



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Amar Telidji- Laghouat

FACULTE : SCIENCES

DEPARTEMENT : SCIENCES AGRONOMIQUES

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par Hadour Nassima

DOMAINE SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE (SNV)

FILIERE DE SCIENCES D'AGRONOMIQUES

OPTION DE PROTECTION DES VEGETAUX ET L'ENVIRONNEMENT

Thème

Contribution à l'étude de l'effet bénéfique des *Pseudomonasspp.* fluorescents sur la croissance végétale du blé et la bioremédiation de sol pollué par un métal lourd : le plomb

Jury de soutenance :

TAOUATI SIHAM
GASSEM
AMEUR DJAMILA

M AA
M AA
M AA

Président
Examineur
Rapporteuse

Promotion : Juin - 2016

Dédicace

Je dédie mon travail à

Mon père et ma mère

Mes sœurs

A toute ma famille

Mes profs toute ma promotion

Et mes camarades

Nassima

Remerciement

Avant toute chose, je remercie mon dieu

De me donné la force

Et le courage d'aboutir à ce travail.

Je remercie mon encadreur

<< Melle : Ameur djamila >>.

Non seulement pour avoir accepté de diriger travail, mais aussi pour son enthousiasme commutatif, sa compétence et sur tout sa disponibilité

Je remercie tous les membres de jury d'avoir acceptée présider et d'examiner notre travail

Je remercie tous les enseignants du département d'agronomie.

Merci pour tous

Hadour nassima

Contribution à l'étude de l'effet bénéfique des *Pseudomonas* spp. fluorescents sur la croissance végétale du blé et la bioremédiation de sol pollué par un métal lourd : le plomb

Résumé :

Les activités humaines sont à l'origine de nombreuses pollutions par des métaux lourds au niveau des écosystèmes et plus particulièrement au niveau des sols. Au cours de ce travail, nous avons effectué la technique de la bioremédiation des sols contaminés ont été effectués à partir des bactéries *Pseudomonas fluorescens*.

Nous avons réalisé un test pour sélectionner des isolats les plus tolérantes aux Plomb, La Concentration minimale inhibitrice (CMI) pour les isolats testées tolèrent des dose élevées de plomb, Les résultats montrent que les isolats **P09** est la plus résistante avec une concentration de **280mg/l** suivi par les isolats **P08** avec une concentration de **140mg/l**. selon ce test, nous avons choisi deux isolats il s'agit des isolats **P08** et **P09**, afin d'étudier leur effet sur la bioremédiation de sol et la biostimulation de la croissance des plants de blé cultivés dans un sol contenant du plomb à une dose de 340mg/kg.

Les résultats du test de viabilité montrent que la concentration des populations bactériennes varie entre 10^5 - 10^8 CFU/ml.

nous n'avons pas remarqué d'effet significatif pour la biostimulation la croissance du blé *in vivo*, et pour les résultats obtenus pour les paramètres de croissance ainsi que les paramètres physiologiques (la teneur en proline et en chlorophylle)

Mots clés : Proline, chlorophylle, *Pseudomonas flueorescens*Spp, Biorémediation.

Hadour nassima

Contribution to the study of the beneficial effect of *Pseudomonas* spp. Fluorescent on plant growth of wheat and soil bioremediation contaminated by a heavy metal: the plamb

Abstract :

Human activities are causing many pollution by heavy metals in ecosystems and in particular in soils. In this work, we performed the technique of bioremediation of contaminated soil have been made from the bacteria *Pseudomonas fluorescens*.

We conducted a test to select the most tolerant Lead strains The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for toléent tested isolates high dose of lead, The results show that the P09 isolates is the strongest with a concentration of 280mg / followed by the P08 isolates with a concentration of 140mg / l. according to this test, we chose two isolates these are the P08 and P09 isolates to study their effect on soil bioremediation and bio-stimulation of the growth of wheat plants grown in soil containing lead at a dose of 340mg / kg.

The results of the viability test show that the concentration of bacterial populations varies between 105-108 CFU / ml.

We have not noticed any significant effect for biostimulation growth in vivo wheat, and for the results obtained for the growth parameters and physiological parameters (the content of proline and chlorophyll).

Keywords: Proline, Chlorophyll, *Pseudomonas fluorescens*, bioremediation.

Key words: Proline, chlorophyll, fluorescent *Pseudomonas* spp, bioremediation.

هدور نسيمه

المساهمة في دراسة التأثير المتبادل من انواع البسودوموناس المشعة على نمو نبات القمح و المعالجة البيولوجية
للتربة الملوثة بالمعادن الثقيلة : الرصاص

الأنشطة البشرية التي تسبب تلوث العديد من المعادن الثقيلة في النظم الايكولوجية و على وجه الخصوص في التربة .
بهدف أن تتحلل الملوثات و تصبح اقل سمية و حتى غير مؤذية. تقنيات المعالجة الحيوية أخذة في الظهور و بدائل حقيقية
للتقنيات التقليدية التي تتطلب فهما أفضل للمجتمعات الميكروبية.
في هذا العمل قمنا بإجراء اختبار من اجل تحديد العزلات الأكثر مقاومة للرصاص, الحد الأدنى للتركيز المثبط من اجل
العزلات المختبرة وجدنا أنها تحتل تركيز مرتفع, من النتائج المتحصل عليها العزلة **P09** هي الأكثر مقاومة تصل
إلى تركيز **280mg/l** تليها العزلة **P08** بتركيز **140mg/l** . حسب هذا الاختبار قمنا باختيار عزلتين هما **P08 P09**
من اجل دراسة تأثير المعالجة الحيوية للتربة و التأثير على التحفيز الحيوي لنمو نبات القمح المزروع في تربة تحتوي
على الرصاص بتركيز **340مغ/ كغ**
النتائج المتحصل عليها تبين قدرة العزلات على البقاء في التربة وتصل قدرتها إلى تركيز يقارب 10^8 خلية/ ل. لكننا لم
نلاحظ أي تأثير كبير على التحفيز الحيوي لنمو القمح في الجسم الحي, و يتم الحصول على نفس النتائج عن محتوى البرولين
والكلوروفيل.

, كلمات البحث : الرصاص, البرولين, الكلوروفيل, المعالجة البيولوجية *Pseudomonas fluorescens* .

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau 01:	Comparaison des différentes méthodes de bioremédiation de sites contaminés	12
Tableau 02:	Teneurs des sols et des plantes en certains éléments. (En mg/kg de poids sec)	14
Tableau 03:	Origine des souches bactériennes	18
Tableau 04:	résultat du teste de la Concentration minimale inhibitrice (CMI)	28

Liste des figures

N ^o Figure	Titre	Page
Figure01 :	Les Cinq compartiments du sol. Chacun des traits symbolise une Possibilité d'interaction	03
Figure02 :	Origine des métaux lourds dans le sol	15
Figure03 :	Sélection des souches la plus tolérant de Plomb	20
Figure04 :	Dispositif expérimentale de l'essai de phytostimulation de la croissance végétale.	22
Figure05 :	Détermination de la teneur en chlorophylle	25
Figure06 :	Détermination de la teneur en proline	26
Figure07:	Extraction et dosage de plomb dans les végétaux.	27
Figure08 :	La Concentration minimale inhibitrice (CMI) chez la Bactérie (P09)	29
Figure09 :	Pigments jaune vert fluorescents	30
Figure10 :	Effets de facteur substrat sur la longueur racinaire (cm)	31
Figure11 :	Effets de facteur bactérie sur la longueur racinaire (cm)	32
Figure12:	Effets de facteur substrat sur la hauteur de tige (cm)	33
Figure13 :	Effets de facteur bactérie sur hauteur de tige (cm)	33
Figure14 :	Effets de facteur substrat sur le poids frais de la racine (g)	34
Figure15 :	Effets de facteur bactérie sur poids frais la de racine (g)	35
Figure16 :	Effets de facteur substrat sur le poids frais de la tige (g)	35
Figure17 :	Effets de facteur bactérie sur le poids frais de la tige (g)	36
Figure18 :	Effets de facteur substrat sur le poids sec de la racine (g)	37
Figure29 :	Effets de facteur bactérie sur le poids sec de la racine (g)	37
Figure20 :	Effets de facteur substrat sur le poids sec de la tige (g)	38
Figure21 :	Effets de facteur bactérie sur le poids sec de la tige (g)	38
Figure22 :	Effets de facteur substrat sur le dosage de la chlorophylle mg/ l ⁻¹	39
Figure23 :	Effets de facteur bactérie sur le dosage de la chlorophylle mg/ l ⁻¹	40
Figure24 :	Effets de facteur substrat sur le teneur de la proline µg/g ⁻¹	41
Figure25 :	Effets de facteur bactérie sur le teneur de la proline µg/g ⁻¹	41
Figure26 :	des tubes représenté les deux phases obtenues pendant l'extraction	42

Liste des abréviations

µg:	Micro grame	Pb(NO3)2:	Nitrate de plomb.
ACC:	1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate.	Pb:	Plomb.
AMF:	Arbuscular Mycorrhizal Fungi (champignons mycorhiziens arbusculaires).	PGPR:	plant <i>growth promoting</i> <i>rhizobacteria</i> .
ANOVA:	analyse of variance.	ppm:	parties par million (équivalent à du mg/L).
C°:	Degré Celsius.	RSI:	Résistance systémique induite.
Chlo a:	Chlorophylle a.	Spp:	plusieurs espèces.
Chlo b:	Chlorophylle b.	t:	tonne.
Chlo(a+b)	Chlorophylle totale.	UFC /ml:	Unité Formant Colonie / ml.
Cm:	Centimètre.	Zn:	Zinc.
DAPG:	2,4-Diacetylphloroglucinol.		
DO:	Densité Optique.		
Fe3+ :	d'oxydes de fer.		
g.cm³ :	gramme. Centimètre cube.		
g :	gramme.		
h:	Heure.		
KB:	milieu B de King.		
Kg:	Kilogramme.		
Mg:	Milligramme.		
min:	Minute.		
ml :	millilitre.		
N°:	Numéro.		
N2:	Azote.		
nm:	nanomètre.		

Tables des matières

Dédicace.....	I
Remerciements	II
Résumé	III
Liste des tableaux.....	VI
Liste des figures.....	VII
Liste des abréviations.....	VIII
 Introduction.....	 1

CHAPITRE I : Donnes bibliographiques

1. Le sol, constituants inertes et êtres vivants.....	03
1.1. Le sol, centre de la vie.....	03
1.2. La rhizosphère.....	03
1.3. Les microorganismes de la rhizosphère.....	04
1.3.1. Les bactéries.....	04
1.3.2. Les champignons.....	04
2. Effets bénéfiques des rhizobactéries sur les plantes.....	05
2.1. Effets directs.....	05
2.1.1. Fixation d’azote.....	05
2.1.2. Solubilisation des phosphates.....	06
2.1.3. Production de sidérophores.....	06
2.1.4. Production des régulateurs de la croissance végétale.....	06
2.1.5. Production d’acide 1- Aminocyclopropane -1- carboxylique désaminase (ACC désaminase).....	07
2.2. Effets indirects.....	07
2.2.1. Compétition pour l’espace et les nutriments.....	07
2.2.2. Antibiose.....	08
2.2.3. Résistance systémique induite ou ISR (Induced Systemic Resistance).....	08
3. Bioremédiation.....	08
3.1. Illustration de quelques stratégies.....	09
3.1.1. L’atténuation naturelle.....	09

3.1.2. La biodégradation.....	09
3.1.3. La bio-immobilisation.....	09
3.1.4. La biolixiviation.....	10
3.1.5. La bioslurry.....	10
3.1.6. La biorestauration.....	10
3.1.7. La bioaugmentation.....	10
3.1.8. La biostimulation.....	11
4. Les Pseudomonas.....	13
5. Métaux lourds.....	13
5.1. Définition des « métaux lourds ».....	13
5.2. Origine de la contamination des sols par les métaux lourds.....	14
A. Origine naturelle.....	15
B. Origine anthropique.....	15
5.3. Pollution par les métaux lourds : le cas du plomb.....	16
5.4. Effets du plomb sur la plante.....	16
5.5. Dépollution des sols pollués par le plomb.....	17

Chapitre II : Matériel et méthodes

1. Les souches bactériennes.....	18
2. Sélection des souches la plus tolérant de Plomb.....	18
3. Essais de bioremédiation du sol et biostimulation de la croissance des plantes.....	21
3.1. Préparation du substrat.....	21
3.2. L'inoculum bactérien.....	21
3.3. Matériel végétale.....	
3.4. Dispositif expérimental.....	21
4. Teste de viabilité.....	23
5. Paramètre étudiés.....	23
5.1. Paramètre de croissance.....	24
5.1.1. Mensuration sur les racines.....	24
5.1.2. Mensuration sur les tiges.....	24
5.2. Paramètre physiologique.....	24
5.2.1. Extraction et dosage de La chlorophylle.....	24

5.2.2. Extraction et dosage de la proline.....	25
5.2.3. Extraction et dosage de plomb dans les végétaux par la spectroscopie d'absorption atomique.....	26
6. Analyse statistique.....	27

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Réactivation des souches	28
2. Résultat de sélection des souches la plus tolérant de Plomb.....	28
3. Test de viabilité.....	30
4. Essai de bioremédiation de la croissance végétale <i>in vivo</i>	31
5. Paramètre de croissance.....	31
5.1. Longueur racinaire.....	31
5.2. Hauteur de tige.....	32
5.3. Poids frais de la racine.....	34
5.4. Poids frais de la tige.....	35
5.6. Poids sec de la racine.....	36
5.7. Poids sec de la tige.....	38
6. Paramètre physiologique.....	39
6.1. Résultats du dosage de La chlorophylle.....	39
6.2. La teneur en proline des feuilles et des racines des plantes de blé.....	40
6.3. Résultats de l'extraction et dosage de plomb dans les végétaux.....	42
Discussion	43
Conclusion	45
Références bibliographiques	47
Annexe	58

Introduction

Introduction :

Les céréales constituent la première ressource alimentaire de l'humanité, et la principale source de protéines. Ils fournissent également une ressource privilégiée pour l'alimentation animale et de multiples applications industrielles. La presque totalité de la nutrition de la population mondiale est fournie par les aliments en grains dont 95% sont produits par les principales cultures céréalières (Bonjean et Picard, 1991).

En Algérie, la superficie réservée à la céréaliculture est de 3,3 millions d'hectares qui représentent 90% des terres cultivées. Si on se réfère aux chiffres de 1929, on constate que cette superficie n'a pas évolué. 40% de cette surface sont destinés à la production du blé dur. Ces rendements, restent très bas puisqu'ils ne tournent qu'autour de 10 à 15Qx/ha, malgré les efforts fournis pour répondre aux besoins alimentaires de la population qui est toujours croissante. Cette faible production est souvent expliquée par l'influence des mauvaises conditions pédoclimatiques associées, notamment à : la désertification, l'érosion, la pollution, les mauvaises pratiques agricoles et la salinisation des sols (Selmi, 2000).

La contamination métallique des sols, suite aux retombées atmosphériques locales (industrielles et urbaines) et à des apports divers (boues de stations d'épuration, composts, engrais...) anciens ou actuels, explique notamment dans les horizons de surface, les teneurs actuelles en éléments traces métalliques (ETM) tels que cadmium (Cd), cuivre (Cu), zinc (Zn) et plomb (Pb) (Goulding et Blake, 1998). Cependant, malgré un effet d'accumulation évident, le transfert de métaux vers la profondeur est également noté, le plus souvent déduit à partir de comparaisons des teneurs totales en métaux dans les différents horizons d'un sol (Droogers et Bouma, 1997). Parmi les éléments métalliques cités, certains sont des oligo-éléments comme le Zn et le Cu, mais deviennent toxiques à fortes concentrations (Van Oort et *al.*, 2002). D'autres comme le Pb ou le Cd sont toxiques dès l'état de trace. Leur accumulation et leur transfert constituent donc un risque pour la santé humaine via la contamination de la chaîne alimentaire, mais aussi pour le milieu naturel dans son ensemble (Blum et *al.*, 1997).

La nécessité de dépolluer les sites contaminés a conduit au développement de nouvelles technologies de l'environnement qui ont pour objectif de détruire les composés xénobiotiques plutôt que de les accumuler dans les décharges. La bioremédiation est une option qui offre la possibilité de détruire ou de rendre moins toxiques les polluants, en utilisant des activités biologiques naturelles. Les microorganismes sont utilisés depuis environ un siècle pour le traitement des eaux usées et des composts. Ce qui est nouveau c'est l'utilisation de ce procédé

microbiologique pour nettoyer les sols, les eaux souterraines, les estuaires etc. Les systèmes sont différents en raison de la nature du polluant et du milieu où se déroule la dégradation.

En effet, les travaux de l'équipe « Dépollution Biologique des Sols » de Colmar ont montré que l'addition de bactéries productrices de sidérophores, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Pseudomonas fluorescens*, augmentait l'extraction de chrome par des plants de maïs (Braud et al, 2009)

Notre objectif par cette étude à mettre en évidence les effets bénéfiques des *Pseudomonas fluorescens* sur la promotion de la croissance du blé dur (*Triticum durum*) et la bioremédiation du sol pollué par le plomb à une dose de 340mg/kg en:

- ✓ Déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI) de certaines souches de *Pseudomonas fluorescens* au plomb.
- ✓ Vérifiant la viabilité des souches de *Pseudomonas* dans un sol pollué par le plomb.
- ✓ Etudiant certains paramètres de croissance de blé.
- ✓ Etudiant certains paramètres physiologiques de blé tel que le dosage de la proline, et la chlorophylle.

Revue
Bibliographique

1. Le sol, constituants inertes et êtres vivants:

1.1. Le sol, centre de la vie :

Le sol est un milieu complexe au sein duquel de nombreux éléments s'influencent Mutuellement. Les réactions que l'on y observe sont de natures chimiques, physiques et biologiques. On peut grossièrement diviser le sol en cinq compartiments (figure.1). En plus des interactions entre ces différents compartiments, le sol dans son ensemble est également influencé et réagit avec l'extérieur, c'est à dire l'atmosphère. (Fuchs et Herisse, 1996).

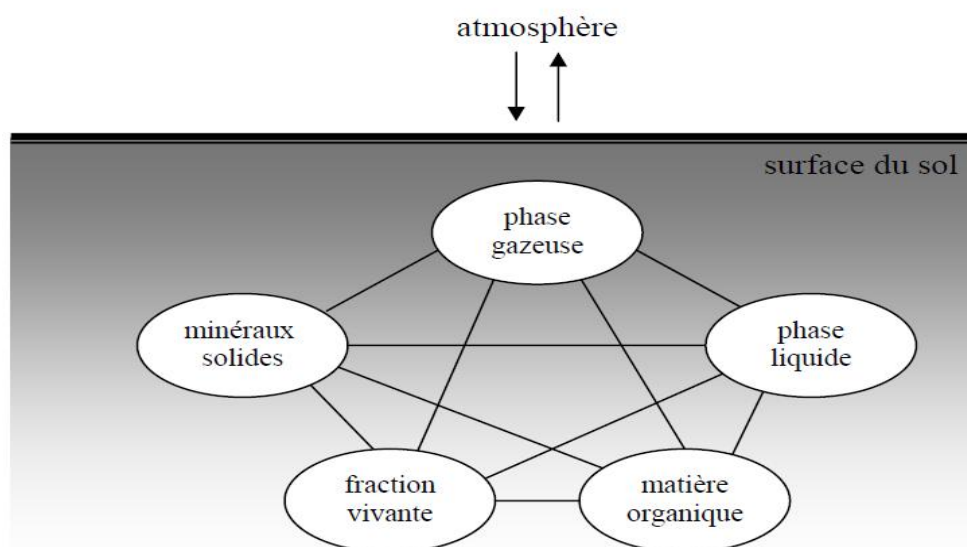


Figure01 : Les Cinq compartiments du sol. Chacun des traits symbolise une possibilité d'interaction (d'après Morel, 1989).

1.2. La rhizosphère :

La rhizosphère est un environnement créé par des interactions entre les exsudats racinaires et les microorganismes (Bell-Perkins et Lynch, 2002). Le terme "rhizosphère" tire son origine du grec "*rhizo*" ou "*rhiza*" signifiant "racine" et "sphère", le champ d'action ou d'influence. Hiltner (1904) a décrit la rhizosphère comme le lieu d'activités microbiennes autour des racines des légumineuses. Par la suite, cette définition a été étendue à toutes les plantes. Cette zone d'interaction s'étend de quelques micromètres à plus de 2 mm en dehors

de la surface racinaire (Kennedy et de Luna, 2004). De même, la densité des bactéries est plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol distant des racines, il s'agit de «l'effet rhizosphère» (Lemanceau, 1992 ; Whipps, 2001 ; Lugtenberg et Kamilova, 2009). Dans la rhizosphère *sensu stricto* il faut distinguer : l'endorhizosphère (intérieur de la racine), le rhizoplan (surface racinaire) et l'exorhizosphère ou le sol rhizosphérique (sol lié à la racine par opposition au sol distant) (Gray et Smith, 2005 ; Brimecombe *et al.*, 2007).

1.3. Les microorganismes de la rhizosphère :

Selon Faugier (2011), la rhizosphère est considéré est comme l'un des environnements les plus complexes des biosphères et a titre un réservoir majeur de la diversité microbienne. Les différentes familles de microorganismes trouvées dans les sols sont les bactéries, les champignons, les protozoaires, les algues et la microfaune. Les deux principaux groupes en quantité et en diversité sont les bactéries et les champignons au sens large. Les microorganismes sont localisés dans toute l'épaisseur du sol mais se rencontrent préférentiellement dans les sites où les conditions nutritionnelles et énergétiques sont satisfaisantes, c'est-à-dire dans les litières, les humus et les horizons superficiels des sols, et en particulier dans la rhizosphère (Djigal, 2003, Berthelin 1998 *In* Perrier 2004).

1.3.1. Les bactéries :

Dans la rhizosphère, les bactéries constituent les microorganismes le plus nombreux (leur densité est de l'ordre de 10^9 /g et de sol) et les plus variées. Elles sont fortement stimulées par l'effet rhizosphérique que les actinomycètes, les champignons, les algues et les protozoaires (Dommergues et Mangenot, 1970).

1.3.2. Les champignons :

Ubiquitaires dans les sols, les champignons sont des organismes chimio-hétérotrophes. De part leur forme filamenteuse et leur production fréquente d'exopolymères, ils possèdent un rôle important dans le maintien de la structure et de l'organisation des sols (Gadd, 2007). La majorité des grands groupes taxonomiques de champignons sont tous hébergés dans le sol. Elles présentent une grande diversité, des études récentes estiment le nombre d'espèces à 1,5 millions approximativement. Les champignons sont souvent dominants dans les sols naturels en termes de biomasse. Dans certains sols, leur biomasse qui constitue une portion importante

du pool de nutriment, peut-être plus importante que celle de tous les autres microorganismes, plantes et animaux réunis (Eyi Ndong, 2009).

2. Effets bénéfiques des rhizobactéries sur les plantes :

Certains microorganismes, principalement des bactéries telles *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia* (Gray et Smith, 2005) et *Streptomyces* spp. (Tokala *et al.*, 2002) sont capables de coloniser efficacement les systèmes racinaires. Elles influencent de manière bénéfique la plante en stimulant sa croissance (voie directe) et/ou en la protégeant contre des infections par des agents phytopathogènes (voie indirecte). Ces bactéries de la rhizosphère sont alors reprises sous le terme PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria).

2.1. Effets directs :

2.1.1. Fixation d'azote :

Parmi les éléments nutritifs nécessaires, celui qui est le plus souvent limitant pour la croissance des plantes est l'azote. La majeure partie de cet élément se trouve sous forme d'azote gazeux (N_2) inaccessible aux animaux et aux plantes (Pujic et Normand, 2009). La fixation biologique de l'azote relève uniquement du domaine des procaryotes grâce à la nitrogénase, une enzyme catalysant la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac (Weyens *et al.*, 2010). Quelques bactéries fixatrices d'azote sont libres dans la rhizosphère (e.g. *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Herba spirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* et *Xanthobacter*) (Tilak *et al.*, 2005). En revanche d'autres fixatrices d'azote sont symbiotiques et fixent l'azote seulement en association avec certaines plantes. Il s'agit des *Rhizobia* (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*) (Tilak *et al.*, 2005 ; Gray et Smith, 2005) associées aux légumineuses et des souches de *Frankia*, bactéries filamenteuses sporulantes associées à des plantes dites actinorhiziennes (Gray et Smith, 2005).

2.1.2. Solubilisation des phosphates :

Après l'azote, le phosphore est l'élément le plus limitant pour les plantes qui sont capables seulement d'absorber ses formes solubles mono- et dibasiques (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}) (Ramos Solano *et al.*, 2008 ; Keneni *et al.*, 2010. in Rabhi 2012). *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus* spp. *Bradyrhizobium* spp. *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas putida* et *Rhizobium* spp. sont des exemples de bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate inorganique en produisant de l'acide gluconique et l'acide 2- céto gluconique (Khan *et al.*, 2009, in Rabhi 2012).

Elles sont aussi capables de minéraliser le phosphate organique par l'excrétion des enzymes extracellulaires telles les phosphatases, les phytases et C-P lyases (Kim *et al.*, 1998, in Weyens *et al.*, 2010).

2.1.3. Production de sidérophores :

Le fer est un élément capital aussi bien pour les bactéries que les champignons et les plantes. Il est abondant dans le sol et se présente sous forme d'oxydes de fer (Fe^{3+}) (Compant *et al.*, 2005), mais il demeure souvent un facteur limitant pour la croissance des bactéries et des plantes. La plupart des microorganismes ont donc développé un mécanisme hautement spécifique afin de l'assimiler via la production de sidérophores. Ce sont des substances de faible poids moléculaire et servant de transporteur de l'ion ferrique Fe^{3+} à l'intérieur de la cellule microbienne (Jacques *et al.*, 1993). *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* et de nombreux champignons sont capables de produire ces composés chélateurs de fer (Zahir *et al.*, 2004). Les sidérophores de bactéries rhizosphériques peuvent influencer directement l'alimentation de la plante en fer, comme ils peuvent le rendre ainsi non disponible pour les champignons pathogènes (O'sullivan et O'gara, 1992). Ils jouent également le rôle de chélateurs de métaux rhizosphériques ayant une faible disponibilité pour les plantes tels le Zn et Pb (Dimkpa *et al.*, 2009).

2.1.4. Production des régulateurs de la croissance végétale :

Il existe cinq catégories des régulateurs de la croissance végétale : les auxines, les gibbérellines, les cytokinines, l'éthylène et l'acide abscissique (Zahir *et al.*, 2004). L'acide indole-3-acétique est la phytohormone la plus répandue, il joue un rôle très important dans l'élongation des racines et dans la prolifération des poils absorbants (Spaepen *et al.*, 2007). Il est produit par un grand nombre de bactéries tels *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas*,

Xantomonas, *Rhizobium*, *Enterobacter cloacae* (Karnwal, 2009) *Aeromonas veronii*, *Alcaligenes piechaudii*, *Rhizobium leguminosarum*, *Bradyrhizobium* spp., *Agrobacterium* spp., et *Comamonas acidovorans* spp. (Weyens *et al.*, 2010). Les cytokinines et les gibbérellines sont impliquées dans la modification de la morphologie des plantes et dans la stimulation de développement de la partie aérienne (van Loon, 2007).

2.1.5. Production d'acide 1- Aminocyclopropane -1- carboxylique désaminase (ACC- désaminase) :

L'éthylène est une phytohormone capable de lever la dormance des graines. Elle favorise également la maturation des fruits et déclenche l'abscission des feuilles (Bleecker et Kende, 2000). Cependant, l'élévation de sa concentration (> à 25ug/l) en état de stress causé par les métaux lourds (Belimov *et al.*, 2005), les pathogènes (Wang *et al.*, 2000. in Rabhi 2012), la sécheresse (Mayak *et al.*, 2004a), la salinité (Mayak *et al.*, 2004b) et les contaminants organiques (Reed et Glick, 2005) se traduit par une inhibition de la formation des poils et l'élongation racinaire et par conséquence une réduction de la croissance végétale. La diminution de la teneur élevée de l'éthylène peut être réalisée en dégradant son précurseur direct, l'acide 1- Aminocyclopropane -1- carboxylique (ACC), à l'aide de l'ACC-désaminase. Cette enzyme est exprimée chez plusieurs rhizobactéries (e.g. *Alcaligenes* spp., *Bacillus pumilus*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter cloacae*, *Methylobacterium fujisawaense*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas* spp., et *Variovorax paradoxus*). Celles-ci peuvent dégrader l'ACC en α - ketobutyrate et en ammonium (Glick *et al.*, 2007. In Rabhi 2012).

2.2. Effets indirects :

2.2.1. Compétition pour l'espace et les nutriments :

Dans certains cas, les rhizobactéries à croissance rapide peuvent éliminer les pathogènes fongiques par une compétition pour le carbone et les sources d'énergie (Kamilova *et al.*, 2005). Le PGPR doit être présent sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique sur les plantes et pour être capable d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Haas et Defago, 2005). Outre la vitesse de croissance intrinsèque, les autres propriétés renforçant la colonisation racinaire sont la mobilité (présence d'un flagelle), le chimiotactisme, les lipopolysaccharides (LPS), la capacité de synthétiser des vitamines et des macromolécules et la faculté d'utilisation des composés excrétés par les racines (Lugtenberg et Kamilova, 2009).

2.2.2. Antibiose :

L'antibiose consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques. Les souches de *Pseudomonas* produisent une variété de métabolites antifongiques puissants impliqués dans le biocontrôle, par exemple l'acide cyanhydrique (HCN), la viscosamide, la pyolutéorine, le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), la pyrrolnitrine, les phénazines, les butyrolactones, les tensines et les tropolones (Defago, 1993 ; de Souza *et al.*, 2003 ; Haas et Defago 2005. *In* Rabhi 2012). D'autre part l'oligomycine A, la kanosamine, la zwittermicine et la xanthobacine sont produites par *Bacillus* spp. , *Streptomyces* spp. et *Stenotrophomonas* spp. (Milner *et al.*, 1996 ; Nakayama *et al.*, 1999). Certaines souches de PGPR ont la capacité à dégrader les parois cellulaires fongiques à travers la production d'enzymes hydrolytiques tels β -1,3-gluconase, exo- et endo-polygalacturonases, pectinolyases, cellulases et chitinases (Whippes, 2001. *In* Rabhi 2012).

2.2.3. Résistance systémique induite ou ISR (Induced Systemic Resistance) :

La reconnaissance par la plante de certaines bactéries de la rhizosphère peut conduire à une réaction d'immunisation lui permettant de mieux se défendre vis-à-vis d'une attaque par un organisme pathogène (van Loon, 2007). Cette « immunisation » de la plante est appelée résistance systémique induite (ISR) (van Loon *et al.*, 2005 ; Jourdan *et al.*, 2008). Ce phénomène d'induction de résistance systémique par les rhizobactéries est considéré comme une stratégie prometteuse dans la lutte biologique contre les maladies des cultures (Ramos Solano *et al.*, 2008). L'ISR peut être induite par des microorganismes variés incluent des bactéries à Gram positif comme *Bacillus pumilus*, ou des bactéries à Gram négatif appartiennent au genre *Pseudomonas* (*fluorescens*, *putida*, *aeruginosa*), et aux entérobactéries comme *Serratia* (*marcesens*, *plymuthica*) ou *Pantoea agglomerans* (Jourdan *et al.*, 2008).

3. Bioremédiation:

Les techniques de bioremédiation utilisent les propriétés dépolluantes de microorganismes (essentiellement des bactéries) endogènes ou exogènes au site contaminé (Boopathy, 2000 ; Vidali, 2001). La biodégradation d'un composé est souvent le résultat de l'action de multiples organismes (Vidali, 2001). Majoritairement, la bioremédiation peut être appliquée *in-situ*. Ces techniques, relativement peu coûteuses, sont appréciées du grand public (McGrath *et al.*,

2002). Elles peuvent être subdivisées en plusieurs catégories selon le principe biologique ou mode de dépollution mis en oeuvre.

3.1. Illustration de quelques stratégies :

3.1.1. L'atténuation naturelle :

Il s'agit de la forme la plus simple de la bioremédiation puisqu'elle consiste uniquement en un suivi analytique de l'abattement de la pollution. Cette technique part du principe que la microflore indigène d'un site pollué a su s'adapter à la pollution considérée et peut utiliser les polluants comme nutriments. La microflore bactérienne native, capable d'utiliser ces polluants, prolifère alors et peut devenir dominante (Mulligan et Yong, 2004). Cette méthode est néanmoins appliquée à un nombre réduit de sites en raison de la durée de dépollution qui peut parfois atteindre plusieurs dizaines d'années et de la surveillance permanente qui s'impose (Heitzer et Sayler, 1993). Elle peut cependant être utilisée en pré- ou post-traitement d'un site contaminé (Mulligan et Yong, 2004).

3.1.2. La biodégradation :

Cette méthode est basée sur la capacité de certains micro-organismes à transformer le Polluant en substrat (source de carbone, d'énergie) (Smith, 1990 ; Vidali, 2001). En effet, cette propriété est mise en évidence dès 1946 par Zobell (Zobell, 1946), qui observe l'utilisation d'hydrocarbures par des micro-organismes. Les polluants sont généralement des hydrocarbures pétroliers ou des solvants industriels (Liss *et al*, 1997 ; Smith, 1990).

3.1.3. La bio-immobilisation :

Elle utilise la capacité de certains micro-organismes à immobiliser un ou plusieurs composants, présents à l'état soluble. Cette technique serait peut-être un des moyens les plus faciles à mettre en oeuvre pour protéger la santé publique d'une éventuelle pollution des nappes phréatiques (Barkay et Schaefer, 2001). La recherche en bio-immobilisation, à l'interface de la microbiologie, la géochimie, la géologie et la biologie moléculaire, bénéficie des avancées dans la caractérisation des communautés microbiennes dans leurs habitats (Bond *et al*, 2000). Dans le cadre de contamination par des métaux ou des produits pétroliers, les bactéries sont les micro-organismes les plus couramment utilisés.

3.1.4. La biolixiviation :

La biolixiviation consiste en la solubilisation et l'entraînement dans la phase aqueuse par les micro-organismes de polluants inorganiques (principalement des métaux) fixés ou piégés dans le sol ou dans certains minerais (lixiviation de minerais sulfurés). Les micro_organismes utilisés sont très majoritairement des bactéries chimiolithotrophes (Bosecker, 1997). Cette méthode a connu un développement rapide au cours des années 1990 (Rohwerder *et al*, 2003).

3.1.5. La bioslurry :

Il s'agit d'un traitement en bioréacteur, et donc hors site, permettant la création d'une boue épaisse composée de la partie fine du sol dans l'eau à laquelle des nutriments sont ajoutés afin de stimuler la croissance de la population microbienne. Un système d'aération est employé pour les procédés aérobies. En fin de traitement, les phases solides et liquides sont séparées et le sol est remis en place (Zappi *et al*, 1996). Ces traitements sont appliqués pour les hydrocarbures, les phénols, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), le pétrole, les polychlorobiphényles (PCB), les composés organiques halogénés volatils ou semivolatils. Les résultats sont cependant étroitement liés à l'accessibilité du polluant et à sa sensibilité à la dégradation biologique, avec un taux de dégradation variable selon le type de sol et la nature du polluant.

3.1.6. La biorestauration :

Cette méthode consiste en l'ajout de nutriments (azote/phosphore) pour stimuler la croissance des micro-organismes indigènes et favoriser la dégradation des polluants organiques (hydrocarbures pétroliers, HAP) ou inorganiques (Hutchins *et al*, 1991).

3.1.7. La bioaugmentation :

Caractérisée par l'ajout de micro-organismes d'intérêt dans le sol, elle a pour but de stimuler la dégradation des polluants organiques et d'agir sur la spéciation des polluants inorganiques. Les micro-organismes employés peuvent être issus de sélections réalisées à partir d'échantillons environnementaux (sols, sédiments, boues...) (Vogel, 1996). Ils sont ensuite cultivés en masse et inoculés dans leur environnement d'origine ou dans un autre environnement. Des micro-organismes génétiquement modifiés peuvent être utilisés à ce titre

mais leur introduction dans l'environnement doit faire l'objet de contrôles poussés (Sayler et Ripp, 2000).

3.1.8. La biostimulation :

Cette dernière a pour objectif d'accroître l'activité de la microflore indigène notamment en terme de croissance et de dégradation, par apport de nutriments (carbonés comme source d'énergie, minéraux) et/ou d'accepteurs finaux d'électrons (oxygène, nitrate, sulfate) afin de pallier la pauvreté en nutriments disponibles pour les micro-organismes. Pour cela, la croissance de la population prélevée sur le site contaminé est stimulée en laboratoire ou en bioréacteurs installés sur le site. Les micro-organismes sont par la suite réensemencés. La gestion « à l'aveugle » de la microflore caractérise cette technique puisque les micro-organismes bénéficiant de la stimulation ne sont pas forcément impliqués dans le traitement du ou des contaminants (Cunningham et Philip, 2000).

➤ Exemple :

Tableau 01: Comparaison des différentes méthodes de bioremédiation de sites contaminés

	Mécanismes	Contaminants	Lieu	Micro-organismes	Avantages	Inconvénients	Références
Atténuation naturelle	Processus naturels (dilution, volatilisation, adsorption, dégradation)	Organiques (hydrocarbures benzéniques, chlorés,...)	<i>In-situ</i>	Flore indigène	Destruction complète possible aucun déchet en pré- ou posttraitement	Surveillance sur du long terme peu efficace pour des concentrations élevées	Mulligan & Yang, 2004
Bio-dégradation	Transformation du polluant en substrat	Organiques (hydrocarbures pétroliers, solvants, ...) et inorganiques	<i>In-situ</i>	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Rhodococcus</i> sp...	Dégradation complète, aucun déchet	Processus lent	Smith, 1990
Bio-immobilisation	Adsorption	Organiques (PCB, HAP, ...) Inorganiques	<i>In-situ</i>	Bactéries (biofilm) champignons	Pas de traitement des déchets facile à mettre en œuvre	Processus lent surveillance fréquente	Barkay & Schaefer, 2001 ; Hutchinson et al., 2003; Olson et al., 2003
Biolixiviation	Solubilisation	Inorganiques (Cu, U, Cr, Pb, ...)	<i>In-situ</i>	Bactéries chimio-lithotropes (<i>A. ferrooxidans</i> , <i>A. thiooxidans</i>)	Peu onéreux processus naturel	Processus lent peu efficace pour des concentrations élevées	Bosecker, 1997
Bioslurry	Dégradation	Organiques (HAP, hydrocarbures, phénols, ...) et inorganiques	Hors-site	Micro-organismes indigènes, préadaptés ou mélange de souches	Métabolisation rapide facilité du contrôle et du maintien en conditions favorables	Teneurs résiduelles plus ou moins élevées coût élevé	Zappiet al., 1996
Bio-restauration	Dégradation	Organiques (hydrocarbures, HAP,...) et inorganiques	<i>In-situ</i> hors site	Flore indigène	Peu onéreuse	Succès souvent limité par les concentrations en O ₂	Hutchins et al., 1991
Bio-augmentation	Dégradation	Organiques lourds, HAP, PCB	<i>In-situ</i> Hors site	Micro-organismes d'intérêts sélectionnés	Peu onéreuse associée à la phytoextraction	Taux de réussite variables	Vogel et al., 1996
Bio-stimulation	Dégradation	Organiques (hydrocarbures pétroliers, HAP, ...)	<i>In-situ</i> hors site	Flore indigène, stimulée en laboratoires ou réacteurs	Peu onéreuse relativement efficace	Gestion à l'aveugle	Cunningham et Philip, 2000

4. Les *Pseudomonas*:

Les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* sont ubiquitaires et ont été isolées de nombreux habitats tels que les sols, les sédiments, les végétaux ainsi que les eaux douces et marines (O'Sullivan et Ogara, 1992). Il apparaît comme l'un des taxons bactériens les plus importants du sol (Garbeva et al, 2004), où les populations indigènes de *Pseudomonas* fluorescents sont très fréquentes (Latour et al, 1999). Ce genre joue des rôles clés dans les sols en tant qu'agent de biocontrôle (O'Sullivan et Ogara, 1992) mais aussi dans la stimulation de la croissance végétale ainsi que dans la bioremédiation (Garbeva et al, 2004).

Les *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, aérobies stricts. Ces bactéries, mobiles grâce à un flagelle polaire, peuvent être retrouvées sous forme planctonique ou sessile. Les *Pseudomonas* des sols produisent généralement un pigment jaune-vert, fluorescent, appelé pyoverdine et correspondant à une famille importante de sidérophores (O'Sullivan et Ogara, 1992). Ainsi, le genre *Pseudomonas* peut être divisé en deux groupes, les *Pseudomonas* non fluorescents et ceux fluorescents, produisant la pyoverdine. Parmi ces derniers sont retrouvés *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas syringae* (Meyer, 2000). Des analyses génomiques de différents *Pseudomonas* indiquent que le transport du fer serait très similaire chez tous les *Pseudomonas* fluorescents (Ravel et Cornelis, 2003). Dans notre étude, l'organisme modèle est *P. aeruginosa*, pathogène opportuniste pour lequel le transport du fer a été le plus étudié et est ainsi le mieux connu.

5. Métaux lourds :

5.1. Définition des « métaux lourds » :

D'un point de vue purement chimique, les éléments de la classification périodique formant des cations en solution sont des métaux.

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.cm³ (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.

Les métaux essentiels sont des éléments indispensables à l'état de trace pour de nombreux processus cellulaires et qui se trouvent en proportion très faible dans les tissus

biologiques (Loué, 1993). Certains peuvent devenir toxiques lorsque la concentration dépasse un certain seuil. C'est le cas du cuivre (Cu), du nickel (Ni), du zinc (Zn), du fer (Fe). Par exemple, le zinc (Zn), à la concentration du milli-molaire, est un oligo-élément qui intervient dans de nombreuses réactions enzymatiques (déshydrogénases, protéinase, peptidase) et joue un rôle important dans le métabolisme des protéines, des glucides et des lipides (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

Les métaux toxiques ont un caractère polluant avec des effets toxiques pour les organismes vivants même à faible concentration. Ils n'ont aucun effet bénéfique connu pour la cellule. C'est le cas du plomb (Pb), du mercure (Hg), du cadmium (Cd). (Tableau 02).

Tableau 02: teneurs des sols et des plantes en certains éléments. (En mg/kg de poids sec) (Pierre, 2010).

Eléments	maximum "normal" dans les sols	Moyenne des sols	maximum "normal" dans les plantes
Cadmium	0.7	0,5	1
Chrome	150	100	0,1
Cuivre	100	20	15
Mercure	0,3	0,03	0,1
Nickel	80	40	8
Plomb	100	30	8
Sélénium	10	—	—
Zinc	300	50	150

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

Le problème principal avec les métaux lourds comme le plomb, le cadmium, le cuivre et le mercure est qu'ils ne peuvent pas être biodégradés, et donc persistent pendant de longues périodes dans des sols. Leur présence dans les sols peut être naturelle ou anthropogénique (Figure 2).

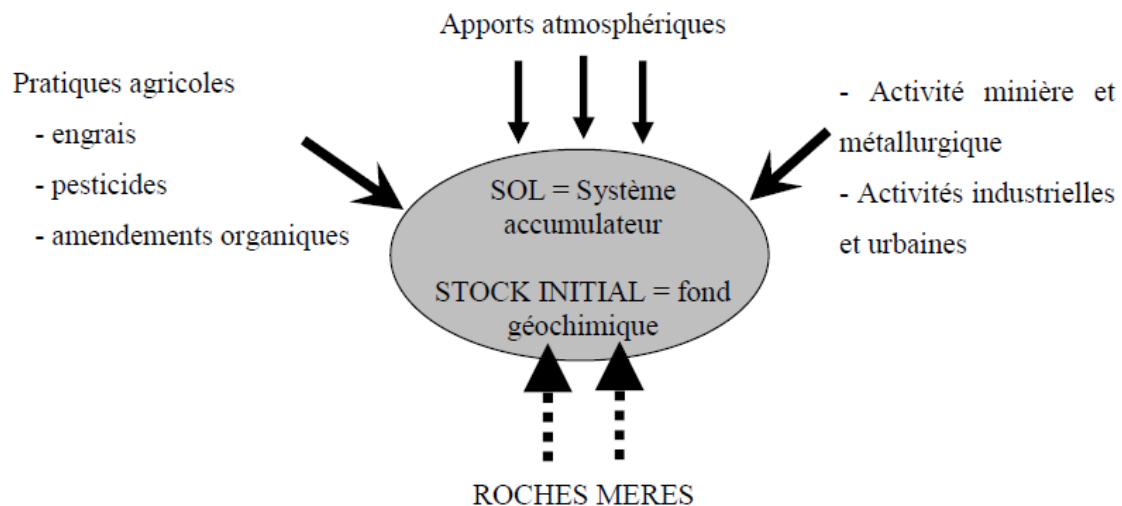


Figure 02: Origine des métaux lourds dans le sol (D'après Robert et Juste, 1999)

(a) Origine naturelle :

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

(b) Origine anthropique :

Cependant, la source majeure de contamination est d'origine anthropique. Au cours des décennies dernières, l'apport de métaux lourds au sol dans le monde s'est étendu ; à l'heure actuelle on l'estime à 22000 tonnes de cadmium, 939000 t de cuivre, 783000 t de plomb, et 1350000 t de zinc (Singh *et al.*, 2003). Les principaux types de pollutions anthropiques responsables de l'augmentation des flux de métaux, sont la pollution atmosphérique (rejets urbains et industriels), la pollution liée aux activités agricoles et la pollution industrielle.

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

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

Le rôle des pratiques industrielles et agricoles dans la contamination des sols doit être pris en compte, Leur accumulation et leur transfert constituent donc un risque pour la santé humaine via la contamination de la chaîne alimentaire, mais aussi pour le milieu naturel dans son ensemble (Bourrelier et Berthelin, 1998).

5.3. Pollution par les métaux lourds : le cas du plomb

Le plomb (Pb), du latin *plombum*, est un métal mou, gris et sans odeur, ni goût caractéristique. Il a pour numéro atomique 82 et appartient au groupe IV b de la classification périodique des éléments. Sa masse atomique est 207,2 g.mol⁻¹, sa densité 11,35 et sa température de fusion 327°C. Le Pb est un élément chalcophile qui se trouve dans la croûte terrestre le plus souvent sous forme de galène. Le fait qu'il possède 2 électrons non appariés sur sa dernière couche électronique (p) lui permet d'avoir 2 formes cationiques : Pb²⁺ et Pb⁴⁺.

5.4. Effets du plomb sur la plante :

Les plantes cultivées dans un milieu contaminé par le Pb présentent un ralentissement de leur développement et une inhibition de la croissance des racines et des parties aériennes. Leurs feuilles ont généralement une surface inférieure à celle des témoins et des chloroses peuvent apparaître. Dans certains cas la présence de Pb peut mener à une mort des cellules (Seregin et Ivaniov, 2001).

Le plomb peut causer des effets graves sur la sensation des métaux. L'accumulation du plomb peut réduire la concentration de chlorophylle. Le fer, l'activité de la réaction de Hill, l'activité des catalases, tandis que augmente la concentration des produits phosphorés, l'activité des peroxydases, la phosphate acide et les ribonucléases dans les feuilles du radis (Gopal et reizvi , 2008).un sommaire des changements des changements physiologiques dans la réponse au Pb sont présentés selon (Sharma et Dubey., 2005).

_ Absorption du nutriment : Altération dans l'absorption des cations (K⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺) et des anions (NO₃⁺).

_ Régimes de l'eau : Diminution dans les composés maintenant la turgescence et la paroi cellulaire, le volume de cellules de grade, l'ouverture des stomates, le niveau de l'acide abscissique et la surface des feuilles.

_ La photosynthèse des chloroplastes :

- Altération de la composition des lipides des membranes des thylakoïdes,
- Diminution dans la synthèse de chlorophylle, plastoquinone, caroténoïdes, Activité de L' NADP oxydoréductase. Le transport des électrons et l'activité des enzymes de cycle de calvin.
- Irrégularités des mitotiques nucléaire : Augmentation dans les formes irrégulières, décomposition du matériel nucléaire, propriété collante des chromosomes, les ponts d'anaphase, c-méiose et la formation des micronucléus.
- La respiration des mitochondries : Diminution dans le transport des électrons, des protons et l'activité enzymatique du cycle de krebs.

5.5. Dépollution des sols pollués par le plomb :

Les nombreux cas de pollution par les métaux lourds génèrent autant de site contaminés qu'il faut réhabiliter. Les méthodes physico-chimiques de dépollution de ces sites utilisées *in situ* et *ex situ* présentent l'inconvénient d'être coûteuses et lourdes à mettre en oeuvre (Gadd, 2000 ; Raskin *et al.*, 1994 ; Salt *et al.*, 1995). De plus, elles perturbent fortement l'activité biologique des sols et altèrent leur structure physique. Le besoin de nouvelles techniques économiquement compétitives et pouvant préserver les caractéristiques du sol s'est fait sentir et l'utilisation des biotechnologies s'est avérée être une alternative intéressante. Si les sols ne peuvent pas être traités sur le site ils sont excavés et par la suite soit stockés dans des décharges soit traités, par exemple par un lavage sous haute pression d'eau ou par lavage avec de l'eau additionnée de tensioactifs (Paff et Bosilovich, 1995; Chandra Sekhar *et al.*, 2005). En parallèle, il existe des processus biologiques pour dépolluer les sols. Même s'ils sont moins utilisés, il est possible de décontaminer un sol grâce à des microorganismes (Berthelin, 1983; Gadd, 1990) ou à des plantes (Yang *et al.*, 2005).

Matériel et Méthodes

Ce travail comporte une principale partie, est la mise en évidence de l'effet de *Pseudomonas* spp fluorescents sur la croissance des plantes et la Bioremédiation par *Pseudomonas* Spp Fluorescents Cas de plomb.

1. Les souches bactériennes :

Cinq souches bactériennes appartenant aux *Pseudomonas* utilisés dans cette travail ont été isolées et identifiées à l'Université Amar Telidji- Laghouat à partir des plantes spontanées (Wilaya de Laghouat). Ces souches ont subi une régénération et une confirmation de la pureté des souches sur milieu King B (Annexe 1).

Après la purification nous avons repiqué les isolats purs dans des tubes contenant le milieu KB. Ces tubes ont été mis au réfrigérateur à une température de $4 \pm 2^\circ\text{C}$, pour les utiliser ultérieurement.

Tableau 03 : Origine des souches bactériennes

Souches	Origine végétal	Origine géographique	Année d'isolement
M4E3	Rhizosphère d' <i>Echinopsspinosus</i>	<i>Makrân- Laghouat</i>	2013
M23E1	Rhizosphère de <i>Maricandia arvensis</i>	<i>Makrân- Laghouat</i>	2013
M18E1	Rhizosphère de <i>Maricandia arvensis</i>	<i>Makrân- Laghouat</i>	2013
P8	Rhizosphère de plantesspontanés	<i>El assafia- Laghouat</i>	2014
P9	Rhizosphère de plantesspontanés	<i>El assafia- Laghouat</i>	2014

2. Sélection des souches la plus tolérant de Plomb:

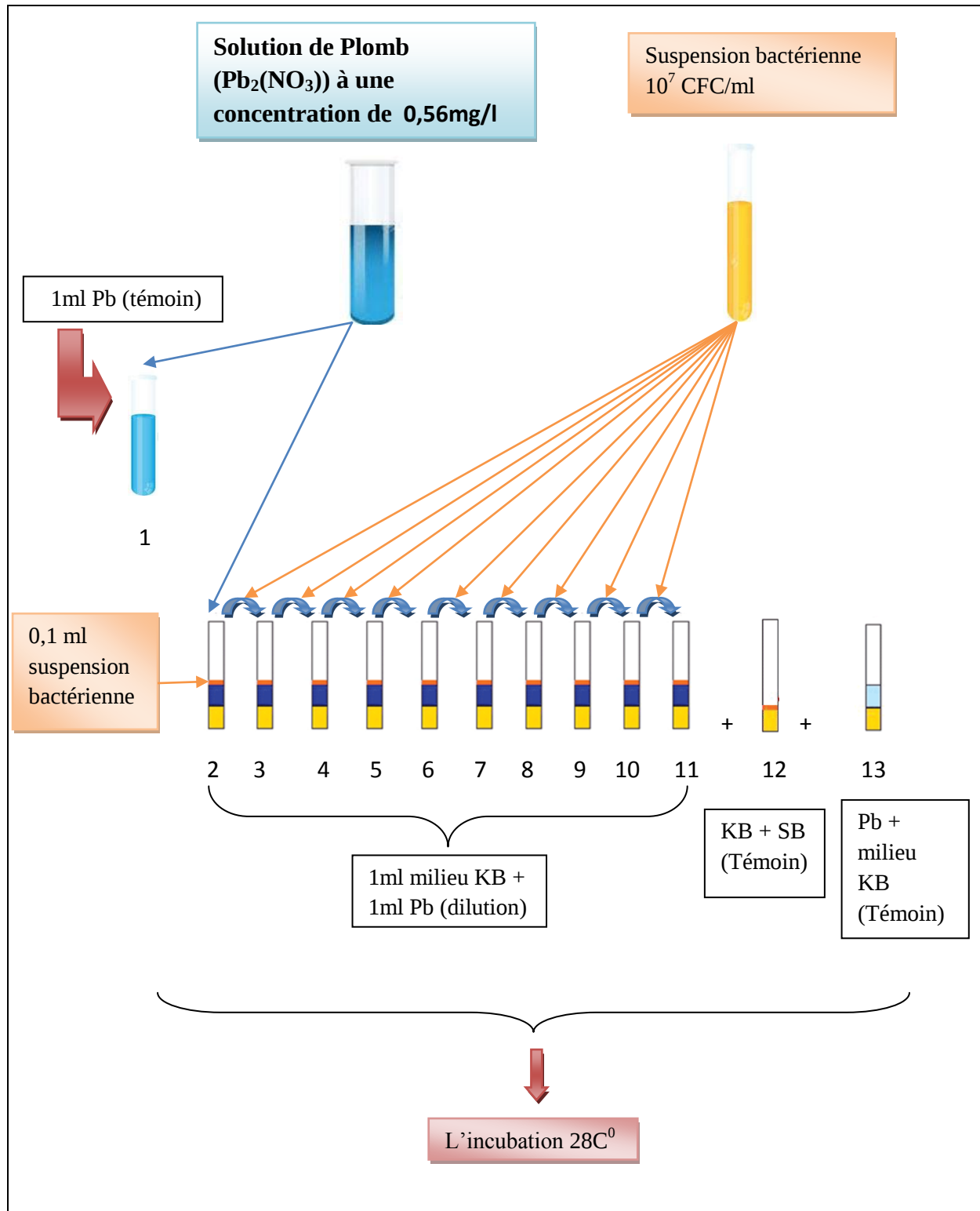
Cet essai consiste à la détermination du spectre de l'action de l'agent chimique le plomb (pb), en fonction de la résistance des *Pseudomonas Spp* . fluorescents étudiés (M4E3, M23E, M18E1, P8 et P9). Il a été réalisé grâce à la méthode classique de dilution successive, (Mazzola et al., 2003).

A partir des cultures bactériennes jeunes âgées de 24h, nous avons préparé des inoculums bactériens à une concentration approximative de 10^8 UFC/ ml, à l'aide d'un spectrophotomètre à une densité optique **DO** à 620nm. En fin, nous avons préparé cinq suspensions bactériennes.

Nous avons préparé une solution mère de plomb à base de nitrate de plomb $Pb(NO_3)_2$ à une concentration de 5,6g /l.

Dans Treize tubes à essai numérotés, contenant 1 ml de milieu de culture KB liquide sauf le tube numéro 1. (01ml) de la solution mère du plomb a été ajouté dans le premier et le second tube de la série, à partir du tube 02 une série de dilution a été réalisée jusqu'au tube 11 en prélevant chaque fois 01ml sauf pour le numéro 12, en suite (0,1ml) de l'inoculum bactérien a été ajouté à tous les tubes sauf le tube 13. L'incubation a été effectuée pendant 48 heures à une température de $28 \pm 2^\circ C$. Les tubes 12 et 13 sont respectivement, le témoin positifs (KB+inoculum) et négatif (KB+Plomb).Figure5.

La CMI est la plus faible concentration de la substance pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu après un temps d'incubation de 18 à 24 h. Sa détermination a été faite par l'observation du trouble induit par la croissance des germes étudiés dans chaque tube. La CMI a été la plus petite concentration pour laquelle il n'y a pas eu de trouble observé à l'œil nu.



SB : suspension bactérienne

Pb : plomb

Figure03: Sélection des souches la plus tolérant de Plomb.

3. Essais de bioremédiation du sol et biostimulation de la croissance des plantes :

3.1. Préparation du substrat :

Le sol utilisé dans cet essai est un sol obtenu de ouïd-m'si Wilaya de Laghouat. Il a été stérilisé par autoclavage.

La démarche expérimentale retenue a consisté à standardiser au maximum les conditions expérimentales (sol, conditions climatiques, forme chimique du polluant). Le métal polluant utilisé dans cette étude est le plomb, apporté lors de l'homogénéisation du sol sous forme de poudre. La doses apporté est 340mg de plomb / kg de sol sec. Chaque Sac contient 02 kg de sol.

3.2. L'inoculum bactérien :

A partir des résultats du test de CMI, nous avons retenu deux parmi les cinq ont été choisi pour être utilisé dans l'essai de biostimulation de la croissance et de bioremédiation du sol, la souche (P08 et P09). P08 déjà testé en 2015 dans un essai de biostimulation de la croissance du blé.

À partir des cultures bactériennes jeunes âgées de 24h, nous avons préparé des inoculum bactériens à une concentration d'environ 10^6 UFC/ ml, à l'aide d'un spectrophotomètre à une densité optique DO à 600nm, pour la souche P8 et P9.

L'inoculation du substrat a été réalisée par irrigation à raison de 25 ml/Sac.

3.3. Matériel végétale :

Nous avons utilisé une variété vitron de blé dur (*Triticum durum*), récolté en 2015.

3.4. Dispositif expérimental :

Dans cet essai nous avons opté pour un dispositif en bloc aléatoire complet à deux répétitions, (Figure04).représentées par deux facteurs :

_ **Facteurs 1** : correspond au substrat, sol sans plomb et sol avec plomb.

_ **Facteurs 2** : représenté par les différentes souches bactériennes (P08 et P09) et le témoin non bactérisé.

Nous avons six (06) traitements avec sept (07) répétitions par bloc:

✓ **Le traitement en question est :**

T1 : sol sans suspension bactérienne et sans plomb (témoin) Négatif.

T2 : sol sans suspension bactérienne et avec plomb (témoin) positif.

T3 : sol traité par la suspension bactérienne (p08) et sans plomb.

T4 : sol traité par la suspension bactérienne (p08) et avec plomb.

T5 : sol traité par la suspension bactérienne (p09) et sans plomb.

T6 : sol traité par la suspension bactérienne (p09) et avec plomb.

Nous avons semis Cinq graine de blé dur variété vitron par Sac, les Sac sont placés à l'air libre.

Figure 04 : Dispositif expérimentale de l'essai de phytostimulation de la croissance végétale.



T1 : substrat témoin non bactérisé et sans plomb.

T3 : substrat sans plomb traité par suspension bactérienne(P08).

T5 : substrat sans plomb traité par la suspension bactérienne (P9)

T2 : substrat témoin non bactérisé + plomb

T4 : substrat traité par la suspension bactérienne (P8) et le (Plomb).

T6 : substrat traité par la suspension bactérienne(P9) et (Plomb).

4. Test de viabilité:

Cet essai consiste à la détermination de la viabilité des populations bactériennes dans un sol traité par ces bactéries, en fonction de la concentration des populations bactériennes.

Le test de viabilité a été réalisé après 15 jours d'inoculation sur les échantillons de sol. Nous avons prélevé à une profondeur de 10 cm des échantillons de sol de différents sacs de chaque traitement. Et nous avons composé des échantillons de 100g.

Les échantillons prélevés ont été mis dans des sacs en plastique stérile, puis ont été transportés au laboratoire.

L'isolement des bactéries appartenant aux *Pseudomonas* ssp. fluorescents a été effectué sur le milieu KB par la méthode des suspensions-dilutions (Klement, 1990).

Dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau distillé stérile, nous avons ajouté une quantité représentative d'un (1g) de sol pour préparer la solution mère.

Après l'agitation par le vortex, nous avons prélevé un(1) ml de solution mère de chaque échantillon et mis dans des tubes contenant 9ml d'eau distillé stérile. Les opérations des isolements ont été effectuées avec les dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-8} .

Nous avons étalé à l'aide de pipette de Pasteur 0,1 ml de chaque dilution sur un milieu de culture King B (King *et al.*, 1954), En réalisant deux répétitions pour chaque dilution. L'ensemble des boîtes ont été incubé à une température de 28 ± 2 °C pendant 24h à 48h.

Pour estimer le nombre des bactéries viables, nous avons utilisé la formule de Klement (1990) pour calculer le nombre de bactéries en Unité Formant Colonie (UFC), après avoir effectué le comptage des colonies bactériennes à l'aide de l'appareil compteur.

$$\text{Nombre de bactérie} = N \times 10^n \times 10 \text{ (cellule/ml}^{-1}\text{)}.$$

N= la moyenne entre le nombre des colonies dans les boîtes de la même dilution.

n= le nombre de dilution.

5. Paramètre étudiés :

L'évaluation de l'effet de la bactérisation a été effectuée 30 jours après le semis, par la mesure des paramètres de croissance et des paramètres physiologiques. Pour les paramètres de croissance les mensurations ont été réalisées sur quatre plants, choisis aléatoirement de chaque traitement par bloc, le reste des plants sont utilisés pour étudier les paramètres physiologiques.

5.1. Paramètre de croissance :

L'évaluation de la croissance du blé a été effectuée par des mensurations sur des paramètres de croissance ci-dessous.

5.1.1. Mensuration sur les racines :

Après dépotage, chaque plant est débarrassé du sol adhérent à la racine, nous procédons immédiatement à la mesure de leur longueur racinaire, et la pesée pour déterminer le poids frais. Le poids sec a été déterminé pour chaque plant, après séchage à l'étuve pendant deux jours à une température de 105 °C.

5.1.2. Mensuration sur les tiges :

Après dépotage, nous procédons à la mesure de la hauteur des tiges. La partie aérienne (tige+ feuille), fraîchement coupée au niveau du collet, a été immédiatement pesée pour déterminer le poids frais. Le poids sec a été déterminé pour chaque plant, après séchage à l'étuve pendant deux jours à une température de 105 °C.

5.2. Paramètre physiologique :

Rappelant que les paramètres physiologique étudiés ont été réalisés sur trois plants de chaque traitement par bloc.

5.2.1. Extraction et dosage de La chlorophylle :

La chlorophylle est extraite selon la méthode décrite par Ferus et Arkosiova (2001) qui consiste en une macération du végétal dans l'acétone. Nous avons pesé 0.5g de limbe foliaire qui est découpé en petits morceaux puis broyé dans un mortier avec 25 ml d'acétone à 80%, et pincée de carbonate de calcium. Après broyage total, la solution est filtrée et mise dans des tubes couverts du papier aluminium pour éviter l'oxydation de la chlorophylle par la lumière. 1 ml de la solution est mis dans la cuve du spectrophotomètre, et la lecture se fait aux deux longueurs d'ondes ou densités optiques (DO) 645 et 663 nm, après étalonnage de l'appareil avec la solution témoin de l'acétone à 80%(Figure 03) .Les valeurs de la chlorophylle sont déduites selon les formules attribuées à Arnon (1949) par Ferus et Arkosiova (2001):

$$\text{Chl a (mg/ l}^{-1}\text{)} = 12.7 (\text{DO } 663) - 2.69 (\text{DO } 645)$$

$$\text{Chl b (mg/ l}^{-1}\text{)} = 22.9 (\text{DO } 645) - 4.68 (\text{DO } 663)$$

$$\text{Chl a+b (mg/ l}^{-1}\text{)} = 8.02 (\text{DO } 663) + 20.20 (\text{DO } 645)$$

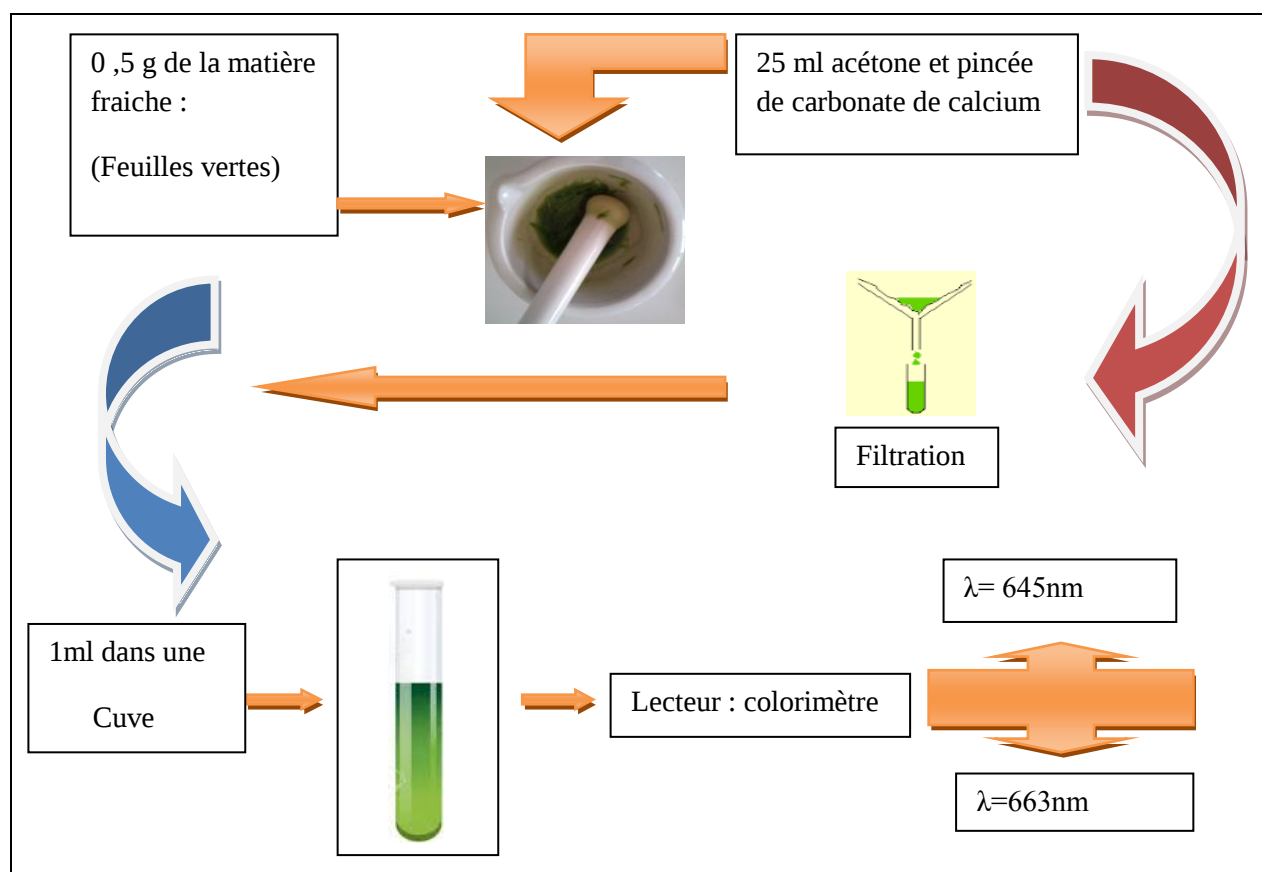
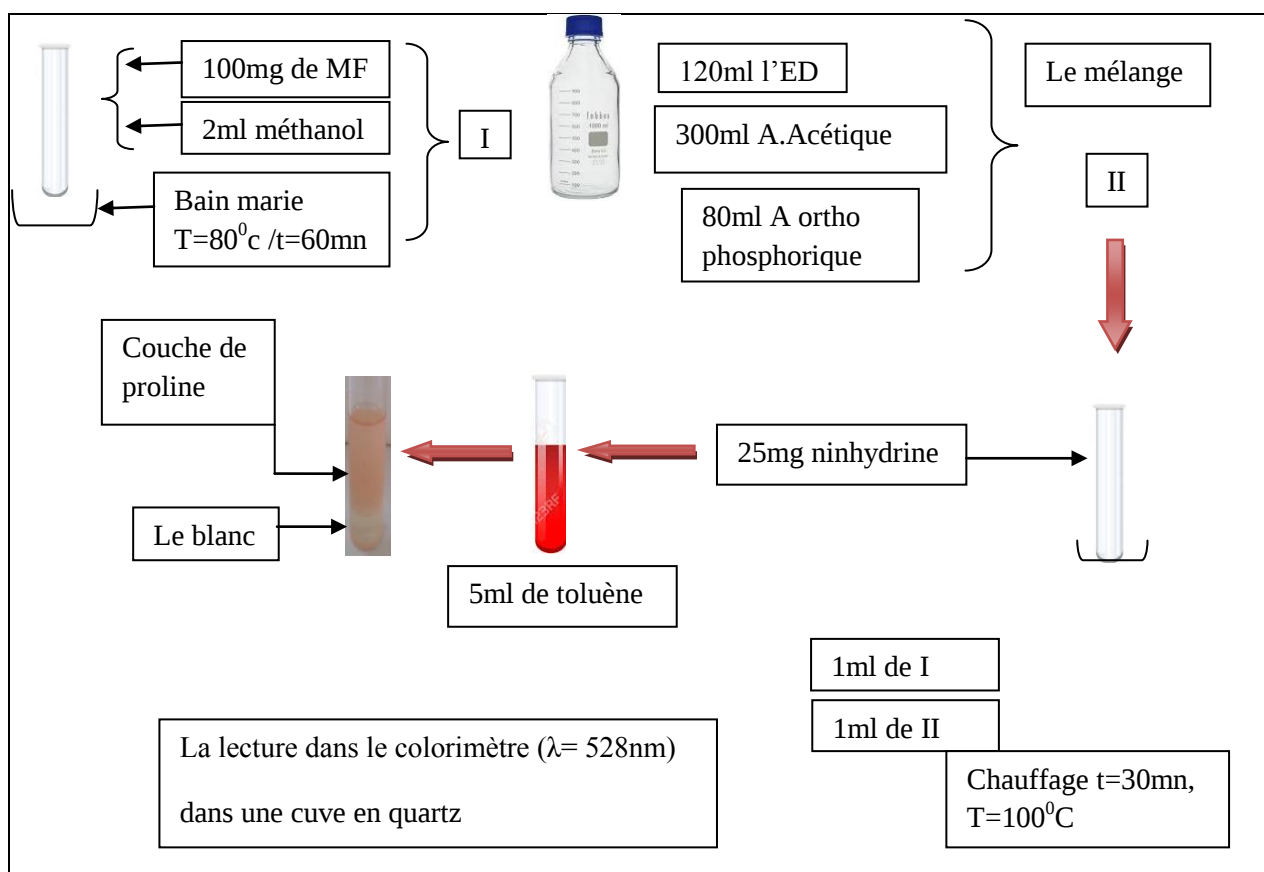


Figure05: Détermination de la teneur en chlorophylle.

5.2.2. Extraction et dosage de la proline :

La proline est quantifiée selon la technique de Troll et Lindsley (1955), Le dosage de la proline a été déterminé sur un échantillon de 100 mg de matière fraîche qui a été prélevés sur le tiers médian foliaire, et placés dans un tube à essai auquel nous avons ajouté 2 ml de méthanol à 40%. L'échantillon est chauffé, pendant 1 heure dans un bain-marie à 85°C. Après refroidissement, 1 ml de la solution d'extraction est ajouté à 1 ml d'acide acétique, 25 mg de ninhydrine et 1 ml du mélange, 120ml eau distillée 300ml d'acide acétique et 80 d'acide ortho phosphorique. L'ensemble est porté à ébullition pendant 30 mn au bain marie. Après refroidissement, nous avons additionne 5 ml de toluène après agitation au vortex et nous avons procédé à la lecture à une longueur d'onde de 528nm (Figure 04). La proline est exprimée en $\mu\text{g/g}^{-1}$ de matière fraîche selon les formules attribuées à Troll et Lindsley (1955) :

$$\text{Pro } (\mu\text{g/g}^{-1}) = 0,62 \times (\text{DO528}).$$



MF : Matière fraîche
ED : Eau distillé

(Source : originale, 2016).

Figure06: Détermination de la teneur en proline.

5.2.3. Extraction et dosage de plomb dans les végétaux par la spectroscopie d'absorption atomique:

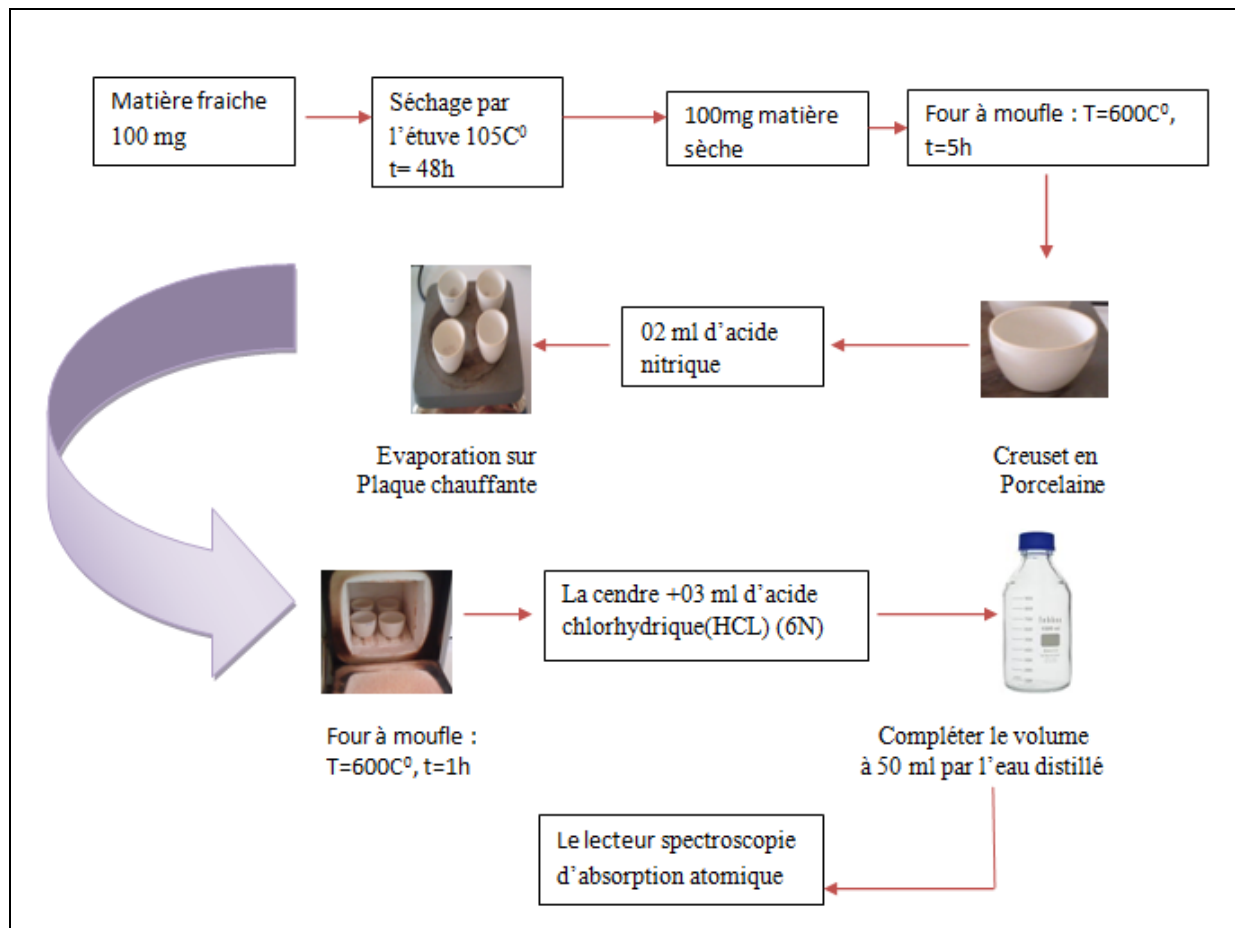
L'extraction et le dosage des éléments minéraux sont faits par la méthode de Lafon et *al.* (1996) qui consiste à déterminer la composition en éléments minéraux d'une plante en procédant d'abord par calcination et puis par destruction complet de la matière organique (Martin-prevel et *al.* , 1984).

Après séchage des parties à tester (tige et racine) à l'étuve à 105 °C pendant 48 heures, seulement 100 mg à été pris pour la calcination mis dans des creusets en porcelaine au four à moufle à 600 °C pendant cinq heures.

Après refroidissement, deux ml d'acide nitrique (HNO₃) ont été ajouté à chacun des échantillons, puis les creusets ont été mis sur la plaque chauffante jusqu'à l'évaporation complète de cet acide. En suit nous avons remis au four une autre heure.

La cendre obtenue est dissoute dans 03 ml d'acide chlorhydrique(HCl) (6N), le volume a été amené par la suite à 50 ml par l'eau distillé.

Les solutions ainsi préparés ont subi un dosage par spectroscopie d'absorption atomique. Au niveau des laboratoires de geni-des procedé.



(Source : originale, 2016)

Figure07: Extraction et dosage de plomb dans les végétaux par la spectroscopie d'absorption atomique.

6. Analyse statistique :

Une analyse de variance (ANOVA) a été réalisée à l'aide du logiciel stat Box végétale, en considérant l'essai factoriel ($\alpha=5\%$).la mise en évidence de différences significatives concerne l'effet de chaque facteur contrôlé (f1 : le substrat, f2 : les bactéries) et de leur interaction (f1xf2).l'effet de bloc est considéré comme aléatoire.

Résultats et Discussion

1. Réactivation des souches:

Après régénérations et purification des souches bactériennes, nous avons obtenu des colonies bactériennes fluorescentes présentant les mêmes caractéristiques phénotypiques de *Pseudomonas spp.* fluorescents. C'est à dire l'apparition des pigments jaune vert fluorescents visible à l'œil nu (petite taille, rondes brillants, bombes et lisse de leur surface) sur le milieu King B.

2. Résultat de sélection des souches la plus tolérant de Plomb:

Après incubation, la CMI est indiquée par le tube contient la plus faible concentration bactérienne où aucune croissance n'est visible. Les résultats montrent que la souche P09 est la plus résistante au plomb à une concentration de 280mg/l suivi par les souches P08 et M4E2 à une concentration de 1400mg/l, pour la souche M18E1 la CMI est de 7,5mg/l, la souche M23E est la plus sensible au plomb à une concentration de 21mg/l.

Tableau 04 : résultat du teste de la Concentration minimale inhibitrice (CMI)

concentration de plomb en mg/ml	0,54 mg/l	1,09 mg/l	2,1 mg/l	4,37 mg/l	8,75 mg/l	17,5 mg/l	35 mg/l	70 mg/l	140 mg/l	280 mg/l
(P09)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(P08)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M4E3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M18E1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
M23E	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-



Croissance bactérie



Pas de croissance bactérie



Figure 08: La Concentration minimale inhibitrice (CMI) chez la Bactérie (P09).

Pour le test de la concentration minimale inhibitrice(CMI), nous avons remarqué un biofilm jaune-vert visible à l'oeil nu surtout chez la souche P09, cette souche très résistant, Ces bactéries sécrètent une substance appelée sidérophore pour inhibe l'effet de plomb.

Les sidérophores sont définis comme des chélateurs organiques ayant une très forte affinité pour le fer (Hider et Kong, 2010). Ils sont synthétisés et sécrétés pour la solubilisation d'ions ferriques par des microorganismes aérobies, tels que les bactéries, en réponse à des conditions de carence en fer (Ratledge et Dover, 2000). Les sidérophores peuvent être libérés par les bactéries dans l'environnement tel que la rhizosphère où les concentrations peuvent atteindre 10^{-7} à 10^{-8} M (Powell *et al*, 1980). De même, dans les solutions de sol, les concentrations sont non négligeables, variant de 10^{-6} M à 10^{-3} M par litre (Hersman *et al.*, 1995). Néanmoins, dans l'environnement, la production de sidérophores par les bactéries, notamment les *Pseudomonas* fluorescents, très présents dans Les sols (O'Sullivan et Ogara, 1992).

La production de sidérophores : en liant le métal dans le milieu extracellulaire, le sidérophore diminue la concentration en métaux libres, affectant sa diffusion dans la bactérie et ainsi sa toxicité (Hannauer *et al*, 2012). Une souche produisant la pyoverdine et la pyochéline apparaît plus résistante aux métaux qu'une souche ne synthétisant pas de sidérophore (Braud *et al*, 2010). Plus de 60 pyoverdines différentes, toutes produites par les *Pseudomonades* fluorescents, ont été identifiées (Meyer *et al*, 2008).

3. Test de viabilité :

D'après les résultats du test de viabilité, la concentration des populations bactériennes variées entre 10^5 – 10^8 CFU/ml. Pour mettre en évidence les effets bénéfiques, les souches de *Pseudomonas* doivent rencontrer un environnement favorable à l'expression de leur survie (Lemanceau, 1992). La colonisation bactérienne est également influencée par la texture du sol (Bahme et Schroth, 1987). Ainsi que l'importance de l'origine géographique peut également influencer les degrés de colonisation et l'adaptation aux rhizosphères diversifiées (Digat, 1992).

Par leur importante diversité phylogénétique et métabolique, leur capacité à s'adapter et à coloniser des environnements extrêmes, ainsi qu'à développer des biofilms, les bactéries apparaissent comme des organismes remarquables dans le règne du vivant (Gorbushina, 2007). La fixation des bactéries sur les surfaces minérales crée des micro-environnements les protégeant des stress environnementaux. Dans ces environnements, les bactéries vont extraire des nutriments inorganiques et de l'énergie directement de la matrice minérale et/ou des micro-organismes les entourant (Uroz et al, 2009). Les mécanismes d'altération connus comprennent notamment des réactions d'oxydo-réduction ainsi que la production de composés altérants tels que les acides organiques et les molécules chélatrices de type sidérophores (Uroz et al, 2009). Les biofilms bactériens auraient également un rôle dans la dissolution des roches et minéraux (Gorbushina, 2007).



(Source : originale, 2006).

Figure09: Pigments jaune vert fluorescents

4. Essai de bioremédiation de sol et biostimulation de la croissance végétale:

Dans cet essai nous avons étudié six paramètres de croissance : longueur des tiges et des racines, poids frais des tiges et de racine, poids sec des tiges et des racines, et trois paramètres physiologiques, à une période correspondent à trente (30) jours après le semis.

Les analyses statistiques des résultats ont montré une différence non significative pour l'ensemble de paramètres étudié que soit pour facteur substrat, ou le facteur bactérie, ou leur interaction.

5. Paramètre de croissance :

5.1. Longueur racinaire :

L'analyse de la variance (annexe02), réalisé sur la longueur racinaire a montré que le facteur substrat a révélé une différence non significative, le substrat (sol+plomb) a donné des racines d'une longueur de 19,64 cm, et le substrat (Sol-Plomb) des longueurs de 18,70 cm. figure(10).

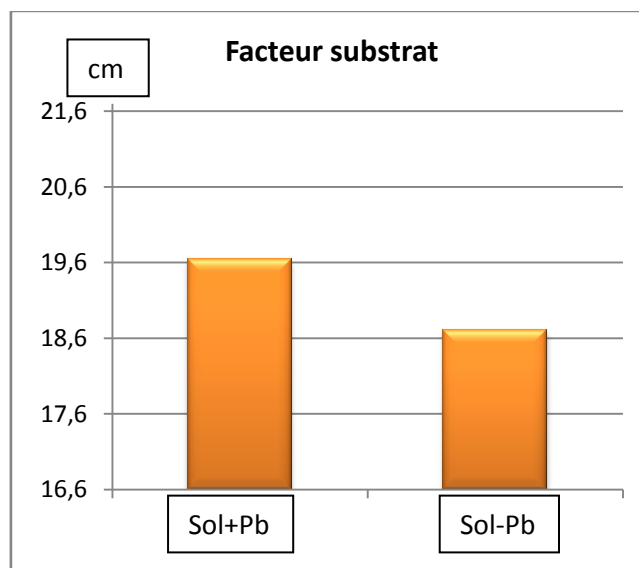


Figure 10: effets de facteur substrat sur la longueur racinaire (cm).

Le facteur des souches bactériennes n'a aucun effet sur la longueur racinaire où la souche bactérienne (P09) a donné des moyenne de 19,68 cm, suivie par Témoin avec une moyenne de 19,14cm, et la souche bactériennes (P08) avec une moyenne de 18,69 cm (figure 11).

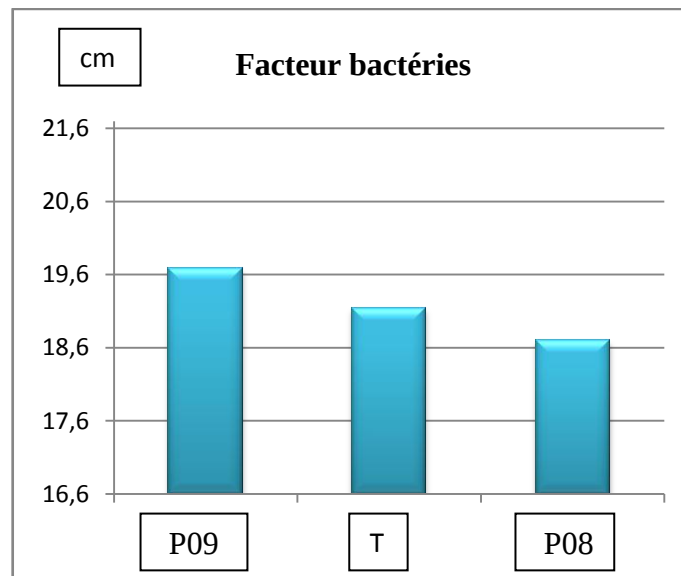


Figure 11: effets de facteur bactérie sur la longueur racinaire (cm).

5.2. Hauteur des tiges:

Selon L'analyse de la variance (annexe03), effectué sur la hauteur des tiges a révélée un effet non significative pour le facteur substrat, le substrat (sol+plomb) a enregistré une moyenne de 21,68 cm, et le substrat (Sol-Pb) une moyenne de 22,58 cm.

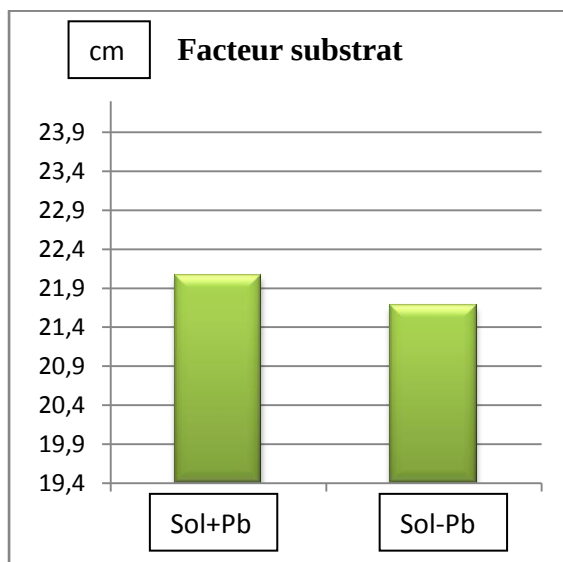


Figure12: effets de facteur substrat sur la hauteur des tiges (cm).

De même pour le facteur bactérie les résultats sont non significatifs, la souche bactérienne (P08) a enregistré une moyenne de 22, 31cm, suivi par le Témoin avec une moyenne de 21, 80cm, et la souche (P09) avec moyenne de 21, 48cm.

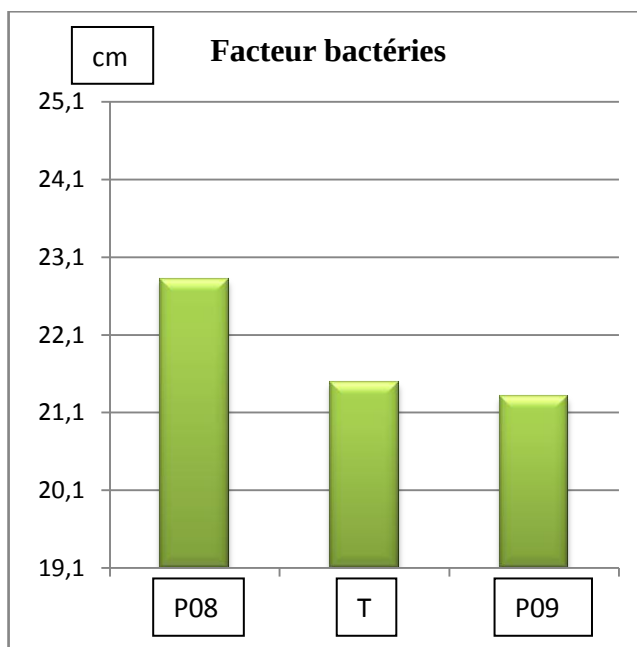


Figure 13: effets de facteur bactérie sur hauteur des tiges (cm).

5.3. Poids frais des racines :

Selon L'analyse de la variance (annexe04), Le facteur substrat a montré une différence non significative avec un poids de 1,31g pour le substrat (sol+plomb) et 0,58g pour le substrat (Sol-Pb).

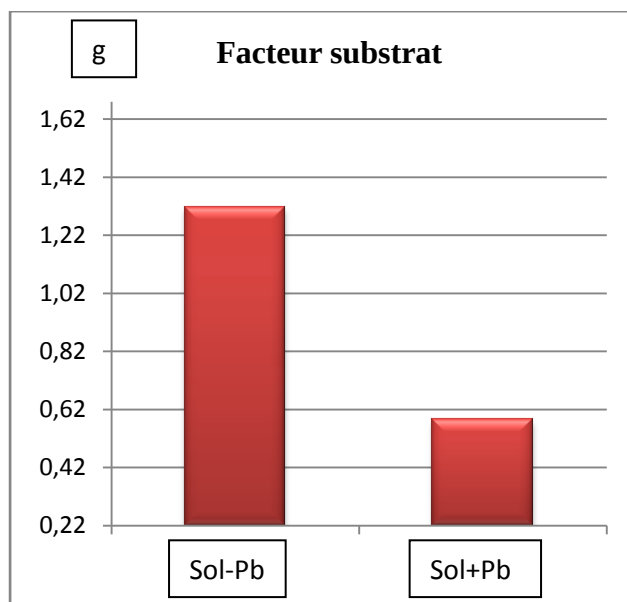


Figure 14: effets de facteur substrat sur le poids frais des racines (g).

L'effet des bactéries sur le poids frais des racines, a révélé une différence non significative, le Témoin non bactérisé a donné une moyenne de 1,32g, les souches bactériennes P08 et P09 ont donné respectivement des moyennes de 0,95g et 0,57g.

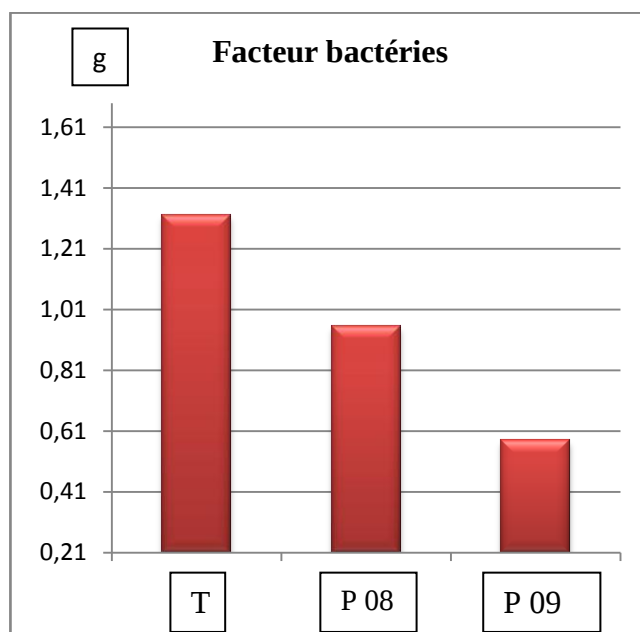


Figure15: effets de facteur bactérie sur poids frais des racines (g).

5.4. Poids frais des tiges :

Concernant le poids frais de la tige, L'analyse de la variance (annexe05), a révélé une différence non significative pour le facteur substrat, le substrat (sol-plomb) et le substrat (sol+plomb) ont enregistré successivement des moyenne de 0,38g et 0,41g.

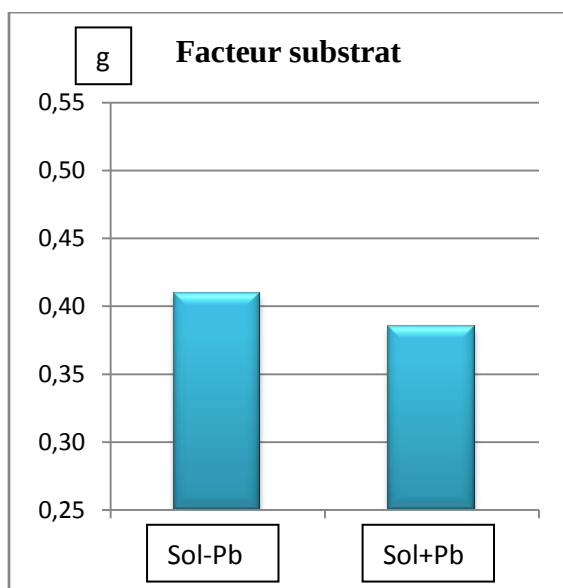


Figure 16: effets de facteur substrat sur le poids frais des tiges (g).

Et elle a révélé une différence non significative pour le facteur bactéries, le témoin non bactérié a donné une moyenne de 0,47g, suivi par les souches bactériennes qui ont donné des moyennes de 0,37g pour la souche (P09) et 0,39g pour la souche (P08).

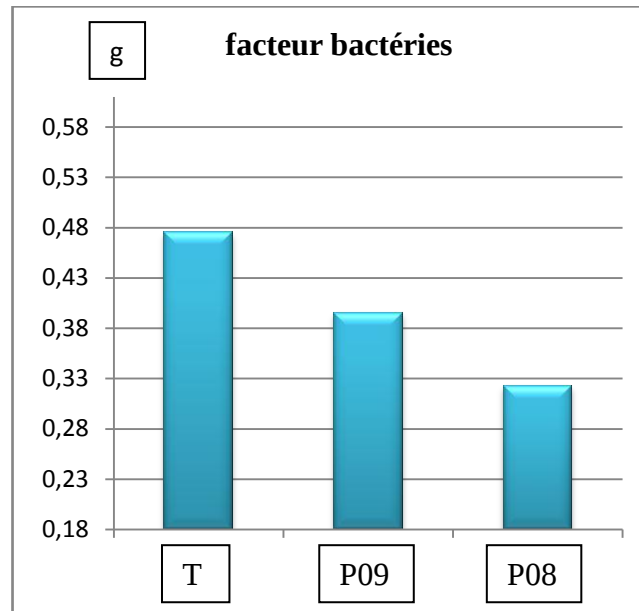


Figure 17: effets de facteur bactérie sur le poids frais des tiges (g).

5.5. Poids sec des racines :

Pour le poids sec des racines, l'analyse de la variance (annexe06), a révélé une différence non significative pour le facteur substrat, le substrat (sol+plomb) a donné une moyenne de 0,63g, et une moyenne de 0,39g pour le substrat (Sol-Pb).

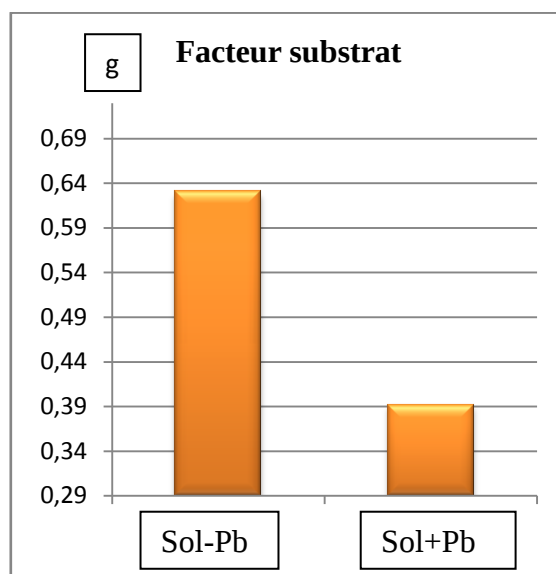


Figure 18: effets de facteur substrat sur le poids sec des racines (g).

Le même effet est obtenu pour les souches bactérienne, une différence non significative, la bactérie(P08) a enregistré une moyenne en poids de 0,57g, le Témoin est classé en deuxième position avec une moyenne 0,49g. En dernier la bactérie (P09) avec une moyenne de 0,46g.

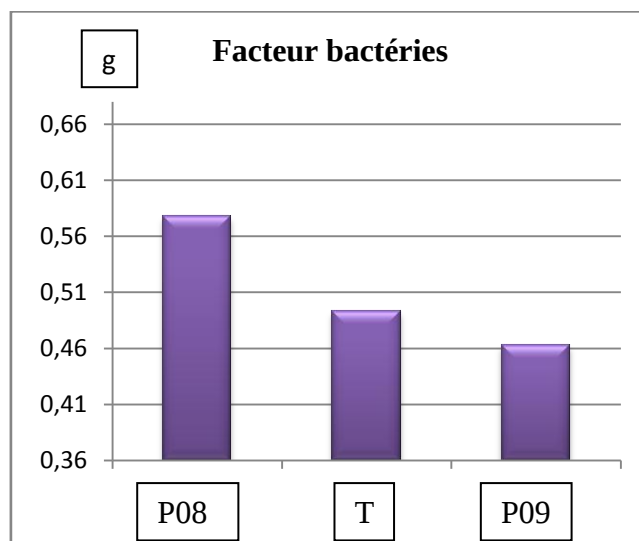


Figure 19: effets de facteur bactérie sur le poids sec des racines (g).

5.6. Poids sec des tiges :

A partir de L'analyse de la variance (annexe07), nous avons observé qu'il ya un effet non significative pour le facteur substrat, le substrat (Sol-Pb) a donné des poids sec avec une moyenne de 0,13 g, et pour le substrat (sol+plomb) a donné une moyenne de 0,17 g.

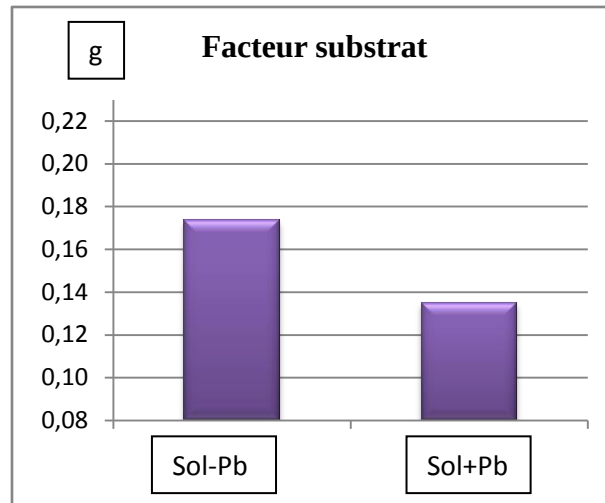


Figure 20: effets de facteur substrat sur le poids sec des tiges (g).

Nous avons observé qui est aussi que le facteur bactérie est non significatif, la souche (P09) a donné des moyenne de 0,18 g, suivie par le Témoin non bactérie avec une moyenne de 0,15 g, et en fin la souche (P08) avec une moyenne de 0,13g.

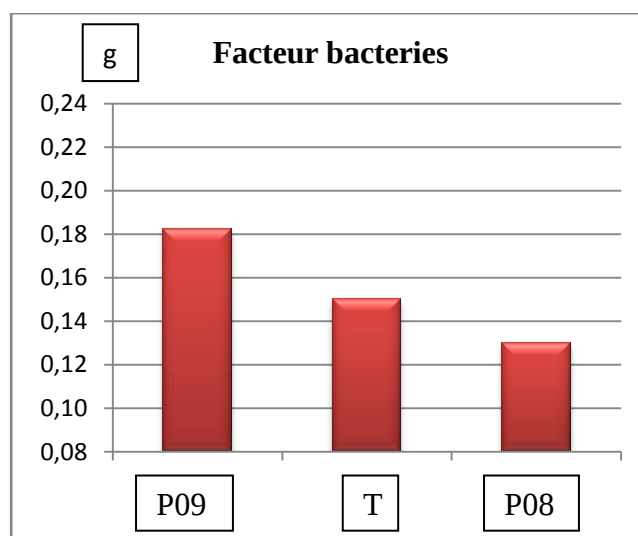


Figure 21: effets de facteur bactérie sur le poids sec des tiges (g).

6. Paramètre physiologique :

6.1. Résultats du dosage de La chlorophylle :

L'effet du plomb sur la teneur en chlorophylles est étudiée en teneurs en chlorophylle **(a)**, chlorophylle **(b)** et en chlorophylle **(a+b)**, où les résultats de l'analyse de la variance ont été non significatifs.

Les résultats soulignés dans la figure (22) ont montré une différence non significative de la teneur en chlorophylle. pour le facteur substrat les teneur en chlorophylle sont représenté par des valeurs de $2,43\text{mg/l}^{-1}$ pour la chlorophylle(a), et de $1,83\text{mg/l}^{-1}$ pour la chlorophylle(b) et de $0,84\text{ mg/l}^{-1}$ pour la chl (a+b) sous le facteur substrat (sol+plomb), et elle sont $1,88\text{ mg/l}^{-1}$ pour Chl(a), et de $1,73\text{mg/l}^{-1}$ pour Chl(b), et de $0,06\text{mg/l}^{-1}$ pour Chl(a+b) sous le facteur substrat (Sol-Pb).

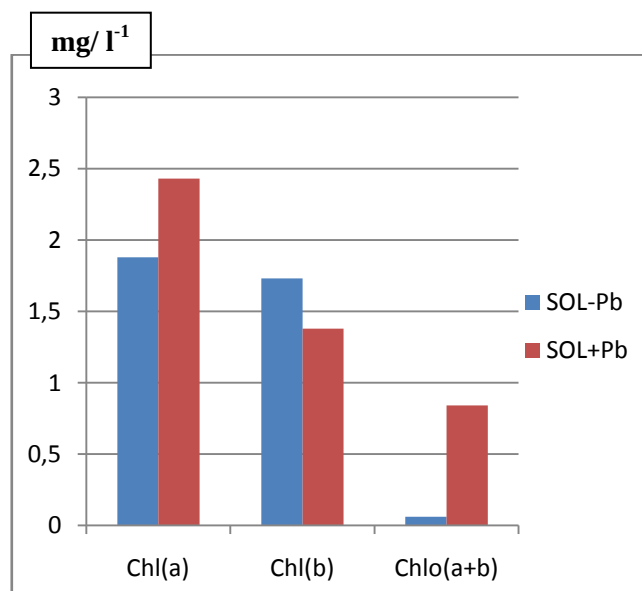


Figure 22: effets de facteur substrat sur le dosage de la chlorophylle mg/l^{-1} .

Les résultats soulignées dans la figure(23), ont montré une différence non significative, de la teneur en chlorophylle pour le facteur bactérie, les teneur en chlorophylle sont représenté par des valeurs de $2,13\text{mg/l}^{-1}$ pour la Chl(a), et de $1,64\text{mg/l}^{-1}$ pour la Chl(b), et de $0,51\text{mg/l}^{-1}$ pour la Chl(a+b) sous la souche (P08), et elle sont de $2,43\text{mg/l}^{-1}$ pour Ch(a), et de $1,52\text{ mg/l}^{-1}$ pour Ch(b), et de $0,93\text{mg/l}^{-1}$ pour Ch(a+b) pour la souche (P09), et elle sont de $1,92\text{mg/l}^{-1}$ pour la Chl(a), et de $1,51\text{ mg/l}^{-1}$ pour la Ch(b), et de $0,24\text{mg/l}^{-1}$ pour la Chl(a+b) pour le Témoin.

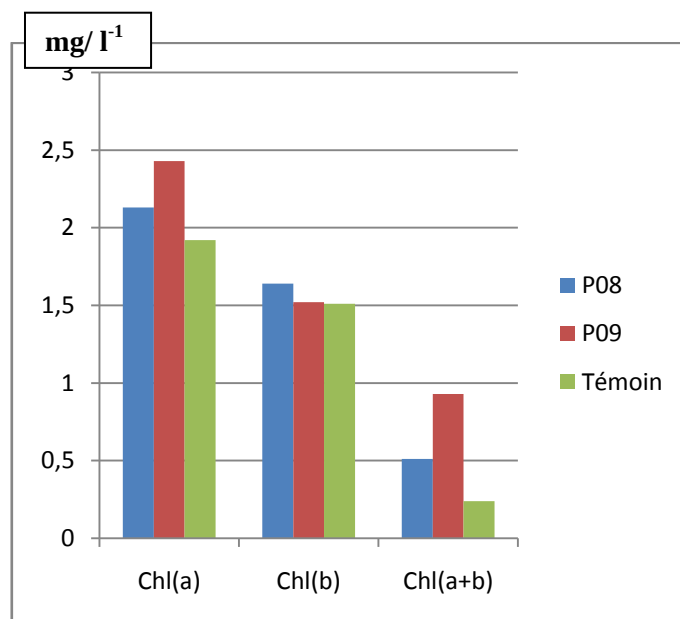


Figure 23: effets du facteur bactérie sur le dosage de la chlorophylle mg/l^{-1} .

6.2. la teneur en proline des feuilles et des racines des plantes de blé:

Les résultats soulignés dans la figure(24) et selon l'analyse de la variance (Annexe11), ont montré une différence non significative de la teneur en proline dans les tiges et dans les racines, le substrat (sol-Pb) a enregistré une moyenne de $0,12 \mu\text{g/g}^{-1}$ par la tige, alors que cette moyenne est de $0,03 \mu\text{g/g}^{-1}$ pour les racines, pour le substrat (sol+plomb) la proline présenté dans les tiges est de $0,06 \mu\text{g/g}^{-1}$, et elle est de $0,05 \mu\text{g/g}^{-1}$ dans les racines.

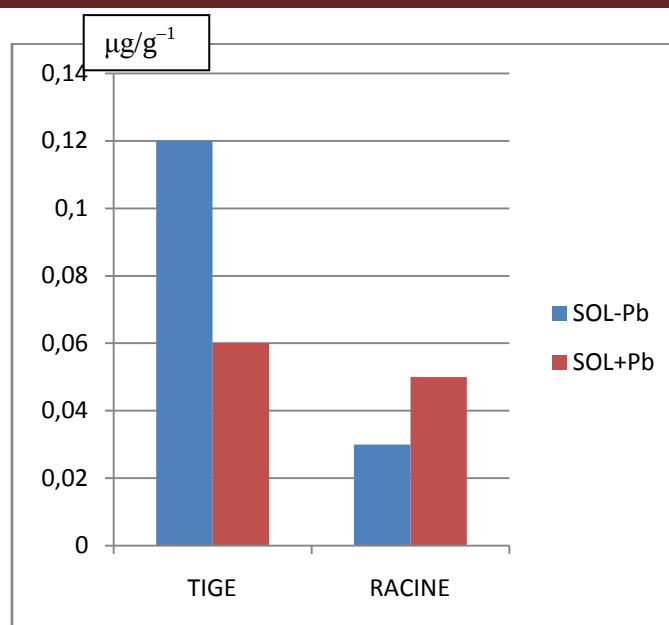


Figure 24: effets de facteur substrat sur le teneur du proline $\mu\text{g/g}^{-1}$.

La souche bactérienne (P09) a donné une teneur de proline de $0,068\mu\text{g/g}^{-1}$ dans les racines, mais le Témoin non bactérisé et la souche (P08) ont donné les mêmes résultats avec moyenne de $0,034\mu\text{g/g}^{-1}$ dans les racines. Et dans les tiges la souche(P08) a donné une teneur de proline de $0,11\mu\text{g/g}^{-1}$, mais le Témoin non bactérisé et la souche (P09) ont donné les mêmes résultats avec moyenne de $0,08\mu\text{g/g}^{-1}$.

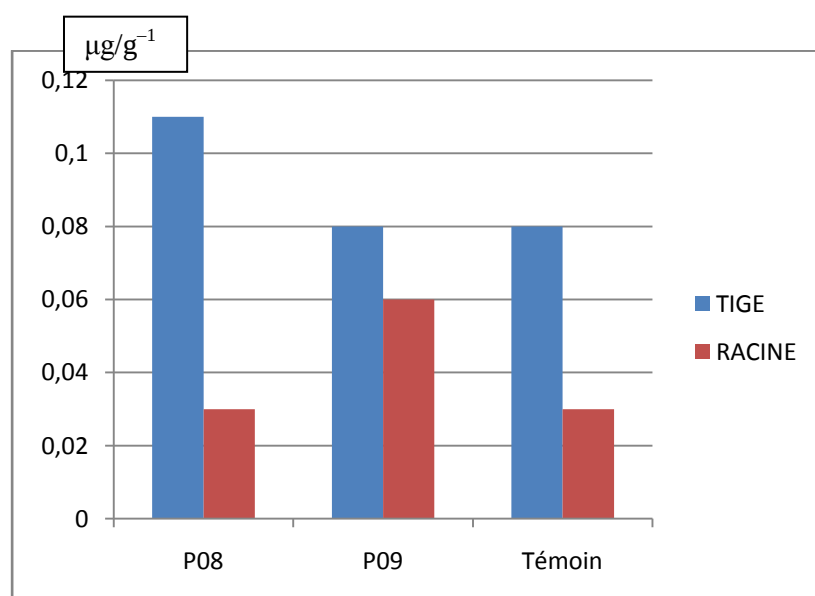
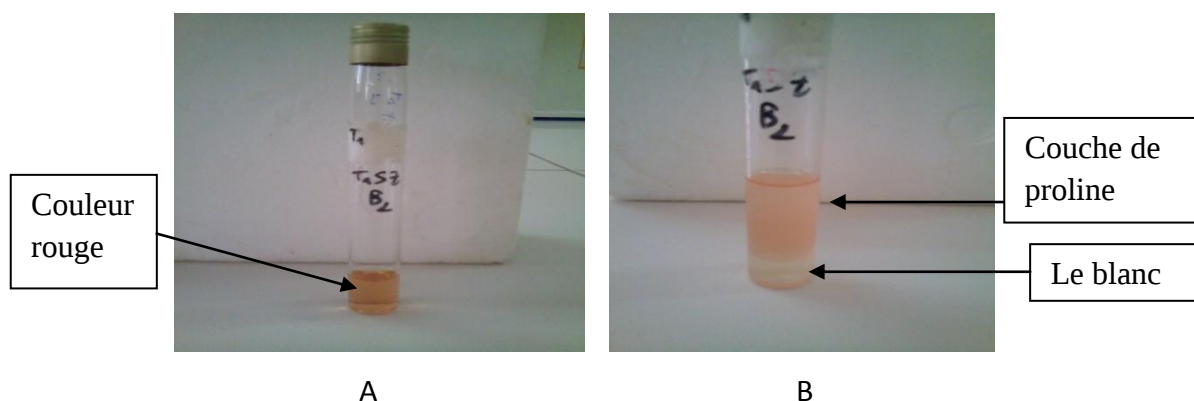


Figure 25: effets de facteur souche sur le teneur de la proline $\mu\text{g/g}^{-1}$.



A : après l'ébullition

B : après ajouté toluène et après agitation au vortex

Figure 26: des tubes représenté les deux phases obtenues pendant l'extraction.

6.3. Résultats de l'extraction et dosage de plomb dans les végétaux :

Pour déterminer la concentration du plomb, nous avons utilisé la spectroscopie d'absorption atomique, L'ensemble des résultats obtenus et Selon la droite d'étalonnage de la spectroscopie d'absorption atomique (Annexe13), ont donné un résultat négatif qui signifié l'absence du plomb dans tous les échantillons.

Discussion

Des résultats des paramètres de croissance et les paramètres physiologiques

Nous visant par ce travail la mise en évidence de l'effet bénéfique de *Pseudomonas fluorescens* sur la croissance des plantes de blé dans un sol pollué par le plomb et sa Bioremédiation.

Les résultats de l'essai de biostimulation des plantes de blé et la bioremédiation de sol sont avérés non significatifs pour l'ensemble des paramètres étudiés que ce sont les paramètres de croissance ou les paramètres physiologiques.

D'après les résultats obtenus, la présence du plomb dans le substrat n'a aucun effet sur le végétal, cela a peut être expliqué par le fait que le plomb par sa forme apporté (poudre de plomb) n'est pas encore été dissous dans la solution du sol durant la période de notre essai (de 30 jours), et cela est confirmé par les résultats des paramètres physiologiques, la teneur en proline, en plus de la chlorophylle.

La proline est souvent citée comme l'osmolyte le plus largement distribué et accumulé sous de conditions environnementales variées (Lepoivre., 2003 ; Parre *et al.*, 2007). En effet, la proline est un acide aminé souvent considéré comme un biomarqueur de stress (Szabados et Savouré., 2009 ; Djerroudi-Zidane *et al.*, 2010 ; Boublenza ., 2012). Selon Mile *et al.* (2002), l'accumulation de proline est une des stratégies adaptatives déclenchées par la plante face aux contraintes de l'environnement. Selon un autre point de vue, l'accumulation de la proline n'est pas une réaction d'adaptation au stress, mais plutôt le signe d'une perturbation métabolique (Cheik M'hamed *et al.*, 2008).

Cette accumulation affecte les feuilles et les racines de plantes stressées. Selon Hassni *et al.* (2008), cette accumulation permet la protection de la membrane cellulaire et participe à l'ajustement osmotique. En plus, Thery *et al.* (2004) ; Djeddi(2006) puis Hadjadj *et al.* (2011) pensent que les quantités accumulées pourraient être liées au niveau de tolérance aux stress.

La teneur en pigments chlorophylliens est souvent utilisée pour évaluer l'impact de nombreux stress environnementaux. Au niveau physiologique une exposition au plomb entraîne de nombreuses perturbations dans les parties aériennes, en particulier l'appareil photosynthétique (Seregin et Ivanov, 2001 ; Sharma et Dubey, 2005).

De ce fait plusieurs travaux montrent que le plomb a une influence sur la réduction de la teneur en pigments chlorophylliens (chlorophylles et caroténoïdes). Ceci pourrait être attribué d'une part, au stress oxydatif que provoque l'inhibition de l'acide aminolévulinique déshydratase (ALAD), une enzyme importante dans la biosynthèse de la chlorophylle (Pereira et *al.*, 2006) et d'autre part, le plomb peut agir directement sur le transport des électrons et des enzymes du cycle de Calvin (en particulier la Rubisco) et indirectement induit une diminution de la teneur en chlorophylle (Chatterjee et Chatterjee, 2000).

Le plomb, en induisant une fermeture des stomates, limite considérablement les flux gazeux entre les feuilles et le milieu extérieur. Cette limitation du flux de CO_2 entrant est considérée comme la cause principale de la forte réduction de la fixation du CO_2 (Bazzaz et *al.*, 1975 ; Parys et *al.*, 1998). Les ions du plomb peuvent aussi être la cause principale de la détérioration de la structure et de la composition des thylakoïdes et des chloroplastes, ce qui a pour effet d'altérer les photosynthèses (Yrueala, 2005). Chose qui n'est pas remarquée pour nos plants traités par le plomb.

Les souches bactériennes n'ont révélées aucun effet significatif sur la croissance végétale malgré que la souche P8 a donné des résultats significatifs selon les essais de biostimulation de la croissance végétale du blé *in vivo* et *in vitro* réalisés par Monir (2015).

Conclusion

Conclusion :

Le plomb pose actuellement des problèmes importants en matière de contamination de l'environnement. Les plantes, du fait de leur immobilité, sont particulièrement vulnérables à l'effet délétère de ce contaminant.

L'objectif de ce travail était d'étudier des effets du plomb sur les paramètres de croissance et physiologiques du plant de blé, et les possibilités de développer des procédés de Bioremédiation assistée par des bactéries productrices de sidérophores dans le but de dépolluer des sols contaminés par des éléments traces métalliques (Cas de Plomb).

Au cours de ce travail, nous avons effectué la technique de la bioremédiation des sols contaminés ont été effectués à partir des bactéries qui se trouvent les *Pseudomonas fluorescents*, ont permis la sélection deux souches parmi des cinq souches à partir le test de concentration minimal inhibitrice(CMI), les souches testées tolèrent des doses élevées de plomb les résultats montrent que la souche **P09** est la plus résistante avec une concentration de **280mg/l** suivie par les souches **P08** et **M4E3** avec une concentration de **140mg/l**.

Concernant les paramètres de croissance (mensuration sur les racines et les tiges) et les paramètres physiologiques (la détermination de la teneur en proline, la teneur en chlorophylle, l'extraction et dosage de plomb dans les végétaux) a été réalisé. Prouvé que l'ensemble des paramètres sont non significatives.

Les résultats du test de viabilité, la concentration des populations bactériennes variées entre 10^5 - 10^8 CFU/ml. Pour mettre en évidence les effets bénéfiques.

Enfin et pour faire suite à cette étude, plusieurs pistes de travail peuvent être envisagées nous suggérons:

- Refaire l'essai en utilisant l'acétate de plomb ou le nitrate de plomb, à différentes doses.
- Prolonger la durée de l'expérimentation.
- Faire des tests supplémentaires sur le sol (enzymatique, taux de plomb dans le sol, etc.....).
- Dosage de plomb dans le sol.
- Extraction et dosage des sucres solubles, l'extraction et dosage des éléments minéraux calcium (Ca), potassium (K⁺) et sodium (Na⁺).
- Faire des tests sur les bactéries elles-mêmes.

- L'application de différentes méthodes de la bioremédiation dans le cadre de la décontaminer les sites pollués.

Référence
Bibliographique

Références bibliographiques

- **Adriano, D. 2001.** *Trace elements in terrestrial environments: Biochemistry, bioavailability and risks of metals.* Springer-Verlag, New York.
- **Arnon, D. 1949.** *Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoxidase in Beta vulgaris.* *Plant Physiol*, 24: P1-15.
- **Azzouz, F. 2011.** *Effet de l'interaction plomb-salinité sur les réponses physiologiques et biochimique d'une halophyte (Atriplex halimus L.) et d'une glycophyte (Vicia faba L.).* Mémoire de magister .P65.
- **Bahme, J. B. et Schroth, M. N. 1987.** *Spatial-temporal colonization patterns of a rhizobacterium on underground organs of potato.* *Phytopathology* 77: 1093-1100.
- **Baize, D. 1997.** *Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France).* INRA Editions, Paris, p 408.
- **Barkay, T. Schaefer, J. 2001.** *Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials.* *Current Opinion in Microbiology*, 4: P318-323.
- **Bazzaz, F. Carlson, R. Rolfe, G. 1975.** *“Inhibition of com and sunflower photosynthesis by lead “.* *Physiologia plantarum*, 34: P326-329.
- **Belimov, A. Hontzeas, N. Safronova, V. Demchinskaya, S. Piluzza, G. Bullitta, S. Glick, B. 2005.** *Cadmium tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (Brassica juncea L. Czern.).* *Soil Biol. Biochem*, 37: P241–250.
- **Bell-Perkins, L. Lynch, J. 2002.** *Rhizosphere microbiology*, p. 2713-2728. In G. Bitton (ed.), *Encyclopedia of environmental microbiology*, A Wiley-Interscience Publication, Canada.
- **Berthelin, J. 1983.** *Microbial weathering processes.* In WE Krumbein, ed, *Microbial Geochemistry.* Blackwell Scientific Publications, Oxford *Biotechnology* 11: 334-343.
- **Bleecker, A. Kende, H. 2000.** *Ethylene: a gaseous signal molecule in plants.* *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 16: P1-18.
- **Blum, W. Brandstetter, A. Wenz, W. W. 1997.** *Trace element distribution in soils as affected by land use.* In *Biogeochemistry of Trace Metals*, Science reviews. Compréhension devenir l'évaluer. p432.

- **Bond, P. Druschel, G. Banfield, J. 2000.** *Comparison of acid mine drainage microbial communities in physically and geochemically distinct ecosystems.* *Applied and Environmental Microbiology*, 66: P4962.
- **Bonjean A, Picard E. 1991.** *Les céréales à paille : Origine-histoire-économie-sélection.* Ligugé; Poitiers : Aubin imprimeur. 36p.
- **Boopathy, R. 2000.** *Factors limiting bioremediation technologies.* *Bioresource Technology* 74: P63-67.
- **Bosecker, K. 1997.** *Bioremediation: Metal solubilization by microorganisms.* *Fems Microbiology Reviews*, 20: P591-604.
- **Boublenza, F. 2012.** *Etude du stress osmotique chez des lactocoques isolé de lait de chamelle de timimoun.* Thèse de doctorat. Laboratoire de microbiologie appliquée.
- **Bouchoukh, I. 2009.** *Comportement éco-physiologique de deux chénopodiacées des genres atriplex et spinacia soumises au stress salin.* Mémoire de magistère en Ecologie et biotechnologie végétale. Université mentouri-constantine, Algérie, 103 :P 38-91-92.
- **Bourrelier, P. Berthelin, J. 1998.** *Contamination des sols par les éléments traces: les risques et leur gestion.* CR. Acc Sci, 42. Ed. Lavoisier, Paris.
- **Braud, A. Hannauer, M. Mislin, GLA. Schalk, IJ. 2009.** *The Pseudomonas aeruginosa pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity.* *Journal of Bacteriology*, 191: P3517- 3525.
- **Braud, A. Jezequel, K. Bazot, S. Lebeau, T. 2010.** *Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria.* *Chemosphere*, 74: P280-286.
- **Brimecombe, M. Leij, F. et Lynch, J. 2007.** *Rhizodeposition and microbial population*, p. 74-98. In R. Pinto, Z. Varanini, P. Nannipieri (ed.), *The rhizosphere : biochemistry and organic substances at the soil-plant interface.* CRC Press. New York.
- **Chandra Sekhar K, Kamala CT, Chary NS, Balaram V, Garcia G. 2005.** *Potential of Hemidesmus indicus for phytoextraction of lead from industrially contaminated soils.* *Chemosphere*, 58: P507-514.
- **Chatterje, J. Chatterje, C. 2000.** *Management of phytotoxicity of cobalt in tomato by chemical measures.* *Plant science*, 64: P793-801.
- **Cheikh M'hamed, H. Abdellaoui, R. Kadri, K. Ben naceur, M. Bel hadj, S. 2008.** *Evaluation de la tolerance au stress salin de quelques accessions d'orge (Hordium vulgareL.) cultivées en tunisie : Approche physiologique.* P30-37.

- **Compant, S. Duffy, B. Nowak, J. Clément, C. Ait Barka, E. 2005.** *Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects.* Appl. Environ. Microbiol, 71: P4951-4959.
- **Cunningham, C. Philip, J. 2000.** *Comparison of bioaugmentation and biostimulation in ex situ treatment of diesel contaminated soil.* Land Contamination and Reclamation, 8: P261-269.
- **Davet, P. 1996.** *Vie microbienne du sol et production végétale.* Institut national de la Recherche Agronomique, INRA, 75338 Paris Cedex 07 : ISBN 2-7380-0648-5. P383.
- **Digat, 1992.** *Contrôle biologique et stimulation de germination par la bacterisation.* Phytoma- Défense des végétaux 441 :34-38.
- **Dimkpa, C. Tanjaweinad, I. Asch, F. 2009.** *Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions.* Plant Cell Environ. doi:10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x. P1-13.
- **Djeddi, H. 2006.** *Utilisation des eaux d'une station d'épuration pour l'irrigation des essences forestières urbaines.* Mémoire de magistère. Laboratoire d'Ecologie végétale. Université Mentouré Constantine. P92.
- **Djerroudi-Zidane, O. Belkhodja, M. Bissati, S. Hadjiadj, S. 2010.** *Effet stress salin sur l'accumulation de proline chez deux espèces d'Atriplex halimus L. et Atriplex canescens(Pursh) Nutt.* European journal of scientific research. Vol.41. n°2 : P248-295.
- **Dommergues , Y . Mangenot , F. 1970.** *Ecologie microbienne du sol .Paris : Masson,* P76.
- **Droogers P. Bouma, J. 1997.** *Soil survey input in exploratory modelling of sustainable soil management practices,* J. Am. Soil Sci. Soc, 61: P1704-1710.
- **Duffus, J. 2002.** « Heavy metals »- A meaningless term? Pure Appl. Chem, 74: P793-807.
- **Eyi Ndong, H . 2009.** *Etude des champignons de la forêt dense humide consommés par les populations du nord du Gabon.* Thèse de doctorat: Université de Ouagadougou. p265.
- **Faugier, A. 2011.** *Diversité bactérienne des sols : accès aux populations à effectifs moniritaires « the rare biosphere ».* Thèse de Doctorat. L'école Centrale de Lyon. P174.
- **Ferous, P. Arkosiova, M. 2001.** *Variability of chlorophyll content under fluctuating environment,* Actafytotechnicaetzootechnica, Vol, 4, Special number proceedings of the international scientific.

- **Fuchs, J, Herisse,J. 1996.***biophyt sa*. In Fuchs, J. *Fertilité des sols : Les produits biologiques: bien les connaître pour mieux les utiliser*. 13 Schulstrasse : Mellikon. P 01.
- **Gadd, G .1990.** *Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms*. Cellular and Molecular Life Sciences, 46: P834-840.
- **Gadd, G. 2007.** *Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation*. Mycol Res, 111: P3-49.
- **Gadd, J.M. 2000.** *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. Raskin. I and Ensley. B.D., John Wiley et Sons, Inc, New York. P304.
- **Garbeva, P. van Veen, J. van Elsas, J. 2004.** *Assessment of the diversity, and antagonism towards Rhizoctonia solani AG3, of Pseudomonas species in soil from different agricultural regimes*. Fems Microbiology Ecology, 47: P51-64.
- **Gopal,R. Rizivi,A. 2008.** *Excess lead alter growth,metabolism and translocation of certain nutrients in radish*. Chemospher 70 (9): P1539-1544.
- **Gorbushina, AA. 2007.** *Life on the rocks*. Environmental Microbiology **9**: 1613-1631.
- **Goulding, K. W. T. Blake,L . 1998.** *Land use, liming and the mobilization of potentially toxic metals*, J. Agri. Ecos. Environ, 67: P135-144.
- **Gray, E. Smith, D. 2005.** *Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signalling processes*. Soil Biol. Biochem, 37: P395-412.
- **Haas, D. Defago, G. 2005.** *Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads*. Nat. Rev. Microbiol, 3: P307-319.
- **Hadjadj, S. Djerroudi, O. Bissati, S. 2011.** *Etude comparative des mécanismes biochimiques tolérance au stress salin de deux espèces d'atriplex : Atriplex halimus L. et Atriplex canescens(purch) Nutt.*Algerian journal of arid environment. Vol.1.n⁰2. P3-10.
- **Hannauer, M. Braud, A. Hoegy, F. Ronot, P. Boos, A. Schalk, IJ. 2012.** *The PvdRT-OmpQ efflux pump controls the metal selectivity of the iron uptake pathway mediated by the siderophore pyoverdine in Pseudomonas aeruginosa*. Environmental Microbiology, 14: P1696- 1708.
- **Hassani, A. Dellal, A. Belkhodja, M. Kaid-Harache, M. 2008.** *Effet de la salinité sur l'eau et certains osmolytes chez l'orge (Hordeum vulgare L.)*.Eroupean jornal of scientific research. Vol. 23. n⁰.1. P61-69.

- **Heitzer A, Sayler G .1993.** *Monitoring the efficacy of bioremediation. Trends in Biotechnology*, 11: P334-343.
- **Hersman, L. Lloyd, T. Sposito, G. 1995.** *Siderophore-promoted dissolution of hematite.*
- **Hider, RC. Kong, X. 2010.** *Chemistry and biology of siderophores. Natural Product Reports*, 27: P637-657.
- **Hutchins, S. Sewell, G. Kovacs, D. Smith, G. 1991.** *Biodegradation of aromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions. Environmental Science & Technology*, 25: P68-76.
- **Hutchinson, S. Schwab, A. Banks, M .2003.** *Biodegradation of petroleum hydrocarbon in the rhizosphere. In Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants (eds S C McCutcheon and J L Schnoor), John Wiley et Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, pp 355-386.*
- **Huynh,D .2009.** *Impacts des métaux lourds sur l'interaction plante/ ver de terre/ microflore tellurique.* thèse de doctorat : Université de Paris Est.
- **Jacques, P. Delfosse, P. Ongena, M. Lepoivre, P. Cornélis, P. Koedam, N. Neirinckx, L. Thonart, P. 1993.** *Les mécanismes biochimiques développés par les Pseudomonas fluorescents dans la lutte biologique contre les maladies des plantes transmises par le sol. Cahiers Agric*, 2 : P301-307.
- **Jourdan, E. Ongena, M. Thonart, P. 2008.** *Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. Biotechnol. Agron. Soc. Enviro*, 12: P437-449.
- **Kabata-Pendias, A. Pendias, H. 2001.** *Trace elements in soils and plants.* CRC Press, London.
- **Kamilova. F. Validov, S. Azarova, T. Mulders, I. Lugtenberg. B. 2005.** *Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. Environ. Microbiol*, 7: P1809–1817.
- **Karnwal, A. 2009.** *Production of indole acetic acid by fluorescent Pseudomonas in the presence of L-Tryptophan and rice root exudates. J. Plant Pathol.* 91: P61-63.
- **Kennedy, A. Luna, L.2004.** *Rhizosphere*, p. 399-409. *In* D. Hillel, C. Rosenzweig, D. Powlson, K. Scow, M. Singer, D. Sparks (ed.), *Encyclopedia of soil in the environment*. Vol03. Columbia University, USA.

- **Kinge et al. 1954** .two simple media for the demonstration of pycianin and flourescin . 44eme edition: l clin med. p301 – 307.
- **Klement, z. 1990.** *Methods in phltobacteriology*. Ed printed: Hungary. 568p.
- **Latour X, Philippot L, Corberand T, Lemanceau, P .1999.** *The establishment of an introduced community of fluorescent Pseudomonads in the soil and in the rhizosphere is affected by the soil type. Fems Microbiology Ecology*, 30: P163-170.
- **Lemanceau, P. 1992.** *Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des Pseudomonas spp. fluorescents. Agronomie*, 12: P 413-437.
- **Lepoivre, P. 2003.** *Phytopathologie bases moléculaires des stratégies de lutte. 1^{ere} édition*, de Boeck et Larcier, Bruscelles : P28-29.
- **Liss, S. Bicho, P. Saddler, J. 1997.** *Microbiology and biodegradation of resin acids in pulp mill effluents: a minireview. Canadian Journal of Microbiology*, 43: P599-611.
- **Loué, A. 1993.** *Oligo-éléments en agriculture*. Ed. Nathan (ed), 45-177.
- **Lugtenberg, B, Kamilova, F. 2009.** *Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annu. Rev. Microbiol.* 63: P541-56.
- **Martin-prevel, P. Gagnarad, J. Gautier, P. Drouineeau, G. 1984.** *Analyse végétale dans le contrôle de l'alimentation des plantes tempérées et tropicales. technique et documentation-lavoisier.* P161-179.
- **Mayak, S. Tirosh, T. Glick, B. 2004 a.** *Plant growth- promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomato and pepper. Plant Sci*, 166: P525-530.
- **Mayak, S. Tirosh, T. Glick, B. 2004b.** *Plant growth- promoting bacteria confer resistance in to tomato plants to salt stress. Plant Physiol. Biochem.* 42: P565-572.
- **McGrath, S. Zhao, F. Lombi, E. 2002.** *Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. Advances in Agronomy*, 75: P1-56.
- **Meyer, J .2000.** *Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent Pseudomonas species. Archives of Microbiology*, 174: P135-142.
- **Meyer, JM. Gruffaz, C. Raharinosy, V. Bezverbnaya, I. Schafer, M. Budzikiewicz, H. 2008.** *Siderotyping of fluorescent Pseudomonas: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. Biometals*, 21: P259-271.
- **Mille, O. Mészáros, I. Veres, S. Lakatos, G. 2002.** *Ecophysiological study on the salt tolerance of a pannonian endemism (Lpidium crassifolium(W. et K)) in inland saline*

- area, P249-250. In proceedings of the 7th Hungaricum congress on plant physiology, S6-P04. Hngray.
- **Milner, J.L., L. Silo-Suh, J.C. Lee, H. He, J. Clardy, et J. Handelsman. 1996.** *Production of kanosamine by Bacillus cereus UW85.* Appl. Environ. Microbiol, 62: P3061-3065.
 - **Mulligan, C. Yong, R .2004.** *Natural attenuation of contaminated soils.* Environment International ,30: P587-601.
 - **Nakayama, T. Homma, Y. Hashidoko, Y. Mizutani, J. Tahara, S. 1999.** *Possible role of xanthobaccins produced by Stenotrophomonas sp. strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease.* Appl. Environ. Microbiol, 65: P4334-4339.
 - **O'Sullivan, DJ. Ogara, F. 1992.** *Traits of fluorescent Pseudomonas spp involved in suppression of plant root pathogens.* Microbiol. Rev, 56: P662-676.
 - **Olson, P. Reardon, K. Pilon-Smits, E .2003.** *Ecology of rhizosphere bioremediation. In Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants (eds S C McCutcheon and J L Schnoor),* John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, p317-354.
 - **Paff, SW. Bosilovich, BE. 1995.** *Use of lead reclamation in secondary lead smelters for the remediation of lead contaminated sites.* Journal of Hazardous Materials, 40: P139-164.
 - **Parre, E. Chars, M. Leprince, A. Thiery, L. 2007.** *Calcium signaling via phospholipase cis essential for proline accumulation upon ionic but not non-ionic hyperosmotic stresses in.* Plant physiol, 16: P588-599.
 - **Parys, E. Romanowska, E. Sidlecka, M. Poskuta, J. 1998.** *The effect of lead on photosynthesis and respiration in detached leaves and in mesophyll protoplasts of Pisum sativum.* Acta physiologiae plantarum, 20: P313-322.
 - **Pereira, L. Tabaldi, L. Goncalves, J. Jukoski, J. Pulletto, M. 2006.** *Effet of aluminium on inolevulinic acid dehydratase (ALAD) and the development of cucumber (Cucumis sativus).* Environ Exp Bot, 57: P106-115.
 - **Perrier, T. 2004.** *Etude théorique et expérimentale du comportement biogéochimique de l'Américium-241 en conditions rhizosphériques simplifiées. Application dans un sol agricole calcaire.* Thèse de Doctorat: l'Université Henri Poincaré Nancy I. P337.
 - **Pierre, G. 2010.** *Les sources de pollution des sols: Essai de quantification des risques dus aux éléments traces.* Direction de la prévention des pollutions. P14.

- **Poole, K. McKay GA. 2003.** *Iron acquisition and its control in Pseudomonas aeruginosa:*
- **Powell, PE. Cline, GR. Reid, CPP. Szaniszlo, PJ. 1980.** *Occurrence of hydroxamate siderophore iron chelators in soils. Nature*, 287: P833-834.
- **Pujic, P. Normand, P. 2009.** *La symbiose racinaire entre la bactérie Frankia et les plantes actinorhiziennes. Biofutur*, 298: P26-29.
- **Rabhi, N. 2012.** *isolement de pseudomonas spp.fluorescents d'un sol salé,effet d'osmoprotecteurs naturels. Mémoire de magistère : université de Sétif.p32. radionuclides. Advances in Agronomy*, 75: P1-56.
- **Ramos Solano, B. Barriuso Maicas, J. Gutiérrez Mañero, F. 2008 .** *Physiological and molecular mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)*, p. 41- 52. In : Ahmad, I. Pichtel, J. Hayat, S. Plant-bacteria interactions. Wiley -Vch,Weinheim.
- **Raskin, I. Kumar, N.P.B.A. Dushenkov, S. Salt. D.E. 1994.** *Bioconcentration of heavy metal by plant. Current Opinion in biotechnology*, 5: P285-290.
- **Ratledge, C. Dover, L.G. 2000.** *Iron metabolism in pathogenic bacteria. Annu.Rev. Microbio.*, 54: P881–941.
- **Ravel, J. Cornelis, P.2003.** *Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. Trends in Microbiology*, 11: P195-200.
- **Reed, M. Glick, B. 2005.** *Growth of canola (Brassica napus) in the presence of plant growth-promoting bacteria and either copper or polycyclic aromatic hydrocarbons. Can. J. Microbiol*, 51: P1061-1069.
- **Robert, M. Juste, C. 1999.** *Dynamique des éléments traces de l'écosystème sol.* In Club CRIN Environnement et Ministère de l'environnement. Spéciation des métaux dans le sol. Paris: CRIN.
- **Rohwerder, T. Gehrke, T. Kinzler, K. Sand, W. 2003.** *Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. Applied Microbiology and Biotechnology*, 63: P239-248.
- **Salt, D.E. Blaylock, M. Kumar, N.P.B.A. Dushenkov, S. Ensley, B.D. Chet, I. Raskin, I. 1995.** *Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. Biotechnology*, 5: p285-290.
- **Sayler, G. Ripp, S. 2000.** *Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes. Current Opinion in Biotechnology*, 11: P286-289.

- **Selmi R. 2000.** *Fin du mythe de l'autosuffisance alimentaire et place aux avantages comparatifs.* Revue Afrique Agriculture. N° 280.P30-23.
- **Serengin, I. Ivaniov, V. 2001.** *Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants.* Russian journal of plant physiology, 48: P523-544 et 606-630.
- **Sharma, P. Dubey, R. 2005.** *Lead toxicity in plants.* Brazilian journal of plant physiology, 17: P35-52.
- **Singh, O. Labana, S. Pandey, G. Budhiraja, R. Jain R. 2003.** *Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil.* Appl. Microbiol. Biotechnol, 61 : P405-412.
- **Smith, M. 1990.** *The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria.* Biodegradation, 1: P191-206.
- **Spaepen, S. Vanderleyden, J. Remans, R. 2007.** *Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling.* FEMS Microbiol. Rev, 31: P425-448.
- **Szabados, L. Savouré, N. 2009.** *Proline : A multifunctional amino acid.* Review. Trends in plant science. Vol. 15: 89-97.
- **Thery, L. Leprince, A. Lefebvre, D. Ghars, M. Debarbieux, E. Savouré, A. 2004.** *Phospholipase D Is a negative regulator of proline biosynthesis in Arabidopsis thaliana.* J. Biol. Chem.279, (15): P14812-14818.
- **Tilak, K. Ranganayaki, N. Pal, K. Saxena, R. Nautiyal, A. Shilpi Mittal, C. Tripathi, A. Johri, B. 2005.** *Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria.* Curr. Sci, 89: P136-150.
- **Tokala, R. Strap, J. Jung, C. Crawford, D. Salove, H. Deobald, L. Bailey, F. Morra. M. 2002.** *Novel plant microbe rhizosphere interaction involving S. lydicus WYEC108 and the pea plant (Pisum sativum).* Appl. Environ. Microbiol. 68: P2161-2171.
- **Troll, W. Lindsley, J. 1955.** *A photometric method for determination of proline.* J. Biol. Chem. N° 215, p 655 - 660.
- **Troxler, J. Svercel, M. Natsch, A. Zala, M. Keel, C. Moenne-Loccoz, Y. Defago, G. 2012.** *Persistence of a biocontrol Pseudomonas inoculant as high populations of culturable and nonculturable cells in 200-cm-deep soil profiles.* Soil Biology & Biochemistry, 44: P122-129.
- **Uroz, S. Calvaruso, C. Turpault, MP. Frey-Klett, P. 2009.** *Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms.* Trends in Microbiology **17**: 378-387.

- **Van Loon, L. 2007.** *Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria.* Eur. J. Plant Pathol, 119: P243-254.
- **Van Loon, L. Bakker, P. 2005.** Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria, p39-66. In Z.A. Siddiqui (ed.), PGPR: biocontrol and biofertilization. Springer Science Dordrecht, The Netherlands.
- **Van Oort, F. Gaultier, J. P. Hardy, R. Bourennane, H. 2002.** *Distributions spatiales de métaux et stratégies d'échantillonnage dans les sols du périmètre agricole d'une friche industrielle.* In : Les Eléments métalliques dans les sols-Approches fonctionnelles et spatiales. INRA-Editions, p281-297.
- **Vidali, M. 2001.** *Bioremediation.* An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73: P1163-1172.
- **Vogel, T. 1996.** *Bioaugmentation as a soil bioremediation approach.* *Current Opinion in Biotechnology*, 7: P311-316.
- **Weyens, N. Monchy, S. Vangronsveld, J. Taghavi, S. Vander Lelie, D. 2010.** *Plant-Microbe Partnerships*, p254-2564 . In K.N. Timmis (ed.), Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- **Whippes, J. 2001.** *Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere.* J. Exp Bot, 52: P487-511.
- **Yang, X. Feng, Y. He, Z. Stoffella, P .2005.** *Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation.* Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 18: P339-353.
- **Yruela, I. 2005.** *Copper in plants: Acquisition, transport and interactions.* Braz, j. Plant physiol, 17: P145-156.
- **Zahir, Z. Arshad, M. Frankenberger, W. . 2004.** *Plant growth promoting rhizobacteria : application and perspectives in agriculture.* Adv. Agro, 81: P97-198.
- **Zappi, M. Rogers, B. Teeter, C. Gunnison, D. Bajpai, R. 1996.** *Bioslurry treatment of a soil contaminated with low concentrations of total petroleum hydrocarbons.* Journal of Hazardous, 46: P1-12.
- **Zerrad, W. Hillali, S. Mataoui, B. El antri, S. Hmyene, A. 2006.** *Etude comparative des mécanismes biochimiques de résistance au stress hydrique de deux variétés de blé dur.* Lebanese science journal, vol. 09, P02.
- **Zhang, J. Nguyen, H. Blumo, A. 1999.** *Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plant.* Journal of exp. P50-322.

- **Zobell, C. 1946.** *Action of microorganisms on hydrocarbons.* *Bacteriology Review*, 10: P1-49.

Annexe

Annexe 01 : Milieu de King B

- ✓ Peptone 20g
- ✓ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,5 g
- ✓ K_2HPO_4 1,5 g
- ✓ Agar agar 15 g
- ✓ Eau distillée 1000 ml

Annexe 02 : Analyse de longueur racinaire:

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var.TOTALE	109,954	11	9,996		
Var.FACTEUR 1	2,632	1	2,632	0,155	0,707
Var.FACTEUR 2	1,957	2	0,978	0,058	0,944
Var.INTER F1*2	3,461	2	1,731	0,102	0,904
VAR.RESIDUELLE 1	101,904	6	16,984		
				Coef. variation %	21,492

Facteur 01 : substrat :

ID	modalité	moyenne	groupe homogène
1	Sol	18,707	A
2	Sol+Pb	19,643	B

Facteur 02 : bactérie :

Id	modalité	moyenne	groupe homogène
1	(P08)	18,698	A
2	(P09)	19,685	B
3	Témoin	19,143	C

Annexe 03: analyse de variance d'hauteur tige :

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var.TOTALE	130,468	11	11,861		
Var.FACTEUR 1	0,429	1	0,429	0,021	0,884
Var.FACTEUR 2	5,431	2	2,715	0,134	0,876
Var.INTER F1*2	3,449	2	1,725	0,085	0,919
VAR.RESIDUELLE 1	121,159	6	20,193		
				Coef. variation %	20,548

Facteur 01 : substrat :

Id	modalité	moyenne	groupe homogène
1	Sol	21,680	A
2	Sol+Pb	22,058	B

Facteur 02 : bactérie :

Id	modalité	moyenne	groupe homogène
1	(P08)	22,815	A
2	(P09)	21,308	B
3	Témoin	21,485	C

Annexe 04 : analyse de variance de poids frais de la racine :

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var.TOTALE	6,940	11	0,631		
Var.FACTEUR 1	1,606	1	1,606	2,961	0,134
Var.FACTEUR 2	1,103	2	0,551	1,016	0,418
Var.INTER F1*2	0,976	2	0,488	0,900	0,457
VAR.RESIDUELLE 1	3,255	6	0,542		
				Coef. variation %	77,459

Facteur 01 : substrat :

Id	modalité	moyenne	groupe homogène
1	Sol	1,317	A
2	Sol+pb	0,585	B

Facteur 02 : bactérie :

Id	modalité	Moyenne	groupe homogène
1	(P08)	0,955	A
2	(P09)	0,578	B
3	Témoin	1,320	C

Annexe 05 : Analyse de variance de poids frai de la tige :

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var.TOTALE	0,526	11	0,048		
Var.FACTEUR 1	0,002	1	0,002	0,025	0,875
Var.FACTEUR 2	0,047	2	0,023	0,305	0,750
Var.INTER F1*2	0,019	2	0,010	0,125	0,885
VAR.RESIDUELLE 1	0,459	6	0,076		
				Coef. variation %	69,547

Facteur 01 : substrat :

Id	modalité	moyenne	groupe homogène
1	Sol	0,410	A
2	Sol+pb	0,385	B

Facteur 02 : bactérie :

Id	modalité	Moyenne	groupe homogène
1	(P8)	0,323	A
2	(P9)	0,395	B
3	Témoin	0,475	C

Annexe 06 : analyse de variance de poids sec de la racine :

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var.TOTALE	0,574	11	0,052		
Var.FACTEUR 1	0,170	1	0,170	4,378	0,080
Var.FACTEUR 2	0,028	2	0,014	0,366	0,711
Var.INTER F1*2	0,142	2	0,071	1,822	0,241
VAR.RESIDUELLE 1	0,234	6	0,039		
				Coef. variation %	38,622

Facteur 01 : substrat :

Id	modalité	moyenne	groupe homogène
1	Sol	0,630	A
2	Sol+pb	0,392	B

Facteur 02 : bactérie :

Id	modalité	Moyenne	groupe homogène
1	(P8)	0,578	A
2	(P9)	0,463	B
3	Témoin	0,493	C

Annexe 07: Analyse de variance de poids sec de la tige :

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var.TOTALE	0,079	11	0,007		
Var.FACTEUR 1	0,004	1	0,004	0,397	0,557
Var.FACTEUR 2	0,006	2	0,003	0,253	0,786
Var.INTER F1*2	0,003	2	0,001	0,127	0,883
VAR.RESIDUELLE 1	0,067	6	0,011		
				Coef. variation %	68,365

Facteur 01 : substrat :

Id	modalité	moyenne	groupe homogène
1	Sol	0,173	A
2	Sol+pb	0,135	B

Facteur 02 : bactérie :

Id	modalité	Moyenne	groupe homogène
1	(P8)	0,130	A
2	(P9)	0,183	B
3	Témoin	0,150	C

Annexe 08: Analyse de variance de La chlorophylle :(a+b)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var.TOTALE	5,363	11	0,488		
Var.FACTEUR 1	0,930	1	0,930	1,571	0,256
Var.FACTEUR 2	0,530	2	0,265	0,448	0,662
Var.INTER F1*2	0,353	2	0,177	0,299	0,754
VAR.RESIDUELLE 1	3,550	6	0,592		
				Coef. variation %	35,613

Facteur 01 : substrat :

Id	modalité	moyenne	groupe homogène
1	Sol	1,882	A
2	Sol+pb	2,438	B

Facteur 02 : bactérie :

Id	modalité	moyenne	groupe homogène
1	P08	2,120	A
2	P09	2,435	B
3	Témoin	1,925	C

Annexe 09: Analyse de variance de La chlorophylle :(a)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var.TOTALE	5,579	11	0,507		
Var.FACTEUR 1	0,913	1	0,913	1,450	0,274
Var.FACTEUR 2	0,532	2	0,266	0,423	0,676
Var.INTER F1*2	0,357	2	0,178	0,283	0,765
VAR.RESIDUELLE 1	3,777	6	0,630		
				Coef. variation %	36,776

Facteur 01 : substrat :

Id	modalité	moyenne	groupe homogène
1	Sol	1,88	A
2	Sol+pb	2,43	B

Facteur 02 : bactérie :

Id	modalité	moyenne	groupe homogène
1	P08	2,11	A
2	P09	2,43	B
3	Témoin	1,92	C

Annexe 10: Analyse de variance de La chlorophylle :(b)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var.TOTALE	1,346	11	0,122		
Var.FACTEUR 1	0,364	1	0,364	2,691	0,150
Var.FACTEUR 2	0,038	2	0,019	0,139	0,872
Var.INTER F1*2	0,133	2	0,066	0,490	0,638
VAR.RESIDUELLE 1	0,812	6	0,135		
				Coef. variation %	23,563

Facteur 01 : substrat :

Id	modalité	moyenne	groupe homogène
1	Sol	1,73	A
2	Sol+pb	1,38	B

Facteur 02 : bactérie :

Id	modalité	moyenne	groupe homogène
1	P08	1,64	A
2	P09	1,52	B
3	Témoin	1,51	C

Annexe 11: Analyse de variance de La proline (les racines) :

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var.TOTALE	0,018	11	0,002		
Var.FACTEUR 1	0,001	1	0,001	0,566	0,485
Var.FACTEUR 2	0,003	2	0,001	0,762	0,510
Var.INTER F1*2	0,002	2	0,001	0,561	0,601
VAR.RESIDUELLE 1	0,012	6	0,002		
				Coef. variation %	97,553

Facteur 01 : substrat :

Id	modalité	moyenne	groupe homogène
1	Sol	0,036	A
2	Sol+pb	0,055	B

Facteur 02 : bactérie :

Id	modalité	moyenne	groupe homogène
1	P08	0,034	A
2	P09	0,068	B
3	Témoin	0,034	C

Annexe 12: Analyse de variance de La proline (les feuilles) :

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
Var.TOTALE	0,042	11	0,004		
Var.FACTEUR 1	0,013	1	0,013	3,376	0,114
Var.FACTEUR 2	0,003	2	0,001	0,357	0,717
Var.INTER F1*2	0,002	2	0,001	0,230	0,802
VAR.RESIDUELLE 1	0,024	6	0,004		
				Coef. variation %	67,338

Facteur 01 : substrat :

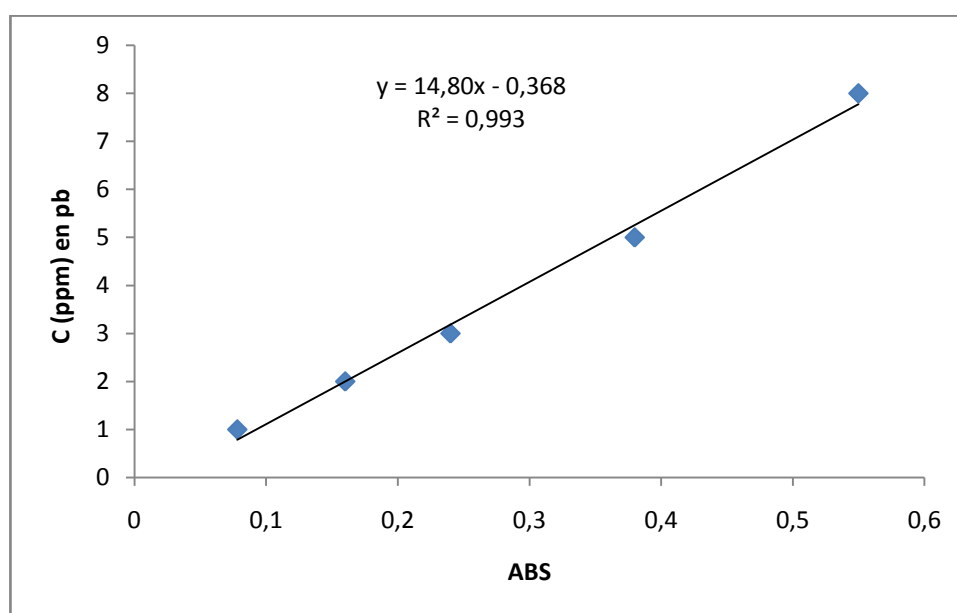
Id	modalité	moyenne	groupe homogène
1	Sol	0,12	A
2	Sol+pb	0,06	B

Facteur 02 : bactérie :

Id	modalité	moyenne	groupe homogène
1	P08	0,11	A
2	P09	0,08	B
3	Témoin	0,08	C

Annexe 13: Extraction et dosage dans les végétaux :

abs	c
0,078	1
0,16	2
0,24	3
0,38	5
0,55	8



Droite d'étalonnage de la spectroscopie d'absorption atomique pour Le dosage Plomb