

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

## Université Constantine 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie

### Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master  
Spécialité : Microbiologie Générale  
Option: Biotechnologie des Mycètes, fermentation et production de substances  
fongiques.

**Identification des bactéries endophytes résistantes au Plomb et au Cadmium  
isolées des racines de deux plantes steppiques :**

*Lygeum spartum et Hedysarum pallidum*

**Présenté par:**

**CHERIET Hanane            et            BELHI Ikram**

**Jury d'évaluation :**

<b>Présidente:</b>	<b>Mme MOSBAH F.</b>	<b>M.A. Univ. Constantine 1</b>
<b>Examinatrice:</b>	<b>Mme LEGHLIMI H.</b>	<b>M.C. Univ. Constantine1</b>
<b>Encadreur:</b>	<b>Mme KASSA LAOUAR M.</b>	<b>M.A. Univ.Constantine1</b>

**Année Universitaire**

**2013-2014**

## *Dédicaces*

*En ces moments précieux, je tiens à dédier ce travail fruit de labeur et sueur à ma MAMAN chérie qui m'a beaucoup aidée dans mes études et qui a toujours été présente dans les moments sombres de ma vie. Elle m'a apporté soutien, amour, tendresse et douceur. Je n'oublierai jamais ses sacrifices envers tous ses enfants, elle est la source de leurs réussites, je ne cesserai d'apprécier son amour et sa gratitude pour tout ce qu'elle a fait pour nous le long de sa vie*

*Ma très chère MAMAN je t'aime.*

*À mon PAPA, écolier de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner de l'aide et à me protéger.*

*Que dieu les garde et les protège.*

*À mes chères sœurs:*

*La gracieuse IMEN et son mari Mohamed cherif et son adorable petit ange AYOUB.*

*Adorable et bien aimée, HASNA à qui je souhaite une bonne réussite au BAC.*

*Mon âme sœur MERIEM ma meilleure amie, que je remercie beaucoup pour son soutien*

*Très chère Oumniya que j'aime beaucoup.*

*À mon unique frère ILYES.*

*À mes très chères tantes et chers oncles, ainsi qu'à leurs familles.*

*À tous mes cousins et cousines spécialement Houssein et surtout Tamer qui m'a été d'un grand soutien.*

*À la mémoire des défunts : mes grands pères, oncle Youcef et tante Chadia.*

*À tous ceux qui me sont chers.*

*À tous ceux qui m'aiment.*

*À tous ceux que j'aime.*

## **IKRAM**

Avant tout je tiens dédier ce travail à ...

*Mes très chers parents SOUAD et AZZEDINE qui se sont dévoués corps et âmes pour me voir réussir dans ma vie, que Dieu les garde.*

*Mes frères Abde almounaan, Abde raouf et Souhail*

A ma grande famille : Mes grands parents, mes tantes, mes oncles ainsi que leurs maris et épouses.

*A mes amies .Hanane, Miya , Meriem, Marwa, Zaho, Kouka et Roumaisa*

## SOMMAIRE

INTRODUCTION.....1

### Revue bibliographique

I. Rhizosphère.....3

1. Définition..... 3

1.1. Interface sol-racine.....3

2. Communautés microbienne de la rhizosphère.....4

2.1. Endophytes .....4

2.1.1. Champignons.....5

2.1.2. Bactéries.....5

3. Physiologie bactérienne .....8

3.1. Besoin nutritifs des bactéries et milieux de culture .....8

3.2. Milieux de cultures.....9

3.2.1. Milieux synthétiques.....9

3.2.2. Milieux empiriques.....9

4. Méthode d'étude bactérienne.....9

4.1. Observation macroscopiques.....10

4.2. Observation microscopiques.....10

4.2.1. Observation à l'état frais.....10

4.2.2. Observation après coloration de Gram.....10

4.2.3. Coloration de Gram.....10

4.2.4. Coloration de spore.....11

5. Etude des caractères biochimiques et physiologiques des bactéries.....11

5.1. Etude du métabolisme respiratoire.....11

5.2. Etude du métabolisme glucidique.....	12
5.3. Etude du métabolisme protéique.....	12
5.4. Galeries d'identification.....	12
II. Métaux lourds.....	13
1. Définition.....	13
1.1. Métaux essentiels .....	14
1.2. Métaux toxiques.....	14
2. Caractères chimiques des métaux lourds.....	14
3. Origine des métaux lourds dans le sol.....	15
3.1. Origine naturelle.....	15
3.2. Origine anthropique.....	15
4. Mobilité et biodisponibilité des métaux lourds.....	16
4.1. Teneur en argile des métaux lourds.....	16
4.2. pH.....	17
4.3. Potentielle redox.....	17
4.4. Activité biologique.....	17
5. Contamination des soles par les métaux lourds.....	18
5.1. Cas du Plomb.....	19
5.2. Cas du Cadmium.....	19
6. Métaux lourds dans la plante.....	19
6.1. Absorption racinaire.....	20
6.2. Accumulation.....	20
7. Notion de tolérance et résistance.....	21
7.1. Notion de tolérance.....	21
7.2. Notion de résistance.....	21
8. Résistance des bactéries aux métaux lourds.....	21
9. Mécanisme de résistance.....	22
10. Champignons résistantes aux métaux lourds.....	24

## **Matériels et méthodes**

1. Objectif de l'étude.....	26
2. Description de la zone d'étude.....	26
3. Description des plantes étudiées.....	26
4. Echantillonnage.....	29
5. Isolement et caractérisation des bactéries endophytes .....	29
5.1. Isolement .....	29
5.2. Coloration de Gram de bactéries endophytes .....	30
6. Testes de toxicité.....	31
6.1. Sélection de bactéries endophytes résistantes .....	31
6.2. Concentration minimal inhibitrice (CMI).....	31
7. Identification des souches bactériennes résistantes au Pb et Cd .....	31
7.1. Test biochimiques .....	32

## **Résultats et discussion.**

1. Isolement des souches résistantes .....	36
2. Test de toxicité.....	36
3. Détermination de la C.M.I .....	40
4. Identification des souches .....	41
4.1. Coloration de Gram .....	41
4.2. Tests biochimiques .....	41

<b>CONCLUSION</b> .....	45
-------------------------	----

<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	47
--	----

<b>ANNEXES</b> .....	53
----------------------	----

<b>RESUMES</b>	
----------------	--

## Liste des abréviations

<b>ADH</b>	Arginine-dihydrolase :
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>(As)</b>	Arsenic
<b>(Ag)</b>	Argent
<b>(Au)</b>	Or
<b>(Cd)</b>	Cadmium
<b>CEC</b>	Capacité d'échange de cation
<b>CMI</b>	Concentrations minimales inhibitrices
<b>(Cu)</b>	Cuivre
<b>(Eh)</b>	Potentiel redox
<b>(Fe)</b>	Fer
<b>(Hg)</b>	Mercur
<b>LBE</b>	Laboratoire de Biologie et Environnement
<b>LDC</b>	Lysine-décarboxylase :
<b>mM</b>	Milli molaire
<b>(Ni)</b>	Nickel
<b>ODC</b>	Ornithine-décarboxylase :
<b>(Pt)</b>	Platine
<b>PC</b>	Phytochélatines
<b>(Pb)</b>	Plomb
<b>ROS</b>	Réactive Oxygen Species
<b>(Se)</b>	Sélénium
<b>(Sn)</b>	Etain
<b>(Sb)</b>	Antimoine
<b>TDA</b>	Tryptophane Désaminase
<b>(Zn)</b>	Zinc

# Liste des Tableaux

**Tableau 1:** Souches étudiées.

**Tableau 2:** Souches obtenues après ensemencement sur les milieux spécifiques.

(Plante. *Lygeum spartum*)

**Tableau 3:** Souches obtenues après ensemencement sur les milieux spécifiques

(Plante. *Hedysarum pallidum*)

**Tableau 4:** Résultats de test de toxicité à 2mM Pb.

**Tableau 5 :** Résultats de test de toxicité à 0.5mM Cd.

**Tableau 6 :** Résultat d'ensemencement des souches résistantes à 2mM Pb sur les milieux spécifiques .

**Tableau 7 :** Résultat d'ensemencement des souches résistantes à 0.5 mM Cd sur les milieux spécifiques .

**Tableau 8 :**Résultats de la CMI pour le Plomb .

**Tableau 9:** Résultats de la CMI pour le Cadmium .

**Tableau 10:** Résultat d'ensemencement des souches résistantes, ayant une CMI plus de 3mM Pb, sur les milieux spécifiques.

**Tableau 11:** Résultat d'ensemencement des souches résistantes, ayant une CMI de 1.5mM Cd, sur les milieux spécifiques.

**Tableau 12:** Résultats globales des tests biochimiques des souches résistantes au Cadmium obtenues sur milieu Mac conkey.

**Tableau 13 :** Résultat globale des tests biochimiques des souches résistantes au Plomb obtenues sur milieu Mac conkey .



**Tableau 14 :**Résultats globale des tests biochimiques des souches résistantes au Cadmium obtenues sur milieu Cetrimide.

**Tableau 15:** Identification traditionnelle des Entérobactéries (1)

**Tableau 16 :** Identification traditionnelle des Entérobactéries (2)

**Tableau 17 :** Identification traditionnelle des Pseudomonas

**Tableau 18 :** Identification des Entérobactéries .

**Tableau 19 :** Identification des Pseudomonas .

## Liste des figures

**Figure 1 :** Distribution des souches Gram – et Gram + chez les deux plantes

*Hedysarum pallidum Lygeum Spartum.*

**Figure 2 :** Distribution des souches Gram + et Gram- chez

*Lygeum Spartum.*

**Figure 3 :** Distribution des souches Gram+ et Gram- chez *Hedysarum pallidum*

**Figure 4 :** Test de toxicité au Plomb.

**Figure 5 :** Test de toxicité au Cadmium .

**Figure 6 :** Bactéries résistantes à 2mM de Plomb .

**Figure 7 :** Bactéries résistantes à 0.5mM de Cadmium .

**Figure 8 :** Résultats de la CMI pour le Plomb.

**Figure 9 :** Résultats de la CMI pour le Cadmium.12

## Introduction

---

### Introduction

La pollution des sols par les métaux lourds représente un risque important pour la santé publique en raison des pathologies variées que peuvent engendrer ces éléments. La dispersion de ces éléments dans l'environnement provient soit des processus naturels (roches magmatiques, métamorphiques et sédimentaires), soit des activités humaines (déchets urbains, utilisation d'engrais, des colorants, de l'exploitation minière et des processus métallurgiques, des pesticides...) [1].

Dans le sol, les microorganismes représentent la majorité des organismes vivants. Il a été estimé qu'un gramme de sol contenait de 6000 à 50000 espèces bactériennes et jusqu'à 200 milles hyphes fongiques [2]. Les microorganismes rhizosphériques sont capables de dissoudre les éléments minéraux et contribuent à la nutrition minérale des plantes. Cette activité peut donc jouer sur la mobilité et la biodisponibilité des éléments majeurs, mais elle peut également le faire avec des éléments traces (oligo-éléments, métaux lourds) [3].

Les endophytes sont définis comme des communautés microbiennes (bactéries et champignons) qui se trouvent à l'intérieur des tissus végétaux sans causer aucun dommage apparent à l'hôte. Les microorganismes, en particulier les bactéries, peuvent interagir avec les métaux de différentes manières. On peut tout d'abord observer une transformation des métaux par des processus d'oxydation/réduction ou d'alkylation. Ces modifications modifient généralement la toxicité et la mobilité du métal d'origine. Les métaux peuvent également être accumulés par des phénomènes d'adsorption passive au niveau des membranes ou par transport actif à l'intérieur de la cellule [3].

Notre travail a pour but d'isoler des bactéries endophytes à partir des racines de deux plantes steppique *Lygeum spartum* et *Hedysarum pallidum* provenant de déblais de mine de la région du Djebel Hamimet. Des tests de toxicité vis-à-vis de Cadmium et de Plomb ont permis d'isoler des bactéries résistantes à ces deux métaux ainsi la détermination de ses C.M.I. Les souches résistantes à des teneurs élevées en métal sont soumises à une série de tests biochimiques à fin de les identifier.

### 1. Rhizosphère

#### 1.1 Définition

Le terme rhizosphère (éthymologiquement rhiza : racine et sphair : ce qui entoure) a été proposé la première fois en 1904 par le chercheur allemand (Hiltner) pour décrire la zone de sol qui entoure la racine et qui est directement ou indirectement influencée par la racine. La rhizosphère peut être qualifiée de la moitié cachée du système racinaire qui est lui même cryptique.

La rhizosphère, par définition, se distingue d'un horizon de sol quelconque par la présence des racines des plantes. Les racines excrètent ainsi diverses substances minérales et organiques en parallèle de leurs prélèvements d'eau et de sels minéraux [5, 6, 7, 8,9].

Ainsi les racines par leur activité modifient directement ou indirectement les propriétés physico-chimiques mais aussi biologiques du sol environ. Les différentes modalités de ces interactions complexes sont souvent résumées sous le terme d'«effet rhizosphérique» [7].

#### 1.2. Interface sol-racine

Les racines vont être à la source de modifications physico-chimiques et microbiologiques du sol, et plus particulièrement dans la rhizosphère. Ces modifications seront caractérisées comme l'effet rhizosphérique car ils résultent en fait des échanges effectués entre le sol, les microorganismes et les racines. Selon Lemanceau et Heulin (1998) [7], les effets sont les suivants : libération de composés organiques et d'ions, absorption d'eau et d'ions par la racine, respiration de la racine et des microorganismes, synthèse de métabolites microbiens variés.

Cet effet rhizosphérique participe dans une certaine mesure à la genèse des sols. Selon Lemanceau et Heulin (1998), des complexes organo-minéraux sont formés par la liaison des molécules organiques (libérées par les plantes vivantes ou mortes) aux fractions minérales de la roche mère.

Le volume de sol soumis à l'effet rhizosphérique évolue dans le temps et l'espace en fonction du développement racinaire et de l'activité photosynthétique de la plante. La distribution des microorganismes le long des racines n'est donc pas régulière ; les parties apicales et subapicales des

racines forment les principales stations d'accueil, en comprenant également les sites d'émission de racines secondaires, où la libération de composés carbonés est importante dans les exsudats. [10].

### **2. Communauté microbienne de la rhizosphère**

La richesse de la rhizosphère en sucres, amino-acides, acides organiques, isoflavonoïdes, régulateurs de croissance et en enzymes libérées par la plante rend ce microenvironnement un site d'une remarquable activité biologique et d'une richesse naturelle en vers de terre, nématodes, protozoaires, algues, champignons et bactéries [11],

Les microorganismes sont requis dans le processus de la décomposition et le recyclage des nutriments dans la rhizosphère de la plante. Ils jouent aussi un rôle significatif dans l'état de la santé de plantes. Certains sont nuisibles, d'autres sont bénéfiques et certains ne semblent avoir aucun effet [12].

#### **2.1. Endophytes**

Les bactéries endophytes sont omniprésentes chez la plupart des espèces végétales soit de façon latente soit colonisant activement, localement ou de façon généralisé les tissus des végétaux. Plusieurs définitions ont été proposées pour les bactéries endophytes.

Les endophytes vont être définies comme des bactéries qui peuvent être isolées de la surface de tissus végétaux désinfectés, ou extraites de l'intérieur des plantes mais sans dommage visible pour ces dernières.

En général, les bactéries endophytes proviennent de communautés bactériennes épiphytes de rhizosphères ou de phyllosphères, aussi bien que de graines ou de matériels de propagation infestés d'endophytes. En plus de pénétrer dans les plantes par des ouvertures naturelles ou par des blessures, les bactéries endophytes semblent utiliser activement des enzymes hydrolytiques, telles la cellulase et la pectinase, pour atteindre l'intérieur des plantes.

Bien que cette définition n'englobe pas les bactéries endophytes non extractibles ; c'est une définition pratique qui inclut les symbiotes bactériens aussi bien que les bactéries non pathogènes qui colonisent l'intérieur des plantes.

## Revue bibliographique

---

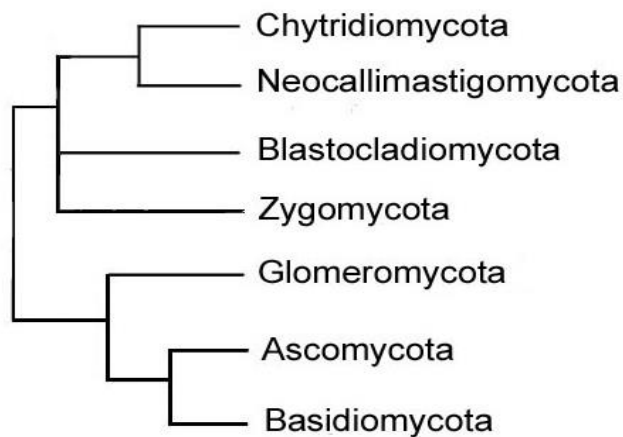
Historiquement, les bactéries endophytes ont été considérées comme des phytopathogènes peu virulents. [12,13,14]

### 2.1.1. Champignons

Les champignons ou Fungi sont des organismes eucaryotes dépourvus de chlorophylle les qualifiant d'organismes hétérotrophes. Une source de carbone organique est donc nécessaire à leur développement. Dans l'arbre du vivant, ils constituent un groupe à part au sein des eucaryotes []

Les classifications les plus récentes font apparaître les champignons dans le règne unique des eucaryotes et plus précisément dans le groupe des [15, 16, 17 et 18]

La classification des champignons est d'abord basée sur le mode de reproduction sexuée. Ce critère définit les groupes principaux : les chytridiomycètes, les zygomycètes, les basidiomycètes et les ascomycètes. Certaines moisissures sont le plus souvent ou exclusivement rencontrées à un stade de multiplication asexuée. Ces organismes sont alors classés d'après le mode de production des spores asexuées ou conidies (voire figure 1) .



**Figure 1** : Les grands groupes des eumycètes [19].

### 2.1.2. Bactéries

Les bactéries font partie des procaryotes, c'est à dire des organismes dont le chromosome n'est pas séparé du cytoplasme par une membrane nucléaire. Le cytoplasme des bactéries est délimité par une membrane cellulaire semi-perméable, à l'extérieure de laquelle se trouve presque toujours une paroi rigide protégeant la cellule. Chez les bactéries mobiles, des cils ou des flagelles provenant du cytoplasme leurs permettent de se déplacer.

Les nutriments des bactéries unicellulaires doivent traverser la paroi puis la membrane cytoplasmique, ce qui n'est possible que pour des molécules relativement petites. Les molécules trop grosses doivent être tout d'abord fragmentées par des enzymes avant de pénétrer dans la cellule.

De nombreuses bactéries du sol revêtent une importance particulière pour la production végétale. Diverses bactéries sont capables de fixer l'azote atmosphérique et de le rendre ainsi disponible pour les plantes. Certaines vivent pour cela en symbiose avec des plantes (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Frankia*, etc.).

Alors que d'autres vivent librement dans le milieu (*Azotobacter*, *Azospirillum* et les Cyanobactéries). D'autres bactéries jouent également des rôles prépondérants dans les cycles de certains éléments fertilisants, comme les bactéries nitrifiantes (*Nitrosomonas* et *Nitrobacter*) ou les bactéries acidifiantes du cycle du soufre (*Thiobacillus*).

Diverses bactéries sont pathogènes et peuvent causer de gros dégâts aux cultures comme: *Erwinia carotovora* sur les carottes, *Xanthomonas fragariae* sur les fraisiers, *Pseudomonas syringae* sur les cucurbitacées, *Streptomyces scabies* sur la pomme de terre, *Agrobacterium tumefaciens* sur diverses plantes.

D'autres bactéries protègent par contre les plantes contre des agents pathogènes telles: *Actinomycetes*, *Streptomyces*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*, *Bacillus subtilis*, etc. Ces bactéries sont appelées antagonistes. Elles sont très importantes pour l'équilibre microbien des sols. La plupart de ces bactéries produisent des antibiotiques qui semblent jouer un rôle non négligeable dans les mécanismes de protection des plantes [20,21].

- **Staphylocoques**

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des coques à Gram positif, groupées en amas ayant la forme de grappes de raisin, immobiles, non sporulés, catalase positive et oxydase négative. Parmi les 27 espèces du genre répertoriées, les principales sont *Staphylococcus aureus*, *S.epidermidis* et *S.saprophyticus* [22]

- **Entérobactéries**

La famille des *Enterobacteriaceae* est une famille hétérogène, elle comprend de nombreux genres bactériens. Ce sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, ils sont aérobies- anaérobies facultatifs et se développent sur milieu ordinaire. Ils sont dépourvus d'oxydase, possédant une catalase et ont la faculté de fermenter le glucose en acides avec ou sans production de gaz, mais aussi de réduire les nitrates en nitrites. Ils ont une mobilité variable en fonction de la présence ou non de flagelles [22].

- **Pseudomonases**

Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien particulièrement important qui comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires. Le nombre d'espèces a subi de nombreuses variations principalement dues à la description de nouvelles espèces et à divers changements de la définition du genre. Le genre *Pseudomonas* est caractérisé par un métabolisme oxydatif et non fermentatif, utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons, et même quelques souches utilisent la dénitrification (les nitrates sont parfois utilisés comme accepteur d'électrons), ce qui permet une croissance en anaérobiose [23].

- **Streptocoques**

Bactérie de forme ronde ou ovoïde, du genre *Streptococcus* qui comprend plusieurs d'espèces, hémolytiques ou non, se présentant le plus souvent en chaînettes, hôte habituel de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux ; chez lesquels elle est à l'origine de nombreuses affections (abrév. strepto)[24].



## Revue bibliographique

---

- **Neisseria**

Les *Neisseria* sont des cocci à Gram négatif, en diplocoques, aérobies stricts, oxydase positive. Certains sont des commensaux des cavités naturelles, tandis que deux espèces *Neisseria meningitidis* et *Neisseria gonorrhoeae* sont des pathogènes [25].

- **Bacillus**

Le genre *Bacillus* est très hétérogène et comprend au moins 36 espèces. Il appartient à la famille des *Bacillaceae*. Il se distingue des autres représentants de la famille par sa morphologie et son type respiratoire. Ce sont des bacilles Gram positif sporulés cultivant en aérobiose, mobiles sauf *Bacillus anthracis*.

Ils possèdent une catalase. Leur type respiratoire est aérobie stricte ou aéroanaérobie : ils sont donc aérobies. Au niveau microscopique, il s'agit généralement de bacilles assez gros, parfois à bouts carrés. Les cultures de *Bacillus* de tout âge montrent des formes Gram + et Gram -, ces dernières étant probablement des morts.

L'examen microscopique est très important pour l'identification : on notera en particulier la place, la forme et l'effet de la spore sur le "sporange". Ce genre apparaît extrêmement hétérogène tant sur le plan génétique que phénotypique (type respiratoire, métabolisme des sucres, composition de la paroi, habitat [26]).

### 3. Physiologie bactérienne

#### 3.1. Besoins nutritifs des bactéries

Les bactéries sont des organismes vivants devant trouver dans l'environnement l'ensemble des substances nécessaires à leur énergie et à leurs synthèses cellulaires.

Leur source d'énergie peut être de nature lumineuse (bactéries phototrophes) ou représentée par des composés minéraux ou organiques divers : on parle alors de bactéries chimiolithotrophes. Parmi cette dernière catégorie de bactéries, on distingue les bactéries chimolithotrophes tirant leur énergie d'un élément minéral et les bactéries chimioorganotrophes les quelles leur source d'énergie est un élément organique.

## **Revue bibliographique**

---

La source de carbone nécessaire à la vie bactérienne peut être le dioxyde de carbone qui est la source de carbone exclusive pour les bactéries autotrophes alors que les bactéries dites hétérotrophes utilisent le carbone de substances organiques diverses comme un alcool, l'acide acétique, l'acide lactique, des sucres divers, ...).

Les bactéries doivent également trouver dans leur environnement une source d'azote et une source de soufre. Les autres éléments nécessaires à la vie bactérienne sont les ions comme le sodium, le potassium, le magnésium, le chlore ; divers oligo-éléments comme le manganèse, le nickel, le zinc, le sélénium, ... ; divers facteurs de croissance comme des acides aminés (acide folique, acide nicotinique, ...) ou des dérivés de l'hème et des vitamines [27].

### **3.2. Milieux de culture**

Leur composition doit permettre la croissance bactérienne et doit donc tenir compte des besoins nutritifs des bactéries. La composition de base de ces milieux comprend des substrats nutritifs (acides aminés, peptides, bases nucléiques, sucres), un système tampon assurant la constance du pH, des sels minéraux, des vitamines et d'autres facteurs de croissance pour certaines bactéries dites exigeantes : sang, protéines, hémoglobine, vitamines supplémentaires [28].

On distingue deux types essentiels de milieux de culture selon leur composition :

#### **3.2.1. Milieux synthétiques**

Ils sont élaborés à partir de diverses substances chimiques pures (organiques ou minérales) et ajoutées dans des proportions idéales pour la croissance des micro-organismes. Les sources de phosphore, de soufre, d'azote et de minéraux sont apportées sous forme de sels (sulfate d'ammonium, chlorure de calcium, phosphate de magnésium). Ils ne sont utilisés que pour certaines analyses particulières [28].

#### **3.2.2. Milieux empiriques**

Ils sont élaborés à partir de la matière organique riche, d'origine animale ou végétale, dans laquelle il est possible de rajouter d'autres constituants nutritifs (glucide, amidon et gélatine) des

## **Revue bibliographique**

---

organiques de base correspond le plus souvent à des extraits de levure, de viande, de cœur, de cervelle, de germe de blé ou des peptones de viande, de soja, de caséines du lait. Ces substrats sont riches en acides aminés, vitamines, minéraux et oligoéléments [28].

### **4. Méthode d'études bactériennes**

Les bactéries sont visualisées au microscope optique sans coloration (état frais) ou après coloration. Diverses techniques de coloration existent, mettant en évidence des affinités tinctoriales différentes telle la coloration de Gram, très utilisée en pratique courante [29].

#### **4.1. Observations macroscopique**

On peut observer les cultures bactériennes en milieu solide ou liquide. En milieu gélosé, une bactérie qui se multiplie donnera naissance à une colonie visible à l'œil nu. En milieu liquide, le développement bactérien se traduira par un trouble, également visible à l'œil nu.

En fonction de la composition du milieu de culture et de la manière dont les germes sont cultivés (en surface ou en profondeur), on peut ainsi déterminer l'aspect des colonies bactériennes : Taille, brillance, texture, contour, couleur, opacité, relief. Cette observation peut apporter certains éléments pour identifier une espèce. [28].

#### **4.2. Observation microscopique**

Il est possible d'observer l'aspect des bactéries au microscope et d'identifier certaines structures cellulaires caractéristiques d'une espèce. On distingue :

##### **4.2.1.1. Observation à l'état frais**

En disposant une goutte de suspension bactérienne sur une lame microscopique ; il est possible de déterminer la morphologie bactérienne (bacille, coccobacille, coque ou vibrion), la longueur et l'épaisseur du germe, le mode de groupement et parfois le déplacement des bactéries mobiles. Il est possible de visualiser les appareils sporifères dont la structure est caractéristique des genres [28].

### 4.2.2. Observation après coloration de Gram

Après avoir disposé et fixé une goutte de la suspension bactérienne sur une lame, on peut colorer les cellules bactériennes. La coloration de Gram est la base de l'identification d'une souche bactérienne. C'est le point de départ du choix des examens complémentaires à effectuer et des milieux à ensemencer.

Au terme du processus de coloration, les bactéries dites « Gram Négatif » apparaissent roses tandis que les bactéries dites « Gram Positif » sont colorés en bleu foncé/violet

La coloration de Gram est une coloration qui teste l'alcool résistance d'une souche bactérienne. En effet, les différences de coloration des bactéries reposent sur des différences de constitution de la paroi. Les bactéries Gram négatives ont une paroi plus fine et très riche en lipides (membrane externe de la paroi) que celles Gram positives. [28].

### 4.2.3. Coloration des spores

Certaines espèces bactériennes, et plus particulièrement le genre *Bacillus* (aérobie strict ou aéro-anaérobie) et *Clostridium* (anaérobie strict), ont la propriété de former des spores, forme de résistance de ces bactéries en particulier vis-à-vis de la chaleur et de la déshydratation.

Les spores, très imperméables, sont parfois visibles à la coloration de Gram sous la forme de zones incolores bien délimitées dans les bactéries ou à l'extérieur. Elles apparaissent très réfringentes à l'état frais.

On peut toutefois les colorer par coloration au vert de Malachite. Cette coloration permet de mettre en évidence les spores (endospores ou exospores). Ce colorant teinte en vert sombre les enveloppes sporales, cependant les bactéries végétatives (et les sporanges) sont colorées grâce à la fushine rose ou à la safranine orange. Il est possible à visualiser la disposition des endospores (centrale, terminale, déformante) [29].

### 5. Etude des caractères biochimiques et physiologiques des bactéries

#### 5.1. Etude du métabolisme respiratoire

Deux activités enzymatiques typiques du métabolisme respiratoire aérobie peuvent être mises en évidence: la catalase et l'oxydase. Ces tests sont très utilisés car ils permettent très rapidement d'orienter l'identification bactérienne.

Ils sont mis en œuvre après la coloration de Gram : le test de la catalase s'effectue sur les bactéries Gram positives, le test de l'oxydase sur des bactéries Gram négatives.

- **Catalase** est une enzyme de détoxification du stress oxydatif qui dégrade le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  en  $O_2$  gazeux.
- **Oxydase** est une enzyme faisant partie de la chaîne respiratoire. Elle permet d'oxyder un réactif incolore en un produit coloré violet [30].

#### 5.2. Etude du métabolisme glucidique

Le métabolisme glucidique peut être étudié pour distinguer certaines espèces par l'identification de produits du métabolisme ou la recherche d'enzymes particuliers [30].

La fermentation glucidique produit divers acides organiques dans le milieu alors que la respiration produit du  $CO_2$  gazeux. La présence d'un indicateur de pH permet de rendre compte de l'acidité produite en présence ou en absence d' $O_2$ . La présence d'un virement de coloration signifie que l'espèce bactérienne fermente le glucose. Les tests colorimétriques en milieu solide ou liquide.

#### 5.3. Etude du métabolisme protidique

L'étude du métabolisme protidique se fait essentiellement par l'identification des enzymes utilisant des acides aminés : désaminases, décarboxylases, et autres enzymes intervenant dans le métabolisme azoté.

- **Désaminases**

Elles coupent la fonction amine des acides aminés. On distingue la phénylalanine désaminase, le tryptophane désaminase (TDA) et la lysine désaminase (LDA).

- **Décarboxylases**

Couper la fonction acide carboxylique des acides aminés. On distingue la lysine décarboxylase, l'arginine dihydrolase et l'ornithine décarboxylase.

### **5.4. Galeries d'identification**

L'identification d'une espèce bactérienne fait appel à un ensemble de milieux, de réactifs et de techniques standardisées qu'on appelle galeries. Celles-ci exploitent les caractéristiques biochimiques et physiologiques des bactéries, par la mise en évidence d'enzymes spécifiques ou de produits du métabolisme. On distingue trois types de galeries :

#### **5.4.1. Galerie traditionnelle en tubes**

Elle comporte une dizaine de milieux de culture et doit être inoculée avec une souche préalablement isolée. Cette galerie n'est plus utilisée en laboratoires d'analyses, mais comporte un intérêt pédagogique, [30].

#### **5.4.2. Galerie miniaturisée**

C'est une plaque en plastique rectangulaire comportant plusieurs microtubes (cupules). Chacun comporte un milieu déshydraté dans lequel on dépose quelques gouttes de la suspension bactérienne. Certaines cupules doivent être recouvertes d'une goutte d'huile de paraffine afin d'établir une anaérobiose. Le principe des tests repose sur celui de la galerie traditionnelle, mais l'analyse est plus simple et plus rapide.

Les résultats obtenus dans chaque cupule sont convertis en un nombre qui permet, à l'aide d'une table de référence, d'identifier avec plus ou moins de précision une espèce bactérienne. Par exemple, la galerie Api 20 des laboratoires Biomérieux permet l'identification précise des espèces des enterobacteriaceae. Cette analyse est pratiquée après le test à la catalase ou à l'oxydase [30].

#### **5.4.3. Carte d'identification**

C'est un procédé automatique de lecture assistée par ordinateur. Elle se présente sous la forme d'une carte dans laquelle se trouve un ensemble de cavités ; contenant un milieu déshydraté, qu'il convient de les remplir par la suspension bactérienne à identifier.

## Revue bibliographique

---

La carte est placée dans un lecteur optique automatique et l'ordinateur donne très rapidement le nom de l'espèce bactérienne avec plus ou moins de précision. Par exemple, la carte Vitek GPI des laboratoires Biomérieux permet l'identification précise des espèces Gram positives, comme *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ou *Listeria monocytogenes*. La carte GNI permet l'identification des entérobactéries [30].

## II. Les métaux lourds

### 1. Définition

Le terme de métaux lourds est arbitraire et imprécis. Il est utilisé pour des raisons de simplicité. Il recouvre des éléments ayant des propriétés métalliques (ductilité, conductivité, densité, stabilité des cations, spécificité de ligand...) et un numéro atomique >20 [32]. De point de vue biologique, on distingue deux groupes de métaux lourds, en fonction de leurs effets physiologiques et toxiques :

#### 1.1. Métaux essentiels

Les métaux essentiels sont des éléments indispensables, à l'état de trace, pour de nombreux processus cellulaires et qui se trouvent en proportion très faible dans les tissus biologiques [33]. 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 [34].

#### 1.2. Métaux toxiques

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) et du cadmium (Cd). [35].

**2. Caractères chimiques des métaux lourds**

La plupart des métaux lourds sont des éléments de transition. Ceux-ci possèdent des orbitales d'incomplètes qui constituent leur couche de valence. Ils peuvent donner des cations métalliques formant des complexes afin de compléter leurs orbitales. Ces complexes ont très souvent des propriétés redox. C'est pourquoi, lorsqu'ils sont à l'état de traces, les cations métalliques jouent un rôle important dans certaines réactions biochimiques.

A haute concentration cependant, ils forment des complexes non spécifiques toxiques pour la cellule. Les éléments présents dans la cellule et essentiels à l'état de traces, comme  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  ou  $Cu^{2+}$ , sont toxiques à plus hautes concentrations [36], ce qui rend indispensable le contrôle strict de l'homéostasie des ions métalliques.

Les métaux de transition comme le cuivre (Cu), l'argent (Ag), l'or (Au), le cadmium (Cd), le platine (Pt) ou le mercure (Hg) ont des propriétés de polarisabilité élevée: le nuage électronique de l'atome se déforme facilement en présence d'un champ électrique. Ils appartiennent à la classe des « métaux ou acides mous » selon la terminologie de Lewis (Tab. 1). Ils sont généralement assez gros et leur charge est faible. Leur polarisabilité leur permet de former des liaisons de coordination avec des « bases molles », telles que les thiolates (réactifs par leur atome de soufre) ou les imidazoles (réactifs par leur atome d'azote). Par exemple, le Cu(I) se lie aux thiolates des cystéines. A l'inverse, les « acides de Lewis durs », comme le cobalt (III), ont une faible polarisabilité : leur nuage électronique est plus ramassé autour du noyau. Ils échangent donc moins facilement leurs électrons et ne participent qu'à des liaisons électrostatiques.

Acides durs	$Li^+$ , $Na^+$ , $Mg^{2+}$ , $Ca^{2+}$ , $Al^{3+}$ , $Cr^{3+}$ , $Fe^{3+}$ , $Co^{3+}$
Acides à la frontière	$Fe^{2+}$ , $Co^{2+}$ , $Ni^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Zn^{2+}$ , $Pb^{2+}$ , $Sn^{2+}$
Acides mous	$Cu^+$ , $Ag^+$ , $Cd^{2+}$ , $Hg^{2+}$ , $Pd^{2+}$ , $Au^+$

**Tableau 1**

Exemples

d'ions acides durs et acides mous [37]



### 3. Origine des métaux lourds dans le sol

#### 3.1. Origine naturelle

Les métaux lourds sont présents de façon naturelle dans le sol. Ils sont majoritairement le résultat de processus géogéniques comme l'érosion, les précipitations géochimiques de roches et de l'eau de source, l'activité volcanique et bactérienne [38].

#### 3.2. Origine anthropique

Les teneurs les plus élevées en éléments inorganiques rencontrées dans les sols sont fortement liées à l'activité humaine. Les principales activités sont les suivantes:

- Pratiques agricoles due aux épandages d'insecticides, de fongicides, d'engrais, de boues résiduaires urbaines ou de composts d'ordures ménagères, etc.
- Pollution dues aux retombées atmosphériques telle que l'industrie extractive et métallurgique, pratiques liées à l'incération, utilisation des énergies fossiles, essence au plomb, etc.
- Stockage de déchets urbains ou industriels dues aux résidus des activités de mines et de fonderies de métaux, installations de stockage de déchets, etc [39].

### 4. Mobilité et biodisponibilité des métaux lourds

La toxicité d'un métal dépend de sa spéciation (forme chimique) autant que des facteurs environnementaux. Dans le sol, les métaux lourds peuvent exister sous forme d'ion libre ou sous forme liée à des particules de sol. Cependant, un métal n'est toxique pour les organismes vivants que s'il est sous forme libre ; il est alors biodisponible. [40]

Comme tout élément chargé positivement, les cations métalliques peuvent interagir dans le sol avec toute particule organique ou minérale chargée négativement. L'équilibre entre les formes libres et les formes fixées de l'ion dépend de sa biodisponibilité, directement liée à sa toxicité.

## **Revue bibliographique**

---

Enfin, la biodisponibilité des métaux lourds varie en fonction de plusieurs facteurs du sol. Parmi lesquels, la capacité d'échange de cation (CEC), le pH, le potentiel redox (Eh), la teneur en phosphate disponible, la teneur en matière organique et les activités biologiques.

### **4.1. Teneur en argile**

Les argiles, de par leurs propriétés physicochimiques, jouent un rôle très important dans la disponibilité des métaux lourds [41]. Les métaux lourds peuvent être absorbés et immobilisés par les minéraux argileux ou également être complexés par la matière organique du sol en formant alors un complexe organométallique.

En effet, la charge électronégative des argiles les rend aptes à contracter des liaisons électrostatiques avec toute entité chargée positivement, comme les cations métalliques. Ces liaisons sont réversibles et les cations fixés sont échangeables. Cette capacité d'échange de cations (CEC) exprimée en milliéquivalents pour 100 g est une caractéristique importante de chaque argile qui conditionne grandement la biodisponibilité d'un métal dans le sol [42].

### **4.2. pH**

Le pH est un important influençant de la solubilité et la spéciation du métal et donc de sa toxicité [43]. Quand le pH diminue d'une unité, la concentration des cations métalliques libres augmente d'environ un facteur 2 dans la solution de sol [44].

Les organismes et les microorganismes eux-mêmes peuvent influencer la disponibilité des métaux lourds dans leur environnement proche ; par acidification locale lors d'une réaction métabolique ou par la production de composés complexant les métaux lourds [45].

### **4.3. Potentiel redox (Eh)**

Le potentiel redox (Eh) permet de caractériser les échanges d'électrons entre les espèces chimiques. Ainsi, les faibles valeurs d'Eh favorisent la dissolution des hydroxydes et entraînent une augmentation de la concentration des métaux associés [46].

De plus, la modification du degré d'oxydation des ligands ou des éléments se liant avec le métal influence indirectement la solubilité des métaux lourds. Par exemple, en conditions réductrices, les sulfates sont réduits en sulfure qui piègent volontiers les éléments métalliques tels que Pb, Cd, Zn [47].

Bien que l'influence des conditions oxydoréductrices du sol semble très importante au regard de la mobilité des éléments métalliques, il n'en demeure pas moins que ce facteur apparaît souvent comme secondaire par rapport au pH. En effet, pour un sol donné l'Eh varie en fonction inverse du pH [48]

#### 4.4. L'activité biologique

La compréhension globale des phénomènes biologiques jouant sur la solubilité des métaux lourds dans les sols est rendue difficile par la multiplicité des actions et les interactions à tous les niveaux.

Parmi les microorganismes on retrouve de nombreuses populations bactériennes et fongiques ; dont les activités métaboliques influencent la mobilité des métaux lourds. Les principaux modes d'action sur la mobilité des polluants métalliques sont la solubilisation, l'insolubilisation et la volatilisation. Cependant, beaucoup de ces phénomènes sont également communs aux plantes :

- La solubilisation provient de la production de composés acides tels que les acides carboxyliques, phénoliques, aliphatiques, nitrique et sulfurique. Certaines bactéries chimiolithotrophes (*Thiobacillus*, *Leptospirillum*, *Galionella*) oxydent le fer et le soufre contenus dans les sulfures et produisent de l'acide sulfurique et libérant ainsi les métaux lourds. Les champignons et les racines des plantes excrètent eux aussi des acides afin d'augmenter leur absorption de nutriments, ou tout simplement comme déchets métaboliques [48]. D'autre part les sidérophores produits par les bactéries, les champignons et les plantes favorisent les déplacements d'éléments métalliques et un transfert diffusif se fait jusqu'aux plantes dans lesquelles ils s'accumulent [46].

- L'insolubilisation constitue le phénomène opposé. Bien que le phénomène de détoxification externe des métaux lourds par des exsudats racinaires n'ait jamais été démontré [49]. Certains acides organiques de faible masse moléculaire, comme les acides oxalique, citrique ou fumarique interviennent dans la complexation intracellulaire d'éléments nutritifs, peuvent être sécrétés dans le milieu extérieur. Ils limiteraient ainsi les transferts par des processus de complexation.
- La volatilisation repose sur l'action directe de certains microorganismes sur le degré d'oxydation de l'espèce métallique. C'est le cas du mercure (Hg), de l'arsenic (As) et du sélénium (Se). La biométhylation permet le transfert de groupements méthyle directement aux atomes, plomb (Pb), étain (Sn), (arsenic) (As), antimoine (Sb) et Sélénium (Se), permettant leur volatilisation dans l'atmosphère [50].

### 5. Contamination des sols par les métaux lourds

Les métaux se répartissent dans les sols sous des formes variées. On les trouve sous forme échangeable dans les argiles et la matière organique qui leur permet d'être absorbés par les plantes. Ils peuvent être inclus dans des phases cristallines ou directement adsorbés sur des particules d'oxydes ou d'hydroxydes de fer, d'aluminium et de manganèse.

La forme des métaux dans les sols dépend de leur composition minéralogique, des conditions de salinité, de pH, d'oxydo-réduction, de la granulométrie du sol, de sa teneur en eau, de la présence de ligands en solution et de microorganismes. Tous ces facteurs influencent la solubilisation des métaux, leur précipitation ou leur adsorption. [51].

#### 5.1. Cas du Plomb

Dans le sol le Pb se trouve sous les formes de  $Pb^{2+}$ ,  $PbHCO_3^+$ ,  $PbOH^+$ ,  $PbSO_4$ ,  $Pb(OH)_2$ ,  $PbCO_3$ ,  $PbO$ ,  $Pb(PO_4)_2$ ,  $PbO(PO_4)_2$ ,  $PbCl^+$  [52]. L'accumulation du Pb, provenant des retombées atmosphériques, ou de déchets contaminés déposés sur le sol, se fait principalement dans les horizons de surface [53] et plus précisément dans les horizons riches en matière organique. Le Pb est très peu prélevé par les racines des plantes où il s'accumule.

## Revue bibliographique

---

Le transfert sol-plante du Pb est négligeable par rapport au dépôt direct sur les parties aériennes de poussières contenant du Pb, sur tout dans les zones urbaines ou industrielles ou le long des grands axes routier [54].

### 5.2. Cas du Cadmium

Dans le sol, le Cd se trouve sous les formes de  $Cd^{2+}$ ,  $CdSO_4$ ,  $CdCl^+$ ,  $CdHCO_3^+$ ,  $CdO$ ,  $CdCO_3$ ,  $Cd(PO_4)_2$ ,  $CdS$  [55]. Il est très phytodisponible, le Cd peut s'accumuler dans les racines ou les parties aériennes. Le chaulage peut diminuer le transfert du Cd vers les plantes. Le Cd est plus mobile dans le sol que le Cu et le Pb, donc plus disponible pour les plantes. Le Cd est considéré comme cancérigène pour l'homme et il présente des effets génotoxiques .

Les apports anthropiques de Cd dans les sols sont importants par rapport aux autres métaux lourds, par l'industrie (essentiellement par voie atmosphérique), les engrais phosphatés et l'épandage de déchets [56].

### 6. Métaux lourds dans la plante

Parmi l'ensemble des métaux lourds, une vingtaine d'entre eux sont indispensables aux processus physiologiques majeurs, en particulier la respiration, la photosynthèse ou l'assimilation des macronutriments [3].

Le premier effet des métaux lourds observable chez les végétaux est une inhibition de la croissance. Celle-ci s'accompagne très souvent de nombreux autres indices de dysfonctionnement : chlorose foliaire, importantes lésions nécrotiques, jaunissement progressif, repliement ou dessèchement du feuillage...

On admet généralement que les bases moléculaires de ces perturbations résultent d'un stress oxydatif, dû à la production d'espèces réactives de l'oxygène ou « Réactive Oxygen Species » (ROS). Les ROS altèrent toute une série de substrats biologiques importants, avec inhibition de l'activité enzymatique, perturbation du métabolisme végétal, oxydation de protéines, altération des membranes cellulaires via l'induction de phénomènes de peroxydation lipidique, apparition de cassures au sein de l'ADN, pouvant conduire à la mort cellulaire [57].

## **Revue bibliographique**

---

Pour éviter ces inconvénients, des systèmes de stockage ou de détoxification des métaux accumulés ont été sélectionnés chez certains végétaux. Trois mécanismes, encore mal compris :

### **6.1. Absorption racinaire**

La voie principale d'absorption des métaux se fait par simple diffusion au travers de l'apoplaste du cortex racinaire et de l'endoderme (voie apoplastique). Le transport des éléments métalliques à travers la paroi cellulaire se fait par les pores du réseau de la cellulose, de l'hémicellulose et des glycoprotéines.

Cependant, une partie des ions peut être adsorbés par les charges négatives de surface de l'acide polygalacturonique des pectines, qui agissent comme des échangeurs d'ions [58]. Puis au niveau de l'endoderme, le transport peut devenir actif au niveau de la membrane plasmique des cellules de la bande de Caspary (voie symplastique), autorisant cette fois un transfert contre le gradient de concentration.

### **6.2. Accumulation**

Plusieurs définitions de l'accumulation ont été proposées : les concentrations en métaux dans les parties aériennes sont supérieures à celles du sol. L'accumulation s'accompagne alors d'une détoxification des métaux par séquestration dans les vacuoles des feuilles [60]. Cependant, de nombreux processus moléculaires sont impliqués dans l'accumulation des métaux chez les plantes. La capacité à mobiliser les métaux pour les faire entrer dans les racines, les séquestrer en partie dans les vacuoles des cellules racinaires, les transférer des racines vers les parties aériennes via le xylème, et enfin à les distribuer vers les organes aériens jusqu'aux vacuoles des cellules foliaires [61].

## **7. Notion de tolérance et résistance**

### **7.1. Notion de tolérance**

La « tolérance aux métaux lourds » est la « capacité d'une plante à survivre et se reproduire sur des sols toxiques ou défavorables à la plupart des organismes en raison d'une contamination métallique » [63].

D'un point de vue physiologique, la tolérance aux métaux lourds correspond à l'ensemble des mécanismes d'homéostasie des métaux (transport, chélation, séquestration) permettant de maintenir la concentration des métaux essentiels dans les limites physiologiques et à minimiser les effets délétères des métaux non essentiels. Elle est présente chez tous les organismes qui supportent des expositions excessives en métaux lourds [64] [65].

### 7.2. Notion de résistance

Dans la littérature scientifique courante, se rapportant à la croissance ou à la survie des microorganismes en présence de certaines concentrations en métaux lourds, on parle souvent de la résistance. Cependant, le Conseil de la Recherche National de Canada définit globalement la résistance comme " la capacité d'un organisme à diminuer sa réponse face à un composé chimique relatif auquel il a été exposé précédemment" [66] [67].

Pratiquement ou techniquement, la résistance, à un composé inhibiteur ou toxique donné, chez une population bactérienne, peut être visualisée en traçant la courbe de distribution d'une population de souches bactériennes en fonction de la concentration de ce composé. La forme de cette courbe renseigne si cette population présente ou non une communauté tolérante. Si la courbe est de type modale, la population présente trois communautés (sensible, tolérante, résistance). Par contre, si elle est de type bimodal, cette population ne présente que deux communautés (sensible, et résistante).

### 8. Résistance des bactéries aux métaux lourds

Les bactéries, peuvent interagir avec les métaux via différents mécanismes. On peut observer une transformation des métaux par des processus d'oxydation/réduction ou d'alkylation. Ces modifications modifient généralement la toxicité et la mobilité du métal d'origine. [68]

Les métaux peuvent également être accumulés par des phénomènes d'adsorption passive ou par transport actif à l'intérieur de la cellule. Il a également été observé la production par les microorganismes de substances telles que des composés organiques ou des sulfides, par exemple, qui modifient la solubilité, et donc la mobilité des métaux.

## Revue bibliographique

---

De plus, de par leur participation aux cycles biogéochimiques, les microorganismes modifient les caractéristiques de la matière organique dans leur environnement, ce qui peut modifier le comportement des métaux via des mécanismes de chélation ou complexation. Enfin les bactéries peuvent influencer de manière indirecte la mobilité des métaux par des modifications du milieu, par exemple par acidification.

Les bactéries ont été soumises à la présence de métaux depuis leur émergence sur terre. Il est de ce fait peu probable que les mécanismes à l'origine de résistance aient été sélectionnés suite à des pollutions anthropiques récentes mais qu'elles soient plutôt apparues au cours de leur évolution suite à une pression métallique naturelle.

Plusieurs mécanismes généraux ont été mis en évidence tels que la réduction de la perméabilité membranaire par l'efflux actif nécessitant la présence de pompes à efflux, la séquestration du métal ou la modification de la forme chimique du métal. De la même façon que pour les résistances aux antibiotiques, les déterminants génétiques à l'origine des résistances aux métaux lourds peuvent être portés par le chromosome entraînant une résistance intrinsèque ou bien par un élément génétique mobile entraînant une résistance acquise. [69]

### 9. Mécanismes de résistance

Les micro-organismes doivent développer des mécanismes de résistance contrebalançant l'effet des hautes concentrations en métaux lourds. Il convient de faire la différence entre la résistance aux métaux lourds dans des domaines de concentrations situées juste au-dessus de la CMI et les véritables résistances aux métaux lourds conduisant à l'adaptation à des milieux extrêmes (comme c'est le cas chez *Cupriavidus metallidurans*).

Des mécanismes de résistance aux métaux lourds tels que la biominéralisation, la séquestration, ou la conversion enzymatique diffèrent des véritables résistances aux métaux lourds qui sont eux liés à la présence de gènes portés par des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides. La biodisponibilité, la toxicité et la nécessité des ions métalliques pour la bactérie dépendent de leurs caractéristiques physicochimiques [70,71]. Hobman *et al.*, (2007) et Bruins *et al.*, (2000) distinguent 4 mécanismes de résistance bactérienne aux métaux :



- **Fixation aux parois cellulaires**

La paroi cellulaire est le premier site d'interaction entre les métaux et la cellule microbienne. Les interactions physico-chimiques (échange ionique, adsorption, complexation, précipitation, et cristallisation) responsables de l'association des espèces métalliques aux parois cellulaires portent le nom de biosorption. Exclusion du métal par la barrière de la perméabilité ou maintien de l'ion toxique hors de la cellule (réduction de l'absorption).

- **Transport et homéostasie**

Le pompage par efflux très spécifique pour l'élimination des ions toxiques qui sont entrés dans la cellule au moyen de systèmes impliqués dans le transport de cations ou d'anions). Les pompes efflux peuvent être des ATPases ou des canaux chimiosmotiques. Les ATPases sont des enzymes qui utilisent l'énergie chimique de scission de la liaison haute énergie phospho-ester de l'ATP, conduisant à la formation d'un gradient de concentration.

- **Les thiols cellulaires**

Séquestration intracellulaire ou extracellulaire par des composants fixateurs d'ions métalliques spécifiques. Le métal se lie à des composés essentiels des voies de détoxification présents chez de nombreux organismes (animaux, végétaux, microorganismes). Il s'agit de thiols cellulaires non protéiques, tel que le glutathion réduit (GSH), les phytochélatines (PCs) et des thiols cellulaires protéiques, tel que les métallothionéines (MTs).

- **Système de détoxification**

La plupart des cellules sont équipées de systèmes antioxydatifs efficaces à la fois non enzymatiques et enzymatiques. qui convertissent un ion très toxique en un ion moins toxique.

## 10. Champignons résistantes aux métaux lourds

Nombreux travaux ont traité la résistance des souches fongique aux métaux lourds. L'étude de l'impact du mercure sur la propagation des champignons du sol, a montré que *Aspergillus tubingensis* et *Aspegillus nivus* résistent jusqu'à 10 ppm d' $\text{HgCl}_2$  tandis que *Mucor racemosum* résiste à une concentration de 2.5 ppm d' $\text{HgCl}_2$ . Alors que les autres espèces isolé comme le *Penicillium citrimum* et *Trichoderma viridie Fusarumchlamydosporum* n'ont pas mentré de résistance à la parésence du  $\text{HgCl}_2$  [73].

## Revue bibliographique

---

Tandis que l'étude d'EZZOUHRI et al. (2009) sur la tolérance aux métaux lourds des champignons isolés des emplacements pollués de Tanger a montré qu'*Aspegillus* ; *Fusarium* ; *Alternaria* sont résistantes au Pb et Cr, Cu et Zn . [74]

Les études de COLPAERT ont aussi montré des variations génétiques aussi bien aux niveaux inter- qu'intraspécifiques pour la tolérance des champignons ectomycorhiziens au Cd. Ces mêmes études ont montré que des isolats de *Suillus luteus* issus d'un sol contaminé par le Cd étaient généralement plus résistants à ce métal que ceux issus d'un sol non contaminé. [75]

Les champignons sont capables d'accumuler le Cd dans leurs carpophores en quantité variable suivant l'espèce (jusqu'à 5.7  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de poids sec pour *S. luteus*). Des études ont montré que le rapport de concentration en Cd dans la biomasse fongique divisée par celle du sol peut varier de 2 à 1000 suivant l'espèce

## Matériel et méthodes

---

### Matériel et méthode

#### 1. Objectif

L'objectif de notre travail porte sur l'identification des bactéries endophytes résistantes à des teneurs élevées en Cadmium et en Plomb. L'isolement est effectué à partir des racines de deux plantes steppiques de la région de Ain Babouche: *Lygeum spartum* et *Hedysarum pallidum*. Ce travail a été effectué au sein du laboratoire de Biologie et Environnement (LBE) de l'Université Constantine I. Nous présentons dans ce travail des techniques qui nous ont permis l'isolement et l'identification de quelques bactéries résistantes à la présence des deux métaux suscités.

#### 2. Description de la zone d'étude

Notre travail porte essentiellement sur la région d'Ain babouche et plus précisément sur Djebel Hammimat. C'est une région semi-aride du Nord-est Algérien située à 90 Km de Constantine. Elle est réputée par ses escargots d'où elle tire d'ailleurs son nom (babouche = escargot) ; mais surtout par des sols caractérisés d'une forte teneur en métaux lourds y compris le Plomb et le Cadmium. (Voir photo1).



**Photo N° 01: Photo satellite montrant la localisation géographique de la zone d'étude (Google Earth, 2014)**

## Matériel et méthodes

---

### 3. Description des plantes étudiées

- *Lygeum spartum*

*Lygeum spartum* est couramment rencontrée dans notre zone d'étude. Cette plante steppique vivace (photo N° 02) appartenant à la famille des graminées. Elle est très répandue en Afrique du nord et en Espagne. C'est une plante accumulatrice du chrome [78].



**Photo N°02** :*Lygeum spartum*

(Photo prise lors des prélèvements des échantillons dans la zone d'étude à Ain- Babouche)

*Lygeum spartum* est une plante unciforme, à rhizome rampant couvert d'écailles brillantes chaumes pleins, ligule de 5mm (souvent confondus avec l'Alfa à l'état végétatif. Cette plante possède une inflorescence très particulière ; constituée par une spathe remplaçant les glumes, à l'intérieur de laquelle se situent 2-3 épillets cornés à la base pour former un tube recouvert de longs poils soyeux ; et s'en distingue par le fait que les feuilles ne s'arrachent pas comme dans l'Alfa et par sa ligne manquée. Les fibres de ses feuilles sont utilisées dans des paniers, des tissus,...etc. Cette plante est aussi broutée d'où sa présence dans la chaîne alimentaire. [79].

Sa classification scientifique est la suivante [80] :

**Règne** : Plantae

**Division** : Magnoliophyta

**Classe** : Liliopsida

**Ordre** :Poales

**Famille** : Poaceae

**Genre** : *Lygeum*

**Espèce** : *Lygeum spartum***26**

## Matériel et méthodes

---

- *Hedysarum pallidum*

C'est une plante vivace cespiteuse, à longues tiges plus au moins prostrées. Elle présente des inflorescences en grappes plus ou moins allongées atteignant 10 – 15 cm à la fructification, de grandes fleurs rosées ou blanches lavées de pourpre, parfois blanches et des calices entièrement hispides. On la rencontre dans l'Oranie depuis la Côte jusqu'aux confins du Sahara, dans la région de Saïda. Elle se développe également dans l'Est algérien, sans pour autant atteindre les côtes et les zones sahariennes [79]. Selon ces mêmes auteurs, on la trouve également dans les forêts et les broussailles. Enfin cette espèce se rencontre sur des sols riches en calcaire total, à teneur variable en potassium, phosphore et calcium, et renfermant moins de 48 ppm de sodium [78].

Sa classification est la suivante [29] :

**Règne:***Plantae*.

**Division:***Magnoliophyta*.

**Classe:***Magnoliopsida* .

**Ordre :***Fabales* .

**Famille :***Fabaceae*

**Genre :***Hedysarum*.

**Espèce:***Hedysarum pallidum*.



**PhotoN°2 :***Hedysarum pallidum*

(Photo prise lors des prélèvements des échantillons dans la zone d'étude à Ain- Babouche )

## Matériel et méthodes

---

### 4. Echontillonnag

L'échantillonnage était effectué en Février 2013 par des membres du laboratoire LBE. Tous les prélèvements ont été effectués d'une manière aseptique selon les étapes suivantes :

A l'aide d'une tarière stérile; on creuse à différents endroits de la zone étudiée ; des trous d'une profondeur de 10cm environ. A l'aide d'une spatule stérile ; des échantillons des racines profondes de chaque plantes sont prélevées ; transvasées dans des bocaux stériles puis étiquetés. Les échantillons ont été conservés dans un congélateur à une température de -4°C jusqu'à leur utilisation (Megnous et Meghraoui ; 2011).

Deux racines de chaque plantes (*Lygeum spartum* et *Hedysarum pallidum*) ont été sélectionnées pour la suite du travail.

### 5. Isolement et caractérisation de bactéries endophytes

#### 5.1. Isolement

Les racines ont été désinfectées avec de l'eau de javel (5%) et de l'éthanol (10%) ; puis rincées avec de l'eau distillée stérile et découpées d'une façon transversale et longitudinale.

Les morceaux découpés obtenus sontensemencés sur la gélose nutritive (GN) (voir annexeI) additionnée d'un antifongique (Amphotéricine) pour inhiber la croissance des champignons. Chaque racine était testée en triple. Les boîtes sont incubées à 30 °C pendant 48 H. Après incubations, les colonies bactériennes obtenues sontensemencées sur bouillon nutritive (voir annexe I) pour avoir une suspension bactérienne dense.

L'étape d'isolement a été réalisée avec l'utilisation les milieux spécifiques suivants:

\* **Mac Conkey** : Milieu sélectif pour l'isolement des bacilles Gram négative (*Salmonella et Shigella*) ainsi que des bactéries coliformes dans les eaux, les produits alimentaires, les produits pharmaceutiques et biologiques. Ce milieu contient deux inhibiteurs de la flore Gram positif : les sels biliaires et le cristal violet.

\* **Chapman** : milieu sélectif, permettant la croissance des germes halophiles et de rares bactéries à Gram négatif. Ce milieu contient une forte concentration en chlorure de sodium ; ce qui permet un isolement sélectif de *Staphylococcus* tolérant la forte concentration en NaCl.

## Matériel et méthodes

---

\* **Cétrimide** milieu sélectif, qui permet l'isolement des *Pseudomonas* notamment *P.aeruginosa*. Ce milieu gélosé est relativement pauvre, il contient un antiseptique: le Cétrimide (bromure de N-cétyl-N, N, N-triméthylammonium). Ce milieu, proche du milieu King A, favorise aussi la production de pigments par *P.aeruginosa*.

Les suspensions bactériennes sont ensemencées par stries afin d'avoir des colonies séparées. Les cultures sont incubées à 30°C pendant 24H ; puis on procède à une observation microscopique après la coloration de Gram.

### 5.2. Coloration de Gram des bactéries endophytes

La coloration de Gram nous permet de déterminer le type de Gram, la morphologie ainsi que le mode de regroupement bactérien. .

## 6. Tests de toxicité

Le but de cette manipulation est d'isoler, de purifier et d'identifier quelques bactéries endophytes résistantes à différentes concentrations de Plomb et de Cadmium).

### 6.1. Sélection de bactéries endophytes résistantes

Le but de cette étape est d'obtenir des endophytes qui sont résistantes aux Cadmium (Cd) et Plomb(Pb). A partir des cultures obtenues sur milieu liquide (BN). Les suspensions bactériennes ont été ensemencées sur un milieu gélosé supplémenté des métaux précédemment cités. Chaque métal est additionné par différentes concentrations voir : [0.5, 2, 5 et 10mM]. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 48H.

### 6.2. Concentration minimal inhibitrice (CMI)

Cette manipulation consiste à déterminer la concentration minimale des métaux à partir de laquelle une souche bien définie ne se développe plus. Seules les souches ayant résisté à une concentration de 2 et 5 mM de Pb et 0.5 mM de Cd sont soumises à ce test.

Les souches sélectionnées sont ensemencées sur milieu gélosé contenant du Plomb à des concentrations de [0 - 6 Mm] avec une variation de 1 mM. Tandis que les concentrations du Cadmium varient entre 0 et 1.5 mM avec un intervalle de 0.5 Mm

## Matériel et méthodes

---

### 7. Identification des souches bactériennes résistantes au Pb et Cd

Les souches résistantes à la présence des métaux sont récupérées dans des tubes contenant du bouillon nutritif puis incubés à 30°C pendant 24 H. Les suspensions obtenues sont mises à une identification en utilisant des milieux spécifiques (Mac Conkey , Chapman et Cétrimide), une coloration de Gram et quelques tests biochimiques.

#### 7.1. Tests biochimiques

- **Test d'oxydation et de fermentation**

C'est un test déterminant si un organisme recourt à un métabolisme oxydatif ou fermentatif pour utiliser l'hydrate de carbone donné, c'est le glucose. On remplit deux tubes à essai sur une hauteur de 8 cm environ avec le milieu Hugh et Leifson (composition voir annexe I) supplémenté par du glucose et un indicateur de pH , le bleu de bromothymol, qui rend le milieu vert (pH 7.0) .

Un des deux tubes est recouvert d'une couche de paraffine stérile, d'environ 1 cm d'épaisseur afin d'éviter la réoxygénation. Les deux tubes sont ensuite incubés à 30°C pendant 24H.

- **Test de l'uréase et la Tryptophane Désaminase (TDA)**

Les uréases sont des enzymes qui hydrolysent l'urée (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>.CO, en dioxyde de carbone et ammoniac. Ce test est effectué sur le milieu urée indole (voir annexe I), les résultats seront obtenus après 24H d'incubation à 30°C.

- **Test de décarboxylases (arginine-dihydrolase : ADH ; ornithine-décarboxylase : ODC ; lysine-décarboxylase : LDC.)**

Ces tests détectent la capacité d'un organisme de produire des décarboxylases, enzymes qui décarboxylent l'arginine, lysine et ornithine en agmatine , cadavérine et putrescine, respectivement.

On inocule avec l'organisme à tester un tube témoin (sans acide aminé) et trois tubes de bouillon de Moëller (voir annexe I), contenant chacun un des acides aminés et le pourpre de bromocrésol et le rouge de crésol comme indicateurs de pH. Le bouillon est recouvert d'une couche de paraffine stérile pour les souches qui possèdent un métabolisme fermentatif. La lecture aura lieu après 24H d'incubation à 30° C.



## Matériel et méthodes

---

- **Test à l'ONPG**

Le principe de ce test repose sur le fait que l'Ortho-nitrophényl –Bdgalactopyranoside (composé incolore ) est scindé par l'enzyme (ONPG hydrolase ) en libérant de l'orthonitrophénol (compose soluble jaune)

Faites une suspension dense de la bactérie à étudier prélevée sur la pente d'un milieu Hajna et Kligler dans 0,5 ml d'eau physiologique stérile (voir annexe). On ajoute un disque d'ONPG et on incube au bain marie à 37°C. **Test Réduction de nitrate**

Ce test détecte si un organisme est capable de réduire le nitrate. Il peut être employé pour les Entérobactéries et les Pseudomonas. On cultive l'organisme dans du bouillon nitraté. (Voir annexe I). La lecture aura lieu après 24H d'incubation à 30° C [30]

- **Test du type respiratoire**

Le milieu utilisé est la gélose viande –foie (VF). Ce milieu contient du glucose comme source d'énergie mais il ne contient pas de nitrate (accepteurs d'électron). Avant d'êtreensemencé, le milieu doit être régénéré par séjour d'une demi-heure au bain –marie bouillant puis refroidi à 45°C

L'ensemencement se fait par une pipette Pasteur. En introduisant l'effilure stérile de la pipette pasteur jusqu'au fond du tube puis en remontant et redescendant successivement plusieurs fois en décrivant des tours de spire très serrées. Puis en sortant verticalement à 0.5 cm de la surface. Incuber à 37°C pendant 24H.

- **Utilisation du glucose, lactose et production de gaz et d'hydrogène sulfureux**

Milieu utilisé est Hajna Kligler (K.I.A.) (voir annexeI). Ce milieu complexe permet de confirmer la fermentation du glucose avec ou sans production de gaz et d'orienter l'identité du genre par l'étude de l'attaque du lactose et de la production d'H<sub>2</sub>S.

La surface de la gélose estensemencée abondamment par stries serrées et le culot par une piqure centrale. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 24H.

- **Production d'indole**

Certaines bactéries sont capables de dégrader le tryptophane en indole grâce à une tryptophanase. La culture est effectuée sur des milieux riches en tryptophanes (eau peptonée exempte d'indole) et incubée à 37°C pendant 24H .

## Matériel et méthodes

---

- **Test sur King A et King B**

Les milieux de King (A et B) permettent de différencier les espèces du genre *Pseudomonas*, par la mise en évidence de la production de pigments spécifiques. L'élaboration des pigments est influencée par la composition du milieu.

La production de pyocyanine par *Pseudomonas aeruginosa* est favorisée par la présence d'ions inorganiques dans le King A. Tandis que la production de la pyoverdine, est favorisée par une teneur élevée en phosphate du milieu King B.

Les milieux sont ensemencés en faisant des stries à la surface de la gélose. L'incubation est réalisée en aérobiose à 37°C pendant 24H.

- **Protéolyse de gélatine**

L'hydrolyse de la gélatine traduit une certaine activité protéolytique de la souche. La technique utilisée est celle de Frazier utilisant comme milieu de la gélose nutritive additionnée de 4% de gélatine. Le milieu stérile est coulé en boîte de pétrie. 0.1ml de la culture est ensemencé au centre de la boîte puis incubé 48H ou plus à 37°C

- **Recherche de la lécithinase**

De nombreux microorganismes peuvent hydrolyser les phospholipides, et tout particulièrement la phosphatidylcholine (ou la lécithine).

Avant l'ensemencement un jaune d'œuf est ajouté au milieu Baird Parker (voir annexe). Ce milieu contient une base nutritive riche des accélérateurs de la croissance comme le pyruvate de sodium et le glycolle. Une goutte de la suspension bactérienne est déposée au centre de la boîte de pétrie et incubée pendant 24 H ou plus à 37°C.

## Résultats et discussion

---

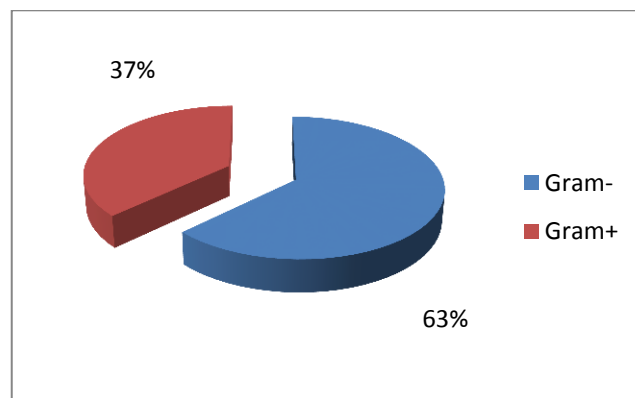
### Résultats et discussion

#### 1. Isolement

Après 48H d'incubation des boîtes contenant les fragments des racines désinfectées et en présence d'un antifongique, on a pu récupérer 30 colonies bactériennes. L'ensemencement des 30 tubes contenant les différentes souches impures (tableau 1 en annexe II) ; dont 10 font partie de *Lygeum spartum*, et 20 font partie de *Hedysarum pallidum* sur les milieux spécifiques a donné 71 souches différentes ; soit 57,75% de *Lygeum spartum* et 42.25% de *Hedysarum pallidum*.

D'après les tableaux 2et 3 (voir annexe II) on remarque que 20.51% des souches isolées des racines de *Lygeum spartum* ont poussé sur milieu Chapman, 28.20% sur Cétrimide et 51.28% sur Mac conkey. Par ailleurs 53.57% des endophytes obtenus des racines de *Hedysarum pallidum* ont poussé sur Chapman, 17.85% et 28.57% sur Mac conkey et Cétrimide respectivement.

L'examen microscopique après coloration de Gram a permis de différencier les bactéries Gram négatif des Gram positif et la forme des bacteries. La figure N°1 montre qu'environ 62.95% des souches appartiennent au Gram négatif et 37.04% au Gram positif.



**Figure 1 : Distribution des souches Gram – et Gram + chez *Hedysarum pallidum* et *Lygeum spartum* .**

## Résultats et discussion

---

Selon les figures 2 et 3 on remarque une prédominance des souches bactériennes à Gram négatif soit environ 79% pour *Lygeum spartum* contre 46 % pour *Hedysarum pallidum*. Donc le taux d'endophytes à Gram négatif est plus important au niveau des racines de *Lygeum spartum* que celles d'*Hedysarum pallidum*.

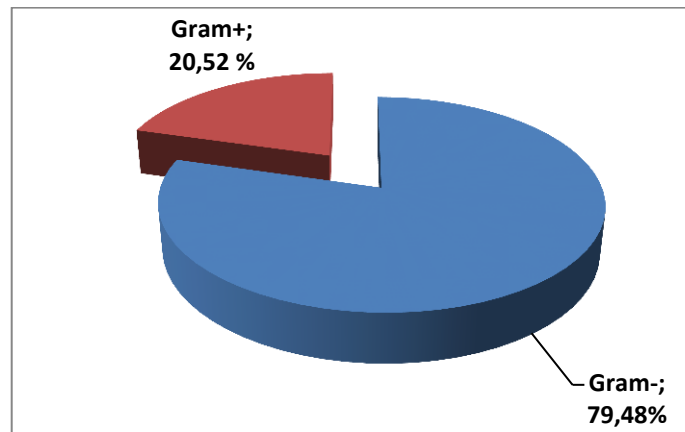


Figure 2 : Distribution des souches Gram + et Gram- chez *Lygeum spartum*

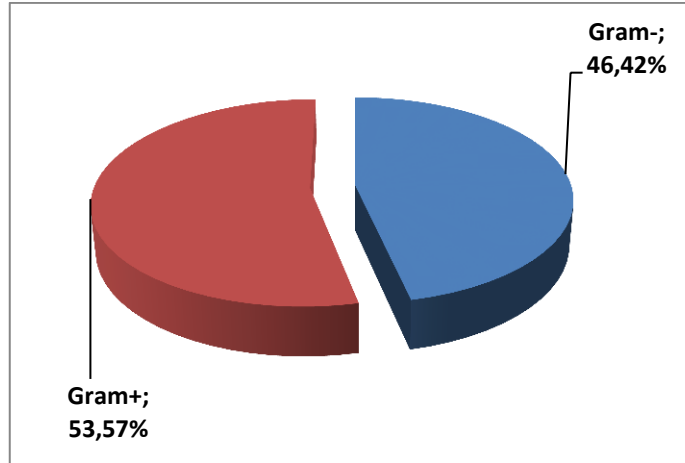


Figure 3 : Distribution des souches Gram+ et Gram- chez *Hedysarum pallidum*

Ces résultats se concordent avec les travaux de BOLTON H et al., 1995 et HARZALLAH B. et al. 2008 qui ont étudié les bactéries rhizosphériques. Cependant nos résultats se contredit avec ceux de INOURI et al., 2007 ; qui dévoilent la prédominance des souches Gram positif.

## Résultats et discussion

---

### 2. Test de toxicité

L'ensemencement des 30 souches précédemment citées sur milieu gélosé supplémenté par 10mM, 5 mM et 2mM de Plomb et Cadmium a donné les résultats suivants :

Pour le plomb, à 10 mM, aucune souche n'a pu se développer. Alors que à 5mM, une seule souche (H8rac1D) de la plante *Hedysarum pallidum* qui a toléré la présence de cette concentration métallique. Et enfin à 2mM on a pu isoler 7 souches ; dont 5 souches d'*Hedysarum pallidum* et 2 autres de *Lygeum spartum*. Les résultats sont résumés dans le tableau 4 porté en annexe II.

On constate pour la première expérience que avec la concentration de 10 mM , il n'y a aucune résistance des souches des deux plantes. Ce qui nous mène à dire que cette concentration du Plomb est inhibitrice. Cependant, à 2 mM de Pb on a obtenu 7 souches qui ont tolérées cette quantité du métal dont en plus d'une souches qui a résistée à 5mM soit : 62.5% des souches appartient à d'*Hedysarum pallidum* et 37.5 % de *Lygeum spartum* . Ce qui est montré dans la Figure N°4.

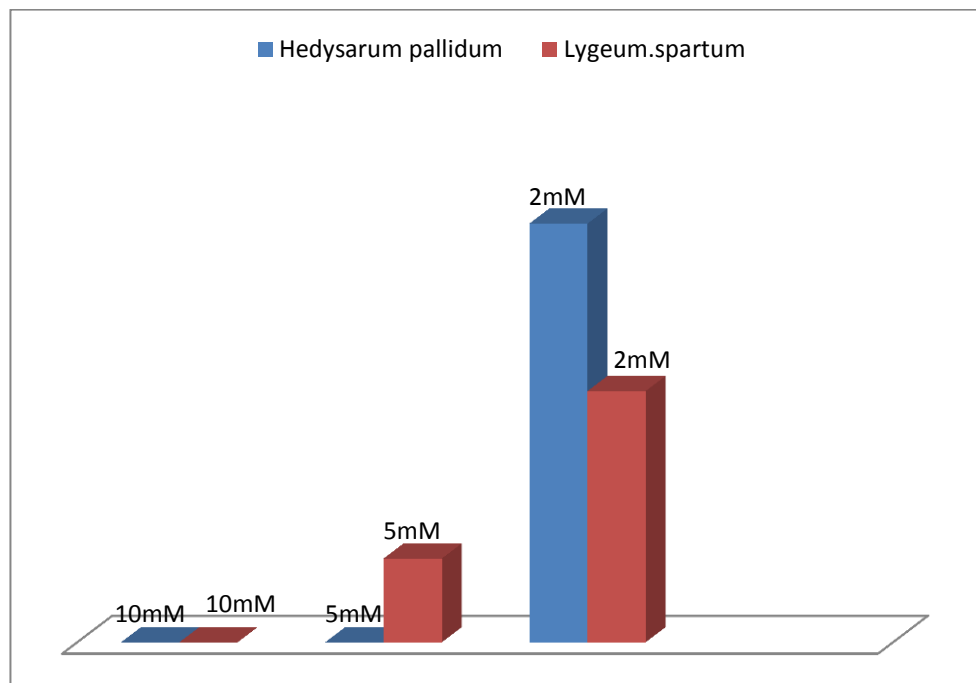
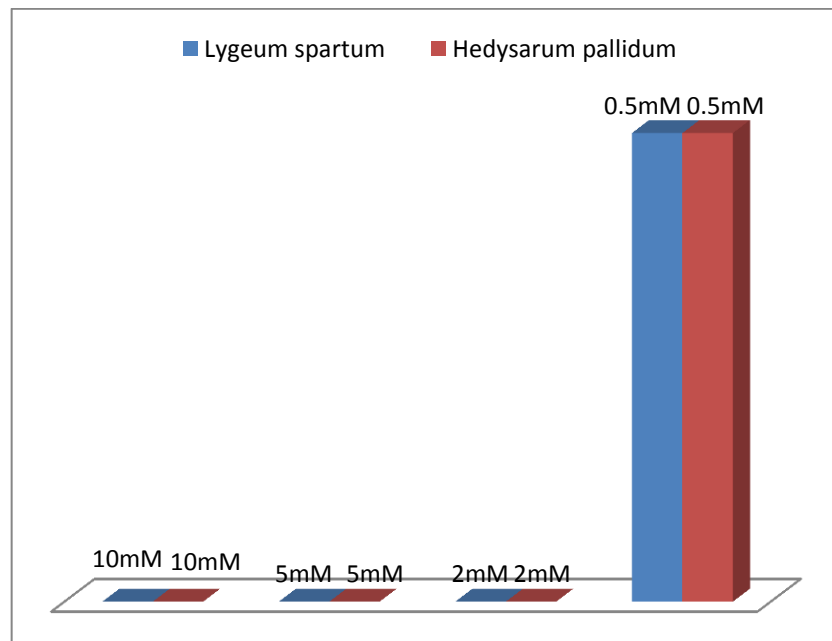


Figure 4 : Test de toxicité au Plomb

## Résultats et discussion

---

Pour le Cadmium toutes les souches étudiées n'ont pas pu résister ni à 10 mM, ni à 5mM et même à 2mM. Ce qui nous a obligé de diminuer la concentration jusqu'à 0.5 mM. Cette concentration a permis le développement de 8 souches dont 4 souches d'*Hedysarum pallidum* et 4 autres de *Lygeum spartum*. Bien que la figure N°5 nous montre le taux de résistance des souches à la présence du métal étudié ;Ces résultats sont résumés dans le tableau N°5 porté en annexe II.



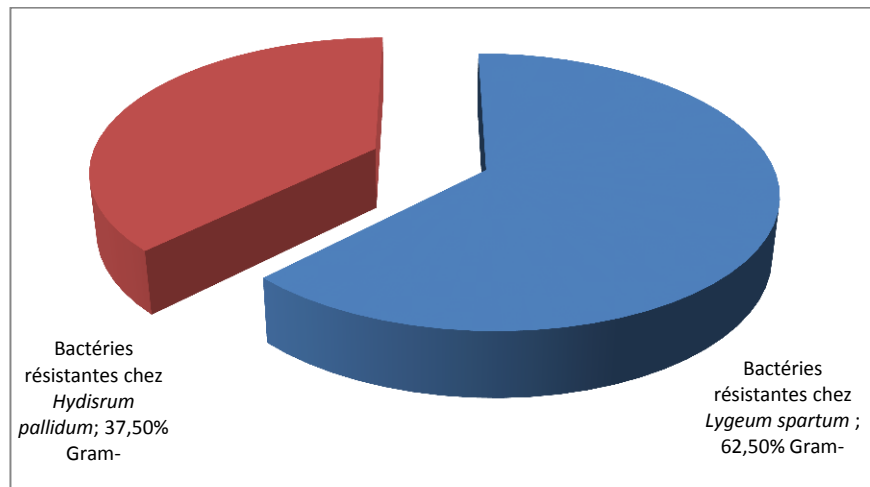
**Figure 5 : Test de toxicité au Cadmium**

D'après les résultats obtenus on constate que, plus la concentration du métal augmente plus le taux des souches sensibles est important. Ces données ont également affirmées que le Cadmium est plus toxique que le Plomb. Cette conclusion est confirmée par CARIP et al. 2008 .

La coloration de Gram des souches résistantes au Pb et Cd a révélé que :

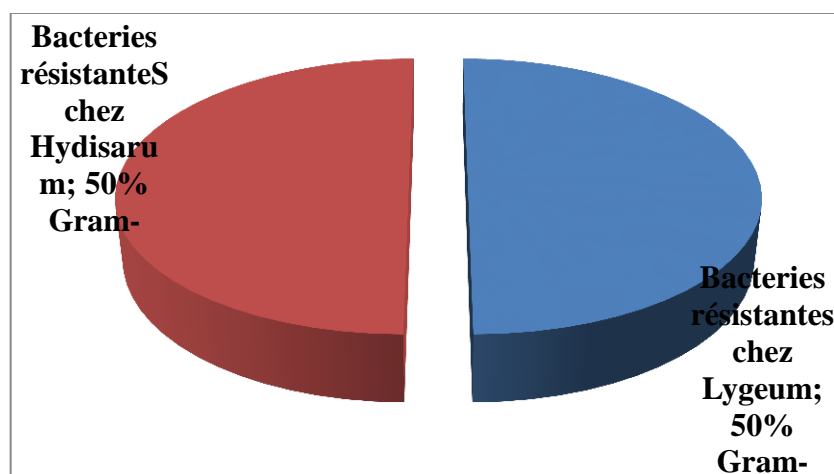
Pour les souches résistantes au Plomb, on a obtenu que des bactéries Gram négatif dont 62.5 % appartenant à *Hedysarum pallidum*, et 37.5% à *Lygeum spartum* (voir Figure N°6).Ce qui nous mène à dire que *Hedysarum pallidum* est plus accumulatrice du Plomb que *Lygeum spartum*. Par conséquent les bactéries Gram négatif issue de la plante *Hedysarum pallidum* sont plus importantes que celles de la plante *Lygeum spartum*. Ces résultats sont porté en annexe II tableau N°6.

## Résultats et discussion



**Figure 6 : Bactéries résistantes à 2mM de Plomb**

Les souches résistantes au Cadmium possèdent également un Gram négatif dont 50 % appartiennent à *Lygeum spartum* et 50% à *Hedysarum pallidum*. Ces résultats montrent que le pourcentage des bactéries résistantes des deux plantes est le même. Ce qui prouve que le taux de résistance des souches, vis-à-vis au Cadmium, de *Lygeum spartum* est similaire avec celui d'*Hedysarum pallidum*. (voir Figure N° 7 ). Par contre on observe un absence complet des bactéries Gram positif dans les deux plantes, également montré précédemment dans le cas du Pb . (voir annexe II, tableau N°7 )



**Figure 7: Bactéries résistantes à 0.5mM de Cadmium**

## Résultats et discussion

Notre étude dévoile que la totalité des souches bactériennes résistantes que se soit au Pb et / ou au Cd sont des bactéries Gram négatif. Encor on constate que les bactéries endophytes de la plante *Hedysarum pallidum* sont plus résistantes au Pb qu'au Cd.

### 3. Détermination de la C.M.I

Il s'agit de la concentration métallique à partir de laquelle une souche bien définie ne peut se développer. La concentration minimale inhibitrice est déterminée pour chaque métal indépendamment. Seules les souches ayant résistées à une concentration métallique de 4 et 6 mM de Pb et 0.5mM de Cd ont été soumises à ce test soit 16 souches (8 pour le Cd et 8 pour le Pb).

D'après les tableaux N°8 et N°9 mentionnés en annexe II on remarque que la croissance bactérienne est inversement proportionnelle à la concentration du métal. Cependant la sensibilité des souches ensemencées dépend du métal étudié.

Selon la figure 8 on observe que cinq souches ont montré une CMI de 3mM vis-à-vis au Pb, mais les autres trois ont résisté à cette concentration. L'augmentation de la concentration du métal révèle que la souche H8rac1D possède une CMI de 6mM tandis que H8rac1A et H7rac3E ont une CMI de 4mM.

Pour le Cadmium toutes les souches sélectionnées ont présenté une CMI de 1.5mM. La Figure 8 et 9 nous permet de témoigner ce résultat.

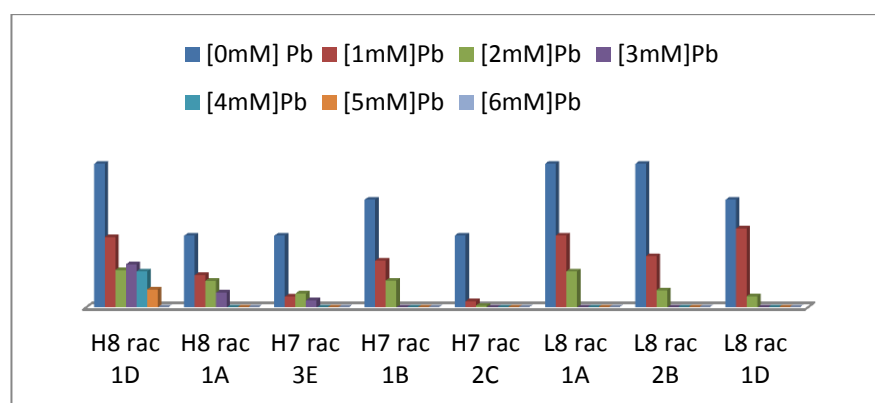


Figure 8 : Résultats de la CMI pour le Plomb



## Résultats et discussion

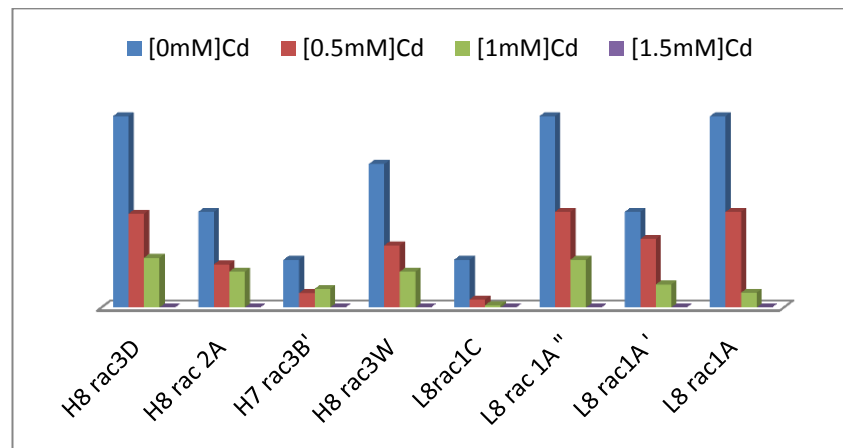


Figure 9 : Résultats de la CMI pour le Cadmium

### 4. Identification des souches

Après la détermination de la CIM, 11 souches qui ont montré une CMI importante ( 4mM et 6Mm pour Pb et 1.5mM pour Cd) sont soumises à une identification. Elles ont été ensemencées sur Mac conkey, Cetrimide et Chapman suivie d'une coloration de Gram puis quelques tests biochimiques. Voir Tableaux 10 et 11 portés en annexe II.

#### 4.1. Coloration de Gram

L'utilisation des milieux sélectifs nous a permis d'obtenir 19 souches pures. Les trois souches résistantes à plus de 3mM et 5mM de plomb, appartiennent à *Hedysarum pallidum*, ont poussé sur le milieu Mac conkey (3 souches) et la coloration de Gram a confirmé que ces trois souches sont des bacilles Gram négatif. Cependant les huit souches, quatre d'*Hedysarum pallidum* et quatre de *Lygeum spartum*, qui ont une CMI de 1.5 mM pour le Cadmium, sont des Gram négatif et qui ont pu se développer sur Mac conkey (8 souches) et Cetrimide (8souches)

#### 4.2. Tests biochimiques

Les différents tests biochimiques des 19 souches, sont résumés dans les tableaux 12,13 et 14 portés en annexeII, l'interprétation de chaque test est comme suite:

## Résultats et discussion

---

**\*Le type de métabolisme glucidique** est déterminé en se basant sur le jaunissement de l'indicateur de pH qui nous renseigne sur l'utilisation de l'hydrate de carbone et la production d'acide. Le virage du bleu de bromothymol au jaune dans le tube avec paraffine indique que les bactéries sont fermentatives. Les bactéries oxydatives montrent un changement au jaune du tube sans paraffine. Cependant, les bactéries oxydatives fermentatives donnent un virage au jaune des deux tubes avec et sans paraffine.

Les résultats de ce test montrent que 13 bactéries sont fermentatives alors que 6 bactéries sont inertes.

**\*La production d'uréase** est mise en évidence par la libération de l'ammoniac qui alcalinise le milieu ; elle fait virer le rouge du phénol de sa teinte de départ jaune orangé au rouge. Sur la totalité des souches testées on a eu 12 bactéries uréase<sup>+</sup> et 7 autres uréase<sup>-</sup>.

**\*La dégradation des acides aminés :** Lysine, Onithine et Arginine est basée sur la production d'une des trois enzymes principales LDC, ODC et ADH dans cette ordre. L'absence d'une des enzymes précédemment citées permet le virage du bromocrésol pourpre au jaune ; tandis que leur présence garde le milieu dans son état initial. Ce test dévoile que : 6 bactéries sont ADH<sup>+</sup> contre 5 bactéries sont ADH<sup>-</sup>, 4 bactéries sont ODC<sup>+</sup> et 7 bactéries sont ODC<sup>-</sup> et enfin 5 bactéries sont LDC<sup>+</sup> tandis que 6 bactéries sont LDC<sup>-</sup> (vu le manque de ce milieu, ce test n'était fait que pour les souches obtenues sur MacConkey)

**\*La recherche d'ONPG oxydase** est réalisée après 15 mn d'incubation puis 30 mn, 1h, 2h... les réactions positives, en majorité, sont observées entre 15 et 30 mn. On constate l'apparition d'une coloration jaune chez 7 souches donc elles sont ONPG<sup>+</sup>.

**\*La réduction de nitrate** est catalysée par la nitrate réductase. L'addition de quelques gouttes de réactifs NR1 et NR2 à la culture qui se combinent à tout nitrite présent et forment un colorant rouge azoïque soluble. Ce test révèle que 18 souches sont NR<sup>+</sup> contre une seule souche qui a montré l'absence de la coloration rouge.

## Résultats et discussion

---

Ce cas peut signifier soit le nitrate n'a pas été réduit, soit que le nitrate s'est formé mais il a été ensuite réduit. Pour distinguer entre ces deux possibilités, on a ajouté la poudre de zinc qui réduit le nitrate en nitrite, et elle a fait apparaître une coloration rouge parce que le nitrite nouvellement formé se combine avec les réactifs du milieu.

**\*Le type respiratoire** des bactéries testées doit montrer un de ces aspects : Aérobie strictes dont la croissance bactérienne se trouve en surface de tube, Aéro-anaérobie facultatif dont les colonies bactériennes occupent tout le milieu et enfin anaérobie strictes où les colonies bactériennes se trouvent au fond de tube.

Cet essai dévoile que 14 bactéries sont aéro-anaérobies facultatives et 4 bactéries sont aérobies strictes et une seule anaérobie stricte

**\*La réaction au rouge de méthyle** est réalisée pour mettre en évidence la production d'acides mixtes. La stabilité de la couleur rouge, du **rouge de méthyle** additionné, en cas de pH inférieur à 5 confirme la production d'acide ( $RM^+$ ) ; dans le cas contraire on observe une couleur jaune ( $RM^-$ ). Le test RM sur nos souches montre que 16 souches sont capables de synthétiser des acides mixtes par ailleurs 3 souches sont dites  $RM^-$

**\*La réaction de Voges- Proskauer** est réalisée par l'addition de quelques gouttes de réactifs VP1 et VP2. Après 10 minutes une coloration rose (rouge) traduit la présence de l'acétoïne. Les résultats montrent que 17 souches sont  $VP^+$  et 2 souches  $VP^-$

**\*Utilisation du glucose ; lactose et production de gaz d'hydrogène sulfureux testées sur milieu Hajna kligler peut donner les résultats suivant :**

Ce milieu nous a pas donné de résultats parce qu'il était malheureusement périmé.

**\*Production d'indole** à partir du tryptophane peut être mise en évidence on ajoutant le réactif Kovacs. La formation d'un anneau rouge en surface se traduit par indole +. La formation d'un anneau brun en surface signifie indole -. Nos résultats montrent que toutes nos souches sont indol-.

## Résultats et discussion

---

\***La tryptophane Désaminase** est montré par l'apparition d'un précipité brun foncé après l'ajout du réactif TDA et donc la souche est dite **TDA+** ; l'absence de précipité signifie que la souche est **TDA-**. Nos résultats montrent que 15 souches sont TDA+ et 4 souches sont TDA-.

L'obtention de couleur bleue sur le milieu **King A** nous permet de dévoiler la présence de **pyocyanine**. Tandis que la couleur jaune-vert fluorescent sur le milieu **King B** nous oriente vers la présence de **pyoverdine**. Six souches ont pu se développer sur King A et deux souches sur King B sans pigmentation sur les deux milieux. (voir tableau 14)

\***La gélatinase** est mise en évidence par l'ajout du Hg Cl<sub>2</sub>/HCL sur le milieu contenant de la gélatine. L'activité protéolytique de la souche se traduit par l'apparition d'un précipité blanchâtre à l'exception de la zone où la gélatine a été hydrolysée. Le tableau 14 montre la totalité des souches incapables de synthétiser cette enzyme donc elles sont gélatinase -

\***La présence de la lécithinase** est observée par une clarification de la gélose autour des stries de l'ensemencement, ce qui montre la présence de **lipoprotéinase**. Selon nos résultats portés dans le tableau 14, on a obtenu 7 souches capables de synthétiser cette enzyme et une seule souche lécithinase -.

**N.B** les tests de la gélatinase et la lécithinase ainsi que l'ensemencement sur milieu King A et King B ont été réalisés que pour les souches obtenues sur la Cétrimide.

Les milieux, Cétrimide et MacConkey, nous orientent aux genres *Pseudomonas* et *Enterobacteriaceae* respectivement. En plus on compare les résultats des tests biochimiques qui sont résumés dans les tableaux 12, 13 et 14 en plus des données portées sur les tableaux 15, 16 et 17 (voir annexe II) nous ont permis d'identifier quelques souches bactériennes. Ces tableaux nous montrent une prédominance des *Enterobacteriaceae*, parmi lesquels on note la présence de : *Salmonella typhi* (1), *Klebsiella oxytoca* (2), *Klebsiella pneumoniae* (E), *Morganella morganii* (3), *Enterobacter cloacae* (G), *Serratia marcescens* (H) et une seule espèce du genre *Pseudomonas* c'est la *P. stutzeri* (F). Toutes ces souches sont des bactéries endophytes isolées des racines de *Hedysarum pallidum*.

## Résultats et discussion

---

D'autre part les souches *Providencia rettgeri* (A), *P. alcalifaciens*(B), *P. rettgeri* (C), *P. stteartti*(D) sont obtenues des racines de *Lygeum spartum*. Signalons que les espèces citées 1-2-3 sont résistantes uniquement au plomb et les espèces A-B-C-D-E-F-G-H sont résistantes uniquement au Cd.

Les tableaux 17 et 18 résument l'ensemble des tests biochimiques pour chaque souche avec son degré de compatibilité avec les souches répertoriées. On remarque qu'on a pu identifier 12 souches sur 19 souches étudiées avec un pourcentage de certitude de 60% et plus dans tous les cas où la bactérie était identifiée.

### Conclusion

Ce travail a été basé principalement sur l'isolement et l'identification des bactéries endophytes résistantes au Cadmium et au Plomb ; à partir de deux plantes steppiques *Lygeum spartum* et *Hedysarum pallidum*.

L'ensemencement sur milieu Chapman, Cétrimide Mac conkey a donné 71 souches différentes ; soit 57,75% de *Lygeum spartum* et 42,25% de *Hedysarum pallidum*. L'examen microscopique après coloration de Gram montre qu'environ 62,95% des souches appartiennent au Gram négatif et 37,04 % au Gram positif

La sensibilité des bactéries vis-à-vis le Cadmium et le Plomb se différencie selon les espèces et le degré de toxicité du métal. Les tests de toxicité ont permis de sélectionner une souche résistante à 5mM et 7 souches résistantes à 2 mM de Pb et 8 souches résistantes à 0.5 mM de Cd. Ces mêmes tests ont montrés que le Cd est plus toxique que le Pb par ailleurs ce dernier possède une CMI de 6mM et 4 mM contre une CMI de 1.5mM de Cd .

Les tests biochimiques ont permis d'identifier les bactéries endophytes résistantes :

- A partir d' *Hedysarum pallidum* : on a identifié sept souches qui appartiennent aux entérobactéries dont : *Salmonella typhi* (1), *Klebsiella oxytoca*(2), (E) *Klebsella pneumoniae*, *Morganella morganii*(3), (G) *Enterobacter cloacae* ,(H) *Serratia marcesens*, et une seule espèce du genre *pseudomonas* c'est la *P. stutzeri* (F) .
- A partir de *Lygeum spatum* on a identifié 4 entérobactéries qui appartiennent au genre *Providencia* : (A) *P. rettgeri* (B) *P. alcalifaciens*, (C) *P. rettgeri*, (D) *P. stuartti* ; signalons que les espèces citées 1-2-3 sont résistantes uniquement au plomb et les espèces A-B-C-D-E-F-G-H sont résistantes uniquement au Cd

Pour compléter ce travail, il serait souhaitable de faire une identification plus poussée des souches les plus résistantes en utilisant des techniques de biologie moléculaire et protéomique. La nécessité de doser quelques enzymes de stress telles que la catalase, la peroxydase, la SOD et autres enzymes pour estimer le degré de stress en présence des métaux étudiés .

### Référence bibliographiques

- [1]- **Bourelrier, P.H., Berthelin, J.** Contamination des sols par les éléments en trace les risques et leur gestion. Tec & Doc Lavoisier (Ed.). Paris. 1998.
- [2]- **Leake, J.R., Johnson, D., Donnelly, D.P., Muckle, G.E., Boddy, L. and Read, D.J.** Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agro ecosystem functioning. *Can. J. Bot.* **82**: 1016-1045. 2004.
- [3]- **Balesdent J. (1998)**, « La biotransformation du carbone et de l'azote », p. 67 -92, in STENGEL P. et GELIN S. (1998), *Le sol : interface fragile*, Paris : INRA éditions, 214 p.
- [4]- **Wilson, D. 1995.** Endophyte - the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, **73**: 274-276
- [5]- **Curl, E. A. & Truelove, B.** (1986). - The Rhizosphere. - Springer Verlag, Heidelberg.
- [6]- **Jaillard, B. & Hinsinger, P.** (1993). - Alimentation minérale des végétaux dans le sol. - Techniques agricoles, 1210(6), 1-13.
- [7]- **Lemanceau, P. & Heulin, T.** (1998). - La rhizosphère. In : Stengel P., Ed, Sol interface fragile, 93-105. INRA.
- [8]- **Gobat, J.M., Aragno, M., & Matthey, W.** (1998). - Le sol vivant. Gérer l'environnement, Vol. 14. - Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne.
- [9]- **Hinsinger, P.** (1998a). - How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. - *Advances in Agronomy*, **64**, 225-265.
- [10]- **Stengel P. et GELIN S.** (1998), *Le sol : interface fragile*, Paris : INRA éditions, 214 p.

## Références bibliographiques

---

- [11]- **Pierson L.S. and Pierson E.A.** (2000). Microbial gossiping: signalling in the rhizosphere. Proceedings of the PGPR Workshop.
- [12]- **Germida J. J., Siciliano S. D., de Freitas J. R. and Seid A. M.** (1998). Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) *FEMS Microbiol.Ecol.* **26**: 43- 50.
- [13]- **Schulz, B. and Boyle, C.** 2006. What are Endophytes? in Soil Biology, V 9 Microbial Root Endophytes. B. Schulz, C. Boyle, T. N. Sieber (Eds.) © Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 1-13
- [14]- **Wilson, D.** 1995. Endophyte - the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, **73**: 274-276 .
- [15]- **Kendrick B.** The fifth kingdom. Troisième Eds (2000).
- [16]- **Adl S.M. and al.** The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* (2005) 52,399-451.
- [17]- **Simpson A.G.B., Roger A.J.** Eukaryotic evolution: getting to the root of the problem. *Current Biology* (2002) 12, R691-R693.
- [18]- **Simpson A.G.B.; Roger A.J.** The real 'kingdoms' of eukaryotes. *Current Biology* (2004) 14,R693-696.
- [19]- **Durrieu G.** <http://www.associationmycologiquetoulouse.ups-tlse.fr/spip.php?article23> (2008).
- [20]- **Thomas W. D. and Graham R. W.** (1952). Bacteria in apparently healthy pinto beans. *Phytopathology*. 42: 214.



## Références bibliographiques

---

- [21]- **Benhamou H., Gagné S., Le Quéré D. and Dehbi L.** (2000). Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: Beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia phymthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Am. Phytopathol. Sc.* 90:45-56.
- [22]- **Pierre et Marie Curie** « *Bactériologie* ». 2003
- [23]- **Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. and Gardan, L.**, 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* .20: 51-63.
- [24]- **MARTIN DU G.**, « Analyse des crachats: pneumocoques, streptos, » *Thib.*, Épil., 1940, p. 996).
- [25]- **Laga M, Plummer.E, Piot P, Datta P, Namaara W, Ndinga-Achola JO, Nzange H, Maitha G, Ronald AR, Pamba .HO and Brunhamr.C.** Prophylaxis of gonococcal and chlamydial ophthalmia neonatorum : a comparison of silver nitrate and tetracycline. *N Engl J Med* 1988 ;318 : 653-57
- [26]- **Emmert E. A. B. and Handelsman J.** 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiol. Lett.* 171: 1- 9. Evreinoff V. A. (1947). Agriculture
- [27]- Bactérie : Anatomie – Structure 2014 [http://umvf.univ-nantes.fr/microbiologie/enseignement/microbiologie\\_4/site/html/cours.pdf](http://umvf.univ-nantes.fr/microbiologie/enseignement/microbiologie_4/site/html/cours.pdf)
- [28]- **Paul .S** ,2004 B « Bactériologie pour la médecine, la biologie et la biotechnologie » paris
- [29]- **Copyright © Dr. R. E. Hurlbert**, 1996. This material may be used for educational purposes only and may not be duplicated for commercial purposes.
- [30]- **Cristian .C**, 2008 « Microbiologie Hygiène bases microbiologique de la diététique » Edition Dunod ,Paris
- [31]- **Raskin I., Kumar P.B.A.N., Dushenkov S., et Salt D.E.**, 1994 : Bioconcentration of heavy metals by plants. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5 : 285-90.
- [32]- **Loué, A.** (1993). Oligo-éléments en agriculture. Ed. Nathan (ed), 45-177.
- [33]- **Kabata-Pendias, A. and Pendias, H.** (2001). Trace elements in soils and plants. CRC Press, London.

## Références bibliographiques

---

- [34]- **Baker, A.J.M., and Walker, P.L.** (1990). Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: Shaw, J. (Ed.). Heavy Metal Tolerance in plants: Evolutionary aspects. CRC Press, Boca Raton, Florida, 155-178.
- [35 ]- **Nies, D. H.** (1999). "Microbial heavy-metal resistance." *Appl Microbiol Biotechnol* **51**(6): 730-50.
- [36]- **Pearson, R. G.** (1963). "Hard and soft acids and bases." *Journal of the American Society* **85**(22): 3533-3539.
- [37]- **Williams, R. J. P. and Frausto da Silva, J. J. R.** (2006). The Chemistry of Evolution: The Development of Our Ecosystem
- [38]- **Sanita Di Toppi L. et Gabrielli R.,** 1999 : Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp. Bot.* 41 : 105-130.
- [39]- **B. J. Alloway.** Soil processes and the behaviour of heavy metals. In Alloway, B. J. (Ed.). Heavy metals in soils. Chapman & London, (1995) p11-35.
- [40]- **Babich, H. and Stotzky, G.** (1980). Environmental factors that influence the toxicity of heavymetals and gaseous pollutants to microorganisms, *Crit. Rev. Microbiol.* 8, 99-145.
- [41]- **Li, L.Y. and Li, R.S.** (2000). The role of clay minerals and effect of H<sup>+</sup> ions on removal of heavy metal (Pb<sup>2+</sup>) from contaminated soil. *Can. J. Geotech/Rev.* 37, 296-307.
- [42]- **Lamy, I.** (2002). Réactivité des matières organiques des sols vis-à-vis des métaux. Journées nationales de l'étude des sols. p 22.

## Références bibliographiques

---

- [43]- **Babich, H. and Stotzky, G.** (1977a). Effect of cadmium on fungi and on interactions between fungi and bacteria in soil: influence of clay minerals and pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 1059-1066.
- [44]- **Christensen, T.H.** (1984). Cadmium soil sorption at low concentrations: I. Effect of time, cadmium load, pH and calcium. *Water Air Soil Pollut.* 21, 105-114.
- [45]- **Giller, E., K., Witter, Ernst. and McGrath, P.S.** (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils. *Soil. Biol. Biochem.* 30, 1389-1414.
- [46]- **Chaignon, V.** (2001). Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées. Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides. Thèse : Ecole doctorale, Sciences de l'Environnement : Système Terre, Université d'Aix-Marseille.
- [47]- **Deneux-Mustin, S., Roussel-Debet, S., Mustin, C., Henner, P., Munier-Lamy, C., Colle, C., Berthelin, J., Garnier-Laplace, J., Leyval, C.** (2003). Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces : influence des micro-organismes du sol. *TEC & DOC*, Paris.
- [48]- **Foy, C.D., Chaney R.L. and White, M.C.** (1978). The physiology of metal toxicity in plants, *Rev. Plant Physiol.* 29, 511-566.
- [49]- **Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Reeves, R.D., Smith, J.A.C.** (1999). Metal hyperaccumulator plants: a review of ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal polluted soils. Ed. Terry N and Banuelos G. Lewis Publishers Boca Raton, London, New York, Washington, 85-107.
- [50]- **S. Nolte, C. Momma, H. Jacobs, A. Tünnermann, B. N. Chichkov, B. Wellegehausen, and H. Welling.** Ablation of metals by ultrashort laser pulses. *J. Opt. Soc. Am. B*, 14 :2716–2722, 1997.

## Références bibliographiques

---

- [51]- **C. Nowak, J. R. Mossmann, and A. Saada.**État des connaissances sur l'atténuation naturelle : mécanismes et mise en oeuvre. BRGM/RP-51960-FR, mars 2003. Étude réalisée dans le cadre des actions de Service public du BRGM 2001-01POL-318.
- [52]- **A. S. Eppler, D. A. Cremers, D. D. Hickmott, M. J. Ferris, and A. C. Koskelo.** Matrix effects in the detection of Pb and Ba in soils using laserinduced breakdown spectroscopy. *Appl. Spectrosc.*, 50 :1175–1181, 1996.
- [53]- **Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., Fourrier, H.** (2000). Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. *Environmental Pollution* 107, 377-389.
- [54]- **R. E. Pugh, D. G. Dick, A. L. Fredeen,** 2002. Heavy metal (Pb, Zn, Cd, Fe and Cu) contents of plant foliage near the Anvil Range lead/zinc mine, Faro, Yukon Territory, J. *Ecotoxi. Environ. Safety* 52 (2002) 273-279.
- [55]- **Sanita Di Toppi L. et Gabrielli R.,** 1999 : Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp. Bot.* 41 : 105-130.
- [56]- **Marc Pansu and Jacques Gautheyrou.** L'analyse du sol. Minéralogique, organique et minérale. Springer, 2003. 998 p.
- [57]- **Devi, S.R., Prasad, M.N.V.,** 1999. Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. In: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems.* Springer-Verlag, Berlin, pp. 99-116.
- [58]- **Briat, J.F., Lebrun, M.,** 1999. Plant responses to metal toxicity. *Plant Biology and Pathology* 322, 43-54

## Références bibliographiques

---

- [59]- **Greger, M.**, 1999. Metal availability and bioconcentration in plants. In: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-27.
- [60]- **Clemens S, Palmgren MG, Kräner U** (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* 7:309-315
- [61]- **Verbruggen N, Hermans C, Schat H** (2009) Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants *New Phytologist* 181:759–776
- [62]- **Brooks RR, Malaisse F** (1990) Metal-enriched sites in South. Central Africa. In Shaw AJ, ed. Heavy Metal Tolerance In Plants: Evolutionary aspects. CRC Press, Boca Raton, USA 53-73
- [63]- **Turner RG** (1969) Heavy metal tolerance in plants. In : Ecological Aspects of the Mineral Nutrition of Plants (ed. Rorison IH), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 399-410
- [64]- **Clemens S, Palmgren MG, Kräner U** (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* 7:309-315
- [65]- **Ernst WHO** (1990) Mine vegetation in Europe. In Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects. Shaw J. A. (ed.). CRC Press, New York 18:21-38
- [66]- **Sasseville J. L.** 1980. La problématique des substances toxiques dans l'environnement, tome 1: L'agression toxique. Bureau sur les substances toxiques, Ministère de l'Environnement, Gouvernement du Québec, p 46.
- [67]- **Wright D. A., and P. Welbourn.** 2002. Environmental toxicology. Cambridge University Press. pp.274-280.
- [68] Ledin, M., 2000. Accumulation of metals by microorganisms — processes and importance for soil systems. *Earth-Science Reviews* 51, 1-31.

## Références bibliographiques

---

- [69]-**Silver, S., Phung, L.T.**, 2005. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J IND MICROBIOL BIOTECHNOL* 32, 587-605.
- [70]-**Hobman J. L, K. Yamamoto, T. Oshima.** 2007. Transcriptomic Responses of Bacterial Cells to Sublethal Metal Ion Stress. In: *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. D.H. Nies, S. Silver:Editors. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [71] -**Bruins M. R., S. Kapil, and F. W. Oehme,** 2000. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol and Environ Safety*, **45**:198-207.
- [72]- **Rühling A et Söderström B,** 1990. Changes in fruitbody production of mycorrhizal and litter decomposing macromycetes in heavy metal polluted coniferous forests in North Sweden. *Water Air Soil Pollut* 49, 375-387.
- [73]- **Menad, A** 2007. Impact du mercure sur la distribution des champignons du sol dans la region de AZZaba .thèse de doctorat d 'etat ,université Mentouri Constantine.
- [74]-**Ezzouhri,L,Castro,E,Moya,M,Espinol,F,Larini,K.**2009/Heavy metal tolerance offilamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier ,Marocco.*African journal of Microbiologiy research* vol.p.035-048.
- [75] -**Colpaert J, Vandenkoornhuysse P, Adriaensen K,** 2000. Genetic variation and heavy metal tolerance in the ectomycorrhizalbasidiomycete *Suillusluteus*.*New Phytologist.* 147, 367-379.
- [76] -**Blaudez D, Jacob C, Turnau K,** 2000b. Differential responses of ectomycorrhizal fungal isolates to heavy metals *in vitro*.*Mycol. Res.* 104, 1366-1371.
- [77]- **Gast C, Jansen E, Bierling J,** 1988. Heavy metals in mushrooms and their relationships with soil characteristics.*Chemosphere*.**17**, 789-799.

## Références bibliographiques

---

[78]- **Rached-Mosbah oualida** ;1993 .Action de l'antimoine sur la végétation en zone steppique et étude de l'adaptation d'une espèce tolérante ( *hedysarum pallidum* Desf.) .Thèse de docteur en sciences du muséum national d'histoire naturelle.

[79]- **Quezel.p,Santa.s** ;1962in nouvelle flore d'algerie et des régions désertiques méridionales tome i et ii.

[80] -fr.wikipedia.org/wiki

## ANNEXES I

Les milieux utilisés

### **Mac conkey**

Peptone tryptique.....17g

Peptone de viande de caséine.....3g

Lactose.....10g

Sels biliars.....5g

Chlorure de Sodium.....5g

Rouge Neutre.....40 mg

pH =7.4

### **Cétrimide (gélose)**

Peptone de gélatine:.....16,0 g

Peptone de caséine:.....10,0 g

Bromure de tétradonium (cétrimide):.....0,2 g

Acide nalidixique:.....15,0 mg

Sulfate de potassium:.....10,0 g

Chlorure de magnésium:.....1,4 g

Agar:.....10,0 g



### **Chapman (gélose)**

Peptone:.....10,0 g

Extrait de viande de bœuf :..... 1,0 g

Chlorure de sodium:.....75,0 g

Mannitol:.....10,0 g

Rouge de phénol:.....0,025 g

Agar:.....15,0 g

Eau distillée:.....1Litre

pH = 7,4

### **Clark et Lubs (Bouillon)**

Peptone..... 5 g

Glucose..... 5 g

Hydrogénophosphate de potassium..... 5 g

Eau distillée..... 1 l

pH = 7,5

### **Eau peptonée**

Peptone exempte d'indole..... 10 g

Chlorure de sodium..... 5 g

pH = 7,2

### **Gélose gélatinée à 4%**

Gélatine ..... 40g

Gélose nutritive ordinaire.....1000ml soit

Peptone.....10g

Extrait de viande.....5g

Chlorure de sodium.....5g

Agar.....15g

### **Hugh et Leifson**

Tryptone..... 2 g

Bleu de bromothymol..... 30 mg

Chlorure de sodium..... 5 g

Hydrogénophosphate de potassium..... 0,3 g

Agar..... 2,5 g

PH = 7,1

### **Kligler-Hajna**

Peptone..... 15 g

Extrait de viande..... 3 g

Extrait de levure..... 3 g

Peptone pepsique de viande..... 5 g

Glucose..... 1 g

Lactose..... 10 g

Rouge de phénol..... 25 g

Chlorure de sodium..... 5 g

Sulfate ferreux..... 0,2 g

Thiosulfate de sodium..... 0,3 g

Agar-agar..... 11 g

pH = 7,5

### **Milieu de Moëller**

Extrait de levure ..... 3 g

L-ornithine (monochlorhydrate)

L-arginine (monochlorhydrate) ..... 5 g

L-lysine (monochlorhydrate)

Glucose ..... 1 g

Bromocrésol pourpre ..... 0,16 mg

Éthanol ..... 1 ml

Chlorure de sodium ..... 5 g

pH = 6,8

### **Bouillon Nitraté**

Infusion cœur-cervelle..... 25 g

Nitrate de sodium..... 10 g

Eau distillée..... 1 l

pH = 7,2 **56**

Urée-indole

L-tryptophane.....3 g

Urée.....20 g

Monophydrogénophosphate de potassium.....1 g

Dihydrogénophosphate de potassium.....1 g

Chlorure de sodium.....5 g

Ethanol à 95°GL.....10 ml

Rouge de phénol.....25 mg

### **Bouillon d'indol**

$K_2HPO_4$ .....3.13g

L-Tryptophane.....1g

NaCl.....1g

$KH_2PO_4$ .....1.27

Eau distillé.....200ml

PH 7.2 ±0

### **Bouillon nutritive**

Extrait de viande .....3g

Extrait de levure.....2g

NaCl.....1g

Eau distillée.....100ml

PH 7.4±0.2à25°C57

### **Gélose nutritive**

Extrait de viande.....	3g
Agar.....	15g
Peptone.....	5g
Extrait de levure.....	2g
NaCl.....	1g
Eau distillée.....	100ml

pH  $\pm 0.2$  à 25°C

### **Coloration de Gram**

#### **\*Coloration primaire**

Les frottis bactériens sont préparés par étalement d'une couche mince de la suspension bactérienne, séchée et fixée. Ces frottis sont recouverts par le violet de Gentiane et laissés agir 2 mn.

#### **\*Mordant**

Sur les lames, on verse quelques gouttes de la solution du Lugol et on laisse agir 1mn ; puis on lave et enfin on fait égoutter les lames.

#### **\*Décoloration**

Les cellules bactériennes sont décolorées par l'addition de l'acétone, après 2sec les lames sont lavées abondamment à l'eau distillée.

#### **\*Contre coloration**

La contre coloration est réalisé par la Fuchine. Après 2 min de son addition, les lames sont rincées avec de l'eau distillée puis séchée.

## ANNEXE II

1. L 8 rac 3a 2. L8 rac 2a 3. L7rac 2b 4. L7rac 1b 5. L 8 rac 1b 6. L 7 rac 1a 7. L8 rac 2b 8. L8 rac 3a 9. L8 rac 1c 10. L8 rac 3a .	11. H8 rac 1A 12. H8 rac 1D 13. H7 rac 1B 14. H8 rac 3W 15. H7 rac 3 16. H8 rac 3 A 17. H7 rac E 18. H7 rac 2C 19. H7 Rac 2C 20. H7 rac 3C	21. H7 rac 3 B 22. H8 rac 2A 23. H8 rac 2C 24. H7 rac 3D 25. H8 rac 3D 26. H7 rac 2A 27. H8 rac 28 28. H7 rac 3C 29. H7 rac 2B 30. H8 rac 1D
<b>33.33% des souches <i>Lygeum spartum</i></b>	<b>66.66% des souches de <i>Hedysarum pallidum</i></b>	

**Tableau 1 : Souches étudiées**

Milieux Mac conkey	Milieux Cetrimide	Milieux Chapman
L7 rac 3B (2)	L7 rac 1B	L8 rac 2A
L7 rac 1B(2)	L8 rac 1C (1)	L8 rac 1 A(1)
L8 rac 1C(1)	L8 rac 3B(1)	L8 rac 2B(2)
L8 rac 2B (2)	L7 rac 2B	L8 rac 1 A (1)
L8 rac3A2)	L8 rac 1A	L8 rac 2 A (1)
L8 rac 1B (2)	L8 rac 2B (1)	L7 rac 2B
L8 rac 3A(4)	L8 rac 3A (1)	L8 rac 1A (2)
L7 rac 2B(2)	L8 rac 2B	L8 rac 2 B (1)
L7 rac 2B(1)	L8 rac 3A	
L8 rac 3B (1)	L8 rac 1B	
L7 rac 1B(1)	L8 rac 2 A	
L8 rac 3A(3)		
L8 rac 2B(1)		
L8 rac 1B(1)		
L8 rac 1A(2)		
L8 rac 3 A (1)		
L8rac 3A(2)		
L8 rac 1A (1)		
L8rac 3A (1)		
L8rac 3A (1)		
51.28%	28.20%	20.51%

**Tableau 2: Souches obtenues après ensemencement sur les milieux spécifiques**

( plante *Lygeum spartum* )

Milieux Mac	Milieux Cetrimide	Milieux Chapman
H8 rac 3W	H8 rac 2C	H8 rac 1A (3)
H7 rac 2 A	H7 rac 3B	H8 rac 1A (1)
H8 rac 28	H8 rac 3D	H8 rac 1D
H7rac 2C	H8 rac 2A	H7 rac 1B
H8 rac 2 A	H8 rac 3W	H8 rac 3W
H7 rac 3C		H7rac 3
H7rac 2B		H8 rac 3E
H8 rac 2C		H7 rac E
		H7 rac 2C
		H7 rac2C
		H8 rac 1D
		H7 rac 3C
		H7 rac 3B
		H8 rac 1A (2)
		H8 rac 2A
28.57%	17.85%	53.57%

**Tableau 3 : Souches obtenues après ensemencement sur les milieux spécifiques**

(plante *Hedysarum pallidum*)

H8 rac 1D	L8 rac 1A
H8 rac 1A	L8 rac 2B
H7 rac 3E	L8 rac 1D (résistante 5 mM)
H7 rac 1B	
H7 rac 2C	
62.5% de <i>Hedysarum pallidum</i>	37.5% de <i>Lygeum.spartum</i>

**Tableau 4 : Résultats de test de toxicité [2mM Pb]**

L8rac1C	H8 rac3D
L8 rac 1A "	H8 rac 2A
L8 rac1A '	H7 rac3B'
L8 rac1A	H8 rac3W
50% <i>Lygeum spartum</i>	50% <i>Hedysarum pallidum</i>

**Tableau 5 : Résultats de test de toxicité [0.5mM Cd]**

Milieu Cétrimide	Milieu Mac conkey	Milieu Chapman
Pas de poussé	H8rac1D	Pas de poussé
Pas de poussé	H8rac1A	Pas de poussé
Pas de poussé	H7rac3E	Pas de poussé
Pas de poussé	H7rac1B	Pas de poussé
Pas de poussé	H7rac2C	Pas de poussé
Pas de poussé	L8rac1A	Pas de poussé
Pas de poussé	L8rac2B	Pas de poussé
Pas de poussé	L8rac1D	Pas de poussé
5 souches <i>Hedysarum pallidum</i>		3 souches <i>Lygeum spartum</i>
62.5% Gram -		37.5% Gram-

**Tableau 6 : Résultat d'ensemencement des souches résistantes à 2mM Pb sur les milieux spécifiques**

Milieu Cétrimide	Milieu Mac conkey	Milieu Chapman
L8rac1A "	Pas de poussé	Pas de poussé
L8rac1C	Pas de poussé	Pas de poussé
L8rac1A'	Pas de poussé	Pas de poussé
L8rac1A	Pas de poussé	Pas de poussé
H8rac3D	Pas de poussé	Pas de poussé
H8rac3W	Pas de poussé	Pas de poussé
H8rac2A	Pas de poussé	Pas de poussé
H7rac3B'	Pas de poussé	Pas de poussé
4 souches de <i>Lygeum spartum</i>		4 souches de <i>Hédysarum pallidum</i>
50% Gram-		50% Gram-

**Tableau 7 : Résultat d'ensemencement des souches résistantes à 0.5 mM Cd sur milieux spécifiques**

Souche résistantes oncentration.	[Pb mM]				
	0	1	2	3	4
H8 rac 1D	Indénombrable	196	104	120	(+)
H8 rac 1A	Indénombrable	90	74	41	(-)
H7 rac 3E	Indénombrable	30	39	20	(-)
H7 rac 1B	Indénombrable	130	75	(-)	(-)
H7 rac 2C	Indénombrable	17	5	(-)	(-)
L8 rac 1A	Indénombrable	200	100	(-)	(-)
L8 rac 2B	Indénombrable	143	48	(-)	(-)
L8 rac 1D	Indénombrable	Indénombrable	31	(-)	(-)

**Tableau 8 : Résultats de la CMI pour le Plomb.**



Souche résistantes	[Cd mM]			
	0	0.5	1	1.5
Concentration				
H8 rac3D	Indénombrable	+++	++	(-)
H8 rac 2A	Indénombrable	+++	++	(-)
H7 rac3B'	Indénombrable	+++	++	(-)
H8 rac3W	Indénombrable	+++	++	(-)
L8rac1C	Indénombrable	+++	++	(-)
L8 rac 1A "	Indénombrable	+++	++	(-)
L8 rac1A '	Indénombrable	+++	++	(-)
L8 rac1A	Indénombrable	+++	++	(-)

**Tableau 9 : Résultats de la CMI pour le Cadmium.**

Milieu Cétrimide	Milieu Mac conkey	Milieu Chapman
Pas de poussé	H8rac1D	Pas de poussé
Pas de poussé	H8rac1A	Pas de poussé
Pas de poussé	H7rac3E	Pas de poussé
3 souches <i>Hedysarum pallidum</i> à 100% Gram-		

**Tableau 10 : Résultat d'ensemencement des souches résistantes, ayant une CMI plus de 3mM Pb, sur les milieux spécifiques .**

Milieu Cétrimide	Milieu Mac conkey	Milieu Chapman
H8 rac3D	H8 rac3D	Pas de poussé
H8 rac 2A	H8 rac 2A	Pas de poussé
H7 rac3B'	H7 rac3B'	Pas de poussé
H8 rac3W	H8 rac3W	Pas de poussé
L8rac1C	L8 rac1C	Pas de poussé
L8 rac 1A "	L8 rac 1A "	Pas de poussé
L8 rac1A '	L8 rac1A '	Pas de poussé
L8 rac1A	L8 rac1A	Pas de poussé
4 souches de <i>Lygeum spartum</i>		4 souches de <i>Hédysarum pallidum</i>

**Tableau 11 : Résultat d'ensemencement des souches résistantes, ayant une CMI de 1.5mM Cd, sur les milieux spécifiques .**


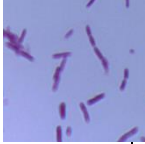

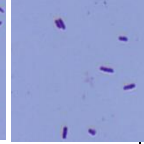
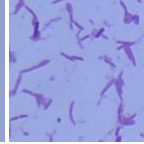
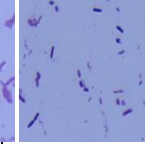
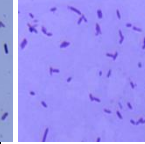
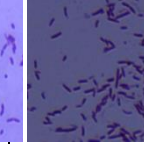
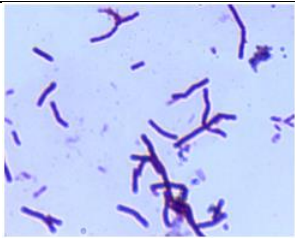
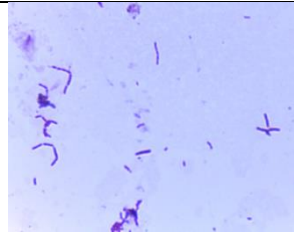

Bactéries	Cd							
	A.L8rac1A''	B.L8rac1C	C.L8rac1A'	D.L8rac1A	E.H8rac3D	F.H8rac3W	G.H8rac2A	H.H7rac3B'
Morphologies des souches								
Urée (urée indol)	+	-	+	-	+	-	+	+
TDA	+	+	+	+	+	+	+	+
NR1/NR2	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	-	-	+	+	-	-	+	+
VF	A/An	A/An	A/An	A/An	A/An	A/An	A/An	A/An
RM	+	+	+	+	+	+	+	+
VP1/VP2	-	+	+	+	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-
DCL	+	+	+	+	+	+	+	+
Métabolisme O/F	F+/-/O+	F+/O+	F-+/O+	F-/O+	Inerte	F+/O+	inerte	Inerte
ADH	-	+	-	-	+	-	+	+
ODC	-	-	+	-	-	-	+	+
LDC	-	-	-	-	-	+	-	+

Tableau 12 : Résultats globales des tests biochimiques des souches résistantes au Cadmium, obtenues sur milieu Mac Conkey .

<b>Pb</b>			
<b>Bactéries</b>	<b>1.H8rac1D</b>	<b>2. H8rac1A</b>	<b>3. H7rac3E</b>
<b>Morphologie des souches</b>			
<b>Uréase(urée indol)</b>	-	+	+
<b>TDA</b>	-	+	+
<b>NR1/NR2</b>	+	+	+
<b>ONPG</b>	-	+	-
<b>VF</b>	<b>A/An</b>	<b>A/An</b>	<b>A/An</b>
<b>RM</b>	+	-	-
<b>VP1/VP2</b>	-	+	+
<b>indol(kovacs)</b>	-	-	-
<b>Métabolisme O/F</b>	<b>Inerte</b>	<b>Inerte</b>	<b>Inerte</b>
<b>ADH</b>	+	+	-
<b>ODC</b>	-	-	+
<b>LDC</b>	+	+	+
<b>Gélatinase</b>	-	-	-

**Tableau 13 : Résultats globales des tests biochimiques des souches résistantes au Plomb obtenues sur milieu Mac Conkey.**

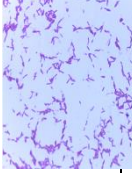

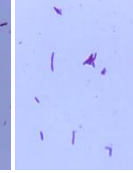
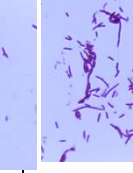
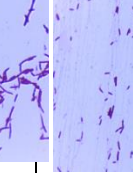
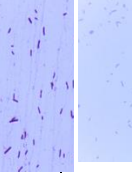
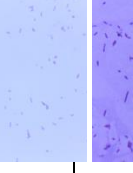
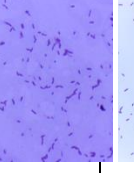
Bactéries	Cd							
	A. L8rac1 A	B. L8rac1 C	C.L8rac1 A'	D.L8rac1 A	E.H8rac3 D	F.H8rac3 3W	G. H8rac2A	H. H7rac3B'
La morphologie								
Urée	+	-	-	+	+	-	+	+
TDA	+	+	+	+	+	-	-	-
NR1/ NR2	+	+	-	+	+	+	+	+
ONPG	-	-	+	-	-	-	-	+
RM	+	+	-	+	+	+	+	+
VP	+	+	+	-	+	+	+	+
VF	As	Ans	A/An	A/An	As	As	A/An	As
indol(kovacs)	-	-	-	-	-	-	-	-
Métabolisme O/F	F-/O+	F+/O-	F-/O+	F-/O+	F-/O+	F-/O+	F+/O+	F-/O+
Lécitinase	+	+	+	+	+	-	+	+
King A	A+	A-	A+	A+	A+	A-	A+	A+
King B	B+	B+	B-	B+	B+	B-	B+	B+
Gélatinase	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 14 : Résultats globaux des tests biochimiques des souches résistantes au Cadmium obtenues sur milieu Cétrimide

	Mobilité	LAClose	ONPG	ADH	LDC	ODC	CITrate (Simmons)	H <sub>2</sub> S	URÉE (uréase)	PDA ou TDA	INDole	VP	Gf/Latimase	MANnitrol	SACcharose	RM	DNase
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	(-)	(+)	V	-	-	-	-	-	-	+	V	+	-	
<i>Shigella sauf sonnei</i>	-	-	-	(-)	-	-	-	-	-	-	V	-	-	(+)	-	+	-
<i>Shigella sonnei</i>	-	-	(+)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Salmonella (majorité)</i>	+	-	-	(+)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Salmonella typhi</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Salmonella paratyphi A</i>	+	-	-	(-)	-	+	-	(-)	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Citrobacter freundii</i>	+	V	+	V	-	(-)	+	(+)	-	-	(-)	-	-	+	V	+	-
<i>Citrobacter diversus</i>	+	V	+	V	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	V	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	(-)	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	+	+	-	+	-	+	-	(+)	-	-	+	-	+	+	(-)	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	(-)	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	(+)	+	+	-	+	+	-	V	-	-	+	-	+	+	(-)	-
<i>Hafnia alvei</i>	(+)	(-)	(+)	(-)	+	+	(-)	-	-	-	-	(+)	-	+	(-)	V	-
<i>Serratia marcescens</i>	+	-	+	-	+	+	+	(-)	-	-	-	+	+	+	+	(-)	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+	-	-	-	-	+	V	+	+	-	-	V	(+)	-	(-)	+	V
<i>Proteus vulgaris</i>	+	-	-	-	-	-	(-)	+	+	+	+	-	(+)	-	+	+	(+)
<i>Providencia rettgeri</i>	(+)	(-)	(-)	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	(-)	(+)	-
<i>Providencia stuartii</i>	(+)	-	(-)	-	-	-	(+)	-	V	+	+	-	-	(-)	V	+	(-)
<i>Providencia alcalifaciens</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	(-)	+	+	-
<i>Morganella morganii</i>	+	-	(-)	-	-	+	-	(-)	+	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	(-)	+	-	-	+	-	-	(+)	-	V	-	-	+	+	+	(-)
<i>Yersinia pestis</i>	-	-	V	-	-	-	-	-	(-)	-	-	-	-	+	-	(+)	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-	-	(+)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-

Tableaux 15: Identification traditionnels des Entérobactéries(1)

	LAC	ONPG	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	CIT	LDC	ODC	ADH	MAN	MOB	SAC
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
<i>Salmonella paratyphi A</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
<i>Salmonella arizonae</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella spp</i>	-	-	+/-	-	-	-	-	-	+/-	+	+	-/+	+	+	+/-
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+	+/-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-/+	+	+	+
<i>Citrobacter diversus</i>	-/+	+	-	-	-	+	-	-	?	+	-	?	+	+	+
<i>Escherichia coli 1</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+/-	+/-	-	+	+	-/+
<i>Escherichia coli 2</i>	+	-/+	-	-	-	?	-	-	-	?	-/+	-	+	+	-
<i>Escherichia vulneris</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	?	-	-/+	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter gergoviae</i>	+	+	-	+	-	-	+	-	+/-	-/+	+	-	+	+	+
<i>Enterobacter spp</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+/-	-	+	-/+	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+/-	-	-/+	-	-	+/-	-	+/-	-/+	-	-	+	-	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+
<i>Klebsiella spp</i>	+	+	-	-	-	-	+/-	-	+/-	+/-	-	-	+	-	+
<i>Hafnia alvei 1</i>	-	+	-	-	-	-	+/-	-	?	+	+	-	+	+	-
<i>Hafnia alvei 2</i>	-	?	-	-	-	-	-/+	-	-	+	+	-	+	+	-
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	?	+	+	-	+	+	+
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	-	+/-	-	-	+	-	-	?	+	+	-	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	-	+	-	-/+	-	-	+/-	+	+	+	-	-	+	+	+
<i>Serratia odorifera</i>	-	+	-	-	-	+	?	+	+	+	?	-	+	+	+
<i>Serratia spp</i>	-	+	-	-	-	-	+/-	+/-	+	?	-	-	+	+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	+	+	+	-	-	+	?	-	?	-	+	+	+
<i>Proteus penneri</i>	-	-	-/+	+	+	-	-	?	-	-	-	-	+	+	+
<i>Morganella morganii</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
<i>Providencia rettgeri</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-/+
<i>Providencia stuartii</i>	-	-	-	-/+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	+	-	+	-	?	-	-	-	-	+	-	+	-	+
<i>Yersinia pestis</i>	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Yersinia spp</i>	-	?	-	?	-	?	-	-	-	-	?	-	+	-	-/+
<i>Shigella sonnei</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+/-	-	-
<i>Shigella spp</i>	-	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Tableau16: Identification traditionnels des Entérobactéries ( 2)

	<i>P.aeruginosa</i>	<i>P.fluorescens</i>	<i>P.putida</i>	<i>P.stutzeri</i>	<i>S.maltophilia</i>	<i>B.cepacia</i>
Oxydase	++	+	+	+	- ou lente	+ lente
KingA(pyocyanine)	v	-	-	-	-	-
King B(pyoverdine)	v	v	v	-	-	-
Réduction NO3	+	v	-	+	-	-
Culture à 41°C	+	-*	-*	v	-	-
ADH	+	+	+	-	-	-
LDC	-	-	-	-	+	v
ODC	-	-	-	-	-	v

Gélatinase	+	+	-	-	+	+/-
Esculine	-	-	-	-	+	v
Citrate Simmons	+	+	+	+	-	+
Assimilation :						
Tréhalose	-	+/-	-	-	-	v
Maltose	-	-	-	+	-	-
Mannitol	+/-	v	v	v	-	+

**Tableau 17 : Identification traditionnelle des Pseudomona**

Test Souches	Urée	TDA	NR1/2	ONPG	VF	RM	VP	Indole	DCL	O/F	ADH	ODC	LDC	Gélatine
<b>1.H8rac1D</b>	-	-	+	-	A/AN	+	-	-	/	Inerte	+	-	+	-
90% <i>Salmonella typhi</i>	-	-	/	-	/	/	-	-	/		-	-	+	-
<b>2.H8rac1A</b>	+	+	+	+	A/AN	-	+	-	/	Inerte	+	-	+	-
70% <i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	/	+	/	/	+	+	/	/	-	-	+	-
<b>3.H7rac3E</b>	+	+	+	-	A/AN	-	+	-	/	Inerte	-	+	+	-
70% <i>Morganella morganii</i>	+	+	/	-	/	/	-	+	/	/	-	+	-	-
<b>A.L8rac1A''</b>	+	+	+	-	A/AN	+	-	-	+	O+/F- +	-	-	-	-
90% <i>Providencia rettgeri</i>	+	+	/	-	/	+	-	+	/	/	-	-	-	-
<b>B.L8rac1C</b>	-	+	+	-	A/AN	+	+	-	+	O+/F+	-	-	-	-
80% <i>Providencia alcalifaciens</i>	-	+	/	-	/	+	-	+	/	/	-	-	-	-
<b>C.L8rac1A'</b>	+	+	+	+	A/AN	+	+	-	+	O+/F- +	-	+	-	-
60% <i>Providencia Rettgeri</i>	+	+	/	-	/	/	-	+	/	/	-	-	-	-
<b>D.L8rac1A</b>	-	+	+	+	A/AN	+	+	-	+	O+/F-	-	-	-	-
70% <i>Providencia stearthi</i>	-	+	/	-	/	/	-	+	/	/	-	-	-	-
<b>E.H8rac3D</b>	+	+	+	-	A/AN	+	+	-	+	Inerte	+	-	-	-
80% <i>Klebsella pneumoniae</i>	+	-	/	-	/	/	+	-	/	/	-	-	-	-
<b>F.H8rac3W</b>	-	+	+	-	A/AN	+	+	-	+	O+/F+	-	-	+	-
80% <i>Salmonella typhi</i>	-	-	/	-	/	+	-	-	/	/	-	-	+	-
<b>G.H8rac2A</b>	+	+	+	+	A/AN	+	+	-	+	Inerte	+	+	-	-
80% <i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	/	+	/	/	+	-	/	/	+	+	-	-
<b>H.H7rac3B'</b>	+	+	+	+	A/AN	+	+	-	+	Inerte	+	+	+	-

<b>70%</b> <i>Serratia marcescens</i>	+	-	/	+	/	/	+	-	/	/	-	+	+	+
--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

**Tableau 18 : Identification des Entérobactéries**

<b>Test</b> <b>Souches</b>	<b>Uréé</b>	<b>indol</b>	<b>ONPG</b>	<b>Lécitinas<sub>e</sub></b>	<b>KingA</b>	<b>KingB</b>	<b>Gélatinas<sub>e</sub></b>	<b>Lactose</b>	<b>TDA</b>	<b>Indol</b>	<b>O/F</b>
<b>E. H8rac3D</b>	+	-	-	+	+	+	-	<b>L-</b>	+	-	<b>O+/F-</b>
<i>Non identifier</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>F. H8rac3W</b>	-	-	-	-	-	-	-	<b>L-</b>	-	-	<b>O+/F-</b>
<b>60%<i>P.stutzeri</i></b>	/	/	/	/	-	-	-	/	/	/	<b>Aérobie</b>

**Tableau 19: Identification des Pseudomonas**



يرتكز عملنا على تحديد البكتيريا endophytes المقاومة لوجود الرصاص و الكاديوم . تم عزل هاته البكتيريا من خلال جذور نبتتين من المناطق السهبية *Hydysarum pallidum* و *Lygeum spartum* . أعطت زراعة 30 سلالة على آجار مغذي مع تركيزات مختلفة من الرصاص و الكاديوم سلالة مقاومة لـ 5 مم من الرصاص مع تركيز أدنى مثبط للمعادن الثقيلة قدر بـ: 6 ميلي مول و 7 سلالات مقاومة لـ 2مم من الرصاص مع تركيز أدنى مثبط للمعادن الثقيلة قدر بـ: 1.5 مم . أظهرت عملية تحديد السلالات الأكثر مقاومة للمعادن الثقيلة عن طريق الاختبارات البيوكيميائية أن هذه البكتيريا هي

*Salmonella typh*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Salmonelle typhi*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcesens*, *Providencia rettgeri*, *Providencia alcalifaciens*, *Providencia stuarti* , *providencia rettgeri*, et *Pseudomonas stutzeri*.

#### الكلمات الدالة

الرصاص و الكاديوم ,المقاومة ,البكتيرية الداخلية , تركيز ادنى مثبط للمعادن الثقيلة .

## Résumé

---

### Résumé

Notre travail porte sur l'identification des bactéries endophytes résistantes à la présence de Pb et Cd. Ces bactéries sont isolées à partir des racines de deux plantes steppique *Lygeum spartum* et *Hedysarum pallidum*.

L'ensemencement de 30 souches sur milieu gélosé supplémenté par différentes concentrations de Plomb et Cadmium a donné : une souche résistante à 5mM de Pb avec une CMI de 6mM, 7 souches résistantes à 2mM de Pb avec une CMI de 4mM et 8souches résistantes à 0.5mM Cd dont leur CMI est de 1.5mM. L'identification des souches les plus résistantes par des tests biochimiques dévoile que ces bactéries sont : *Salmonella typhi*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Salmonelle typhi*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcesens*, *Providencia rettgeri*, *Providencia alcalifaciens*, *Providencia stuarti*, *providencia rettgeri*, et *Pseudomonas stutzeri*.

### Mots clés

Tests de toxicité, CMI, Endophytes, Cadmium, Plomb, Resistances.

## Abstract

---

### Abstract

Our work focuses on the identification of endophytes resistant to the presence of Pb and Cd bacteria. These bacteria were isolated from the roots of two steppe plants and *Lygeum spartum* and *Hydysarum pallidum*. Seeding of 30 strains on agar medium supplemented with different concentrations of lead and cadmium gave a strain resistant to 5 mM Pb with an MIC of 6 mM, 7 resistant to 2 mM Pb with an MIC of 4 mM and 0.5 mM Cd 8souches resistant how their CMI is 1.5mm. The identifications of the most resistant strains by biochemical tests revealed that these bacteria are *Salmonella typhi*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Salmonelle typhi*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcesens*, *Providencia rettgeri*, *Providencia alcalifaciens*, *Providencia stuarti*, *providencia rettgeri*, et *Pseudomonas stutzeri*.

### Key words

Toxicity, Tests, MIC, Endophytes, Cadmium, Plomb, Resistance, Identification.

**BELHI IKRAM**  
**CHERIET HANANE**

Date de soutenance : 25/06/2014

**Titre : Identification des bactéries endophytes résistantes au Plomb et au Cadmium isolées des racines de deux plantes steppiques :*Lygeum spartum* et *Hedysarum pallidum***

**Nature du Diplôme : Master en Microbiologie Générale /Option: Biotechnologie des Mycètes,fermentation et production de substance fongique .**

### **Résumé**

Notre travail porte sur l'identification des bactéries endophytes résistantes à la présence de Pb et Cd. Ces bactéries sont isolées à partir des racines de deux plantes steppiques *Lygeum spartum* et *Hedysarum pallidum*.

L'ensemencement de 30 souches sur milieu gélosé supplémenté par différentes concentrations de Plomb et Cadmium a donné : une souche résistante à 5mM de Pb avec une CMI de 6mM, 7 souches résistantes à 2mM de Pb avec une CMI de 4mM et 8souches résistantes à 0.5mM Cd dont leur CMI est de 1.5mM. L'identification des souches les plus résistantes par des tests biochimiques dévoile que ces bactéries sont :*Salmonella typhi*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*,*Morganella morganii*,*Salmonelle typhi*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcesens*, *Providencia rettgeri*, *Providencia alcalifaciens*, *Providencia stuartii* , *providencia rettgeri*, et *Pseudomonas stutzeri*.

**Mots clés : Tests de toxicité ; CMI ; Endophytes ; Cadmium ;Plomb : Resistances .**

**Laboratoire de Biologie et Environnement. Université Constantine 1.**

**Encadreur : Mme KASSA LAOUAR Mounia**

**Année Universitaire 2013-2014**