

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 de Science Biologique de l'Environnement.
Filière : Science de l'Environnement.
Option : Environnement et Santé Publique.



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

MASTER

Thème

**Impact des métaux lourds sur la croissance des
bactéries nodulant quelques légumineuses**

Présenté par :
M^{elle} AIT HADDAD Dallal & M^{elle} BEDOUHENE Mouna.

Soutenu le : **14 Juin 2015**

Devant le jury composé de :

| | | |
|--|------------|------------|
| M ^{elle} BENMOUHOU B Hassina. | MAA | Présidente |
| M ^{me} BOULILA Farida. | MCA | Encadreur |
| M ^r RAMDANI Nacer. | MAA | Examineur |
| M ^{elle} SALMI Adouda. | Doctorante | Invitée |

Année universitaire : 2014 / 2015

Remerciements

Nos remerciements s'adressent à :

-Mademoiselle BENMOUHOUB Hassina, pour avoir accepté de présider ce jury et d'évaluer ce travail;

-Monsieur RAMDANI Nacer qui nous à fait l'honneur d'examiner ce document.

Nos remerciements les plus sincères s'adressent à Madame BOULILA Farida et Mademoiselle SALMI Adouda, pour leurs suivis et initiations à la recherche tout au long de ce travail ainsi qu'à leurs encouragements répétés ;

Nous aimerons remercier également tout le personnel du Laboratoire d'Ecologie Microbienne de nous avoir aidé à chaque fois qu'on en avait besoin.

Tout comme nous exprimons les mêmes sentiments de gratitude à tous les enseignants qui nous ont comptés parmi leurs étudiants tout le long de ces années.

Enfin, Dans le souci de n'oublier personne, tout ceux qui nous ont soutenu, encouragé, conseillé et aidé de près ou de loin, trouvent dans ces lignes l'expression de notre reconnaissance et gratitude.

Dallal et Mouna.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

Aux deux êtres qui me sont les plus chers que tout le reste dans ce monde et qui ont sacrifié pour assurer ma réussite dans mes études, ma douce et précieuse mère et mon très cher père ;

À mon unique frère : Adel ;

À mes très chères sœurs : Sabah et Hana ;

À tout le reste de la famille : Grand-mère, oncles, tantes, cousins, cousines ;

À Mouna, ma très chère binôme et amie pour toute sa patience, sa compréhension et sa bonne humeur.

À tous mes amis (es), et tous ceux qui m'ont aidé durant le parcours de mes études.

Dallal.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

Aux deux êtres qui me sont les plus chers que tout le reste dans ce monde et qui ont sacrifié pour assurer ma réussite dans mes études, ma douce et précieuse mère et mon très cher père ;

À ma sœur Amel et mon frère Salah El Eddin qui sont loin de moi (aux USA) ;

À mon frère Adel et ma petite sœur Nour El Houda ;

À tout le reste de la famille : oncles, tantes, cousins, cousines ;

À Dallal, ma très chère binôme et amie pour toute sa patience, sa compréhension et sa bonne humeur.

À mes chers amies et copines de chambre : Houda et Abla.

À tous mes amis (es), et tous ceux qui m'ont aidé durant le parcours de mes études.

Mouna.

Sommaire

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction01

Chapitre I : synthèse bibliographique

I- Métaux lourds02

I-1- Origine des métaux lourds.....02

I-2- Impact des métaux lourds sur l'environnement.....02

I-3- Impact des métaux lourds sur la symbiose rhizobium-légumineuse.....03

I-4- Impact des métaux lourds sur la santé.....03

II- Mode d'action des métaux lourds.....04

III- Mécanismes de résistance aux métaux lourds.....05

III-1- Système d'efflux.....05

III-2- Résistance par séquestration.....05

III-3- Résistance par imperméabilité.....05

III-4- Conversion enzymatique.....06

IV- Bioremédiation des sols.....06

V- Fixation biologique de l'azote.....07

V-1-Microorganismes fixateurs libres.....07

V-2-Microorganismes fixateurs symbiotiques.....08

VI- Symbiose rhizobium-légumineuse.....08

VII- Légumineuses.....09

VIII- Rhizobium11

Chapitre II : Matériel et Méthodes

I- Matériel biologiques.....12

II- Méthodes12

II-1- Authentification des isolats.....12

| | |
|--|-----------|
| II-1-1- Préparation et germination des graines | 12 |
| II-1-2- Préparation des plantules et inoculation..... | 12 |
| II-2- Caractérisation phénotypique des souches bactériennes..... | 13 |
| II-2-1- Caractérisation morphologique des colonies..... | 13 |
| II-2-2- Caractérisation cytologique des souches bactériennes..... | 14 |
| II-2-3- Caractérisation biochimique des souches bactériennes..... | 14 |
| III- Etude de la sensibilité et de la résistance des souches aux métaux lourds..... | 15 |
| III-1-Sur milieu solide YMA..... | 16 |
| III-2-Sur milieu liquide YMB..... | 16 |
| Chapitre III : Résultats et Discussion | |
| 1- Authentification des isolats..... | 19 |
| II-Caractérisation phénotypique des souches bactériennes..... | 19 |
| II-1-Caractérisation morphologique des colonies..... | 19 |
| II-2-Caractérisation cytologique des souches bactériennes..... | 21 |
| II-3-Caractérisation biochimique des souches bactériennes..... | 22 |
| III- Etude de la croissance des souches aux métaux lourds..... | 24 |
| III-1-Sur milieu solide YMA..... | 24 |
| III-1-1-Détermination des concentrations minimales inhibitrices..... | 32 |
| III-1-2-Etude de la résistance et de la sensibilité des souches aux métaux lourdes..... | 34 |
| III-1-2-3-Métallotypes des souches étudiées | 36 |
| III-2-Sur milieu liquide YMB..... | 37 |
| Conclusion et perspectives..... | 42 |
| Références bibliographiques | |
| Annexes | |

Liste des tableaux

Tableau I : Les différentes concentrations en sels de métaux lourds utilisées.

Tableau II: Les concentrations critiques exprimant la résistance ou la sensibilité des souches de rhizobia aux métaux lourds.

Tableau III: Caractères cultureux des souche étudiées.

Tableau IV: Résultats de la caractérisation biochimique.

Tableau V: Croissance des souches en présence de différentes concentrations en métaux lourds.

Tableau VI: Concentrations minimales des métaux lourds inhibitrices des souches étudiées.

Tableau VII: Résistances des souches aux métaux lourds.

Tableau VII : Metallotypes de résistance des souches aux métaux lourds.

Liste des figures

Figure 1 : Les étapes d'une symbiose légumineuse-rhizobium.

Figure 2 : Germination des graines de *Vigna unguiculata*.

Figure 3 : Aspect des nodules de *Vigna unguiculata* après un mois d'inoculation.

Figure 4 : Aspect des colonies formées par les souches.

Figure 5 : Observation microscopique d'une souche bactérienne à l'état frais (Grossissement 8×40).

Figure 6: Observation microscopique d'un frottis bactérien (Test Gram) (Grossissement 8×100).

Figure 7 : Exemples des résultats obtenus de la caractérisation biochimique sur galeries.

Figure 8: Exemple de résultats de croissances des isolats en présence de différents métaux lourds.

Figure 9 : Taux de résistance des souches de rhizobium en présence du zinc.

Figure 10: Taux de résistance des souches de rhizobium en présence du cuivre.

Figure 11 : Taux de résistance des souches de rhizobium en présence du mercure.

Figure 12 : Taux de résistance des souches de rhizobium en présence du cadmium.

Figure 13: Taux de résistance des souches de rhizobium en présence du plomb.

Figure 14 : Taux de résistance des souches de rhizobium en présence du chrome.

Figure 15: Taux de résistance des souches *vis-à-vis* des métaux lourds.

Figure 16 : Effet de zinc sur la croissance des souches étudiées.

Figure 17 : Effet de cuivre sur la croissance des souches étudiées.

Figure 18: Effet de chrome sur la croissance des souches étudiées.

Figure 19 : Effet de mercure sur la croissance des souches étudiées.

Figure 20 : Effet de plomb sur la croissance des souches étudiées.

Figure 21 : Effet de cadmium sur la croissance des souches étudiées.

Liste des abréviations et symboles chimiques

ABC –transporteur : ATP Binding cassette transporteur.

ADH: Arginine DiHydrolase.

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique.

ADI : Acide ADIrique.

ARA: ARAbinose.

ATP: Adenosine Tri-Phosphate.

CAP : Acide CAPrique.

Cd: Cadmium.

CIT: trisodium CITrate.

CO₂ : Dioxyde de carbone.

CMI : Concentration Minimal Inhibitrice.

Cr : Chrome.

Cu : Cuivre.

D.O : Densité Optique.

EPS : ExoPolySaccharides.

ESC : ESCuline.

GEL : GELatine.

GLU : GLUcose.

GNT: potassium GlucoNaTe.

Hg: Mercure.

MAL: MALtose.

MAN: MANnitol.

MLT: MaLaTe.

MNE: ManNosE.

N₂ : Diazote.

NAG: N-Acétyl –Glucosamine.

Nbr : Nombre.

NH₃ : Ammoniaque.

NH₄ : Ammonium.

NIT : NITrite.

nod : Gène de nodulation.

NO₃/N₂ : Nitrate/Nitrite réductase.

P : Phosphore.

PAC : Acide PhénylACétique.

Pb : Plomb.

pH : Potentiel Hydrogène.

PHB : Poly-β HydroxyButrates.

PNG: Para-Nitrophényl- β D-Galctopyranosidase.

PSym : Plasmide Symbiotique.

R: Résistant.

S: Sensible.

TRP: TRyptophane.

UFC: Unité formant colonies.

URE: UREase.

YMA: Yeast Mannitol Agar.

YMB: Yeast Mannitol Broth.

Zn: Zinc.

Introduction

Introduction

Le problème des sols contaminés est aujourd'hui très préoccupant pour les pays émergents. Les métaux lourds tels que le plomb, le cadmium, le cuivre, le zinc et le mercure ne peuvent pas être biodégradés et donc persistent dans l'environnement. De plus ils sont continuellement rajoutés dans les sols par diverses activités : à titre d'exemple par l'application de boues d'épuration, dans l'industrie métallurgique ou dans l'agriculture.

L'accumulation des métaux lourds dans l'environnement peut se répercuter sur la santé des êtres humains et des animaux (Wang et *al.*, 2003). A l'échelle microscopique, les métaux lourds ont aussi des effets néfastes sur les populations bactériennes, leurs impacts a fait l'objet de très nombreuses études (Khalil et *al.*, 1996 ; Belyaeva et *al.*, 2005). Le développement de techniques efficaces pour décontaminer les sites pollués est devenu indispensable (Rufus et *al.*, 1997 ; Prabha et Loretta, 2007). La bioremédiation qui se penche sur l'utilisation de la symbiose résistante entre les rhizobiums et les légumineuses est considérée comme un moyen efficace de restauration des sols affectés par des métaux lourds (Carrasco et *al.*, 2005).

L'association symbiotique légumineuse-rhizobia est un phénomène qui permet à la plante d'acquérir l'azote sous forme réduit, mais aussi à la bactérie d'obtenir les nutriments nécessaires pour son développement. La survie des rhizobiums dans le sol, la nodulation et la fixation de l'azote atmosphérique sont des processus très sensibles à l'action d'un certain nombre de facteurs (Wery, 1985).

La recherche des niveaux de résistances des souches de rhizobium aux métaux lourds dans les différents écosystèmes est indispensable, pour comprendre ce phénomène sous l'angle épidémiologique et écologique et pour pouvoir lutter contre cet incontestable problème menaçant la fertilité du sol (Carrasco et *al.*, 2005). En effet, les bactéries présentes dans les sols et leurs interactions avec des plantes hyper accumulatrices ont été le centre de plusieurs investigations (Abou-Shanab et *al.*, 2003a,b). L'étude de la biodiversité des populations des microorganismes symbiotiques reste aussi nécessaire pour toute sélection de couples symbiotiques performants (El-Hilali, 2006).

Dans cette optique, nous avons entrepris une étude sur l'impact des métaux lourds sur des bactéries endosymbiotes de quelques légumineuses. Ceci permettra la sélection des bactéries caractérisées par un potentiel de résistance nécessaire pour tout projet de bioremédiation.

*Synthèse
bibliographique*

I- Métaux lourds

D'un point de vue chimique, les éléments de la classification périodique formant des cations en solutions sont des métaux (Huynh, 2009).

D'un point de vue physique, le terme « métaux lourds » désigne les éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes (environ 65 éléments), caractérisés par une forte masse volumique supérieure à 5 g.cm^3 (Adriano, 2001).

D'un autre point de vue biologique, on en distingue deux types en fonction de leurs effets physiologiques et toxiques : métaux essentiels et métaux toxiques (Huynh, 2009). En effet, ces métaux sont présents dans tous les compartiments écologiques de la biosphère (Mirouze, 2005), tels que Zn, Cu, Ni qui sont essentiels comme oligo-éléments pour les plantes, les animaux et les microorganismes, alors que d'autres comme Cd, Hg et le Pb n'ont aucune fonction biologique ou physiologique et sont considérés toxiques même à très faibles concentrations (Kurlaze, 2007 ; Liu, 2008). Cependant, même les métaux essentiels peuvent devenir toxiques s'ils sont présents à de fortes concentrations (Nies, 1999). C'est pour cela également qu'ils sont désignés sous le terme « d'éléments potentiellement toxiques » car, ils présentent une certaine toxicité, notamment en fonction de leurs formes chimiques et ceci à partir d'une certaine dose. Les cheminements pris par les métaux lourds dans l'environnement dépendent de leurs modes d'introductions (rejets directs dans les rivières, dans l'atmosphère ou sur le sol) ainsi que de leurs formes physiques : solide, liquide ou gazeuse (Foster, 1995). D'où la nécessité de s'intéresser au devenir des éléments métalliques dans l'environnement y compris dans le sol (Gounon, 2008).

1-1-Origine des métaux lourds

Une quantité importante de métaux lourds est introduite dans l'environnement par l'intermédiaire de sources naturelles et humaines. Cette contamination a plusieurs origines telles que : la combustion des énergies fossiles, les gaz d'échappement des véhicules, l'incinération des déchets, l'activité minière, l'agriculture et les déchets liquides et solides. Mais elle peut également être d'origine naturelle via : l'activité des volcans, et des sources thermales, l'érosion, l'infiltration (Di Benedetto, 1997).

1-2-Impact des métaux lourds sur l'environnement

Contrairement aux contaminants organiques, les métaux lourds générés par les activités anthropiques ne peuvent pas être dégradés biologiquement et persistent indéfiniment dans l'environnement. De plus, les environnements pollués tels que les sites miniers sont généralement soumis à de fortes contraintes climatiques et hydriques, érodant fortement les

déchets et induisant une pollution pour les eaux et les sols environnants. Les sols miniers sont pauvres en matières organiques et en minéraux fertilisants comme l'azote ; empêchant alors le développement d'une couverture végétale pouvant faire office de barrière à la dispersion des métaux lourds. De ce fait, la non-gestion des sites miniers pose un problème environnemental conduisant à de graves dégâts écologiques, car une accumulation excessive de métaux lourds dans un milieu réduit l'activité et la diversité microbienne (Smejkalová et al., 2003; Stan et al., 2011).

I-3- Impact des métaux lourds sur la symbiose rhizobium-légumineuse

Les métaux lourds influent négativement sur les microorganismes en affectant leurs croissances, leurs morphologies et leurs activités (Gusmao-Lima et al., 2005), réduire la taille des populations de rhizobiums et affectant irréversiblement leurs croissances et leurs performances symbiotiques (Koomen et al., 1990).

Le Cd par exemple est l'un des métaux lourds qui même à de faibles doses est très toxique pour les organismes vivants. Son effet sur la symbiose et sur le développement des deux partenaires est bien documenté (Pereira et al., 2006; Younis, 2007). Le Cd affecte la diversité, la croissance et l'activité microbienne ce qui est directement corrélé avec la diminution du nombre de nodosités présentes sur les racines (Stan et al., 2011). Bien que le Zn soit un oligo-élément indispensable à la vie, à de trop fortes concentrations il affecte significativement la survie et le nombre de rhizobia (Broos et al., 2005). La formation des nodosités est inhibée de 50 %, la fixation d'azote est réduite en présence de fortes teneurs en Zn (Zhang et al., 1998).

I-4- Impact des métaux lourds sur la santé

En général, les humains sont exposés aux métaux lourds par voie orale (l'ingestion, boisson ou nourriture), par voie respiratoire (inhalation) ou par voie cutanée (Martin et Griswold, 2009), une exposition permanente à de petites doses de métaux peut déclencher de nombreuses réactions chez l'être humain (Soussou, 2013).

Les métaux s'insèrent à différents niveaux de l'organisme et créent des perturbations dans le bon déroulement des processus physiologiques. Etant donné la complexité du vivant et la multiplicité des cofacteurs associés, les conséquences seront très variables d'un individu à un autre (Soussou, 2013). En effet, les organes cibles des métaux lourds sont variés: les ions métalliques se fixent sur les globules rouges (Pb, Cd, CH₃Hg), les métaux s'accumulent dans le foie et les reins (organes très vascularisés), les dents et les os accumulent le plomb. En outre, les métaux solubles dans les lipides comme le plomb tétraéthyl ou le méthyl-mercure

peuvent pénétrer dans le système nerveux central. Le danger est encore plus grand pour les petits enfants car chez eux la barrière hémato-encéphalique n'est pas entièrement développée (intoxication au plomb possible). Par diffusion passive ; grâce à leurs solubilités dans les lipides, le cadmium, le plomb, le nickel, le méthyl-mercure, traversent le placenta et peuvent s'y concentrer.

Les métaux lourds sont donc des polluants qui ont un fort impact toxicologique. Selon leurs natures et leurs concentrations, ils ont des effets spécifiques sur la santé. On distingue trois grandes catégories (Soussou, 2013) :

- ❖ Les métaux lourds toxiques même à très faibles concentrations, tels que le mercure, le cadmium, le chrome et le plomb.
- ❖ Les métaux moyennement toxiques, tels que le cuivre et le nickel.
- ❖ les métaux faiblement toxiques, tels que le fer ou l'aluminium.

II- Mode d'action des métaux lourds

Les ions métalliques entrent dans la cellule par deux voies, la première est rapide, empruntée par une large gamme de substrats, indépendante du métal, fait intervenir des porines exprimées de manière constitutive et dépend uniquement d'un gradient chimiosmotique au travers de la membrane bactérienne alors que, la seconde requiert une concentration d'énergie souvent sous forme d'ATP. Ces systèmes sont inductibles en réponse à des besoins particuliers (Nies, 1999).

La toxicité intracellulaire des ions métalliques lourds relève de divers mécanismes :

- L'inhibition des activités enzymatiques par fixation des cations métalliques sur des résidus cystéine, acide glutamique ou acide aspartique qui font partie du site actif de plusieurs enzymes (Monchy, 2007). Cette inhibition peut également être due à une compétition avec le véritable cofacteur de l'enzyme ; les oxyanions de plomb ou d'arsenate, par exemple, peuvent occuper les sites de fixation des phosphates (Untereiner, 2008).
- L'altération de la structure des acides nucléiques par fixation des cations métalliques sur les groupements phosphates entraînant ainsi des modifications de structure empêchant la transcription ou la traduction des gènes (Monchy, 2007).
- L'interaction avec des molécules oxygénées réactives issues des processus cellulaires respiratoires, ce qui entraîne la formation de radicaux libres qui peuvent endommager l'ADN (mutation), les protéines (par pontages entre ou intra moléculaires) ou encore les acides gras insaturés de la membrane cellulaire (Untereiner, 2008).

III-Mécanismes de résistance aux métaux lourds

La résistance microbienne aux métaux est hétérogène que se soit sur le plan génétique ou biochimique. Elle peut être codée par le chromosome, le plasmide ou le transposon avec l'implication d'un ou de plusieurs gènes. Au niveau biochimique, les microorganismes montrent une diversité dans les types de mécanismes de résistances qui se produisent seuls ou en diverses combinaisons (Rouch et *al.*, 1995).

III-1-Système d'efflux

Les systèmes actifs de transport ou d'efflux représentent la catégorie la plus importante des mécanismes de résistance aux métaux chez les bactéries (Monchy, 2007). Les microorganismes utilisent des mécanismes de transports actifs pour exporter des métaux toxiques des cytoplasmes. Les métaux non essentiels rentrent normalement dans la cellule par des systèmes de transports des éléments nutritifs mais, ils sont rapidement exportés (Bruins et *al.*, 2000).

III-2-Résistance par séquestration

La séquestration du métal dans un compartiment de la cellule ou sur la surface externe des membranes est un mécanisme efficace mis en place par les bactéries pour résister aux métaux lourds. Cette séquestration peut agir comme première ligne de défense pour immobiliser rapidement les métaux et éviter leurs effets toxiques (Monchy, 2007).

-Séquestration intracellulaire

Elle consiste en l'accumulation de métaux lourds dans le cytoplasme pour éviter une exposition aux composants cellulaires essentiels. Les métaux les plus fréquemment séquestrés sont le Cd, le Cu et le Zn (Silver et Phung, 1996).

-Séquestration extracellulaire

La résistance aux métaux lourds basée sur la séquestration extracellulaire existe aussi bien chez les bactéries, chez les levures et les champignons (Bruins et *al.*, 2000). Ce type de séquestration peut provoquer une résistance à condition que des niveaux suffisants de la substance à séquestrer soient réduits (Rouch et *al.*, 1995).

III-3-Résistance par imperméabilité

Les modifications de la structure de la paroi cellulaire, de la membrane ou de l'enveloppe des microorganismes ou la liaison non spécifique des métaux à la membrane externe ou à l'enveloppe (liaison entre le cuivre, le cadmium ou le zinc avec l'acide

polygalacturonique) sont des exemples de résistances des microorganismes (Bruins et *al.*, 2000).

III-4-conversion enzymatique

La conversion enzymatique consiste à convertir le métal en une forme moins toxique ou en d'autres formes qui peuvent être plus facilement et plus rapidement évacuées de la cellule. Cette transformation peut se faire par voie enzymatique, par oxydation ou réduction comme pour le mercure ou encore après réaction avec un produit du métabolisme énergétique de la cellule (Monchy, 2007).

IV- Bioremédiation des sols

Les effets nocifs des métaux lourds peuvent conduire à une réduction de la biodiversité dans le sol (Liu, 2008). Les métaux lourds peuvent interférer avec l'absorption et la distribution des minéraux nutritifs essentiels aux plantes, causant des carences en éléments nutritifs (Pishchik et *al.*, 2002, Jing et *al.*, 2007). Par conséquent, leurs assimilations et leurs accumulations dans les tissus végétaux peuvent constituer des vecteurs de contamination en cas de consommation animale ou humaine (Grant et *al.*, 1995).

Le développement des stratégies de décontamination des sols affectés par les métaux est nécessaire pour la préservation de l'environnement et de la santé humaine (Singh et *al.*, 2010).

Bien que les processus mécaniques et chimiques peuvent être adoptés pour faire face aux déversements de produits toxiques, les méthodes de remédiation traditionnelles (physiques ou chimiques) ne fournissent pas des solutions acceptables pour l'élimination des métaux du sol, tels que le Cd, Cu, Pb et Zn, qui sont très persistants (Pajuelo et *al.*, 2008). La bioremédiation est la technique de décontamination des sols, elle est à ce jour la plus stratégique, économique et respectueuse de l'environnement (Kamaludeen et Ramasamy, 2007), elle consiste en l'utilisation des microorganismes naturels ou génétiquement modifiés pour nettoyer les sols contaminés par des polluants. Ces microorganismes sont très prometteurs comme outils pour la bioremédiation des sols contaminés en raison de leurs souplesses métaboliques d'une part et de leurs capacités de transformer rapidement une grande variété de composés. Elle est influencée par plusieurs facteurs à savoir : la forme ionique du métal, les donneurs d'électrons, les accepteurs d'électrons, l'azote (N), le phosphore (P) et des paramètres du sol : pH, l'humidité, la matière organique et la température (Sadowsky, 2000).

Certains travaux ont proposé l'utilisation de l'interaction symbiotique rhizobium-légumineuses comme un système de bioremédiation pour éliminer les métaux et les métalloïdes dans les sols contaminés (Pajuelo et al., 2008).

En Algérie, des efforts ont été fait pour la valorisation des plantes du Sahara algérien comme biomatériaux pour l'absorption des métaux lourds toxiques dans l'eau. Ainsi, Cheriti et al., (2009), ont utilisé *Retama raetam*, plante disponible localement à El Bayadh, pour l'élimination des ions de cuivre dans une solution aqueuse.

L'efficacité de cette technique est influencée par l'activité des microorganismes de la chaîne alimentaire et des concentrations des métaux lourds déposés dans le sol (Khan et al., 2008). Ces microorganismes rhizosphériques, en association avec les espèces végétales hyper accumulatrices offrent un avenir prometteur efficace pour la décontamination des sols métallo-pollués (Sadowsky, 2000).

V-Fixation biologique de l'azote

La fixation biologique de l'azote est une activité microbienne aussi importante pour la photosynthèse que pour le maintien de la vie sur le globe terrestre. Environ 175 millions de tonnes d'azote atmosphérique sont réintroduits annuellement dans le cycle de la vie par la fixation biologique. Pour comparaison, les engrais azotés utilisés en agriculture correspondent à environ 40 millions de tonnes d'azote par an. En absence de fertilisation azotée, la fixation biologiques de l'azote est pratiquement la seule source d'azote permettant de maintenir la fertilité du sol (Roger, 1996).

Les organismes eucaryotes sont incapables de fixer l'azote, uniquement les procaryotes (diazotrophes) le peuvent, simplement parce qu'ils possèdent un complexe enzymatique, nommé nitrogénase, qui catalyse la réduction de l'azote en ammoniac (Hopkins, 2003). Deux types de diazotrophes sont connus :

-Microorganismes fixateurs libres

Diverses bactéries à l'état libre dans le sol ou dans l'eau, sont capables de fixer l'azote atmosphérique. Les plus répandues sont des hétérotrophes. On les rencontre en conditions anaérobies ou micro-aérophiles comme *Clostridium*, *Klebsiella*, *Bacillus*, et *Azospirillum* mais aussi en conditions d'aérobies comme *Azotobacter*. Beaucoup vivent et se multiplient en s'adjoignant aux surfaces des racines comme *Klebsiella Pneumoniae*, *Bacillus* sp, et *Clostridium* (Iniguez et al., 2004). D'autres, comme le cas d'*Azospirillum* sont associés à certaines plantes telles que le maïs et le sorgho (Steenhoudt et Vanderleyden, 2000).

- Microorganismes fixateurs symbiotiques

Dans les associations symbiotiques, la plante représente l'hôte et le partenaire bactérien le symbionte. Chez les légumineuses, les bactéries (les rhizobiums) s'installent dans les racines des plantes ; le végétal fournit des matières nutritives à la bactérie ; celle-ci capte l'azote de l'air et le donne à son hôte (Pousset, 2003). Cependant chez les plantes non légumineuses, le symbionte est une bactérie filamenteuse, à titre d'exemple *Frankia*, qui fait partie du groupe des actinomycètes (Hopkins, 2003).

VI-Symbiose rhizobium-légumineuse

D'un strict point de vue étymologique le mot symbiose provient du grec sym (avec) et bio (vie) d'où sa définition générale très large: vie avec ou vie en commun (Lefevre, 2004). La symbiose est une association de deux ou plusieurs organismes différents, vivant ensemble grâce à leurs échanges (Broughton, 2000).

Les symbioses fixatrices d'azote fixent au niveau mondial, environ 110 millions de tonnes d'azote par an (Gruber et Galloway, 2008).

La symbiose rhizobiums-légumineuses est un phénomène indispensable à la plante pour acquérir l'azote sous forme réduite mais aussi au rhizobium pour obtenir les nutriments nécessaires à leur développement (Raven et *al.*, 2000).

Cette symbiose culmine par la formation d'un nouvel organe, le nodule racinaire, au sein duquel les rhizobia fixent l'azote atmosphérique. Le processus de nodulation (Figure 1). Commence par une pré-infection, une phase de reconnaissance entre les deux partenaires, qui est suivie de deux étapes quasiment simultanées, l'infection de la racine par les bactéries et l'organogenèse du nodule (Patriarca et *al.*, 2004)

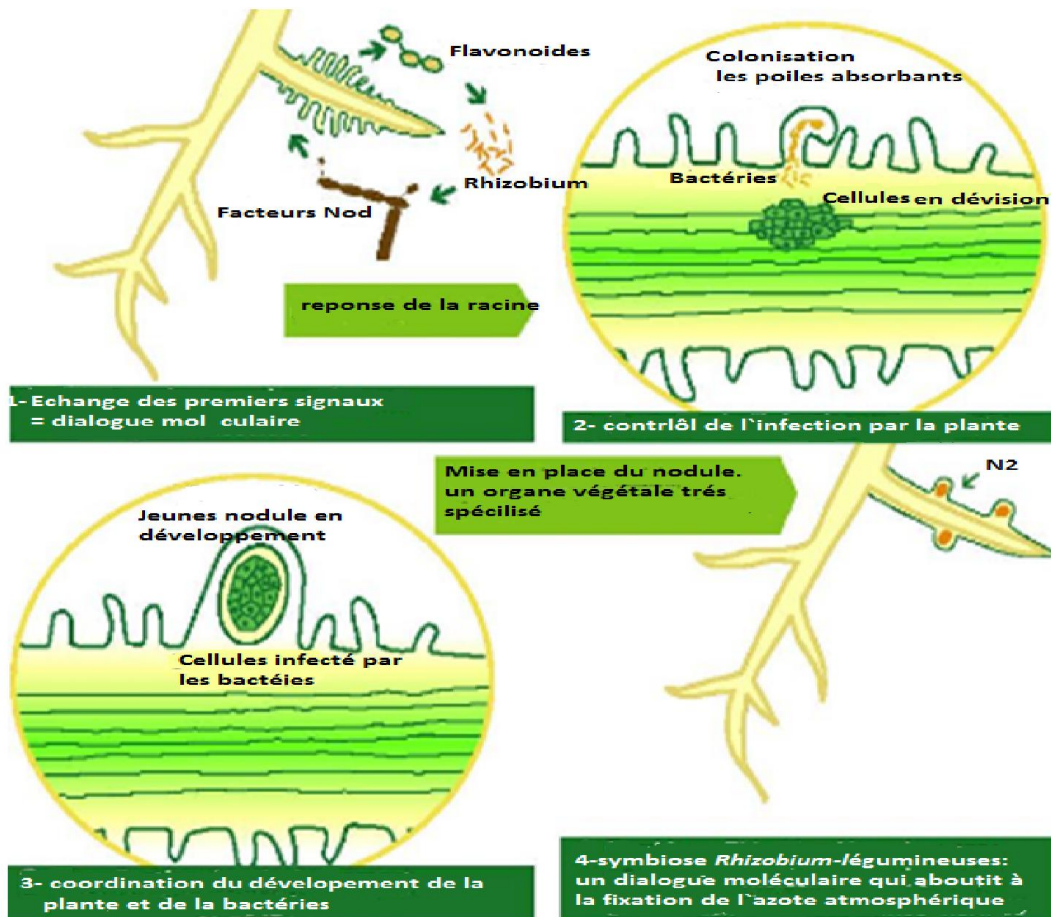


Figure 1: Etapes d'une symbiose légumineuse-rhizobium (Journet, 2004).

VII- Légumineuses

Les légumineuses constituent une des familles les plus abondantes et diversifiées des plantes supérieures, avec plus de 650 genres et environ 20000 espèces. Cette famille comprend des plantes herbacées annuelles telles que des plantes ligneuses ; elles colonisent aussi bien les régions tropicales que les régions tempérées ou arctiques du globe terrestre. Cette famille présente une importance économique majeure ; de nombreuses espèces constituent des ressources en fourrages (luzerne, trèfle, sainfoin), bois (palissandres), aliments (soja, haricot, arachides), ou présentent des propriétés médicinales, horticoles (mimosas) ou de colorants (indigo) (Saoudi, 2008).

Une des plus grandes particularités de cette famille, est la présence de renflement au niveau de racines appelées nodosités et contenant des bactéries symbiotiques du genre

rhizobiums, ces bactéries sont capables de convertir l'azote atmosphérique en azote organique (NO_3), participant ainsi à la fertilité des sols.

Selon Quezel et Santa, (1962), la famille de *leguminosae* est subdivisée en trois sous familles : les *papilionoideae*, et *mimosoideae*, et les *caesalpinoideae* (Hopkins, 2003).

La nodulation des légumineuses par les rhizobia est un phénomène très fréquent. En effet, parmi les 20% des légumineuses étudiées, 97% des espèces de la sous famille *papilionoideae* : (pois, haricot, fève, lentille, ...), 90% de la sous famille des *mimosoideae* (robinier, glycine, *acacia*, ...) et 30% de la sous famille des *caesalpinoideae*, sont nodulées (de Faria et al., 1989).

De nombreux travaux ont démontré l'utilité des légumineuses dans différents domaines, et parmi ces intérêts:

- Intérêts écologiques

Les légumineuses sont utilisées dans la restauration des milieux dégradés et la fertilisation des sols pauvres. Ce pouvoir est rendu possible grâce à l'association symbiotique entre les rhizobiums et les légumineuses (Masson et Gintzberger, 2000 ; Zahran et Willis, 2009). Les légumineuses contribuent aussi à la réduction de l'émission de gaz à effet de serre, à la diminution de l'utilisation des engrais azotés, qui contribuent à la fois aux émissions de CO_2 et le N_2O (Rispaïl et al., 2010).

- Intérêts économiques

En termes d'importance économique, les légumineuses sont au deuxième rang après les graminées (céréales) dans la fourniture des cultures vivrières destinées à l'agriculture mondial. Elles sont une source majeur de protéines et de lipides pour la consommation humaine et animale (Masson et Gintzberger, 2000).

- Intérêts médicale et pharmaceutiques

Selon une récente enquête ethnobotanique dans la région Nord-est de la Libye *Retama* est prescrite pour le traitement de l'hypertension (Ishurd et al., 2004), et des troubles gastro-intestinaux (Chereti et al., 2009). En Algérie *Retama* a été utilisé contre le rhumatisme, les piqûres de scorpion et blessures, sous forme d'infusions, poudres, tisanes ou compresses (Ould el hadj et al., 2003).

VIII-Rhizobium

« Rhizobia » est un terme qui a été donné aux bactéries du sol qui rentrent en symbiose principalement avec des plantes de la famille des légumineuses (O'Hara et *al.*, 2002), en formant des nodosités sur les racines dont lesquelles ils réduisent l'azote atmosphérique en ammoniac. La formation de nodule est contrôlés par des molécules de signal bactériens, appelées des facteurs Nod, qui sont reconnus par la plante hôte. (Lerouge et *al.*, 1990 ; Schultze et Kondorosi, 1998).

Du point de vue morphologique, les rhizobia ont la forme de bâtonnets, sont Gram négatif et mobiles, prolifèrent facilement lorsque les milieux nutritifs contiennent du mannitol comme source de carbone et de l'extrait de levure. Sur milieu Yeast Mannitol (YM) solide, les rhizobia à croissance rapide forment des colonies circulaires, convexes et translucides, avec un diamètre de 2 à 4 mm après 3 à 5 jours d'incubation. Les rhizobia à croissance lente forment des colonies circulaires, opaques. Ces colonies ne dépassent pas 1 mm de diamètre après 5 à 7 jours d'incubation (Blondeau, 1980 et Jordan, 1984).

Les rhizobia appartiennent au Domaine *Bacteria*, au phylum *Protobacteria*. Ils se répartissent en 13 genres comportant 99 espèces, phylogénétiquement intercalés parmi de nombreux autres genres et espèces bactériennes à l'intérieur des α - et des β -Protéobactéries. Cette classification est en évolution, et chaque jour des espèces et des genres nouveaux sont découverts. Les principaux genres sont :

- *Rhizobium* (Frank, 1889), qui contient 30 espèces.
- *Mesorhizobium* (Jarvis et *al.*, 1997), qui 21 contient espèces.
- *Ensifer* autrefois *Sinorhizobium* (Young, 2003), qui contient 17 espèces.
- *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982), qui contient 9 espèces.
- *Burkholderia*, (Chen et *al.*, 2007), qui contient 7 espèces.
- *Azorhizobium* (Dreyfus et *al.*, 1988), qui contient 2 espèces.
- *Microvirga*, (Ardley et *al.*, 2011), qui contient 3 espèces.
- *Phyllobacterium*, (valverd et *al.*, 2005), qui contient 3 espèces.
- *Ochrobactrum*, (Zurdo-Piñeiro et *al.*, 2007), qui contient 2 espèces.
- *Methylobacterium*, (N'zoué et *al.*, 2006), qui contient 1 espèce.
- *Cupriavidus*, (Chen et *al.*, 2001), qui contient 1 espèce.
- *Devosia*, (Moulin et *al.*, 2001), qui contient 1 espèce.
- *Shinella*, (Lin et *al.* 1983), qui contient 1 espèce.

*Matériel et
méthodes*

I-Matériel biologiques

Cette étude porte sur 8 souches bactériennes présumées appartenir aux rhizobia. Ces souches font partie de la collection du Laboratoire d'Ecologie Microbienne, 4 souches de référence ont été également utilisées : *Bradyrhizobium canariense* **BTA-1** (Vinuesa et al., 2005), *Bradyrhizobium japonicum* **USDA6** (Jordan, 1982), *Bradyrhizobium elkanii* **USDA76** (Kuykendall et al., 1992), *Bradyrhizobium pachyrhizi* **PACU8** (Ramirez-Bahena et al., 2008).

Le test d'authentification des isolats a été réalisé avec des plantules de *Vigna unguiculata*.

II-Méthodes

II-1- Authentification des isolats

Un test de nodulation a été effectué afin de vérifier l'aptitude des souches bactériennes à former des nodules sur les racines de *Vigna unguiculata* connue comme plante à large spectre de bactéries nodulantes.

II-1-1- Préparation et germination des graines

Après sélection des graines saines de *Vigna unguiculata*, nous avons procédé à leurs stérilisations en surface selon le protocole de Vincent:

- Les graines sont mises dans un bain de l'éthanol à 95% pendant 30 s à 1 min afin de désinfecter leurs téguments ;
- Puis dans de l'hypochlorite de sodium à 3% pendant 3 à 4 min ;
- Ceci est suivi d'un très bon rinçage abondant, pour éliminer toute trace de l'éthanol et de l'hypochlorite de sodium.

Les graines ainsi stérilisées en surface sont mises à germer à l'obscurité à 20°C dans des boîtes Pétri contenant du papier absorbant imbibé d'eau stérile.

II-1-2- Préparation des plantules et inoculation

Après 6 jours, les graines ayant germées (figure 2) sont transférées aseptiquement dans des tubes à essai contenant du milieu Jensen stérile (annexe I). La partie racinaire est recouverte par du papier aluminium jusqu'à la limite supérieure du tube, afin de lui assurer l'obscurité nécessaire (Boulila et al., 2009). Les plantules ont été inoculées après 48 h avec 1 ml d'une culture bactérienne contenant environ 10^9 bactéries/ml. Cette expérience a été menée en trois

exemplaires. Trois plantules non inoculées ont été prises comme témoin négatif. Les plantules sont mises à une photopériode de 14 heures de lumière et 10 heures à l'obscurité. La nodulation est surveillée régulièrement chaque jour.



Figure 2: Germination des graines de *Vigna unguiculata* (original).

II-2- Caractérisation phénotypique des souches bactériennes

Les souches étudiées ont subi une caractérisation phénotypique à savoir la caractérisation morphologique, cytologique, une caractérisation biochimique, et l'étude de la sensibilité et résistance aux métaux lourds.

II-2-1- Caractérisation morphologique des colonies

Les caractéristiques morphologiques des colonies sont étudiées à travers la forme, la taille, la couleur, l'opacité, l'aspect de la surface, l'élévation et la production des exopolysaccharides. Cette description se fait sur des colonies obtenues sur milieu YMA après 10 jours d'incubation à 28°C.

II-2-2- Caractérisation cytologique des souches bactériennes

La forme, la mobilité et la présence des poly β -hydroxybutyrates (PHB) ont été déterminées par observation au microscope optique (grossissement 8 x 40) à l'état frais d'une culture âgée de 6 à 10 jours. Le Gram est pratiqué selon la méthode classique de microbiologie qui consiste à réaliser une coloration spéciale d'un frottis bactérien, l'observation est faite au microscope optique (grossissement 8 X 100).

II-2-3- Caractérisation biochimique des souches bactériennes

Afin de caractériser les souches biochimiquement un test de galerie Api 20 NE a été réalisé.

La galerie est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux. Elle comporte 20 micro-tubes contenant des substances déshydratés.

-Préparation et inoculation de la galerie

La préparation de la galerie se fait d'abord par la répartition de 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour reconstituer les milieux.

Pour préparer l'inoculum, il faut prélever 1 à 4 colonies de morphologie identique, préférentiellement des cultures jeunes, les repiqué dans un tube contenant 2 ml de solution saline à 0.85 %.

Pour inoculer la galerie, les tubes de la galerie sont remplis avec la suspension précédemment préparée. Concernant les trois tests (GLU, ADH, URE), un remplissage par l'huile de paraffine est fait pour former un ménisque convexe. La lecture et l'interprétation se font après 6 jours d'incubation.

Les cupules des tests d'assimilation sont inoculées avec un milieu minimum et les bactéries se développent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture (Annexe II).

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs comme dans le cas des deux tests NO₃ et TRP :

-Test de NO₃

Une goutte de réactifs NIT 1 et NIT 2 est ajoutée dans la cupule, et après 5 min :

- Une couleur rouge indique une réaction positive, qui signifie la réduction de nitrate en nitrite.
- Le résultat incolore indique une réaction négative. Ceci est synonyme d'absence de nitrite dans le milieu mais cela peut être dû à deux raisons: la bactérie n'a pas de nitrate, ou elle a une nitrite réductase qui transforme les nitrites en azote atmosphérique.

Pour distinguer ces deux cas, il suffit juste d'ajouter une pincée de poudre de zinc. Cette poudre, très réductrice, réduit en quelques minutes les nitrates en nitrites et la coloration rouge apparait. La bactérie est donc (nitrate-). Si aucune coloration n'apparait, c'est qu'il ne reste plus de nitrates dans le bouillon, donc la bactérie est (nitrate+ ; réductrice de nitrites en azote).

-Test de TRP

Ajouter une goutte de réactif de JAMES dans la cupule correspondante, la diffusion d'une couleur rose dans toute la cupule indiquant ainsi une réaction positive, se traduit par la formation d'indole.

La fermentation de glucose se traduit par une couleur jaune, la même couleur est considéré positif concernant la présence de β -galactosidase. L'orange, le rose ou le rouge est témoin d'une réaction positif dans le cas de l'arginine dihydrolase ainsi que l'uréase. Concernant l'esculine qui est un hétéroside qui libère par hydrolyse, du glucose et de l'esculetine, cette dernière produite lors de l'hydrolyse forme un précipité noir en présence de fer. Enfin le résultat positif dans le cas de la gélatine c'est la diffusion d'un pigment noir (voire tableau annexe II).

II-3- Etude de la sensibilité et de la résistance des souches aux métaux lourds

Deux tests ont été réalisés, un test sur milieu solide YMA et un autre sur milieu liquide YMB additionnés de solutions stériles de métaux lourds. Ils permettent d'étudier la capacité des souches à croître et à résister aux métaux lourds.

Les métaux lourds utilisés ainsi que leurs concentrations sont choisis selon des études faites par El-Hilali (2006) et Abou Shanab *et al.*, (2007). Ces métaux sont utilisés sous formes de sels hydrosolubles. Les concentrations en sels de métaux utilisés pour la préparation des solutions mères sont les suivantes :

- Sulfates de cuivre ($\text{Cu SO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$) : 50 mg/ml.
- Acétate de plomb ($\text{Pb (OOCCH}_3)_2, 3\text{H}_2\text{O}$) : 30 mg/ml.
- Sulfate de cadmium ($3 \text{ CdSO}_4, 8 \text{ H}_2\text{O}$) : 10mg/ml.
- Chlorure de mercure (HgCl) : 200mg/ml.
- Sulfate de zinc ($\text{Zn SO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$) : 100mg/ml.
- Chromate de potassium (CrK_2O_4) : 200mg/ml.

II-3-1- Sur milieu solide YMA

A partir des solutions mères (initiales) de sels de métaux lourds, des volumes bien définis sont prélevés et ajoutés à un volume de la gélose YMA (Annexe I), pour avoir un volume final de 100 ml. Les concentrations et les volumes nécessaires pour la préparation des différents milieux YMA additionnés de métaux lourds à différentes concentrations est donné en annexe IV, étant donné que la masse de la solution mère des différents métaux lourds est donné en annexe III.

Les inocula préparés précédemment sont utilisés pour ensemer en spot et à raison de $10\mu\text{l}$ (10^7UFC/ml , déterminé à l'aide d'une cellule malassez) les différents milieux. Ainsi, trois répétitions sont réalisées pour chacune des concentrations. Un témoin négatif sans métal est ensemené avec les mêmes suspensions bactériennes.

Après incubation à 28°C pendant 6 jours, la présence ou l'absence de croissance est notée pour chaque souche à chaque concentration de métaux. Les concentrations minimales inhibitrices qui correspondent à la plus faible concentration inhibant toute croissance bactérienne visible à l'œil nu sont déterminées.

II-3-2-Sur milieu liquide YMB

A partir des solutions mères (initiales) de sels de métaux lourds, des volumes bien définis sont prélevés et ajoutés à un volume de milieu liquide YMB (Annexe I), pour avoir un volume

final de 200 ml. Les concentrations et les volumes nécessaires pour la préparation des différents milieux YMB additionnés de métaux lourds à différentes concentrations est donné en annexe V, étant donné que la masse de la solution mère des différents métaux lourds est donné en annexe III.

Les inocula (10^7 UFC/ml, déterminé à l'aide d'une cellule malassez) préparés précédemment sont utilisés pour ensemercer des différents milieux. Ainsi trois répétitions sont réalisées, pour chaque souche à toutes les concentrations. Un témoin négatif, contenant que le milieu liquide YMB est réalisé. Après incubation à 28°C pendant 6 jours, une lecture au spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda=630$ nm est faite pour mesurer la croissance bactérienne (Annexe VI).

Les différentes concentrations en ions de sels métalliques utilisées sont représentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau I : les différentes concentrations en sels de métaux utilisées (El-Hillali, 2006).

| Ions métalliques | Concentrations ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | |
|------------------------|-------------------------------------|------|-----|-----|-----|------|
| | 25 | 50 | 100 | 200 | 400 | 800 |
| Zn²⁺ | 25 | 50 | 100 | 200 | 400 | 800 |
| Cu²⁺ | 12.5 | 25 | 50 | 100 | 200 | 400 |
| Hg²⁺ | 50 | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 |
| Cd²⁺ | 6.25 | 12.5 | 25 | 50 | 100 | 200 |
| Pb²⁺ | 25 | 50 | 100 | 200 | 400 | 800 |
| Cr²⁺ | 50 | 100 | 200 | 400 | 800 | 1600 |

Les souches qui poussent à des concentrations supérieures aux valeurs critiques (Tableau IV) sont considérées résistantes. Pour évaluer la sensibilité et la résistance de ces souches de rhizobiums, nous avons tenu compte des travaux d'Abou-Shanab *et al.*, (2007).

Tableau II : Les concentrations critiques exprimant la résistance ou la sensibilité des souches de rhizobia aux métaux lourds (Abou-Shanab et *al.*, 2007).

| Métaux lourds | Concentration (µg/ml) |
|----------------------|------------------------------|
| Cd | 112,41 |
| Zn | 65,38 |
| Cu | 63,50 |
| Cr | 52,00 |
| Pb | 207,20 |
| Hg | 20,06 |

Résultats et discussion

I-Authentification des isolats

Le test de nodulation a été réalisé sur *Vigna unguiculata*, considérée comme légumineuse à large spectre de bactéries nodulantes, afin de vérifier l'aptitude des souches étudiées à noduler les légumineuses. Ceci a permis d'authentifier 8 isolats bactériens appartenant aux rhizobia. Les nodules sont apparus après un mois d'inoculation (Figure 3). Ces nodules multilobés sont bruns indiquant la présence de leghémoglobine (Appleby, 1984).

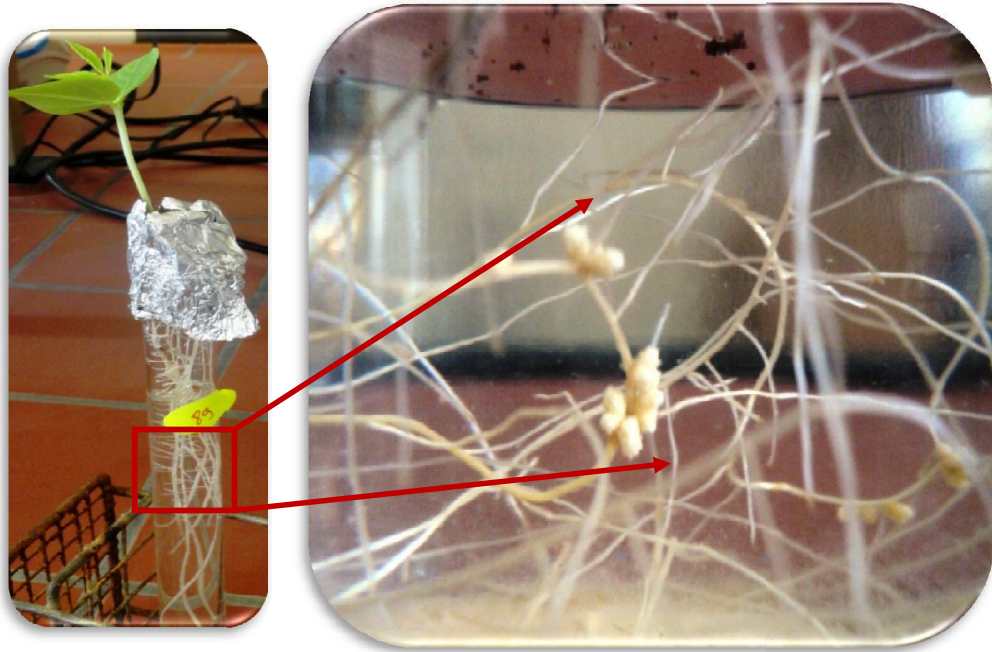


Figure 3 : Aspect des nodules de *Vigna unguiculata* après un mois d'inoculation (original).

II-Characterisation phénotypique des souches bactériennes

II-1-Characterisation morphologique des colonies

Les isolats étudiés forment des colonies qui ont une forme ronde, avec contour régulier et des diamètres allant de 1 à 2 mm. Elles sont beiges, opaques et ont un aspect gluant, d'autres sont translucides et de couleur blanche (tableau V et figure 4). Toutes les souches étudiées sécrètent des exopolysaccharides. L'apparition des colonies après 6 jours d'incubations à 28°C permet de classer ces souches en bactéries à croissance lente, caractérisant les espèces du genre *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982, 1984).

Tableau III : Caractères cultureux des souches étudiées.

| Caractères Souches | Diamètre des colonies (mm) | Couleur et aspect des colonies | Présence des EPS | Temps d'apparitions | Forme et contour des colonies |
|-----------------------|----------------------------|--------------------------------|-------------------|---------------------|-------------------------------|
| S ₂₈ | 2 mm | Opaque, beige, gluant | Présence des EPS. | Six (06) Jours | Arrondie à contour régulier |
| S ₄₂ | <1 mm | Opaque, beige, gluant | | | |
| S ₄₆ | 1 mm | Opaque, beige, gluant | | | |
| S ₇₁ | >1 mm | Opaque, beige, gluant | | | |
| S ₈₉ | 2 mm | Opaque, beige, gluant | | | |
| S ₁₅₁ | 2 mm | Translucide, blanche, muqueux | | | |
| S ₁₅₄ | 1.5 mm | Translucide, blanche, muqueux | | | |
| S ₁₅₈ | 2 mm | Translucide, blanche, muqueux | | | |
| <i>B.canariense</i> | >1 mm | Opaque beige, gluant | | | |
| <i>B.japonicum</i> | 1 mm | Opaque, beige, gluant | | | |
| <i>B.elkanii.</i> | >1 mm | Opaque, beige, gluant. | | | |
| <i>B. pachyrhizi</i> | >1 mm | Opaque, beige, gluant. | | | |

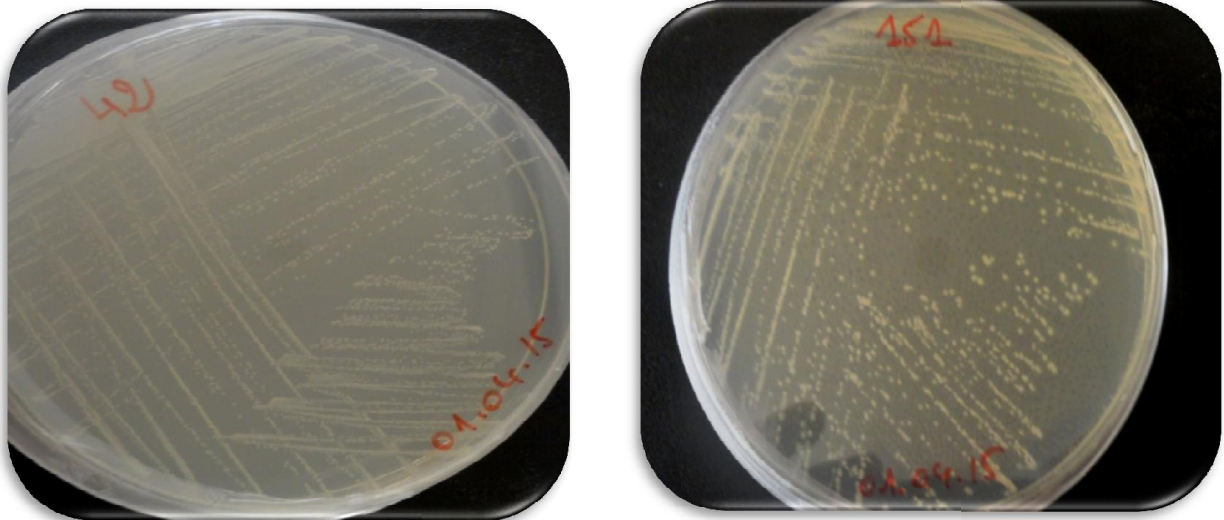


Figure 4 : Aspect des colonies formées par les souches.

II-2-Characterisation cytologique des souches bactériennes

L'observation microscopique d'une suspension bactérienne âgée de 06 jours, montre des cellules qui ont la forme de bâtonnets à extrémités arrondies et mobiles (Figure 5). Ces bactéries présentent un aspect réfringent dû à la présence de granules de poly B-hydroxybutyrates (Pedrosa, 1988). La coloration de Gram réalisée a montré leurs appartenances aux bactéries Gram négatif (Figure 6).

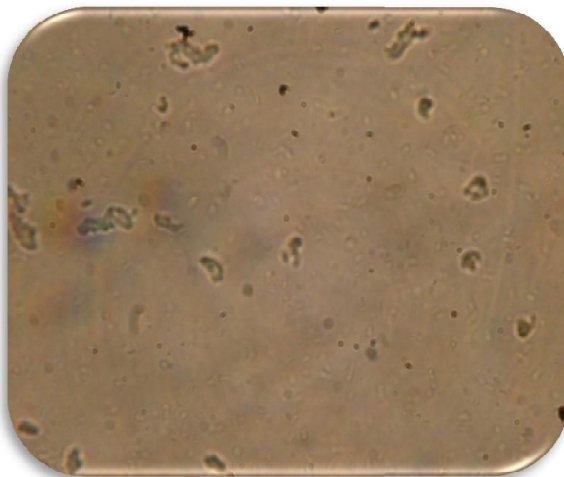


Figure 5 : Observation microscopique d'une suspension bactérienne à l'état frais (Grossissement 8×40).

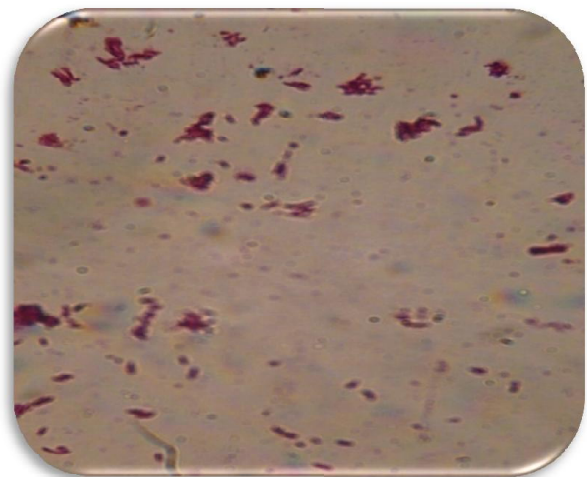


Figure 6: Observation microscopique d'un frottis de bactérie Gram négatif (Grossissement 8×100).

II-3- Caractérisation biochimique des souches bactériennes

20 tests biochimiques ont été réalisés sur 8 souches étudiées et 4 souches de référence (Tableau VI et figure 7).

Tableau IV : Résultats de la caractérisation biochimique

| Souches | NO ₃ /N ₂ | TRP | GLU | ADH | URE | ESC | GEL | PNG | GLU | ARA | MNE | MAN | NAG | MAL | GNT | CAP | ADI | MLT | CIT | PAC |
|-----------------------|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| S ₂₈ | ++ | - | - | + | + | - | + | + | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| S ₄₂ | ++ | - | - | + | + | - | + | - | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| S ₄₆ | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + |
| S ₇₁ | ++ | - | - | + | + | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - | - |
| S ₈₉ | ++ | - | - | + | + | - | + | - | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| S ₁₅₁ | ++ | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| S ₁₅₄ | ++ | - | - | + | + | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| S ₁₅₈ | ++ | - | - | + | + | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>B. canariense</i> | ++ | - | - | + | + | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>B. japonicum</i> | ++ | - | - | + | + | + | - | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>B. elkanii</i> | ++ | - | - | + | + | + | - | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>B. pachyrrhizi</i> | + | - | - | + | + | - | + | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |

- : Test négatif, + : Test positif.
+ : nitrate réductase. ++ : Nitrite réductase

- Résultats des tests conventionnels

Le test sur galerie montre que la pluparts des souches étudiées possèdent la nitrite réductase, à l'exception de S₄₆ et *B. pachyrrhizi* qui possèdent la nitrate réductase.

Grâce à la tryptophane hydrolase les bactéries dégradent le tryptophane en indole acide pyruvique, dans cette étude, toutes les souches y compris les souches de référence ne produisent pas d'indole à partir du tryptophane. Les résultats obtenus révèlent aussi qu'aucune souche ne fermente le glucose. Cependant l'arginine et l'urée sont hydrolysés par toutes les souches ce qui suggèrent la présence de l'arginine dihydrolase et d'une uréase respectivement. Les résultats trouvés par le test de l'hydrolyse d'esculine révèlent que la pluparts des souches sont incapable de produire du glucose et de l'escultine à l'exception des souches S₄₆, S₁₅₁, *B. japonicum*, et *B. elkanii*. La présence d'une gélatinase a été révélée par la diffusion du pigment, le résultat est positif pour toutes les souches à l'exception de *B. japonicum*, et *B. elkanii*. Le test de PNPG montre que seulement les souches S₄₆, S₁₅₁, S₂₈, *B. japonicum*, *B. elkanii*, et *B. pachyrhizi* possèdent le β -galactosidase.

- Résultats des tests d'assimilations

L'utilisation des glucides comme seule source de carbone et d'énergie a été étudiée, six sucres ont été utilisés : D-glucose, L-arabinose, D-mannose, D-mannitol, N-acétyl-glucosamine, D-maltose. Les résultats montrent que toutes les souches assimilent le D-mannitol. Cependant, aucune souche n'assimile le N-acétyl-glucosamine. Le D-glucose n'est assimilé que par les souches: S₄₂, S₄₆, S₈₉, *B. japonicum*. L'arabinose est également très peu utilisé. En effet, son assimilation n'est possible que par les souches : S₂₈, S₄₂, S₄₆, et *B. japonicum*. Enfin la S₄₆ semble être la seule souche qui utilise le D-mannose, et le D-maltose.

Certains travaux indiquent que les rhizobia peuvent utiliser différentes sources de carbone ce qui les caractérisent (Cepeda-Hernandez, 2005). L'étude de l'assimilation de diverses sources de carbone par différentes souches appartenant au genre *Rhizobium* ont une grande aptitude à assimiler les mono, et les disaccharides. Cependant les bactéries du genre *Bradyrhizobium* ont une aptitude variable pour l'assimilation des monosaccharides et moindre pour les disaccharides (Stowers, 1985).

Un test d'utilisation des acides gras par les souches a été également réalisé, 2 acides gras sont testés : acide caprique, acide adipique, ainsi qu'un test de 2 acide organique : acide malique et acide phénylacétique. Les résultats trouvés révèlent que seule la S₄₆ assimile les : acide adipique, malique, et phénylacétique. En outre, l'acide caprique n'est assimilé que par la S₇₁.

Le test d'assimilation du trisodium citrate, comme seule source de carbone appelé aussi le citrate de sodium, montre qu'aucune souche n'assimile le trisodium citrate.

Les tests biochimiques réalisés sur les rhizobia ont été largement étudiés montrant ainsi une diversité de caractères traduisant une variabilité importante de l'équipement enzymatique des souches de rhizobia étudiées (Kedjar, 2001 ; Bensaid, 2002).



Figure 7 : Exemples des résultats obtenus dans la caractérisation biochimique sur galeries (original).

III-Etude de la croissance des souches en présence des métaux lourds

III-1-Sur milieu solide YMA

Les résultats de l'étude de la croissance des différentes souches en présence des six métaux sont présentés dans le tableau VII :

Tableau V : Croissance des souches en présence de différentes concentrations en métaux lourds

| Souches | | S ₂₈ | S ₄₂ | S ₄₆ | S ₇₁ | S ₈₉ | S ₁₅₁ | S ₁₅₄ | S ₁₅₈ | <i>B. canariense</i> | <i>B. japonicum</i> | <i>B. elkanii</i> | <i>B. pachyrhizi</i> |
|-----------------------|------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|----------------------|---------------------|-------------------|----------------------|
| Métaux lourds (µg/ml) | | | | | | | | | | | | | |
| Zn | 25 | ++ | ++ | ++ | + | ++ | + | + | ++ | ++ | ++ | + | + |
| | 50 | ++ | ++ | ++ | + | ++ | + | + | ++ | ++ | ++ | + | + |
| | 100 | + | + | + | + | ++ | + | + | ++ | ++ | ++ | + | + |
| | 200 | + | + | + | + | ++ | + | + | ++ | ++ | ++ | + | + |
| | 400 | + | + | + | + | ++ | + | — | — | ++ | ++ | + | + |
| | 800 | — | — | — | — | — | — | — | — | + | ++ | + | + |
| Cu | 12,5 | + | + | + | + | + | + | — | — | + | + | + | + |
| | 25 | + | — | + | — | — | + | — | — | + | + | + | + |
| | 50 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | 100 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | 200 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | 400 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Cd | 6,25 | + | + | + | + | + | — | — | — | ++ | ++ | + | + |
| | 12,5 | — | — | + | — | — | — | — | — | + | + | + | + |
| | 25 | — | — | — | — | — | — | — | — | + | + | + | — |
| | 50 | — | — | — | — | — | — | — | — | + | — | — | — |
| | 100 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | 200 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |

+ : Présence de croissance. — : Absence de croissance. ++ : Bonne croissance.

Ces résultats montrent que la plupart des souches se développent en présence de faibles concentrations de métaux lourds. Leur croissance diffère en fonction du métal et de la concentration considérée.

En présence du zinc, la plupart des souches croît jusqu'à la concentration de 400 µg/ml à l'exception des souches S₁₅₄ et S₁₅₈. En effet, ces dernières supportent uniquement les concentrations de 200 µg/ml. La souche de référence *B. japonicum* est la seule souche qui se développe dans toutes les concentrations testées.

Il semble que la plupart des souches croît en présence du plomb et du mercure, avec des concentrations allant jusqu'à 200 µg/ml voire 400 µg/ml pour le plomb, à l'exception de la souche S₄₆ qui est la seule qui ne présente aucune croissance.

Nous constatons que le cuivre, le cadmium et le chrome affectent la croissance de la plupart des souches, particulièrement les souches S₁₅₄ et S₁₅₈ pour le cuivre et le chrome en plus de la S₁₅₁ pour le cadmium. Cependant, la souche de référence *B. canariense* est la souche la plus persistante pour le cadmium (50µg/ml).

Il a été rapporté que les métaux lourds présents dans le sol peuvent entraîner un dysfonctionnement du métabolisme cellulaire des rhizobies (Gusmao-Lima *et al.*, 2005). Le nombre et la survie de ces bactéries dans les sols contaminés peuvent être sévèrement affectés (Reddy *et al.*, 1983 ; Obbard *et al.*, 1994).

Angle *et al.*, (1993) ainsi que Tong et Sadowsky (1995) ont rapporté que les souches de *Bradyrhizobium* sont plus résistantes aux métaux lourds puisqu'elles ont la capacité d'alcaliniser le milieu et rendre ainsi les métaux lourds moins disponibles dans leurs environnements. Cependant, une grande variabilité de résistance à différents métaux lourds a été observée entre les souches appartenant à la même espèce *Bradyrhizobium japonicum* (Kinkle *et al.*, 1987).

Un exemple de résultats de croissances des souches en présence des différents métaux lourds est présenté dans la figure 8 :

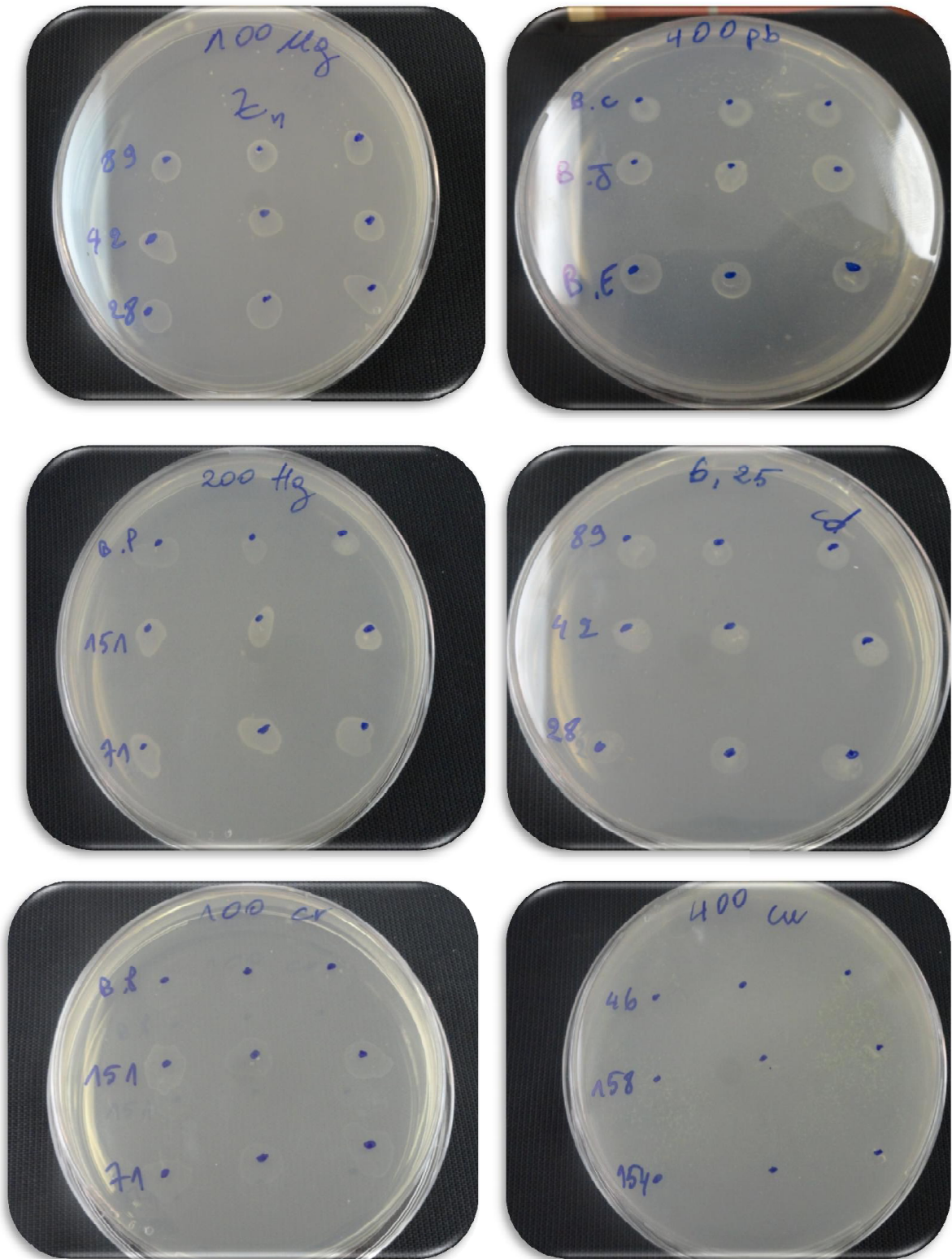


Figure 8 : Exemple de résultats de croissances des souches en présence de différents métaux lourds (original).

Pour mieux évaluer le niveau de résistance et de sensibilité. Les taux de croissance des différentes souches en présence des différents métaux lourds sont présentés dans les figures 9, 10, 11, 12, 13, 14.

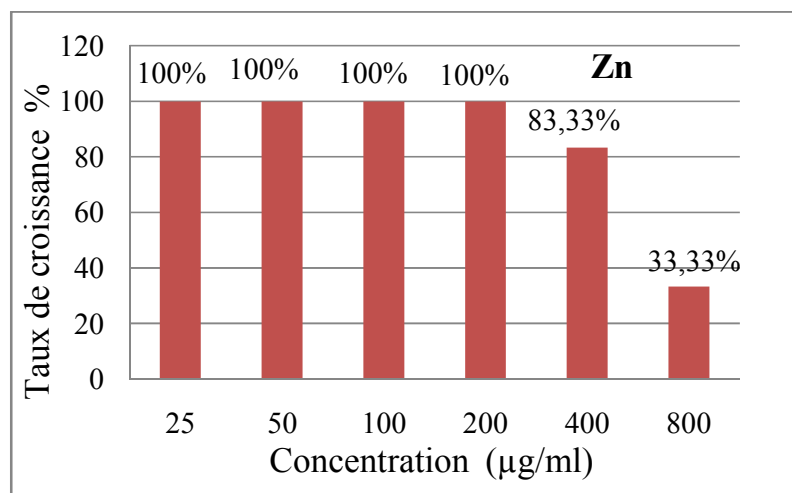


Figure 9: Taux de croissance des souches de rhizobium en présence du zinc.

Toutes les souches poussent dans les 4 faibles concentrations (25, 50, 100, et 200 µg/ml) avec un taux de 100%. En effet, 83,33% des souches se développent dans la concentration de 400 µg/ml, et uniquement 33,33% des souches présente une croissance dans la plus forte concentration : 800 µg/ml. (Figure 9). C'est résultats sont proches de ceux trouvés par El-Hilali (2006), qui a rapporté les plus grand taux de croissance rhizobial à 400 µg/ml variant entre 60% et 80%.

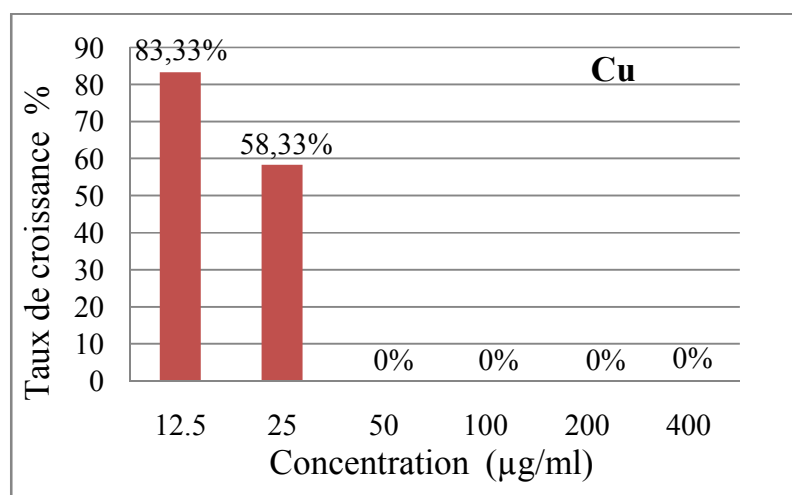


Figure 10 : Taux de croissance des souches de rhizobium en présence du cuivre.

Concernant le cuivre, la croissance des souches est très faible. En effet, 83,33% des souches poussent dans la concentration de 12,5 $\mu\text{g/ml}$. Tandis que 58,33% des souches croît dans la concentration de 25 $\mu\text{g/ml}$ (figure 10). Ces résultats sont différents de ceux obtenus par Ceveheri et al (2011) sur des rhizobiums isolés de *Vicia palaestina* qui a décrit des souches présentant un taux de croissance très important au cuivre.

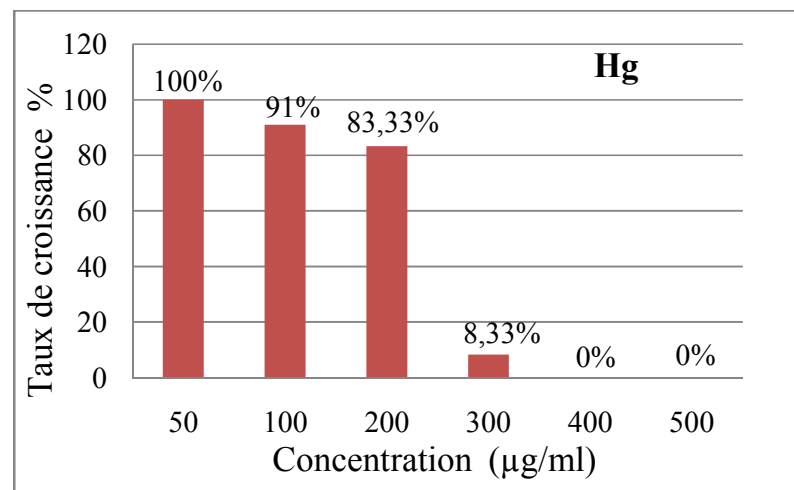


Figure 11 : Taux de croissance des souches de rhizobium en présence du mercure.

Une importante croissance est observée dans le cas de mercure. En effet, 100% des souches poussent dans la plus faible concentration qui est de 50 $\mu\text{g/ml}$, cependant 91,66% des souches se développent à 100 $\mu\text{g/ml}$, et 83,33% des souches poussent à la concentration de 200 $\mu\text{g/ml}$. Alors qu'uniquement 8,33% croît à 300 $\mu\text{g/ml}$ de mercure (figure 11). Ces résultats sont différents de ceux obtenus par El-Hilali (2006), qui a notée une forte sensibilité au mercure même à des concentrations nettement faibles par rapport à celles utilisées dans notre étude.

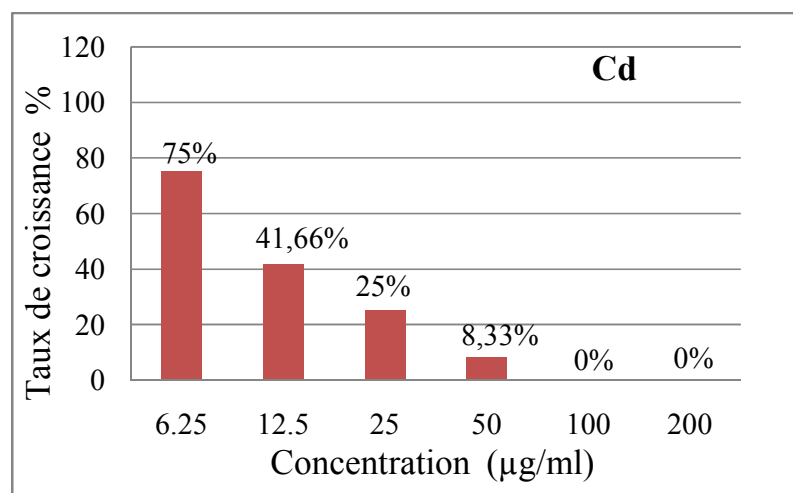


Figure 12 : Taux de croissance des souches de rhizobium en présence du cadmium.

La figure 12 représente le pourcentage de souches qui croît en présence du cadmium, 25% des souches poussent à 25 µg/ml, et 8,33% des souches présentent une croissance à 50 µg/ml, et au-delà de 50 µg/ml aucune souche n'a pu se développer en présence du cadmium. Ces résultats ne coïncident pas avec ceux trouvés par El-Hilali (2006), en effet, ses souches ont présenté 70% de croissance à 25 µg/ml de cadmium.

Le cadmium est connu comme étant néfaste aussi bien pour les microorganismes symbiotiques que pour l'établissement de la symbiose (Tiller et *al.*, 1994; Gusmao-Lima et *al.*, 2005).

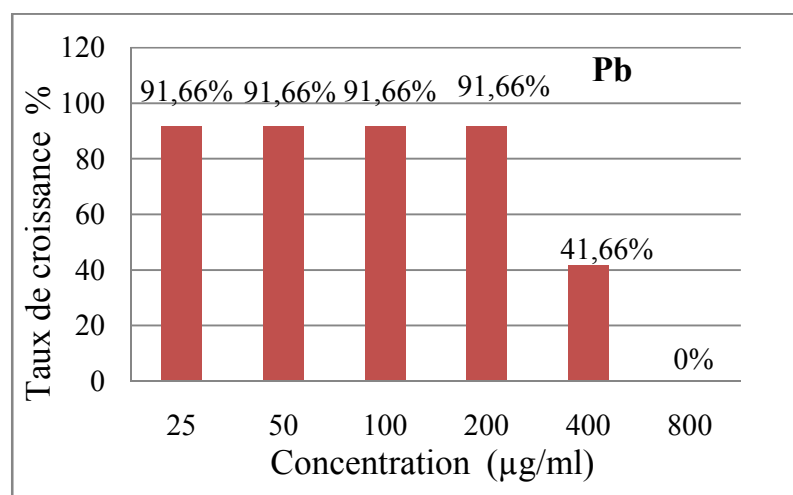


Figure 13 : Taux de croissance des souches de rhizobium en présence du plomb.

Une forte croissance est enregistré dans le cas de plomb, en effet 91,66% des souches présentent une bonne croissance dans les concentrations de: 25, 50, 100, et 200 $\mu\text{g/ml}$, alors que seul 41,66% des souches poussent à 400 $\mu\text{g/ml}$ de plomb (figure 13). Ces résultats viennent confirmer ceux obtenus par Carrasco et *al.*, (2005).

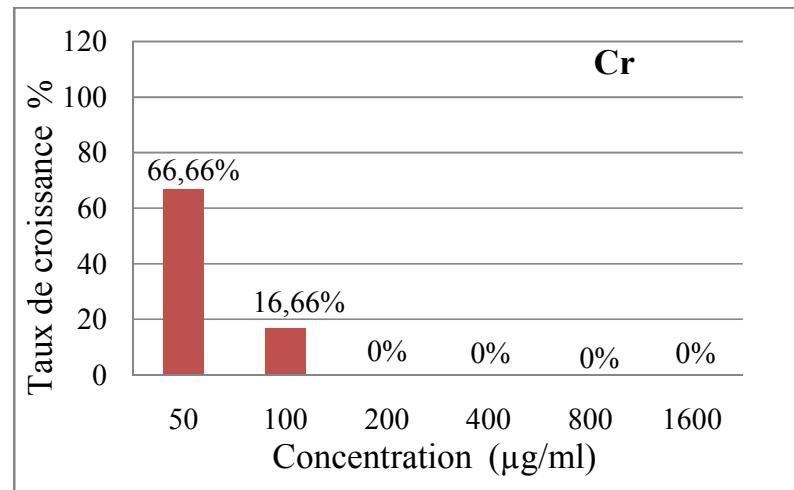


Figure 14 : Taux de croissance des souches de rhizobium en présence du chrome.

En présence du chrome, 66,66% des souches poussent à 50 $\mu\text{g/ml}$, et uniquement 16,66% croît à 100 $\mu\text{g/ml}$ (figure 14). Ces résultats sont différents de ceux obtenus par Abou-Shanab et *al.*, (2007), qui a rapporté que ces isolats de rhizobia sont plus sensibles au chrome.

III-1-1-Détermination des concentrations minimales inhibitrices

Les résultats de la détermination des concentrations minimales inhibitrices montrent une variabilité de comportement des souches en présence des métaux lourds utilisés (Tableau VII),

Tableau VI : Concentrations minimales des métaux lourds inhibitrices des souches étudiées.

| Métaux lourds µg/ml Souches | Zn | Cu | Hg | Cd | Pb | Cr |
|-----------------------------------|------|-------|-----|-------|-----|-----|
| S ₂₈ | 800 | 50 | 300 | 12,5 | 400 | 100 |
| S ₄₂ | 800 | 25 | 300 | 12,5 | 400 | 100 |
| S ₄₆ | 800 | 50 | 200 | 25 | <25 | <50 |
| S ₇₁ | 800 | 25 | 300 | 12,5 | 400 | 100 |
| S ₈₉ | 800 | 25 | 300 | 12,5 | 400 | 100 |
| S ₁₅₁ | 800 | 50 | 300 | <6,25 | 800 | 200 |
| S ₁₅₄ | 400 | <12,5 | 400 | <6,25 | 400 | <50 |
| S ₁₅₈ | 400 | <12,5 | 100 | <6,25 | 400 | <50 |
| <i>B. canariense</i> | >800 | 50 | 300 | 100 | 800 | 100 |
| <i>B. japonicum</i> | >800 | 50 | 300 | 50 | 800 | 200 |
| <i>B. elkanii</i> | >800 | 50 | 300 | 50 | 800 | 100 |
| <i>B. pachyrhizi</i> | >800 | 50 | 300 | 25 | 800 | <50 |

Toutes les souches y compris celles de référence possèdent une forte CMI pour le zinc, elle est de 800 µg/ml voire plus, à l'exception des souches S₁₅₄ et S₁₅₈, qui ont les CMI les plus faibles pour le cuivre (<12,5 µg/ml), le cadmium (<6,25 µg/ml) et le chrome (<50 µg/ml).

Concernant les CMI liées au plomb et au mercure, elles sont toutes élevées allant jusqu'à 800 µg/ml pour le plomb et 400 µg/ml pour le mercure à l'exception de la souche S₄₆ qui est effectivement la plus sensible au plomb avec une CMI de <25µg/ml. Il est à noter que les CMI liées au plomb sont faibles pour les souches isolées comparées aux souches de références.

Les résultats obtenus montrent également que ces souches présentent des faibles CMI allant de :<50 à 200 µg/ml dans le cas du chrome, de : 6,25 à 100 µg/ml pour le cadmium, et enfin de 12,5 à 50 µg/ml pour le cuivre.

L'étude de la sensibilité des souches isolées aux métaux lourds montre que ces souches sont plus tolérantes que celles isolées par Abou-Shanab et al. (2007).

III-1-2-Etude de résistance et de la sensibilité des souches aux métaux lourds

L'étude de l'effet des différents métaux lourds sur le développement des souches isolées permet d'évaluer leurs résistances ou sensibilités (Tableau IX). Ceci en comparant les CMI des souches étudiées avec les concentrations critiques exprimant la résistance ou la sensibilité aux métaux lourds (Abou-Shanab *et al.*, 2007).

Tableau VII : Résistance des souches aux métaux lourds.

| Métaux lourds µg/ml Souches | Zn | Cu | Hg | Cd | Pb | Cr |
|-----------------------------------|----|----|----|----|----|----|
| S ₂₈ | R | S | R | S | R | R |
| S ₄₂ | R | S | R | S | R | R |
| S ₄₆ | R | S | R | S | S | S |
| S ₇₁ | R | S | R | S | R | R |
| S ₈₉ | R | S | R | S | R | R |
| S ₁₅₁ | R | S | R | S | R | S |
| S ₁₅₄ | R | S | R | S | R | S |
| S ₁₅₈ | R | S | R | S | R | S |
| <i>B. canariense</i> | R | S | R | R | R | R |
| <i>B. japonicum</i> | R | S | R | S | R | R |
| <i>B. elkanii</i> | R | S | R | S | R | R |
| <i>B. pachyrhizi</i> | R | S | R | S | R | S |

La résistance bactérienne est observée dans le cas de Zn et de l'Hg, ainsi que le Pb, cependant les souches se sont montrées nettement sensibles au Cr, et au Cd, et on remarque aussi que la sensibilité est totale en présence de Cu.

Les taux de résistance et de sensibilité des différentes souches aux métaux lourds sont présentés dans la figure 15.

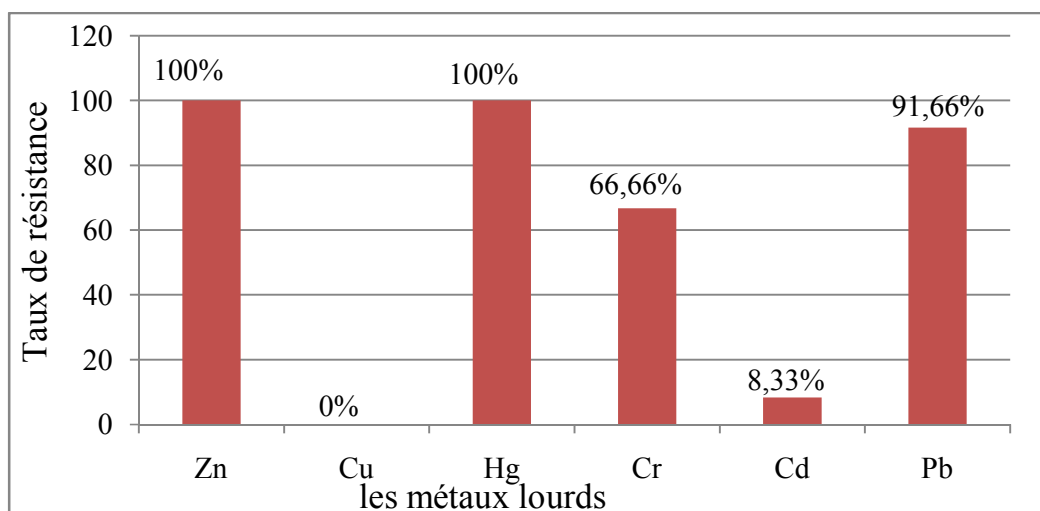


Figure 15 : Taux de résistance des souches étudiées *vis-à-vis* des métaux lourds.

La plus forte résistance est observée dans le cas du zinc et du mercure, la majorité des souches ont résisté aux différentes concentrations. Les fréquences de résistance aux ions métalliques testés sont comme suit : Zn = 100%, Hg= 100%, Pb = 91,66%, Cr = 66,66%, Cd = 8,33%, Cu = 0%.

Le cuivre est le plus toxique pour les souches étudiées, sa présence inhibe la croissance de la totalité des souches. L'ordre de toxicité des métaux a été jugé selon les résultats obtenus comme suit : Cu > Cd > Cr > Pb > Hg > Zn.

Le pourcentage de résistance obtenu dans le cas du Zn (100%) est similaire à ceux rapporté par Abou-Shanab et *al.* (2007). Il est nettement supérieur dans le cas d'Hg (100%), du Cr (66,66%), comparés aux résultats obtenus par ces derniers, qui sont de 29 % pour le mercure et 53 % pour le chrome. Cependant les pourcentages de résistance obtenus dans le cas du Pb (91,66%), Cd (8,33%), Cu (0%) sont inférieurs à ceux rapportés par Abou-Shanab et *al.* (2007) : 100% pour le plomb, 42 % pour de cadmium, et 98% pour le cuivre.

Selon Abou-Shanab et *al.* (2007), l'exposition aux métaux lourds tend probablement à sélectionner des souches résistantes parmi les populations bactériennes du sol.

Les souches S₂₈, S₄₂, S₇₁, S₈₉, en plus des souches de référence *B. canariense*, *B. japonicum*, et *B. elkanii* présentent une résistance plus importante aux différents métaux lourds comparés relativement aux autres souches.

III-1-2-3-Métallotypes des souches

On note une diversité de réponse quant à la présence de métaux lourds, ceci permet de classer les différentes souches utilisées en différents métallotypes (Tableau X).

Tableau VIII : Métallotypes de résistance des souches étudiées aux métaux lourds.

| Type de résistance | Nombre de souches | % de résistance |
|-------------------------------|-------------------|-----------------|
| <u>A six métaux</u> | | |
| Pb, Cr, Hg, Cd, Zn, Cu | 0 | 0 |
| <u>A cinq métaux</u> | | |
| Zn, Cd, Pb, Cr, Hg | 1 | 8,33 |
| <u>A quatre métaux</u> | | |
| Pb, Hg, Cr, Zn | 8 | 66,66 |
| Cr, Pb, Zn, Cd | 1 | 8,33 |
| <u>A trois métaux</u> | | |
| Cr, Cd, Pb | 1 | 8,33 |
| Zn, Pb, Cr | 8 | 66,66 |
| <u>A deux métaux</u> | | |
| Pb, Hg | 11 | 91,16 |
| Pb, Cr | 8 | 66,66 |

Les souches isolées présentent 7 métallotypes avec une résistance multiple allant de deux à cinq métaux. Le tableau X montre que toutes les souches présentent une multiple résistance aux métaux lourds ; toutefois, le profil de résistance est différent. Le pourcentage de résistance à 2 métaux lourds présente le taux le plus élevé avec 91,66% des souches,

58,33% des souches résistent à 4 métaux et 8,33% des souches présentent une résistance à 5 métaux lourds.

Abou-Shanab et al (2007) ont rapporté une résistance à neuf métaux lourds (Cr, Cu, Ni, Zn, Pb, Cd, Co, Hg et As) chez une souche de *Rhizobium mongolense*.

III-2-Sur milieu liquide YMB

Les résultats obtenus sur milieux YMB en présence des différents métaux lourds (figure 16, 17, 18, 19, 20, 21) révèlent la présence d'une variabilité de croissance entre les souches avec les différentes concentrations des métaux lourds étudiés. L'ensemble des souches présentent une croissance inversement proportionnel à l'augmentation de la concentration du métal.

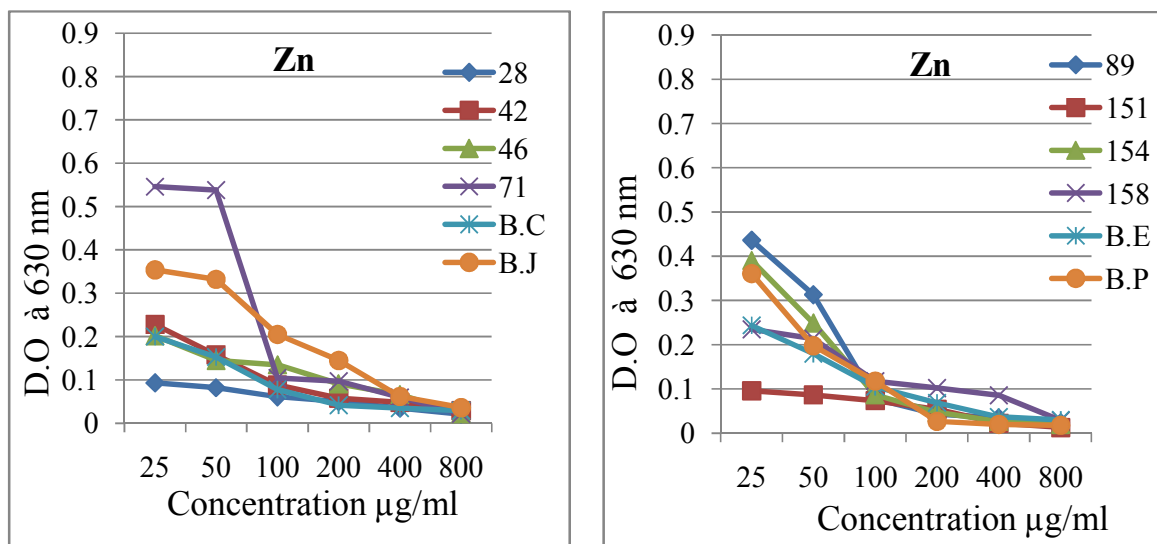


Figure 16 : Effet de zinc sur la croissance des souches étudiées.

Dans le cas de zinc, les résultats obtenus montrent que la majorité des souches se développe dans les concentrations allant de 25 à 200 µg/ml (figure 16). Ces résultats confirment ceux obtenus sur milieu solide YMA.

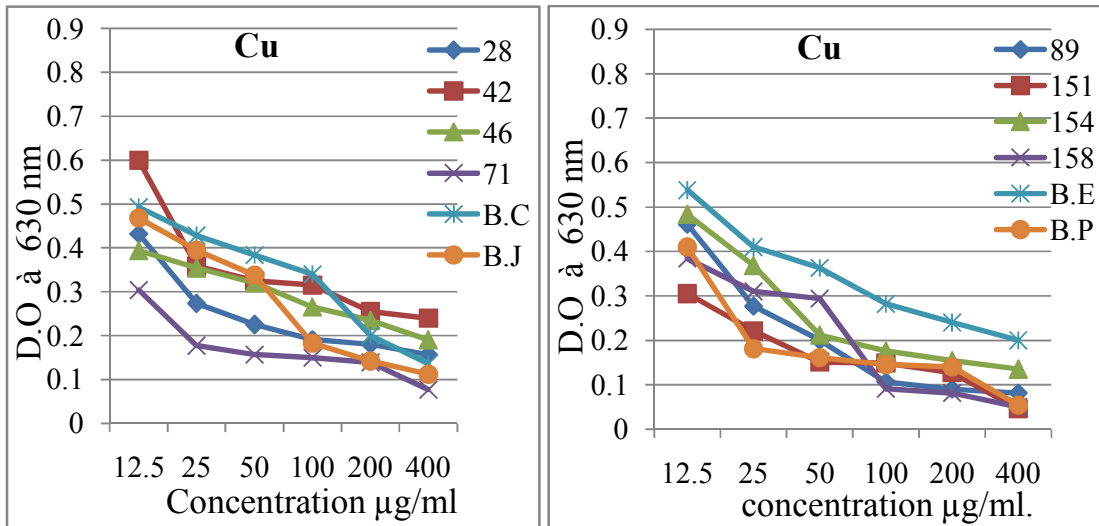


Figure 17 : Effet de cuivre sur la croissance des souches étudiées.

Concernant le cuivre, les souches se développent à des concentrations allant de 12,5 jusqu'à 100 µg/ml voire 200 µg/ml pour certaines souches (figure 17). Ce résultat est en contradiction avec celui obtenu sur milieu YMA. On remarque que la croissance est meilleure dans le cas du Cu sur YMB que sur YMA là où 25 µg/ml de Cu inhibe complètement la croissance.

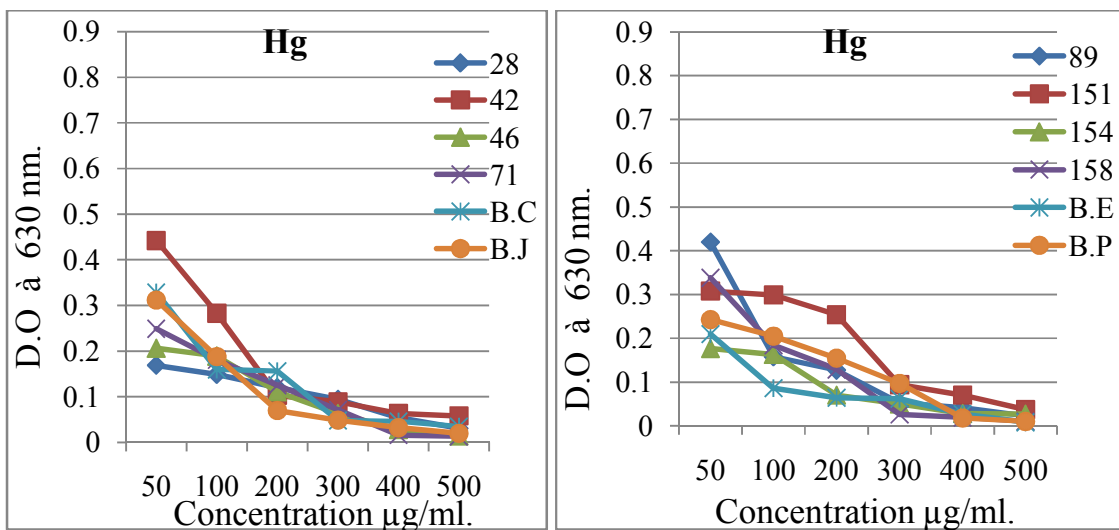


Figure 18: Effet de mercure sur la croissance des souches étudiées.

Des concentrations allant de 50 à 200 µg/ml du mercure permettent la croissance de la pluparts des souches (figure 18), à l'exception de *B. japonicum*, *B. elkanii*, et S₁₅₁. Certaines

ont même une bonne croissance à des concentrations élevées (300 µg/ml) tel que S₄₂, S₁₅₁, et *B. pachyrhizi*. En comparant ces résultats avec ceux obtenus sur YMA. Nous pouvons constater également une meilleure croissance de ces souches sur milieu YMB.

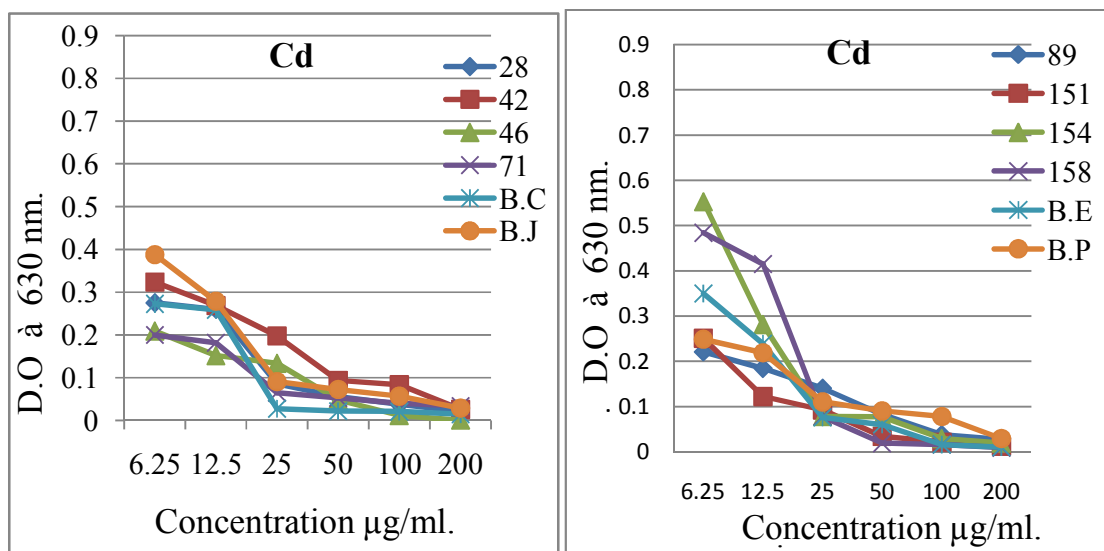


Figure 19 : Effet de cadmium sur la croissance des souches étudiées.

La plupart des souches se développent à des concentrations allant jusqu'à 25 µg/ml voire 50 µg/ml pour certaines souches, à 100 µg/ml pour S₄₂ et *B. pachyrhizi* (figure 19). En comparant avec les résultats obtenus sur milieu YMA nous remarquons là aussi que le milieu liquide a favorisé la croissance des souches. Puisque sur milieu YMA uniquement 25% des souches poussent à 25 µg/ml et que 100 µg/ml inhibent complètement la croissance des souches.

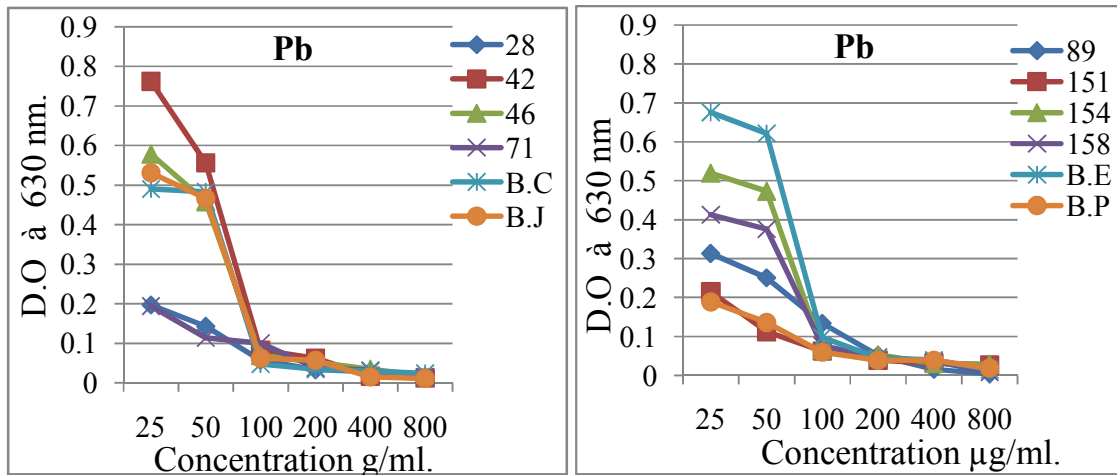


Figure 20 : Effet de plomb sur la croissance des souches étudiées.

La croissance des souches sur milieu liquide YMB additionné de plomb, est bonne pour toutes les souches allant jusqu'à la concentration de 100 µg/ml (figure 20). Alors que sur milieu liquide nous constatons une meilleure croissance des souches même dans des concentrations de 200 µg/ml voire 400 µg/ml de plomb.

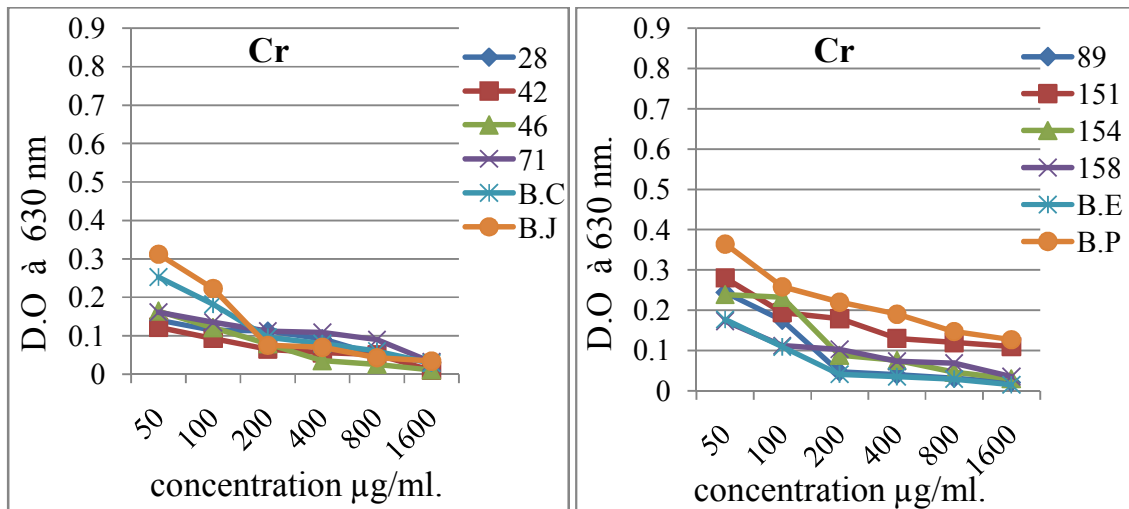


Figure 21 : Effet de chrome sur la croissance des souches étudiées.

Pour le chrome, les résultats montrent que la pluparts des souches se développent à des concentrations allant jusqu'à 100 µg/ml à l'exception de *B. pachyrhizi* et *S*₁₅₁ qui se développent à toutes les concentrations (figure 21), là aussi nous pouvons dire que la

croissance de la plupart des souches est meilleure sur milieu liquide YMB que sur milieu solide YMA.

La comparaison des résultats de croissance des souches de rhizobium sur milieu YMB avec les résultats obtenus auparavant sur milieu YMA, nous permet de confirmer que les métaux lourds ont un impact sur la croissance des souches de rhizobium, et de constater que le milieu liquide favorise mieux la croissance des souches étudiées.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Cette étude s'est portée sur l'impact de 6 métaux lourds sur la croissance de huit souches endosymbiotiques. Quatre souches de référence ont été prises à titre de comparaison.

Avant d'approfondir cette étude nous avons décrit quelques paramètres phénotypiques des souches à savoir le test de nodulation, les caractères morphologiques des colonies, les caractères cellulaires des bactéries et les caractères biochimiques. En effet, le test d'authentification révèle que toutes les souches étudiées nodulent *Vigna unguiculata*. L'apparition des colonies après 6 jours d'incubation nous permet de suggérer l'appartenance de ces bactéries endosymbiotiques au *Bradyrhizobium*. Les caractères culturels et cellulaires des bactéries répondent à ceux qui caractérisent les espèces du Genre *Bradyrhizobium*. Les tests biochimiques réalisés sur les souches de rhizobium montrent une diversité de caractères témoignant d'une variabilité importante de l'équipement enzymatique des souches de rhizobia étudiées.

L'étude de l'impact de 6 métaux lourds sur la croissance des huit souches a été réalisée sur deux milieux : solide (YMA) et liquide (YMB). Les résultats obtenus sur YMA ont montré la présence de différents niveaux de résistance chez les rhizobia étudiés *vis-à-vis* de ces métaux. En effet, en comparant les CMI des différentes souches de chaque métal aux normes présent dans cette étude, nous avons trouvé que l'ensemble des souches ne résiste pas au cuivre, et résiste peu au cadmium (8,33%). Cependant cette résistance est considérable dans le cas de chrome (66,66%) et de plomb (91,66%). Une totale résistance de ces souches y compris celle de référence a été obtenue dans le cas de zinc et de mercure.

Les résultats obtenus sur YMB ont montré que la plupart des souches ont une croissance proportionnellement inverse à l'augmentation des concentrations en métaux lourds. La comparaison des résultats obtenus sur milieu YMA et YMB montre que la croissance des souches est favorisée sur milieu liquide que sur milieu solide.

En perspective, nous proposons de :

- ❖ Compléter cette étude par une analyse moléculaire et génotypique des rhizobia étudiées
- ❖ Réaliser une étude de résistance avec une large gamme de métaux lourds.
- ❖ Elargir l'étude de l'impact des métaux lourds sur la plante.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- ✓ Abou-Shanab, R.I., Angle, J.S., Delorme, T.A., Chaney, R.L., van Berkum, P., Moawad, H., Ghanem, K., Ghazlan, H.A. (2003a). Rhizobacterial effects on nickel extraction from soil and uptake by *Alyssum murale*. N. Phytol. **158**, 219–224.
- ✓ Abou-Shanab, R.I., Delorme, T.A., Angle, J.S., Chaney, R.L., Ghanem, K., Moawad, H., Ghazlan, H.A. (2003b). Phenotypic characterization of microbes in the rhizosphere of *Alyssum murale*. Int. J. Phytorem. **5**, 367–380.
- ✓ Abou-Shanab, R.A.I., Van Berkum, P., Angle, J.S. (2007). Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. Chem. **68**, 360-367.
- ✓ Adriano, D.C., (2001). Trace elements in terrestrial environments: Biochemistry, bioavailability and risks of metals. 2ed. Springer-Verlag, New York. pp 4-12, 64-65.
- ✓ Angel, J.S., McGrath, S.P., Chaudri, A.M., Chaney, R.L., Giller, K.L. (1993). Inoculation effect on legumes grown in soil previously contaminated with sewage sludge. Soil. Biol. Biochim. **25**, pp. 575-580.
- ✓ Appleby, C. (1984). Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. In: Briggs, W. R. ed. Ann. Rev. Plant. Physiol. **35**, 443-478.
- ✓ Ardley, J.K., Parker, A.M., De Meyer, S.E., Trengove, R.D., O'Hara, G.W., Reeve, W.G., Yates, R.G., Dilworth, M.J., Willems, A., Howieson, J.G. (in press) *Microvirga lupini sp. nov.*, *Microvirga lotononidis sp. nov.*, and *Microvirga zambiensis sp. nov.* are Alphaproteobacterial root nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. published ahead of print December 23, 2011
- ✓ Belyaeva, O.N., Haynes, R.J., Birukova, O.A. (2005). Barley yield and soil microbial and enzyme activities as affected by contamination of two soils with lead, zinc or copper. Biol. Fertil. Soil. **41**, 85–94.
- ✓ Bensaid, K. (2002). Caractérisation phénotypique des rhizobia isolés de *Midecago polymarpha* de la région de Bejaia et étude de l'effet de NaCl sur leur symbiose. Mémoire de Magister en Biologie. Université Abderahmane Mira Béjaia. 67p.

- ✓ Blondeau, R. (1980). Fixation biologique de l'azote atmosphérique. Librairie Vuibert. Paris. pp 5-6.
- ✓ Boulila, F., Depret, G., Boulila, A., Belhadi, D., Benallaoua, S., Laguerre, G. (2009). *Retama* species growing in different ecological-climatic areas of northeastern Algeria have a narrow range of rhizobia that form a novel phylogenetic clade with in the *Bradyrhizobium* genus. Syst. and Appl. Microbiol. **32**, 245-255.
- ✓ Broos, K., Beyens, H., Smolders, E., (2005). Survival of rhizobia in soil is sensitive to elevated zinc in the absence of the host plant. Soil. Biol. Biochem. **37**, 573–579.
- ✓ Broughton, W.J., Jabbouri, S., Perret, X., (2000). Keys to Symbiotic Harmony. J. of Bacteriol. **182(20)**, pp 5641-565.
- ✓ Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme, F.W. (2000). Microbial Resistance to Metals in the Environnement. Ecotoxi. Environ. Saf. **45**, 198-207.
- ✓ Carrasco, J.A., Armario, P., Pajuelo, E., Burgos, A., Caviedes, M.A., López, R., Chamber, M.A., Palomares, A.J. (2005). Isolation and characterization of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcóllar pyrite mine. Soil. Biol. and Biochem. **37**, 1131-1140.
- ✓ Cepeda Hernandez, M.L. (2005). Phenotypic characterization of rhizobia that nodulate ball clover. Thèse de Magister. Texas A et M University. 61p. Conditions and in arid climate. Microbiol. Molec. Rev. **63(4)**, 968-989.
- ✓ Cevhri C., Küçük, Ç., Çetin, E. (2011). Fungicide, antibiotic, heavy metal resistance and salt tolerance of root nodule isolates from *Vicia palaestina*. Af. J. of Biotech. **10(13)**, 2423-2429.
- ✓ Chen, W.M., Laevens, S., Lee, T.M., Coenye, T., De Vos, P., Mergeay, M., and Vandamme, P. (2001). *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient. Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol. **51(5)**. pp 1729–1735.
- ✓ Cheriti, A., Talhi, M., Figueroa, M., Barea, G.M., Roldan, A. (2003). Re-establichement of *retama sphaerocarpa* as a target species for reclamation of soil physical and biological properties in semi-arid Mediterranean area. Fores. ecol. and manage. **182**, 49-58.
- ✓ Cheriti, A., Talhi, M.F., Belboukhari, N., Taleb, S., Roussel, C. (2009). Removal of copper from aqueous solution by *Retama forsk.* growing in Algerian Sahara. Desal. and wat. Treat. **10**, 317-320.

- ✓ De Faria, S.M., Lewis, G.P., Sprent, J.I., et Sutherland, J.M. (1989). Occurrence of nodulation in the *leguminosae*. *N. phytol.* **111**, pp.607-619.
- ✓ Di Benedetto, H. (1997). Méthodes spectrométriques d'analyses et de caractérisation des métaux lourds. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne. pp. 8-15.
- ✓ Dreyfus, B., J.L. Garcia, Gillis, M (1988). Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. Nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 89-98.
- ✓ El-Hilali, I. (2006). La symbiose *Rhizobium*-LUPIN : biodiversité des microsymbiotes et mise en évidence d'une multi-infection nodulaire chez *lupinus luteus*. Thèse de Doctorat en Microbiologie et Biologie Moléculaire. Université du Rabat. 206p.
- ✓ Foster, J.W. (1995). Low pH adaption and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Critic. Rev. in Microbiol.* **21**, 215–237.
- ✓ Frank, B. (1889). Uber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber. Dtsc. Bot. Ges.* **7**, 332-346.
- ✓ Gounon, C. (2008). Mobilité des éléments traces métalliques dans les sédiments : couplage et comparaison des approches chimiques et microbiologiques. Thèse de doctorat de Sciences de l'Univers et de l'Environnement. Université de Paris. **12**, Val de Marne. 314p.
- ✓ Grant, C.A., Bailey, L.D., Selles, F., Uckeley, W.T. (1995). Cadmium à accumulation in transport into plants, Workshop proceeding .Ottawa. pp.55-71.
- ✓ Gruber, N., Galloway, J.N. (2008). An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle *Nature.* **451**, 293-296.
- ✓ Gusmão-Lima, A.I., Figueira, E., de Almeida, M.P., Pereira, S.I.A. (2005). Cadmium tolerance plasticity in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*: glutathione as a detoxifying agent. *Can. J. Microbiol.* **51**, 7-14.
- ✓ Hopkins, W.G. (2003). *Physiologie végétale*. 2Ed. Beock Université. Bruxel. pp. 470-499.
- ✓ Huynh, T. (2009). Impact des métaux lourds sur l'interaction plantes/ver de terre/microflore tellurique. Thèse de Doctorat. Université de Paris Est. 151p.
- ✓ Iniguez, A.L., Dong, Y., Triplett, E.W. (2004). Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Molecul. Plant. Microb. Interac.* **17 (10)**, 1078-1085.
- ✓ Ishurd, O., Ketmagi, A., Zgheel, F., Flafla, M., Elmabrouk, M., Yalin, W., Kennedy, J.F., Yuanjiang, P. (2004). Structural aspects of water-soluble galactomannans isolated from the seeds of *Retama raetam*. *Carbohydr. polymes.* **58** , 41-44.

- ✓ Jarvis, B.D.W., van Berkum, P., Chen, W.X., Nour, S., Fernandez, M.P., Cleyet Marrel, J.C., Gillis, M. (1997). Transfert of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 895-898.
- ✓ Journet, E.P. (2004). symbioses racinaires. Fiche 4, l'agriculture peut-elle utiliser moins d'engrais?
- ✓ Jing, Y.D., He Z.L., Yang, X.E. (2007). Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *J. Zhejiang University science B.* **8(3)**, 192-207.
- ✓ Jordan, D.C. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan to *Bradyrhizobium* gen. nov, a genus of slow growing root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**, 136-139.
- ✓ Jordan, D.C. (1984). *Rhizobiaceae*. In : Bergey's Manual of systematic Bacteriology. (Krieg N. R. and Holt J. G. 1Ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. pp. 234-242.
- ✓ Kamaludeen, S.P.B., and Ramasamy, K. (2008). Rhizoremediation of metals: harnessing microbial communities. *Ind. Journ. of Bacteriol.* **48**, 80-88.
- ✓ Kedjar , F. (2001). Caractérisation phénotypique et analyse des protéines en SDS/PAGE de souches de *Rhizobium meliloti* isolées de la région de Bejaia. Thèse de Magister. Université Abderahmane Mira. Béjaia. 82p.
- ✓ Khalil, A.M., Abdel-Lateif, M.H., Bayoumi, M., Straalen, M.V.N. (1996). Analysis of separate and combined effects of heavy metals on the growth of *Aporrectodea caliginosa* (Oligochaeta; Annelida), using the toxic unit approach. *App. Soil. Ecol.* **4**, 213-219.
- ✓ Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A. Oves, M. (2008). Role of plant growth promoting rhizobacteria in the Remediation of metal contaminated soils. In: Organic Farming, Pest control and remediation of soil pollutants. Sustainable Agriculture Reviews. Ed. E .Lichtfouse. pp.319-350.
- ✓ Kinkle, B.K., Angle, J.S., Keyser, H.H. (1987). Long-term effects of metal-rich sewage sludge application on soil population of *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**. pp. 315-319.
- ✓ Koomen, I., McGrath, S.P., Giller, K.E. (1990). Mycorrhizal infection of clover is delayed in soils contaminated with heavy metals from past sewage sludge applications. *Soil. Biolo. & Biochem.* **22**, 871-873.

- ✓ Kurlaze, G.V. (2007). Environmental Microbiology Research Trends. Nov. Scien. Publ. Inc. pp : 239-245.
- ✓ Kuykendall, L.D.B., Saxena, T.E., Devine, S.E.U. (1992). Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan (1982) and a proposal for *Bradyrhizobium obiumel kunii* sp. nov. Can. J. Microbiol. **38**. 501 -505.
- ✓ Lefevre, C., (2004). Caractérisation et phylogénie des bactéries symbiotiques intracellulaires des charançons de la famille des *Dryophthoridae*. Thèse de Doctorat d'Institut National Sciences Appliquées de Lyon. France.
- ✓ Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Prome, J.C., Denarie, J. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. Nature. **344**, 781-784.
- ✓ Lin, W., Okon. Y., Hardy. R.W.F. (1983). Enhanced mineral uptake by Zea mays and Sorghum bicolor roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. Appl. Environ. Microbiol. **45**, 1775-1779.
- ✓ Liu, T.X. (2008). Soil ecology research developments. Nov. Scien. Publ. Inc. pp : 139-145.
- ✓ Martin, S., Griswold, W., (2009). Human Health Effects of Heavy Metals. Environ. Scien. and Technol. Bri. for Citizen. **15**, 1-6.
- ✓ Masson, P., Gintzberger, G. (2000). Les légumineuses fourragères dans le système de production méditerranéenne : utilisation alternative. CIHEAM-IAMZ. Inst. Nat. de rech. Agro. Montpellier. **483**, 395-406
- ✓ Mirouze, M. (2005). Recherche de gène impliqué dans la tolérance au zinc chez l'espèce modèle hyperaccumulatrice de zinc *Arabidopsis halleri* : un nouveau rôle possible pour les défenses de plantes. Thèse de Doctorat. Université Montpellier II. 184P.
- ✓ Monchy, S. (2007). Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez *Cupriavidus metallidurans* CH₃₄. Thèse de Doctorat. Université libre de Bruxelles. 99p.
- ✓ Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., Boivin-Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the β -sb class of Proteobacteria. Nature N° 411 pp 948-950.
- ✓ Nies, D.H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. Appl. Microbial. Biotechnol. **51**, 730-750.
- ✓ N'zoué, A., Domergue, O., Moulin, L., Avarre, J.C. de Lajudie, P., (2006). Tropical Legume Nodulating Bacteria. Molecular Biology of Tropical Plants. pp 105-141.

- ✓ Obbard, J.P., Sauerbeck, D.R., Jones, K.C. (1994). The effect of heavy metal contaminated sewage sludge on the rhizobial soil population of an agricultural field trial. pp. 127-161. *In*: Donker, M.H., Eijsackers, H., Heimback, F. Ed, Ecotoxicology of soil organisms. Lewis Publishers, London, United Kingdom.
- ✓ O'hara, G.W., Howison, J.G., Graham, P.H. (2002). Nitrogen fixation and Agricultural Practice. G. Jeffrey Leigh, Editor. pp. 391-419.
- ✓ Oued el haj, D., Haj-mahmed, M., Zabeirou, H. (2003). Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara Septentrional Est) Université Mohammed Khider-Biskra, Algérie, courrier du savoir _ N°03.pp :47-51.
- ✓ Pajuelo, E., Dary, M., Palomares, A.J., Rodriguez Liorente, I.D., Carasco, J.A., Chamber, A. (2008). Biorhizoremediation of heavy metals toxicity using *rhizobium*-legume symbioses. *In*: biological Nitrogen Fixation : Towards Poverty Alleviation through Sustainable Agriculture. Ed. Sprin. Scien. and Bus. Med. B.V. pp. 101-104
- ✓ Patriarca, E.J., Taté, R., Ferraili, S., Iaccarino, M. (2004). Organogenesis of legume root nodules. *Int. Rev. Cyto.* **234**, 201-262.
- ✓ Pedrosa, F.O. (1988). Physiology biochemistry and genetics of *Azospirillum* and other root associated nitrogen-fixing bacteria. *C.R.P.Sci.* **6**, 345-348.
- ✓ Pereira, S.I.A., Lima, A.I.G., Figueira, E.M. (2006). Heavy metal toxicity in *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* isolated from soils subjected to different sources of heavy metal contamination: effect on protein expression. *Appl. Soil. Ecolo.* **33**, 286-293.
- ✓ Pishchik, V.N., Vorbyer, N.I., Chernyaeva, I.I., Timofeeva, S.V., Rozhemyakov, A.P., Alexeev, Y.V., Lukin, S.M. (2002). Experimental and mathematical stimulation of plant interaction under cadmium stress. *Plant. and soil.* **243**, 173-186.
- ✓ Pousset, J. (2003). Engrais verts et fertilité des sols. 2Ed Agridecisions, Paris.
- ✓ Prabha, K., Loretta, Y.L. (2007). Phytoremédiation Technology: Hyper-accumulation Metals in Plants. *Wat. Air. Soil. Pollut.* **184**, 105–126.
- ✓ Quezel, P., Santa, S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertique méridionales. Tome 1. Centre national de la recherche scientifique. Paris. pp, 15-475.
- ✓ Ramirez-Bahena, M.H., Garcia-Fraile, P., Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J.M., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E., Velazquez, E. (2008). Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum*, Frank, (1879) Frank (1889AL), *Rhizobium phaseoli*

- Dangeard (1926AL) and *Rhizobium trifolii* Dangeard (1926AL). *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132T (5NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 2484–2490.
- ✓ Ranjard, L., Poly, F., Nazaret, S. (2000). Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques. *appl. to soil. Environ. Res. Microbiol.* **151**, 167–177.
 - ✓ Raven, P.H., Evert R.F., Eichlorn S.E. (2000). *Biologie végétale*. 6 Ed de beock. Paris.
 - ✓ Reddy, G.B., Cheng, C.N., Dunn, S.J. (1983). Survival of *Rhizobium japonicum* in sludge environment. *Soil. Biol. Biochem.* **15**, 343-345.
 - ✓ Rispaill, N., Kalo, P., Kiss, J.B., Noel Ellis, T.H., Gallardo, K., Thompson, R.D., Prats, E., Larrainainzar, E., Ladrera, R., Gonzalez, E.M., Arese-Igor, C., Ferguson, B.J., Gresshoff, P. M., Rubiales, D. (2010). Model legumes contribute to faba bean breeding. *Fiel. Crop. Resea.* **115**, 253-269.
 - ✓ Roger, P., (1996). La fixation biologique de l'azote: quelles potentialités pour le développement ? Conférence débats de l'ORSTOM. Paris Xe France.
 - ✓ Rouch, D.A., Lee, B., Morby, A.P. (1995). Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. *J. Ind. Microbiol.* **14**,132-141.
 - ✓ Rufus, L.C., Minnie, M., Yin, M.L., Sally, L.B., Eric, P.B., Scott-Angle, J., Alan, J.M.B. (1997). Phytoremediation of soil metals. *Cur. Opin. in Biotechnol.* **8**, 279-284.
 - ✓ Sadowsky, M.J. (2000). Bioremediation of metal contaminated soils. *In: Nitrogen fixation: form molecules to crop productivity*. Ed. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp. 577-578.
 - ✓ Saoudi, M. (2008). Les bactéries nodulant les légumineuses (B.N.L.P) : caractérisation des bactéries associées aux nodules de la légumineuse *Astragalusarmatus*. Thèse de Génétique et Amélioration des Plantes. Université Mentouri, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Canstantine. 99p.
 - ✓ Schultze, M., Kondorosi, A., (1998). Regulation of symbiotic root nodule development. *Ann. Rev. Genet.* **32**, 33-57.
 - ✓ Silver, S., Phung, T. (1996). Bacterial Heavy Metal Resistance: New surprises. *Ann. Rev. Microbiol.* **50**, 753-89.

- ✓ Singh, N.K., Rai, U.N., Tewari, A.M. (2010). Metal Accumulation and Growth Response in *Vigna radiata* L. Inoculated with chromate Tolerant Rhizobacteria and Grown on Tannery Sludge Amended soil. Bull. Environ. Contam. Toxicol. **84**, 118-414.
- ✓ Smejkalova, M., Mikanova, O., Boruvka, L. (2003). Effects of heavy metal concentrations on biological activity of soil micro-organisms. Plan. Soil and Environ. **49**, 321–326.
- ✓ Soussou, S. (2013). Adaptation de la symbiose Fabacées-rhizobium aux sites miniers : Absorption du zinc par *Anthyllis vulneraria* et analyse de la diversité des bactéries symbiotiques d'*Hedysarum coronarium*, Thèse de Dectorat ; Sousse, Tunis. 190p.
- ✓ Stan, V., Gament, E., Cornea, C.P., Voaides, C., Dusa, M. (2011). Effects of heavy metal from polluted soils on the *Rhizobium* diversity. Notul. Botan. Horti. Agrobot. Cluj-Napoca. **39**, 88-95.
- ✓ Steenhoudt, O., Vanderleyden, J. (2000). *Azospirillum*, a free living nitrogen- fixing bacterium closely associated with grasses: genetic. bioch. and ecol. Aspec.. FEMS Microbiol. Rev. **24** (4), 487-506.
- ✓ Stowers, M.D. (1985). Carbon metabolism in *Rhizobium* species. Ann. Rev. Microbiol. **39**, 89-108.
- ✓ Tiller, K., Merry, R., Mc Laughlin, M. (1994). Cadmium: a modern day problem. Rural Resear. **162**, 32-35.
- ✓ Tong, Z., Sadowsky, M.J. (1994). A selective medium for the isolation and quantification of *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii* strains from soils and inoculants. Appl. Environ. Microbiol. **60**, 581-586.
- ✓ Untereiener, G. (2008). Etude de l'impact de bactéries environnementales sur la spéciation de l'Uranium en vue de processus de bioremediation. Thèse de Doctorat de Microbiologie. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech). 296p.
- ✓ Valverde, A., Velazquez, E., Gutierrez, C., Cervantes, E., Ventosa, A., and Igual, J.M., (2003) - *Herbaspirillum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris* Int. J.Syst. Evol.Microbiol. **53**, 1979-1983.
- ✓ Vinuesa, P., Leon-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo, A., Perez- Galdona, R., Werner, D., Martinez-Romero, E. (2005). *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteeae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*,

- Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **55**, 569-575.
- ✓ Wang, Q.R., Cui, Y.S., Liu, X.M., Dong, Y.T., Christie, P. (2003). Soil contamination and plant uptake of heavy metals at polluted sites in China. J. Environ. Scien. Health Part A Toxic/ Hazard. Subst. Environ. Eng. **38**, 823-838.
 - ✓ Wery, J. (1985). Relation entre la nutrition azote et la production chez les légumineuses. In: nutrition azotée des légumineuses. Ed. INRA, Paris. 213p.
 - ✓ Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martinez-Romero, E., Kerr, A., Sawada, H. (2003). Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium* - a reply to Farrand et al. (2003). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **53**, 1689-1695
 - ✓ Younis, M., (2007). Response of Lablab *perpureus*-*Rhizobium* symbiosis to heavy metals in pot and field experiments. J. Agro. Scien. **3**, 111-122.
 - ✓ Zahran, M. A., Willis, A.J. (2009). The vegetation of Egypt. Springer Science + Business Media. Ed 2. pp. 3-221.
 - ✓ Zhang, Z.Q., Wong, M.H., Nie, X.P., Lan, C.Y. (1998). Effects of zinc (zinc sulfate) on Rhizobia-earleaf acacia (*Acacia auriculaeformis*) symbiot. Associate. Bio.Technol **64**, 97-104.
 - ✓ Zurdo-Pineiro, Jose, L., Rivas, Raul, Trujillo, Martha, E., Vizcaino, Nieves, Carrasco, Jose Antonio, Chamber, Manuel, Palomares, Antonio, Mateos, Pedro, F., Martinez-Molina, Eustoquio, Velazquez, Encarna. (2007). *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **57**, 784-788.

Annexes

Annexe I : Composition des milieux de culture.

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

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

Ajuster le pH à 6,8

Stériliser à 120°C pendant 20min.

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

| | |
|--|--------|
| Mannitol..... | 10g |
| Extrait de levure..... | 0,35g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,5g |
| MgSO ₄ , 7H ₂ O..... | 0,2g |
| NaCl..... | 0,1g |
| H ₂ O..... | 1000ml |

Ajuster le pH à 6,8

Stériliser à 120°C pendant 20min.

Le milieu Jensen (Vincent, 1970)

| | |
|--|--------|
| CaHPO ₄ , 2H ₂ O..... | 1g |
| K ₂ HPO ₄ , 7H ₂ O..... | 0,2g |
| MgSO ₄ , 7H ₂ O..... | 0,2g |
| NaCl..... | 0,2g |
| Solution stock..... | 1ml |
| FeCl ₃ , 6H ₂ O..... | 0,1g |
| Agar..... | 5g/l |
| Eau distillée..... | 1000ml |

Le pH est ajusté à 7

Stérilisé à 120°C pendant 20min.

Annexe II : Tableau de lecture des galeries

| TESTS | COMPOSANTS ACTIFS | QTE (mg/cup.) | REACTIONS/ENZYMES | RESULTATS | |
|-----------------|--|------------------|---|---|------------------------------|
| | | | | NEGATIF | POSITIF |
| NO ₃ | potassium nitrate | 0,136 | réduction des Nitrates en nitrites | NIT 1 + NIT 2 / 5 min incoloré rose-rouge | |
| | | | réduction des Nitrates en azote | Zn / 5 min rose incolore | |
| TRP | L-tryptophane | 0,2 | formation d'indole (TRYPTOPHANE) | JAMES / immédiat incoloré vert pâle / jaune rose | |
| GLU | D-glucose | 1,92 | fermentation (GLUCOSE) | bleu à vert | jaune |
| ADH | L-arginine | 1,92 | Arginine DiHydrolase | jaune | orange / rose / rouge |
| URE | urée | 0,76 | UREase | jaune | orange / rose / rouge |
| ESC | esculine citrate de fer | 0,55 0,072 | hydrolyse (β-glucosidase) (ESCUline) | jaune | gris / marron / noir |
| GEL | gélatine (origine bovine) | 0,6 | hydrolyse (protéase) (GELatine) | pas de diffusion du pigment | diffusion du pigment noir |
| PNPG | 4-nitrophényl-βD- galactopyranoside | 0,22 | β-galactosidase (Para-NitroPhényl-βD- Galactopyranosidase) | incoloré | jaune |
| [GLU] | D-glucose | 1,56 | assimilation (GLUCOSE) | transparence | trouble |
| [ARA] | L-arabinose | 1,4 | assimilation (ARABINOSE) | transparence | trouble |
| [MNE] | D-mannose | 1,4 | assimilation (MANNOSE) | transparence | trouble |
| [MAN] | D-mannitol | 1,36 | assimilation (MANNITOL) | transparence | trouble |
| [NAG] | N-acétyl-glucosamine | 1,28 | assimilation (N-ACÉTYL-GLUCOSAMINE) | transparence | trouble |
| [MAL] | D-maltose | 1,4 | assimilation (MALTOSE) | transparence | trouble |
| [GNT] | potassium gluconate | 1,84 | assimilation (potassium GLUCONATE) | transparence | trouble |
| [CAP] | acide caprique | 0,78 | assimilation (acide CAPRIQUE) | transparence | trouble |
| [ADI] | acide adipique | 1,12 | assimilation (acide ADIPIQUE) | transparence | trouble |
| [MLT] | acide malique | 1,56 | assimilation (MALIQUE) | transparence | trouble |
| [CIT] | trisodium citrate | 2,28 | assimilation (trisodium CITRATE) | transparence | trouble |
| [PAC] | acide phénylacétique | 0,8 | assimilation (acide PHÉNYLACÉTIQUE) | transparence | trouble |
| OX | (voir notice du test oxydase) | - | cytochrome-oxydase | (voir notice du test oxydase) | |

Annexe III : Méthode de calcul de la solution mère (exemple de zinc)

$$MM \text{ ZnSO}_4 = 65,4 + 32,1 + 64 = 161,5 \text{ g/mol}$$

$$MM \text{ Zn} = 65,4 \text{ g/mol}$$

$$\begin{array}{l} 161,5 \text{ g/mol} \longrightarrow 100 \% \\ 65,4 \text{ g/mol} \longrightarrow X \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} 161,5 \text{ g/mol} \\ 65,4 \text{ g/mol} \end{array}} \right\} X = 40,495 \%$$

Préparation de la solution initiale :

$$\begin{array}{l} C = 100 \text{ mg/ml} \\ 1 \text{ g ZnSO}_4 \longrightarrow 0,404 \text{ g Zn} \\ X \longleftarrow 0,1 \text{ g} \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} 1 \text{ g ZnSO}_4 \\ X \end{array}} \right\} X = 0,247 \text{ g}$$

Pour 10 ml on mesure 2,47 g

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \quad \Longrightarrow \quad C_2 = \frac{25 \times 10^{-6} \times 100}{100 \times 10^{-3}}$$

$$C_2 = 0,025 \text{ ml}$$

$$C_2 = 25 \mu\text{l}$$

Annexe IV : Préparation des concentrations en sels de métaux lourds pour les tests faits sur le milieu YMA

Sulfate de zinc ($\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$) : 100mg/ml

| | | | | | | |
|----------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $[\text{Zn}^{2+}]$ | 25 | 50 | 100 | 200 | 400 | 800 |
| VSM (ml) | 0,025 | 0,05 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,8 |
| VM _A (ml) | 99,975 | 99,95 | 99,90 | 99,80 | 99,60 | 99,20 |

VSM : Volume de la solution mère VM_A : Volume en milieu YMA

Sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$) : 50mg/ml

| | | | | | | |
|----------------------|--------|-------|------|------|------|------|
| $[\text{Cu}^{2+}]$ | 12,5 | 25 | 50 | 100 | 200 | 400 |
| VSM (ml) | 0,025 | 0,05 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,8 |
| VM _A (ml) | 99,975 | 99,95 | 99,9 | 99,8 | 99,6 | 99,2 |

Chlorure de mercure (HgCl) : 5mg/ml

| | | | | | | |
|----------------------|-------|------|-----|------|-----|------|
| $[\text{Hg}^{2+}]$ | 50 | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 |
| VSM (ml) | 0,25 | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | 2,5 |
| VM _A (ml) | 99,75 | 99,5 | 99 | 98,5 | 98 | 97,5 |

Sulfate de cadmium ($3\text{CdSO}_4, \text{H}_2\text{O}$) : 10mg/ml

| | | | | | | |
|----------------------|--------|--------|-------|------|-----|-----|
| $[\text{Cd}^{2+}]$ | 6,25 | 12,5 | 25 | 50 | 100 | 200 |
| VSM (ml) | 0,0625 | 0,125 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 |
| VM _A (ml) | 99,937 | 99,875 | 99,75 | 99,5 | 99 | 98 |

Acétate de plomb (Pb (OOCCH₃)₂, 3H₂O) : 30mg/ml

| | | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| [Pb²⁺] | 25 | 50 | 100 | 200 | 400 | 800 |
| VSM (ml) | 0,083 | 0,166 | 0,333 | 0,666 | 1,333 | 2,666 |
| VM_A (ml) | 99,917 | 99,833 | 99,667 | 99,334 | 98,667 | 97,334 |

Chromate de potassium (CrK₂O₄) : 200mg/ml

| | | | | | | |
|----------------------------|--------|-------|------|------|------|------|
| [Cr²⁺] | 50 | 100 | 200 | 400 | 800 | 1600 |
| VSM (ml) | 0,025 | 0,05 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,8 |
| VM_A (ml) | 99,975 | 99,95 | 99,9 | 99,8 | 99,6 | 99,2 |

Annexe V: Préparation des concentrations en sels de métaux lourds pour les tests faits sur le milieu YMB

Sulfate de zinc ($\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$) : 100mg/ml

| | | | | | | |
|----------------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $[\text{Zn}^{2+}]$ | 25 | 50 | 100 | 200 | 400 | 800 |
| VSM (ml) | 0,05 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 |
| VM _B (ml) | 199,975 | 199,9 | 199,8 | 199,6 | 199,2 | 198,4 |

VSM : Volume de la solution mère VM_B : Volume en milieu YMB

Sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$) : 50mg/ml

| | | | | | | |
|----------------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $[\text{Cu}^{2+}]$ | 12,5 | 25 | 50 | 100 | 200 | 400 |
| VSM (ml) | 0,05 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 |
| VM _B (ml) | 199,975 | 199,9 | 199,8 | 199,6 | 199,2 | 198,4 |

Chlorure de mercure (HgCl) : 5mg/ml

| | | | | | | |
|----------------------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|
| $[\text{Hg}^{2+}]$ | 50 | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 |
| VSM (ml) | 0,5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 15 |
| VM _A (ml) | 199,5 | 199 | 198 | 197 | 196 | 195 |

Sulfate de cadmium ($3\text{CdSO}_4, \text{H}_2\text{O}$) : 10mg/ml

| | | | | | | |
|----------------------|--------|--------|-------|-----|-----|-----|
| $[\text{Cd}^{2+}]$ | 6,25 | 12,5 | 25 | 50 | 100 | 200 |
| VSM (ml) | 0,125 | 0,250 | 0,500 | 1 | 2 | 4 |
| VM _A (ml) | 199,87 | 199,75 | 199,5 | 199 | 198 | 196 |

Acétate de plomb (Pb (OOCCH₃)₂, 3H₂O) : 30mg/ml

| | | | | | | |
|----------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| [Pb²⁺] | 25 | 50 | 100 | 200 | 400 | 800 |
| VSM (ml) | 0,166 | 0,333 | 0,666 | 1,333 | 2,666 | 5,333 |
| VM_A (ml) | 199,834 | 199,667 | 199,334 | 198,667 | 197,334 | 194,667 |

Chromate de potassium (CrK₂O₄) : 200mg/ml

| | | | | | | |
|----------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| [Cr²⁺] | 50 | 100 | 200 | 400 | 800 | 1600 |
| VSM (ml) | 0,5 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 |
| VM_A (ml) | 199,95 | 199,9 | 199,8 | 199,6 | 199,2 | 198,4 |

Annexe VI : Les moyennes des différentes DO obtenues aux différents métaux lourds**Sulfate de zinc ($\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$) : 100mg/ml**

| Souches Métaux lourds µg/ml | S₂₈ | S₄₂ | S₄₆ | S₇₁ | S₈₉ | S₁₅₁ | S₁₅₄ | S₁₅₈ | S_{B.C} | S_{B.J} | S_{B.E} | S_{B.P} |
|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 25 | 0,093 | 0,228 | 0,202 | 0,546 | 0,436 | 0,096 | 0,391 | 0,235 | 0,200 | 0,354 | 0,244 | 0,361 |
| 50 | 0,082 | 0,158 | 0,145 | 0,538 | 0,313 | 0,087 | 0,249 | 0,214 | 0,153 | 0,332 | 0,180 | 0,198 |
| 100 | 0,061 | 0,088 | 0,135 | 0,104 | 0,078 | 0,074 | 0,087 | 0,118 | 0,078 | 0,205 | 0,105 | 0,118 |
| 200 | 0,05 | 0,058 | 0,091 | 0,097 | 0,043 | 0,054 | 0,047 | 0,102 | 0,042 | 0,145 | 0,069 | 0,027 |
| 400 | 0,035 | 0,048 | 0,066 | 0,060 | 0,035 | 0,023 | 0,027 | 0,086 | 0,035 | 0,062 | 0,037 | 0,020 |
| 800 | 0,021 | 0,029 | 0,017 | 0,022 | 0,024 | 0,013 | 0,020 | 0,042 | 0,029 | 0,036 | 0,030 | 0,018 |

Sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$) : 50mg/ml

| Souches Métaux lourds µg/ml | S₂₈ | S₄₂ | S₄₆ | S₇₁ | S₈₉ | S₁₅₁ | S₁₅₄ | S₁₅₈ | S_{B.C} | S_{B.J} | S_{B.E} | S_{B.P} |
|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 12,5 | 0,432 | 0,600 | 0,394 | 0,304 | 0,461 | 0,305 | 0,483 | 0,384 | 0,493 | 0,468 | 0,538 | 0,410 |
| 25 | 0,273 | 0,358 | 0,354 | 0,177 | 0,277 | 0,221 | 0,368 | 0,310 | 0,428 | 0,395 | 0,410 | 0,181 |
| 50 | 0,225 | 0,325 | 0,320 | 0,157 | 0,200 | 0,151 | 0,212 | 0,294 | 0,384 | 0,338 | 0,363 | 0,161 |
| 100 | 0,191 | 0,315 | 0,265 | 0,150 | 0,106 | 0,149 | 0,176 | 0,091 | 0,340 | 0,183 | 0,282 | 0,145 |
| 200 | 0,180 | 0,255 | 0,235 | 0,139 | 0,090 | 0,127 | 0,154 | 0,081 | 0,200 | 0,142 | 0,240 | 0,140 |
| 400 | 0,157 | 0,240 | 0,190 | 0,077 | 0,081 | 0,046 | 0,135 | 0,050 | 0,136 | 0,112 | 0,200 | 0,054 |

Chlorure de mercure (HgCl) : 5mg/ml

| Souches Métaux lourds µg/ml | S₂₈ | S₄₂ | S₄₆ | S₇₁ | S₈₉ | S₁₅₁ | S₁₅₄ | S₁₅₈ | S_{B.C} | S_{B.J} | S_{B.E} | S_{B.P} |
|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 50 | 0,249 | 0,442 | 0,206 | 0,249 | 0,426 | 0,308 | 0,177 | 0,338 | 0,328 | 0,312 | 0,210 | 0,243 |
| 100 | 0,149 | 0,283 | 0,189 | 0,181 | 0,158 | 0,299 | 0,163 | 0,184 | 0,160 | 0,188 | 0,086 | 0,209 |
| 200 | 0,120 | 0,103 | 0,111 | 0,125 | 0,127 | 0,254 | 0,070 | 0,129 | 0,156 | 0,070 | 0,064 | 0,155 |
| 300 | 0,094 | 0,089 | 0,063 | 0,071 | 0,052 | 0,094 | 0,050 | 0,026 | 0,048 | 0,049 | 0,062 | 0,097 |
| 400 | 0,054 | 0,063 | 0,028 | 0,016 | 0,041 | 0,070 | 0,028 | 0,019 | 0,046 | 0,032 | 0,027 | 0,018 |
| 500 | 0,031 | 0,055 | 0,014 | 0,013 | 0,023 | 0,037 | 0,027 | 0,010 | 0,035 | 0,020 | 0,008 | 0,010 |

Sulfate de cadmium (3CdSO₄, H₂O) : 10mg/ml

| Souches Métaux lourds µg/ml | S₂₈ | S₄₂ | S₄₆ | S₇₁ | S₈₉ | S₁₅₁ | S₁₅₄ | S₁₅₈ | S_{B.C} | S_{B.J} | S_{B.E} | S_{B.P} |
|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 25 | 0,279 | 0,324 | 0,209 | 0,200 | 0,221 | 0,251 | 0,553 | 0,484 | 0,273 | 0,388 | 0,350 | 0,249 |
| 50 | 0,260 | 0,269 | 0,152 | 0,182 | 0,184 | 0,122 | 0,281 | 0,415 | 0,259 | 0,279 | 0,239 | 0,219 |
| 100 | 0,086 | 0,198 | 0,134 | 0,065 | 0,140 | 0,092 | 0,078 | 0,078 | 0,028 | 0,091 | 0,076 | 0,110 |
| 200 | 0,056 | 0,094 | 0,048 | 0,053 | 0,082 | 0,034 | 0,077 | 0,019 | 0,022 | 0,073 | 0,060 | 0,090 |
| 400 | 0,038 | 0,084 | 0,012 | 0,040 | 0,038 | 0,021 | 0,029 | 0,016 | 0,021 | 0,057 | 0,016 | 0,078 |
| 800 | 0,021 | 0,026 | 0,001 | 0,034 | 0,027 | 0,012 | 0,019 | 0,009 | 0,015 | 0,029 | 0,010 | 0,029 |

Acétate de plomb (Pb (OOCCH₃)₂, 3H₂O) : 30mg/ml

| Souches Métaux lourds µg/ml | S₂₈ | S₄₂ | S₄₆ | S₇₁ | S₈₉ | S₁₅₁ | S₁₅₄ | S₁₅₈ | S_{B.C} | S_{B.J} | S_{B.E} | S_{B.P} |
|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 25 | 0,197 | 0,762 | 0,578 | 0,194 | 0,313 | 0,215 | 0,520 | 0,413 | 0,490 | 0,531 | 0,676 | 0,189 |
| 50 | 0,143 | 0,556 | 0,458 | 0,114 | 0,251 | 0,113 | 0,473 | 0,376 | 0,483 | 0,466 | 0,622 | 0,136 |
| 100 | 0,057 | 0,083 | 0,069 | 0,100 | 0,134 | 0,063 | 0,066 | 0,076 | 0,047 | 0,062 | 0,098 | 0,060 |
| 200 | 0,033 | 0,062 | 0,052 | 0,038 | 0,051 | 0,039 | 0,053 | 0,047 | 0,034 | 0,057 | 0,045 | 0,039 |
| 400 | 0,028 | 0,017 | 0,035 | 0,032 | 0,016 | 0,032 | 0,031 | 0,037 | 0,029 | 0,015 | 0,040 | 0,039 |
| 800 | 0,012 | 0,012 | 0,017 | 0,015 | 0,004 | 0,027 | 0,029 | 0,009 | 0,024 | 0,011 | 0,015 | 0,019 |

Chromate de potassium (CrK₂O₄) : 200mg/ml

| Souches Métaux lourds µg/ml | S₂₈ | S₄₂ | S₄₆ | S₇₁ | S₈₉ | S₁₅₁ | S₁₅₄ | S₁₅₈ | S_{B.C} | S_{B.J} | S_{B.E} | S_{B.P} |
|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 50 | 0,141 | 0,122 | 0,164 | 0,161 | 0,244 | 0,280 | 0,239 | 0,173 | 0,253 | 0,312 | 0,177 | 0,364 |
| 100 | 0,114 | 0,093 | 0,121 | 0,135 | 0,175 | 0,194 | 0,232 | 0,112 | 0,182 | 0,223 | 0,109 | 0,258 |
| 200 | 0,113 | 0,065 | 0,079 | 0,112 | 0,047 | 0,179 | 0,088 | 0,103 | 0,096 | 0,075 | 0,041 | 0,220 |
| 400 | 0,092 | 0,056 | 0,035 | 0,109 | 0,040 | 0,130 | 0,075 | 0,073 | 0,080 | 0,070 | 0,035 | 0,190 |
| 800 | 0,050 | 0,051 | 0,026 | 0,090 | 0,031 | 0,120 | 0,046 | 0,069 | 0,065 | 0,043 | 0,029 | 0,147 |
| 1600 | 0,031 | 0,010 | 0,011 | 0,032 | 0,020 | 0,110 | 0,030 | 0,035 | 0,029 | 0,034 | 0,015 | 0,127 |

Résumé :

Ce travail a été réalisé dans le but de déterminer l'impact des métaux lourds sur huit souches de rhizobia et quatre souches de références isolées à partir des nodules racinaires de quelques légumineuses, et d'évaluer leurs taux de résistance, cette étude est réalisée après une caractérisation phénotypique.

L'ensemble des souches ne présentent sont sensibles au Cuivre, une faible résistance est notée vis à vis du Cadmium est qui est de l'ordre de 8,33%. Une résistance considérable est trouvée *vis-à-vis* du chrome (66,66%), et du plomb (91,66%). Tandis que toutes les souches sont résistantes au zinc et au mercure (100%).

Le test de résistance et de sensibilité aux métaux lourds réalisé sur milieu liquide a confirmé les résultats trouvés auparavant, et a montré que la plupart des souches se développent en présence de faibles concentrations et qu'elles ont une croissance proportionnellement inverse à l'augmentation des concentrations en métaux lourds,

Mots clés : Rhizobia, légumineuse, métaux lourds, impact, résistance.

Abstract:

This work was carried out in order to determine the impact that can have the heavy metals on 8 strains of rhizobium isolated from root nodules and 4 reference stains, and to evaluate their resistance levels, after a phenotypic characterization.

All strains show sensibility to copper, low resistance to cadmium (8.33%), considerable resistance to chromium (66.66%) and lead (91.66%). However, all strains were resistant to zinc and mercury (100%).

The resistance test made on YMB confirmed the results found previously on YMB, and shows that the most parts of strains grows in the low concentrations of heavy metals, and has a growth proportionally inverse to the increase in heavy metals concentrations.

Keywords: Rhizobia, legume, heavy metals, impact, resistance.