium ulmi* sp. nov., a xylanolytic, phosphate-solubilizing bacterium isolated from sawdust of *Ulmus nigra*. International journal of systematic and evolutionary microbiology 54, 513-517.

Rodríguez, H., Fraga, R. (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology advances 17, 319-339.

S

Salt, D.E., Smith, R., Raskin, I. (1998) Phytoremediation. Annual review of plant biology 49, 643-668.

Schwyn, B., Neilands, J. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical biochemistry 160, 47-56.

Siddiqui, Z.A. (2005) PGPR: prospective biocontrol agents of plant pathogens, PGPR: biocontrol and biofertilization. Springer, pp. 111-142.

Siedlecka, A., Krupa, Z., Samuelsson, G., Öquist, G., Gardeström, P. (1997) Primary carbon metabolism in *Phaseolus vulgaris* plants under Cd/Fe interaction. Plant Physiology and Biochemistry 35, 951-957.

Silver, S. (1996) Bacterial resistances to toxic metal ions-a review. Gene 179, 9-19.

Smit, E., Leeflang, P., Wernars, K. (1997) Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. FEMS Microbiology Ecology 23, 249-261.

Smith, R.L., Schank, S., Milam, J., Baltensperger, A. (1984) Responses of *Sorghum* and *Pennisetum* species to the N₂-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. Applied and environmental microbiology 47, 1331-1336.

Smith, S. (1994) Effect of soil pH on availability to crops of metals in sewage sludge-treated soils. I. Nickel, copper and zinc uptake and toxicity to ryegrass. Environmental Pollution 85, 321-327.

Sonam S., Vijay K. et Tripathi R.B. (2011) Isolation of Phosphate Solubilizing Microorganism (PSMs) From Soil. J. Microbiol. Biotech. Res. 1: 90-95.

Suman, A., Shasany, A., Singh, M., Shahi, H., Gaur, A., Khanuja, S. (2001) Molecular assessment of diversity among endophytic diazotrophs isolated from subtropical Indian sugarcane. World Journal of Microbiology and Biotechnology 17, 39-45.

T

Tilak, K., Ranganayaki, N., Pal, K., De, R., Saxena, A., Nautiyal, C.S., Mittal, S., Tripathi, A., Johri, B. (2005) Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. Current science 89, 136-150.

Timoney, J., Port, J., Giles, J., Spanier, J. (1978) Heavy-metal and antibiotic resistance in the bacterial flora of sediments of New York Bight. Applied and environmental microbiology 36, 465-472.

Tripathi, R.D., Srivastava, S., Mishra, S., Singh, N., Tuli, R., Gupta, D.K., Maathuis, F.J. (2007) Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. TRENDS in Biotechnology 25, 158-165.

V

- 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 ATMOSPHERIQUE 80-86.
- Vessey, J.K. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and soil 255, 571-586.
- Vikram, A., Hamzhezarghani, H. (2008) Effect of phosphate solubilizing bacteria on nodulation and growth parameters of greengram (*Vigna radiata* L. Wilczek). Res J Microbiol 3, 62-72.
- Vilchez, J.I., García-Fontana, C., Román-Naranjo, D., González-López, J., Manzanera, M. (2016) Plant drought tolerance enhancement by trehalose production of desiccation-tolerant microorganisms. Frontiers in Microbiology 7.

W

- Wahyudi, A.T., Astuti, R.P., Widyawati, A., Mery, A., Nawangsih, A.A. (2011) Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting rhizobacteria. Journal of Microbiology and Antimicrobials 3, 34-40.
- Wani, P.A., Khan, M.S. (2010) *Bacillus* species enhance growth parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in chromium stressed soils. Food and Chemical Toxicology 48, 3262-3267.
- Weyens, N., Truyens, S., Dupae, J., Newman, L., Taghavi, S., Van Der Lelie, D., Carleer, R., Vangronsveld, J. (2010) Potential of the TCE-degrading endophyte *Pseudomonas putida* W619-TCE to improve plant growth and reduce TCE phytotoxicity and evapotranspiration in poplar cuttings. Environmental Pollution 158, 2915-2919.
- Whipps, J.M. (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of experimental botany 52, 487-511.
- Wittenwiler, M. (2007) Mechanisms of Iron Mobilization by Siderophores. Master Studies in Environmental Sciences Master, ETH Zürich.
- Woo, S.L., Lorito, M. (2007) Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol, Novel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management. Springer, pp. 107-130.
- Wuertz, S., Mergeay, M. (1997) The impact of heavy metals on soil microbial communities and their activities. Modern soil microbiology, 607-642.

Y

- Yuan, L., Zhi, W., Liu, Y., Karyala, S., Vikesland, P.J., Chen, X., Zhang, H. (2015) Lead toxicity to the performance, viability, and community composition of activated sludge microorganisms. Environmental science & technology 49, 824-830.

Z

- Zaidi, A., Khan, M., Ahemad, M., Oves, M. (2009) Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica* 56, 263-284.
- Zaidi, A., Khan, S. (2005) Interactive effect of rhizotrophic microorganisms on growth, yield, and nutrient uptake of wheat. *Journal of plant Nutrition* 28, 2079-2092.
- Zakharova, E.A., Shcherbakov, A.A., Brudnik, V.V., Skripko, N.G., Bulkhin, N.S., Ignatov, V.V. (1999) Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. *European journal of biochemistry* 259, 572-576.
- Zelibor, J., Doughten, M., Grimes, D., Colwell, R. (1987) Testing for bacterial resistance to arsenic in monitoring well water by the direct viable counting method. *Applied and environmental microbiology* 53, 2929-2934.
- Zhao, F.-J., McGrath, S.P., Meharg, A.A. (2010) Arsenic as a food chain contaminant: mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. *Annual review of plant biology* 61, 535-559.
- Zhuang, X., Chen, J., Shim, H., Bai, Z. (2007) New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment international* 33, 406-413.
- Zorrig, W., Rouached, A., Shahzad, Z., Abdelly, C., Davidian, J.-C., Berthomieu, P. (2010) Identification of three relationships linking cadmium accumulation to cadmium tolerance and zinc and citrate accumulation in lettuce. *Journal of plant physiology* 167, 1239-1247.

Annexes

Annexe I. Composition des milieux de culture utilisés (pour un litre de milieu)**• Bouillon PBS**

NaCl.....	18, 0 g
Kcl.....	0,2g
Na ₂ HPO ₄	1,44g
KH ₂ PO ₄	0,24g
pH.....	7

• Milieu PCA (Plat Count Agar)

Tryptophane.....	6g
Extrait de levure	2,5g
Glucose.....	1g
Agar.....	15g
pH.....	7

• Milieu Pikovskaya's (PKA)

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

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

- **Milieu LuriaBertani (LB)**

Tryptophane	10g
Extrait de levure.....	5g
NaCl.....	4g
Agar	8g
pH.....	7

Annexe II. Courbe d'étalonnage d'Acide Indole Acétique

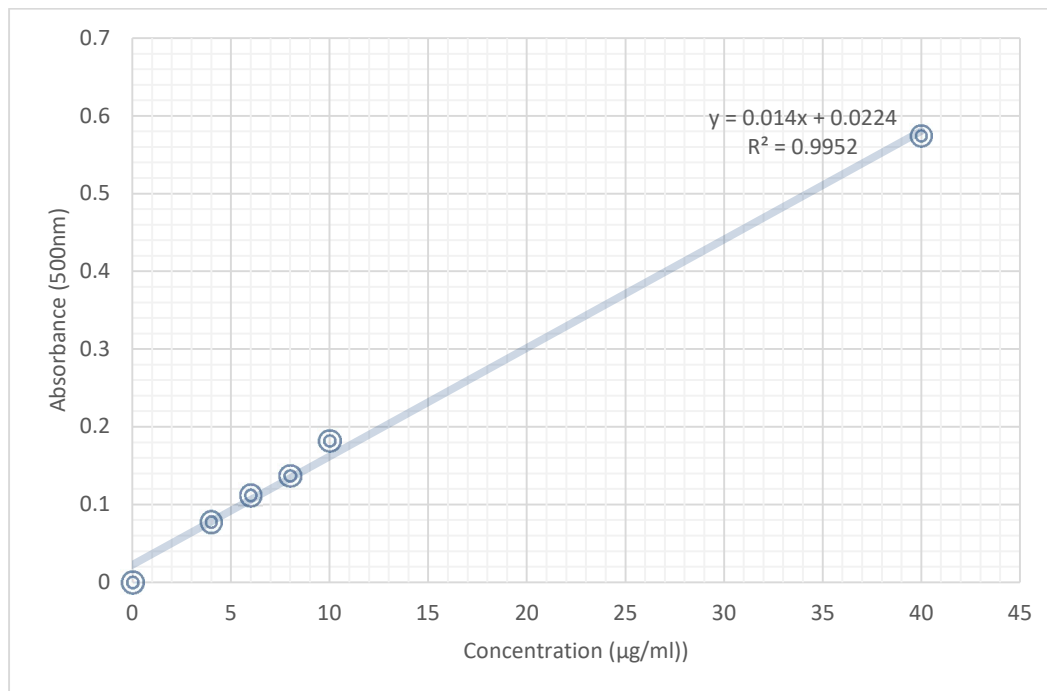


Figure 1. Courbe d'étalonnage d'Acide Indole Acétique (AIA) à 500nm

Résumé : L'application des rhizobactéries métallo-résistantes pour la restauration de la croissance des plantes constitue une alternative prometteuse aux procédés physiques et chimiques. 7 échantillons sont collectés à partir de différents sols rhizosphériques dans la région de Merdj Ouamane, Wilaya de Béjaia. 6 isolats (A1, A2, D3, D4, E4 et E5) ont été sélectionnés sur la base de leur résistance au Cadmium. Ils ont fait l'objet d'une caractérisation par rapport à quelques traits de la promotion de la croissance des plantes ; production d'AIA et solubilisation du phosphate. Ce dernier test a révélé l'aptitude des isolats D4, E4 et E5 à solubiliser le phosphate, quant au taux de la production de l'AIA, les résultats sont variables, allant de 3 à 17 µg/ml. L'effet des isolats sélectionnés, en consortia deux à deux, sur la restauration de la croissance des plants de tomate sous stress de cadmium a été étudié. Les graines de tomates inoculées ont été irriguées chaque trois jours (avec de l'eau de robinet pendant 20 jours et avec de l'eau de robinet additionné ou non du métal pendant 15 jours). Les deux consortia C2 et C3 ont significativement stimulé la tolérance des plantules de tomate au stress. Les résultats obtenus appuient le fait que la tolérance bactérienne aux métaux lourds est un caractère non négligeable pour le screening de bactéries stimulatrices de la croissance des plantes sous stress dû aux métaux lourds.

Mots-clés : PGPR, Tomate, Cadmium, Bactéries métallo-résistantes, AIA, Solubilisation du phosphate.

Abstract: The application of metallo-resistant rhizobacteria for the restoration of plant growth is a promising alternative to physical and chemical processes. 7 samples were collected from rhizospheric soils in Merdj Ouamane, Wilaya of Bejaia. 6 isolates (A1, A2, D3, D4, E4 and E5) were selected based on their resistance to Cadmium. They were characterized by some features of plant growth promotion; Production of AIA and solubilization of phosphate in this case. This last one revealed the ability of the isolates D4, E4 and E5 to solubilize the phosphate, concerning the production rate of the AIA, all selected isolates produced it (ranged from 3 to 17 µg/ml). The effect of bacterial consortia (two isolates in each consortium), on the restoration of tomato growth under Cadmium stress was studied. The inoculated seedlings were irrigated every three days (with tap water for 20 days and tap water with or without Cadmium for 15 days). The consortia C2 and C3 stimulated significantly the growth parameters of tomato under Cadmium stress. These results support the fact that the tolerance to heavy metals is a potential character for the screening of bacteria which stimulate plant growth under metal stress.

Keywords: PGPR, Tomato, Cadmium, Metallo-resistant bacteria, AIA, Phosphate solubilization.