

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES  
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

# Mémoire

**De fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master**

**Domaine : Sciences de la nature et de la vie (S.N.V.)**

**Filière : Sciences biologiques**

**Spécialité : Biotechnologie microbienne**

**Intitulé du thème :**

Etude de l'effet des métaux lourds sur la croissance de  
*Lactobacillus* en tant que PGPR

Présenté par : *Melle Abiras Chahrazed Ikram*

*Melle Bousahla Lamia*

Mémoire déposé devant l'honorable jury composé de :

**Président : Mr Abbouni. B (Professeur, Univ\_UDL\_SBA)**

**Examineur : Mr Benine. M (MCA, Univ\_UDL\_SBA)**

**Examinatrice : Melle KANOUN. K (MCA, Univ\_UDL\_SBA)**

**Encadreur : Mme GHALEM. M (MCB, Univ\_UDL\_SBA)**

**Année universitaire 2020 – 2021**

**Session : « Juin »**

## **Remerciement**

*Nous remercions ٱللہ (allah) le tout puissant ..... qui nous a donné la force et la patience lors de la réalisation de ce travail .*

*Nous exprimons nos remerciements à notre encadreur **Mme GHALEM.M** Maître à l'UDL de Sidi Bel Abbas, pour l'encadrement de ce travail aussi pour ses rôles prépondérants, ainsi que pour nous avoir fait profiter de ses connaissances .*

*Nous sommes très honorés et tenons à remercier tous les membres du jury : responsable de spécialité biotechnologie microbienne et président du jury **Mr ABBOUNI.B** Professeur de l'UDL de Sidi Bel Abbas.*

***Mr BENNIN. M** Maître de conférence pour avoir accepté examiner notre travail.*

***Melle KANOUN.K** Maître de conférence, pour avoir accepté examiner notre travail.*

*Enfin toute notre sympathie et nos remerciements vont également à tous ceux et celles, qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire.*

## Dédicace

*Je dédie ce modeste travail :*

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

*À mon frère : Abdéljaber et Farouk*

*À mes très chères sœurs : Meriem et Hadjer*

*A mon époux chère : Hadi*

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

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

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

## Dédicace

*Je dédie ce modeste travail :*

*À mes chers parents source de vie, et d'amour,*

*À mes belles sœurs Maïssaà , Àlaa et mon*

*À mon chère frère Farouk*

*À ma petite princesse sœur Malek*

*À ce que j'aime beaucoup, qui m'ont toujours soutenus et étaient toujours*

*à mes coté : Soumia et son marie Mustapha, Khawla , Rekia ,*

*Oussama*

*À tout le reste de la famille : Grand-mère, oncles, tantes, cousins, cousine*

*À mes chères amies : Ben gazi Hadjer, Ferial, Hadjer, Khadidja ,*

*Chaïmaà,*

*A mon chère binôme Chahrazed*

*À tous ceux qui ont eu un impact sur ma vie et à tous ceux qui aiment*

*mon cœur*

*Merci pour leurs amours et leurs encouragements*

**Lamia**

## Résumé

Les métaux lourds sont naturellement présents dans l'environnement et sont très préoccupants dans le monde entier. L'accumulation de métaux lourds dans les sols peut entraîner de graves effets indésirables chez l'homme et les végétaux.

Dans le but de trouver solution à ce problème, la présente étude se concentre sur les probiotiques de genre *Lactobacillus* en tant que des PGPR via la recherche des activités de biofertilisation (fixation d'azote et solubilisation de phosphate tricalcique et production de  $\text{NH}_3$ ) et de biostimulation tel que la production d'acide indo-acétique; et avec le potentiel d'agent de bioremédiation à travers la caractérisation de sa tolérance aux métaux lourds de sol.

Au total, dix isolats de lactobacilles ont été obtenus à partir de lait de vache cru et identifiés en fonction de leurs propriétés morphologiques et biochimiques. Ces isolats ont été testés pour le potentiel PGP par les tests de solubilisation de phosphate, fixation d'azote, production d'ammonium, production d'acide indole acétique ainsi qu'un essai de germination. Afin de sélectionner la souche la plus intéressante et d'en évaluer la tolérance aux métaux lourds.

Les résultats ont démontré que la totalité des bactéries testées expriment des activités impliquées dans la promotion de la croissance des plantes.

L'étude de la tolérance de la souche ANS6, identifiée comme *Lactobacillus casei* *subsp. casei*, pour certains métaux lourds a été testée par criblage en milieu liquide (LB) et différentes concentrations de métaux ont été expérimentées. L'effet toxique des métaux lourds ( $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CrK}_2\text{O}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$  et  $\text{HgCl}_2$ ) apparaît dès la première concentration testée ( $50\mu\text{g/ml}$ ). Cette effet est modère avec le  $\text{ZnSO}_4$ , le  $\text{CrK}_2\text{O}_4$  et le  $\text{CuSO}_4$ . La souche ne présente, cependant, aucune tolérance au chlorure de mercure, sa croissance se trouve inhibé à la plus faible concentration testé ( $50\mu\text{g/ml}$ ).

**Les mots clés :** Métaux lourds, *Lactobacillus*, PGPR, PGP.

## ABSTRAC

Heavy metals are naturally present in the environment and are preoccumulative worldwide. Accumulation of heavy roux in soils can cause serious adverse effects in humans and plants.

In order to find a solution to this problem, the present study focuses on the probiotic genus *Lactobacillus* as PGPR with PGP potential through the research of biofertilisation activities (nitrogen fixation and solubilization of tricalcium phosphate and production of NH<sub>3</sub>) and biostimulation such as indo-acetic acid production; and with the potential for bioremediation through characterization of its tolerance to heavy soil metals.

A total of 10 lactobacilli's isolates have been obtained from raw cow's milk. They have been identified according to their morphological and biochemical properties. Theses isolates have been tested for PGP potential by solubilization, nitrogen fixation, ammonium production and indole acetic acid production tests. Germination trial has also been performed. The most interested strain has been identified and characterization of its tolerance to heavy soil metals.

The results demonstrated that all of the bacteria tested express activities involved in plant growth promoting.

The heavy metal tolerance capacity of the strain ANS6, identified as *Lactobacillus casei subsp. casei*, for some heavy metals was tested by liquid screening (LB) and different concentrations of metals were tested. The toxic effect of heavy metals (ZnSO<sub>4</sub>, CrK<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub> and HgCl<sub>2</sub>) appears from the first concentration tested (50 µg / ml). This effect is moderate with ZnSO<sub>4</sub>, CrK<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and CuSO<sub>4</sub>. The strain shows, however, no tolerance to mercury chloride, its growth is inhibited at the lowest concentration tested (50 µg / ml).

**Key words:** heavy metals, *lactobacillus*, PGPR, PGP

## المخلص

المعادن الثقيلة موجودة طبيعيا في البيئة و متراكمة في جميع انحاء العالم .تراكم المعادن الثقيلة في التربة يمكن ان يسبب اثار ضارة على الانسان و النبات.

ومن أجل إيجاد حل لهذه المشكلة ، تركز هذه الدراسة على جنس البروبيوتيك لاكتوباسيلوس كبكتيرية محفزة لنوم الباتات (PGPR) من خلال البحث في أنشطة الاستعمال الحيوي (تثبيت النيتروجين، ذوبان فوسفات ثلاثي الكالسيوم وإنتاج  $NH_3$ ) والتوقيت الحيوي مثل إنتاج حمض الخليك الهندي ؛ ومع إمكانية الإصلاح البيولوجي من خلال توصيف تحمله للمعادن الثقيلة في التربة.

وفي المجموع ، تم الحصول على 10 عزلات من اللاكتوباسيلوس من حليب البقر الخام وتم تحديدها وفقا لخصائصها المورفولوجية والكيميائية الحيوية. وقد اختُبرت هذه العزلات لإمكانية PGP عن طريق اختبارات تثبيت النيتروجين ، إنتاج الأمونيوم ، إنتاج حمض الخليك indole . تم بعد ذلك تحديد جنس احسن عزالة و اختبار قدرتها على تحمل المعادن الثقيلة.

أظهرت النتائج أن جميع البكتيريا التي تم اختبارها تعبر عن أنشطة تشارك في تعزيز نمو النبات. دراسة احتمال سلالة ANS6 ، التي تم تحديدها باسم *Lactobacillus casei subsp. casei* ، لبعض المعادن الثقيلة تم اختبارها عن طريق الغربلية السائلة (LB) . تظهر التأثير السامي للمعادن الثقيلة ( $ZnSO_4$  و  $CrK_2O_4$  و  $CuSO_4$  و  $HgCl_2$ ) من أول تركيز تم اختباره (50 ميكروغرام / مل). هذا التأثير معتدل مع  $ZnSO_4$  و  $CrK_2O_4$  و  $CuSO_4$ . ومع ذلك ، تظهر السلالة عدم تحمل كلوريد الزئبق ، حيث يتم تثبيط نموها عند أدنى تركيز تم اختباره (50 ميكروغرام / مل).

الكلمات المفتاحية : المعادن الثقيلة ; *Lactobacillus* ; PGP ; PGPR .

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1 :</b> Temps de demi-vie biologique de quelques éléments .....	07
<b>Tableau 2 :</b> Habitat des <i>Lactobacillus</i> .....	15

## *Liste des figures*

<b>Figure 1 :</b> Origine des métaux lourds dans le sol (d'après Robert et Juste, 1999).....	05
<b>Figure 2 :</b> Rôle de l'acide indole acétique dans l'amélioration de la croissance végétale.....	20
<b>Figure 3 :</b> Mécanismes d'action des bactéries solubilisant les phosphates .....	24
<b>Figure 4 :</b> Protocole d'isolement des <i>Lactobacillus</i> . .....	27
<b>Figure 5 :</b> Aspect macroscopique des isolats.....	34
<b>Figure 6 :</b> Aspect microscopique des quelques isolats.....	35
<b>Figure 7 :</b> Exemple un résultat négatif au test catalase.....	35
<b>Figure 8 :</b> Les résultats de screening des isolats sur milieu PVK.....	36
<b>Figure 9:</b> Evaluation de l'activité de solubilisation du phosphate sur milieu de culture Pikovskaya solide. ....	36
<b>Figure 10 :</b> Résultats de screening des isolats sur milieu Ashby.....	37
<b>Figure 11 :</b> Production de l'acide indole acétique chez les isolats, inoculées sur milieu de culture de Luria-Bertani liquide .....	38
<b>Figure 12 :</b> Concentrations d'AIA produites par les isolats sur milieu de culture luria-Bertani sans L-trp. ....	38
<b>Figure 13 :</b> Concentrations d'AIA produites par les isolats sur milieu de culture luria-Bertani additionné de L-trp. ....	39
<b>Figure 14 :</b> Courbe standard du dosage de la production d'ammoniac NH <sub>3</sub> .....	40
<b>Figure 15 :</b> Concentrations d'ammoniac NH <sub>3</sub> produites par les isolats sur milieu eau péptonée.....	40
<b>Figure 16 :</b> Résultats de la capacité des dix isolats à produire l'ammoniac (NH <sub>3</sub> ).....	41
<b>Figure 17 :</b> Effet des isolats sur le taux de germination du blé dur.....	42
<b>Figure 18 :</b> Effet des isolats sur la longueur des racines et des tiges des graines de blé dur.....	42
<b>Figure 19 :</b> Effet des isolats sur le poids frais des plantules de blé dur.....	43
<b>Figure 20 :</b> Effet des isolats sur l'indice de vigueur des graines de blé dur.....	44
<b>Figure 21 :</b> Aperçu de résultat de test de germination.....	44
<b>Figure 22 :</b> Identax bacterial identification system version 1.2.....	46

<b>Figure 23</b> : Profils biochimiques la souche ANS6.....	47
<b>Figure 24</b> : Rapport d'identification de la souche ANS6.....	48
<b>Figure 25</b> : Effet des métaux lourds sur la croissance de la souche ANS6.....	49
<b>Figure 26</b> : Aspect des résultats d'effet des métaux lourds sur la souche ANS6.....	50

## *Liste des abréviations*

**%** : pourcent

**°C** : Degré Celsius

**µl** : microlitre

**µm**: micromètre

**AIA**: Acide idole acétique

**BaCl<sub>2</sub>** : Chlorure de Baryum

**Br**: Baryum

**Ca<sub>3</sub> (PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>**: tri-calcium phosphate

**cm** : centimètre

**Cr**: Chrome

**Cu SO<sub>4</sub>** : Sulfate de cuivre

**Cu**: Cuivre

**Do**: Densité optique

**g/l**: Gramme par litre

**g**: Gramme

**h**: Heure

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: Peroxyde d'hydrogène

**Hg**: Mercure

**HgCl<sub>2</sub>** : Chlorure de Mercure

**IS**: Indice de Solubilisation.

**IV**: Indice de Vigueur

**j**: jour

**K<sub>2</sub> Cr<sub>2</sub> O<sub>7</sub>** : Dichromate de potassium

**kg**: kilogramme

**l**: litre

**LB**: Luria-Bertani

**mg** : milligramme

**ml**: millilitre

**mm:** millimètre

**Mn :** Manganèse

**MRS:** Man Rogosa

**N :** azote.

**NaCl:** Chlorure de Sodium.

**NH<sub>3</sub>:** Ammonium

**nm:** nanomètre

**P:** phosphore.

**PGP:** Plants Growth Promoting

**PGPR:** Plants Growth Promoting Rhizobacteria.

**pH :** potentiel d'hydrogène

**PVK:** Pikovskaya

**rpm:** rotation par minute

**V:** volume

**Zn SO<sub>4</sub> :** Sulfates de zinc

**Zn:** Zinc

## *Sommaire*

Résumé

ABSTRAC

الملخص

*Liste des tableaux*

*Liste des figures*

*Liste des abréviations*

Introduction ..... 1

### *Chapitre I : Revue bibliographique*

1	Définition des métaux lourds .....	3
1.1	Origine de la contamination des sols par les métaux lourds .....	3
1.1.1	Origine naturelle .....	4
1.1.2	Origine anthropique .....	4
1.2	Paramètres influençant la biodisponibilité des métaux .....	5
1.3	Effet des métaux lourds sur le vivant .....	6
1.3.1	Exposition .....	6
1.3.2	Métaux lourds entre physiologie et toxicologie .....	7
1.4	Principaux métaux lourds étudiés .....	9
1.4.1	Cuivre .....	9
1.4.2	Chrome .....	9
1.4.3	Zinc .....	10
1.4.4	Baryum .....	11
1.4.5	Manganèse .....	12

1.4.6	Mercure.....	13
2	Description générale des bactéries lactiques .....	13
3	Le genre <i>lactobacillus</i> .....	14
3.1	Habitat.....	15
3.2	Caractères morphologiques.....	15
3.3	Caractères biochimiques .....	15
3.4	Caractères cultureux.....	16
4	Les bactéries lactique en tant que PGPR .....	16
4.1	Mécanisme d'action des bactéries PGPR.....	18
4.1.1	Production d'hormones de croissance .....	19
4.1.2	Fixation de l'azote .....	20
4.1.3	Solubilisation du phosphate .....	22
4.1.4	Production des sidérophores.....	24
4.1.5	Effet sur la germination.....	25

## *Chapitre II : Matériels et méthodes*

1	Objectif et lieu de travail .....	26
2	Matériels biologiques.....	26
2.1	Échantillonnage.....	26
3	Méthodes.....	26
3.1	Isolement.....	26
3.1.1	Purification et conservation.....	27
3.1.2	Conservation des isolats .....	27
3.1.3	Identification préliminaire .....	28
3.1.4	Examen macroscopique.....	28
3.1.5	Aspect microscopique.....	28

3.1.6	Test de catalase .....	29
3.2	Caractérisation du potentiel de promotion de la croissance .....	29
3.2.1	Screening des isolats pour la solubilisation du phosphate.....	29
3.2.2	La production d'acide indole acétique.....	30
3.2.3	Fixation d'azote .....	30
3.2.4	Production d'ammoniac.....	30
3.3	Effet des isolats sur la germination des graines de blé dur .....	31
3.4	Identification biochimique des isolats ANS6 par la galerie API 50 CH.....	31
3.5	Estimation de la tolérance des bactéries aux métaux lourds .....	33
3.5.1	Préparation des milieux de culture à concentrations variables en métaux lourds .....	33
3.5.2	Préparation de l'inoculum .....	33
3.5.3	Ensemencement et incubation .....	33

### *Chapitre III : Résultats*

1	Isolement, purification et caractérisation des bactéries du genre <i>lactobacillus</i> .....	34
1.1	Aspect macroscopique.....	34
1.2	Aspect microscopique .....	34
1.3	Test de catalase.....	35
2	Caractérisation du potentiel de promotion de la croissance .....	35
2.1	Solubilisation du phosphate sur milieu solide.....	35
2.2	Fixation d'azote.....	37
2.3	Quantification de la production d'acide indolo-acétique .....	37
2.4	Production d'ammoniac (NH <sub>3</sub> ).....	39
2.5	Mise en évidence de l'effet de promotion des isolats sur la germination du blé dur .....	411
2.6	Identification biochimique d'isolat ANS6 par la galerie API 50 CH .....	44
3	Effet des métaux lourds sur les isolats.....	48

## *Chapitre IV : Discussion*

Discussion .....	51
Conclusion & perspectives .....	55
Référence bibliographiques.....	57
Annexes .....	68

# *Introduction*

## Introduction

Au fil des siècles, les activités anthropiques telles que les procédés métallurgiques, la production industrielle, les activités agricoles et l'exploitation minière, ont entraîné une élévation des teneurs en métaux lourds et donc une vaste contamination qui menace le bien-être de l'environnement mondial d'aujourd'hui. L'industrie minière est parmi les principaux contributeurs qui a conduit à un fort accroissement de la pollution métallique des terres, des rivières et de l'air dans de nombreuses parties du monde (Wuana and Okieimen, 2011 Akpor *et al.*, 2014 ; Cinnirella *et al.*, 2014). Cette contamination métallique, et particulièrement celle des sols, est devenue un problème majeur et préoccupant, en terme de risques pour la santé humaine et environnementale (Cinnirella *et al.*, 2014).

En effet, les métaux lourds, sont des composés stables, non dégradables et donc hautement persistants, ils peuvent avoir des répercussions négatives sur le comportement des organismes vivants présents sur le site ou dans les zones environnantes. A compter d'une certaine concentration même les oligoéléments tels que le Zn et le Cu...deviennent toxiques pour la vie animale et végétale (Young, 1992), même à l'échelle microscopique, les métaux lourds ont des effets néfastes sur les populations bactériennes, Pour cela, il existe des techniques conventionnelles de dépollution qui font appel aux procédés physico-chimiques et thermiques. Elles sont, efficaces pour certains types de contaminants mais elles sont très onéreuses et très lourdes à mettre en œuvre car elles nécessitent l'excavation des sols, le transport, et le lavage. D'autres techniques de dépollution innovantes appelées bioremédiation ont été envisagées. Elles présentent l'avantage d'être moins onéreuses et plus écologiques faisant appel à des procédés biologiques qui peuvent impliquer des micro-organismes (Gaur *et al.*, 2014). En effet, l'utilisation des traitements microbiens probiotique permet d'améliorer le sol. Ce sont des bactéries bénéfiques qui aident à stériliser le sol et à éliminer les sous-produits qui peuvent s'accumuler et créer un environnement nocif. La présence de lactobacilles limite les organismes indésirables dans le sol. Cela crée un environnement plus équilibré capable de soutenir la vie végétale. *Lactobacillus*

contribue à la décomposition et à la suppression de la maladie. Le cycle bactérien est chargé de réguler l'équilibre de la formation dans le sol, de favoriser la vie en augmentant la formation d'humus. *Lactobacillus* agit également comme un régulateur de croissance pour les champignons, les levures et les bactéries aérobies. L'Université Ryokos au Japon a joué un rôle fondamental dans l'étude de l'utilisation des lactobacilles comme probiotique du sol. Les chercheurs ont conclu en 2004, après plusieurs expériences, que les bactéries augmentaient la croissance des plantes d'essai. L'université de Sao Paulo, au Brésil, a mené une expérience similaire et a produit les mêmes résultats bénéfiques sur des plantes cultivées dans un sol enrichi de lactobacilles. Primavesi a présenté un article à la quatrième conférence sur l'agriculture naturelle de Kyusei qui a exprimé le besoin d'une étude plus approfondie sur les lactobacilles en tant que micro-organismes puissants. Des recherches sont en cours sur l'utilisation de *Lactobacillus* et la croissance des plantes (Higa, *et al.*, 1991).

Le présent travail constitue une modeste contribution à ces recherches, ses objectifs sont

- Isoler des lactobacilles à partir de lait cru de vache ;
- Caractériser leur potentiel PGP via la recherche des activités de biofertilisation (fixation d'azote et solubilisation de phosphate tricalcique et production de  $\text{NH}_3$ ) et de biostimulation tel que la production d'acide indo-acétique ;
- Vérifier leur potentiel PGP sur la germination via l'inoculation des grains de blé dur ;
- Identifier le /les isolats les plus intéressants,
- Tester don potentiel d'agent de bioremédiation à travers la caractérisation de sa tolérance aux métaux lourds.

*Chapitre I:*  
*Revue bibliographique*

## 1 Définition des métaux lourds

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

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

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

### 1.1 Origine de la contamination des sols par les métaux lourds

Les métaux lourds sont des éléments naturellement présents dans les roches et les sols. Leur présence dans les milieux tels que l'air ou l'eau, résulte des processus naturels mais aussi des activités humaines qui les utilisent pour leurs propriétés particulières ou les rejettent indirectement dans l'environnement (Figure 1).

## 1.1.1 Origine naturelle

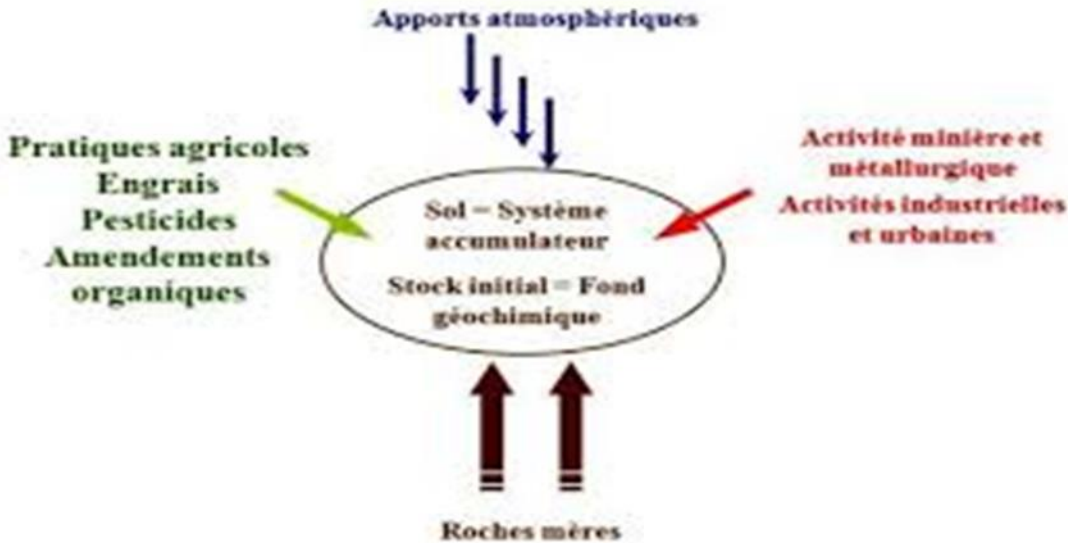
Les métaux lourds sont présents naturellement dans les roches, ils sont libérés lors de l'altération de celles-ci pour constituer le fond géochimique (**Bourrelier et Berthelin, 1998**). La concentration naturelle de ces métaux lourds dans les sols varie selon la nature de la roche, sa localisation et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

## 1.1.2 Origine anthropique

Cependant, la source majeure de contamination est d'origine anthropique. Au cours des dernières décennies, l'apport de métaux lourds au sol dans le monde s'est étendu ; à l'heure actuelle on l'estime à 22000 tonnes de cadmium, 939000 t de cuivre, 783000 t de plomb, et 1350000 t de zinc (**Singh et al, 2003**).

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

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



**Figure 01** : Origine des métaux lourds dans le sol (d'après Robert et Juste, 1999).

## 1.2 Paramètres influençant la biodisponibilité des métaux

La toxicité d'un métal dépend de sa spéciation (forme chimique) autant que des facteurs environnementaux (Babich, 1980). 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. Différents paramètres influencent la biodisponibilité des métaux dans les sols et donc leur toxicité. Parmi ces paramètres, le pH joue un rôle essentiel dans la solubilité des métaux. Ainsi, un pH acide entraîne une solubilisation des métaux, les rendant plus disponibles et donc potentiellement plus toxiques. La composition du sol est également impliquée. L'argile et la matière organique adsorbent les éléments et les séquestrent sous forme de complexes stables faiblement mobiles alors que les particules plus grossières comme le sable ou le gravier retiennent moins les métaux, augmentant leur biodisponibilité (Huynh, 2009). De plus, l'augmentation de la température, que ce soit du point de vue chimique ou physiologique, a pour effet d'intensifier l'action des substances toxiques, en facilitant le contact entre les microorganismes et les substances toxiques d'une part, et d'autre part en stimulant

l'activité métabolique. Les microorganismes vont absorber ainsi, dans l'unité de temps, une plus forte quantité de substance toxique (HABI, 2007).

### 1.3 Effet des métaux lourds sur le vivant

#### 1.3.1 Exposition

Pour l'homme, l'inhalation de poussières et d'aérosols reste la principale source d'intoxication, mais les risques liés à l'absorption de métaux lourds par ingestion d'eau ou de nourriture ne sont toutefois pas négligeables (Baize, 1997). C'est ce qui s'est produit lors de la catastrophe tristement célèbre de la baie de Minamata, au Japon, dans les années 50 (Miquel, 2001) : une usine de produits chimiques déversait dans la mer l'Hg alors employé comme catalyseur. Les poissons et les coquillages, largement consommés par la population locale, furent fortement contaminés et empoisonnèrent près de 2000 personnes. La pêche fut interdite pendant 40 ans dans la baie. La troisième voie d'introduction des polluants dans l'organisme est la voie dermique, qui intervient en cas de contact direct avec les substances. Cependant, quel que soit le mode de contamination, les éléments s'accumulent dans l'organisme (sang, foie, cerveau, reins, etc.) et ne sont éliminés que très lentement. Le tableau II montre, par ordre croissant, la demi-vie biologique des métaux (Salle, 1999), au bout de laquelle l'organisme a éliminé la moitié de la quantité absorbée. Celle-ci s'étale de quelques jours pour le molybdène (Mo) à plusieurs années pour le Cr, le Zn ou le Cd. On note que certains éléments (Pb, Hg, Cd) ont des demi-vies biologiques très différentes selon leur cible dans l'organisme. D'une manière générale, Il est important de noter que le temps de demi-vie biologique des métaux est fonction de la concentration du métal absorbée (Tableau 01).

**Tableau 01** : Temps de demi-vie biologique de quelques éléments (**Webb et Al., 1997 ; Salle, 1999**).

Elément	Temps de demi-vie biologique
<b>Mo</b>	5 jours
<b>Pb</b>	20-30 jours dans le sang 40-60 jours dans les reins, la moelle, le foie, le cerveau 2-10 ans dans les os
<b>Hg</b>	30-60 jours 1 an dans le cerveau
<b>Cr</b>	1-2 ans
<b>Zn</b>	2-3 ans
<b>Cd</b>	30 jours dans le sang 20-30 ans dans le rein

### 1.3.2 Métaux lourds entre physiologie et toxicologie

Leurs propriétés redox et de liaison confèrent aux métaux lourds un rôle important dans diverses réactions métaboliques aussi bien chez les organismes procaryotes qu'eucaryotes (cofacteurs et stabilisants structurales de nombreuses enzymes et autres protéines) (**Williams et Frausto, 2006**). En revanche, les propriétés qui rendent les métaux essentiels (propriétés redox du fait de leur propension à former des cations et des liaisons ionique), les transforment en éléments toxiques dès que leur concentration devient trop élevée (**Chaignon, 2001**).

La plupart du temps, les effets toxiques des métaux lourds concernent le système nerveux, le sang ou la moelle osseuse, Ils sont généralement cancérigènes. Il faut

souligner que leur toxicité varie énormément en fonction de leur spéciation (forme chimique) (**Sigg et Behra, 2005**). Ainsi l'Hg, par exemple, dont la forme élémentaire est quasi-inoffensive par ingestion (mais pas par inhalation), mais dont les formes organométalliques telles que le méthyl-mercure et l'éthyl-mercure (à l'origine de la tragédie de Minamata) sont beaucoup plus toxiques (**Hashida et al., 2002**). Ces formes ont la capacité de traverser les barrières méningées (toxicité nerveuse), dépasser le placenta et contaminer le fœtus (molécules tératogène) (**Koch et al., 2004**). Il en va de même pour le Cr (VI), beaucoup plus dangereux que le Cr (III) et qui provoque des affections allergiques cutanées (dermites eczématiformes) et respiratoires (asthme) (**Cotte et Duret, 2010**). Tandis que ce dernier est un cofacteur essentiel de l'insuline dont la carence peut avoir des conséquences cardiaques et éventuellement sur le diabète. D'une manière générale, La toxicité intracellulaire des ions métalliques a plusieurs origines :

1) Ils peuvent inhiber les enzymes en se fixant sur les groupements sulfures (-SH) ou dans les sites de liaison à l'oxygène des sites actifs (**Rooney, 2007**). Cette inhibition peut également être due à une compétition avec le véritable cofacteur de l'enzyme :  $Cd^{2+}$  avec  $Zn^{2+}$  ou  $Ca^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  et cobalt ( $Co^{2+}$ ) avec  $Fe^{2+}$ , et  $Zn^{2+}$  avec  $Mg^{2+}$ , ce qui altère ainsi la fonction propre de ces derniers (**Nies, 1999**) ;

2) Ils peuvent altérer la structure des acides nucléiques par fixation sur les groupements phosphates ou provoquer indirectement des mutations sur l'ADN en se fixant sur les protéines de régulation et de réparation. La transcription ou la traduction sont ainsi inhibées, par le Cd ou le Co par exemple (**HENGSTLER et al., 2003**) ;

3) Ils peuvent être responsables de la formation de radicaux libres créant alors un stress important (dommages à l'ADN ou aux protéines) (**Nelson, 1999**). La présence d'As, par exemple, provoque l'apparition de peroxyde d'hydrogène et de radicaux hydroxylés, toxiques pour la cellule (**WANG et al., 1996**).

## 1.4 Principaux métaux lourds étudiés

Les éléments traces sélectionnés pour ce travail sont parmi les polluants métalliques les plus fréquemment rencontrés dans les sols contaminés et étudiés :

### 1.4.1 Cuivre

Le cuivre est assez fréquemment retrouvé dans la nature, par exemple sous forme de chalcopryrite. Ses caractéristiques chimiques n'autorisent cependant pas l'existence de fortes concentrations dans les eaux naturelles. La composition moyenne de la croûte terrestre en Cuivre serait comprise entre 45 et 70 mg/kg selon (**Baize, 1997**).

Le cuivre est un élément essentiel aussi bien pour l'homme que pour la plante (**Welch, 1995**). Il semble poser plus de problèmes de carence chez les végétaux, le bétail et l'homme, que de toxicité. Les manifestations pathologiques chez les plantes, le cuivre peut provoquer une phytotoxicité dans certains cas. Il induit des symptômes de la chlorose ferrique et une diminution de l'absorption du fer et du phosphore (**Loué, 1986**). Il induit également une réduction de la photosynthèse et une réduction de la croissance des feuilles et des racines (**Pedersen et al., 2000 ; Mateos-Naranjo et al., 2008**) et diminue la nodulation des légumineuses même à faible concentration (**Kopittke et al., 2007**). Aussi, le cuivre s'accumule dans les racines (**Pedersen et al., 2000 ; Kopittke et al., 2009**). Pour cette raison, la concentration de Cu dans les plantes est très bien réglementée (**Peñarrubia et al., 2010**).

### 1.4.2 Chrome

Est un métal du groupe VI-B de la série des éléments de transition. Il s'agit du 21ème élément le plus abondant dans la croûte terrestre et le 10ème dans le manteau. Il est principalement présent dans les roches ignées et plus particulièrement les roches ultramafiques où il est souvent substitué au Fe (**Bariand et al., 1977**).

Le chrome peut être présent en forte quantité de manière naturelle suite à l'altération des massifs riches en ETM, mais également suite aux activités anthropiques comme la prospection minière, le traitement du bois, la métallurgie, la chimie (catalyseur) et l'industrie (tannerie, chromage) (**Henderson, 1994; Baron et al., 1996; Barnhart, 1997; Berthelin et Leyval, 2000; Shtiza et al., 2005**).

Etant donnée sa toxicité, l'organisation mondiale de la santé a proposé en 1993 une concentration limite de Cr total dans les eaux potables  $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ , ainsi qu'en Cr(VI) pour les eaux vives ( $10\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Au Canada, une directive sur le Cr recommande une concentration maximale de  $8 \mu\text{g L}^{-1}$  pour les eaux d'irrigation afin de protéger les plantes des effets nocifs du Cr(VI) (**Pawlisz et al., 1996**).

Le Cr et plus particulièrement le Cr(VI) est un élément très toxique aussi bien pour la faune que pour la flore. Cette toxicité a notamment été démontrée à différents degrés et étapes du stade de croissance et développement des plantes (**Shanker et al., 2005**). Le Cr est toxique pour la majorité des plantes supérieures à partir de  $100 \mu\text{M}$  par kg de masse sèche (**Davies et al., 2002**). Le Cr engendre une diminution de croissance et de développement des végétaux et modifie la capacité de germination des graines (**Srivastava et al., 1999**). Des concentrations de  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  en solution et de  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  dans le sol se sont révélées toxiques pour les plantes (**Turner et Rust, 1971**). Lors d'expérimentations sur colonnes, (**Banks et al., 2006**) ont pu mettre en évidence la présence de Cr au sein des tissus des plantes, et ont estimé que les plantes prélevaient seulement 1% du Cr disponible au sein des sols. Le développement racinaire s'avère plus profond dans le cas des sols dont la teneur en Cr est plus faible, suggérant une forte phytotoxicité du Cr (**Banks et al., (2006)**).

### 1.4.3 Zinc

Le zinc est un élément chimique, de symbole Zn et de numéro atomique 30. Le zinc est un métal, moyennement réactif, qui se combine avec l'oxygène et d'autres non-métaux, et qui réagit avec des acides dilués en dégageant de l'hydrogène (**Mahan, 1987**). L'état d'oxydation unique du zinc est +2 (appelé ion zincique), ainsi la

géochimie du zinc est relativement peu complexe et l'on note un comportement chalcophile assez marqué par une association fréquente avec le soufre (**S, Mahan, 1987**). Les sources naturelles de zinc dans l'environnement sont l'altération de roches (56%), le volcanisme (22%) et la végétation (**Lantzy et Mc Kenzie, 1979 ; Phelan et al., 1982 ; Horowitz, 1985**). Cependant, **Nriagu (1991 ; 1996)** a calculé que ces sources naturelles ne représentent qu'environ 7% des émissions totales de cet élément dans l'environnement, étant donné que la production et le traitement de minerai et les activités industrielles représenteraient 75% et 18% respectivement, des émissions du Zn dans le milieu naturel. Le minerai le plus utilisé est le sulfure de zinc appelé blende ou sphalérite ( $ZnS$ ). Le mot blende, désormais abandonné dans la littérature minéralogique, provient du mot allemand blenden : «éblouir, tromper» (**Anonyme, 2007**). Ce sulfure — le plus répandu dans la lithosphère — cristallise dans le système cubique. Il peut contenir des impuretés métalliques, telles que du fer (blendes foncées) : la marmatite,  $(Zn, Fe) S$ , contient jusqu'à 14 % de fer (**Hurlbut Jr. et Klein, 1982**). Dans la nature, la sphalérite est associée à d'autres sulfures, comme la galène (sulfure de plomb,  $PbS$ ). La wurtzite a la même composition chimique mais cristallise dans le système hexagonal : c'est le polymorphe de haute température de  $ZnS$  (**Hurlbut Jr. et Klein, 1982**).

#### 1.4.4 Baryum

Baryum (Ba), élément chimique, l'un des métaux alcalino-terreux du groupe 2 (IIa) du tableau périodique. L'élément est utilisé en métallurgie et ses composés sont utilisés dans la pyrotechnie, la production de pétrole et la radiologie. (**Timothy P. Hanusa, 2015**)

Le baryum est un métal lourd divalent, très réactif et inflammable ; des particules finement dispersées forment des mélanges explosifs dans l'air. Dans la nature, il existe essentiellement sous forme de barytine ( $BaSO_4$ ) et de withérite ( $BaCO_3$ ). Le baryum et ses composés ont de nombreuses applications, notamment dans l'industrie pétrolière, l'industrie chimique et le secteur des matières de charge. Les intoxications sont généralement aiguës et dues à l'ingestion accidentelle ou volontaire

de certains composés. Leur capacité à libérer des ions  $Ba^{++}$  dans les fluides biologiques est un déterminant critique de leur toxicité. Les composés solubles tels que l'oxyde, le nitrate et le chlorure sont donc plus toxiques que les composés insolubles. Bien que  $BaCO_3$  ne soit pas soluble dans l'eau, en cas d'ingestion, des ions  $Ba^{2+}$  sont libérés dans l'estomac suite à sa solubilisation en milieu acide. Le sulfate, le chromate et le fluorure sont peu solubles dans l'eau. Le tableau clinique comporte nausées, vomissements, violentes douleurs abdominales accompagnées de diarrhées, de myoclonies, contractures douloureuses puis paralysie flasque, de troubles du rythme et de la conduction cardiaque. La mort survient généralement suite à un arrêt cardiorespiratoire. Le traitement est symptomatique. Les mécanismes d'action toxique du baryum ne sont pas totalement élucidés mais semblent essentiellement liés à une hypokaliémie de transfert et à la stimulation des fibres musculaires lisses, striées et cardiaques provoquées par les ions  $Ba^{2+}$ . Chez l'animal, le système cardiovasculaire et le système nerveux sont les principales cibles en cas d'exposition aiguë ( $BaCl_2$ ). Ni les études expérimentales, ni les études épidémiologiques n'objectivent de façon consistante un effet de l'exposition prolongée sur la morbidité/mortalité cardiovasculaire. La néphrotoxicité, effet critique chez le rat exposé de façon chronique ( $BaCl_2$ ), n'est pas rapportée chez l'homme. L'inhalation prolongée de poussières de  $BaSO_4$  est susceptible d'entraîner une pneumoconiose bénigne, ou barytose. Sur la base des connaissances actuelles, le baryum n'est pas classé comme agent cancérigène, mutagène ou reprotoxique. (Timothy P. Hanusa, 2015)

### 1.4.5 Manganèse

Le manganèse est un élément chimique, de symbole Mn et de numéro atomique 25. Ce nom découle des propriétés magnétiques de la pyrolusite, un minéral qui était déjà connu dans l'Antiquité (Hurlbut et Klein, 1982). Le manganèse est un métal de transition gris-blanc qui ressemble au fer. C'est un métal dur et fragile, il fond sans difficulté, mais il est facilement oxydé. Le manganèse n'est ferromagnétique qu'après un traitement spécifique. Le métal et ses ions les plus communs sont paramagnétiques (Mahan, 1987). Les états d'oxydation les plus communs sont +2, +3, +4, +6 et +7, bien que tous les états entre +1 et +7 soient observés.  $Mn^{2+}$  est souvent en compétition avec

Mg<sup>2+</sup> dans les systèmes biologiques. Les composés de manganèse où celui-ci est en état +7 sont de puissants agents oxydants (par exemple, le permanganate de potassium KMnO<sub>4</sub>, à la couleur violet sombre bien connue, (Mahan, 1987). Les minerais les plus abondants sont la pyrolusite (MnO<sub>2</sub>), la psilomélane ((Ba, H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> Mn<sub>5</sub>O<sub>10</sub>) et la rhodochrosite MnCO<sub>3</sub>, (Hurlbut Jr. et Klein, 1982). Ces minéraux ne sont pas stables dans des conditions acides (Tessier *et al.*, 1996), comme c'est le cas du Val de Milluni.

### 1.4.6 Mercure

Le mercure est l'élément de numéro atomique 80, de masse atomique 200. Son symbole chimique Hg, du mot grec latinisé hydrargyrum est tiré du fait que c'est le seul métal à l'état liquide dans les conditions normales de température et de pression, c'est un argent liquide ou « vif argent ». Il se divise par l'agitation en fines gouttelettes.

Le mercure est un métal dont la dynamique dans l'environnement est conditionnée par trois propriétés fondamentales :

- Physique, par sa volatilité à température ambiante,
- Chimique, par la stabilité de ses liaisons avec le carbone et le soufre,
- Biologique, par sa très forte bioconcentration et sa toxicité.

Le Hg est présent naturellement dans l'écorce terrestre. On le rencontre sous trois états fondamentaux dans l'environnement : les vapeurs de mercure Hg<sup>0</sup>, les composés inorganiques Hg<sup>2+</sup> et les composés méthyles CH<sub>3</sub>-Hg et (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Hg (Adil Chahid, 2016).

## 2 Description générale des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont très anciennes et sont apparues avant les cyanobactéries, il y a près de 3 milliards d'années (Tailliez, 2001).

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimiotrophes (de Roissart et Luquet, 1994). Elles sont ubiquistes, sont retrouvées

dans différentes niches écologiques, et peuvent être isolées de certains aliments tel que le lait et le fromage (Hogg, 2005). Ce groupe de bactéries a été défini par Orla-Jensen (1919) et réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique (Leveau et Bouix, 1993). Du fait des exigences nutritionnelles des bactéries lactiques, leurs milieux de cultures doivent être riches en sucres, en matières azotées et facteurs de croissance (acides aminés, peptides et vitamines) (Federighi et al., 2005).

Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif, oxydase négative, généralement nitrate réductase négative. Leur capacité de biosynthèse est faible, elles sont anaérobies facultatives : microaérophiles, elles sont capables de réaliser la fermentation en anaérobiose comme en aérobiose (Leveau et Bouix, 1993 ; de Roissart et Luquet, 1994). Du point de vue phylogénétique, les bactéries lactiques ont un pourcentage de G+C% inférieur à 55% (Federighi et al., 2005). Selon le Bergey's manuel de la taxonomie (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des Firmicutes, la classe des Bacilli et ordre des Lactobacillales et renferment trente-cinq genres (Devos et al., 2009). Au sein des bactéries lactiques, les lactobacilles forment un ensemble très disparate. (De Vos et al., 2009).

### 3 Le genre *Lactobacillus*

Au sein des bactéries lactiques, les lactobacilles forment un ensemble très disparate. Ils appartiennent au groupe des Firmicutes, à la classe des Bacilli, à l'ordre des Lactobacillales et à la famille des Lactobacillaceae (De Vos et al., 2009). Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques. Créé, pour la première fois, par Beijerinck en 1901, il comprend actuellement, au moins 145 espèces reconnues qui présentent une diversité phylogénétique, diversité est due à la variation en contenu guanine/cytosine (G/C) qui varie entre 30 et 55 selon les espèces (De Vos et al., 2009).

### 3.1 Habitat

Les lactobacilles ont un habitat vaste et ils sont présents dans de nombreux biotopes (**Tableau 02**).

**Tableau 02** : Habitat des *Lactobacillus* (**Perry et al., 2004**).

Habitat	Espèces rencontrées	Activité ou produit
<b>Matériel végétal en décomposition</b>	<i>Lb. plantarum, Lb. casei, Lb. acidophilus,</i>	Cornichons, ensilage et choucroute
<b>Laiterie</b>	<i>Lb. delbrukii, Lb. lactis</i>	Fromage, yoghourts, etc .
<b>Tractus gastro-intestinal des animaux</b>	<i>Lb. salivarius L. gasseri, L. rhamnosus</i>	
<b>-(Oral)</b>	<i>Lb. casei, Lb plantarum,</i>	Formation de Carie dentaire
<b>-(Intestinal)</b>	<i>Lb. gasseri</i>	Flore normale
<b>Vagin des mammifères</b>	<i>Lb. vaginalis</i>  <i>Lactobacillus spp.</i>	Flore normale

### 3.2 Caractères morphologiques

Les lactobacilles sont des bactéries à Gram positif, non sporulées et généralement non mobiles. Les souches mobiles le sont grâce à une ciliature péritriche. Ils peuvent se présenter sous la forme de bâtonnets longs et fins ou très courts ou coccobacilles, où la formation de chaînes de cellules est courante (**De Vos et al., 2009**).

### 3.3 Caractères biochimiques

Les lactobacilles sont catalase négative, certains ont une pseudocatalase. Ils sont dépourvus de cytochrome généralement, nitrate réductase négative,

gélatinase négative et ils sont micro aérophiles ou anaérobies. Le métabolisme énergétique des lactobacilles est exclusivement fermentaire (**Hammes et Hertel, 2009**). Les lactobacilles sont subdivisés, selon leur type fermentaire, en trois groupes selon la classification d'Orla-Jensen remaniée par Kandler et Weiss (**Guiraud et Rosec, 2004**).

- **Groupe I:** Il comprend les espèces homofermentaires obligatoires. Elles sont incapables de fermenter les pentoses et le gluconate. Ce groupe est constitué d'environ 25 espèces, la plupart thermophiles (croissance à 45°C), dont *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus* et *Lb. helveticus*.
- **Groupe II:** Ce sont les espèces hétérofermentaires facultatives. Il est constitué d'une vingtaine d'espèces, dont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb sake* et *Lb. plantarum*, majoritairement mésophiles.
- **Groupe III:** Il est constitué des espèces hétérofermentaires obligatoires. C'est un groupe qui rassemble des espèces relativement hétérogènes, surtout mésophiles, comme *Lb. brevis*, *Lb. kefir* et *Lb. sanfransisco*.

### 3.4 Caractères cultureux

La plupart des lactobacilles se multiplient dans une gamme de température comprise entre 15°C et 42°C. Certaines souches de lactobacilles dites « thermophiles » restent viables à 55 °C (**Tailliez, 2004**). De plus, les lactobacilles se développent au mieux dans des conditions acides, quand le pH avoisine les 4,5 à 6,4, mais leur croissance s'arrête, lorsque le pH avoisine 3,5. Quant au milieu le plus adapté à leur culture est celui De Man, Rogosa et Sharpe (MRS), où les colonies se développent en 24 à 48 heures. Elles sont généralement petites, incolores, blanchâtres ou jaunâtres, lisses ou rugueuses, arrondies ou lenticulaires (**De Vos et al., 2009**)

## 4 Les bactéries lactique en tant que PGPR

Afin d'assurer leur survie et leur croissance, les plantes ont besoin de 16 éléments essentiels. Trois d'entre eux (carbone, hydrogène, et oxygène) proviennent essentiellement de l'air et de l'eau. Le reste est normalement absorbé par les racines des plantes. Chacun de ces éléments essentiels a au moins un rôle spécifiquement défini dans la croissance des plantes (**Swaidar et al., 1992; Decateau, 2000**). Les PGPR sont considérées comme une composante pour le maintien de la nutrition adéquate des plantes. Les PGPR pourraient favoriser l'absorption des nutriments, réduire ainsi la nécessité de l'apport d'engrais et prévenir l'accumulation de nitrates et de phosphates dans les sols agricoles (**Yang et al., 2009 ; Bhattacharyya et al., 2012**). Parmi les éléments essentiels à la croissance des plantes, on compte le phosphore et l'azote. Ce sont les nutriments majeurs-clé limitant la survie du règne végétal. (**Kumar et Narula, 1999; Sundara et al., 2002; Podile et Kishore, 2006**). En outre, certaines PGPR améliorent le prélèvement de ces ions minéraux en favorisant le développement des racines (**Mantelin et Touraine, 2004**) par la production de phytohormones (**Kloepper et al., 2007**).

Dans ce contexte, les recherches scientifiques disent que : Les LAB sont l'un des principaux groupes microbiens responsables de décomposer une variété de matières organiques destinées à l'agriculture; ils sont courants dans le compost (**Partanen et al., 2010**), et les systèmes de digestion anaérobie méthanogène (**Li et al., 2011**). Ces systèmes de traitement des déchets utilisent généralement populations microbiennes indigènes, mais il y a tentation d'améliorer ces processus en inoculant les déchets avec des consortiums microbiens. Les consortiums de micro-organismes efficaces (EM) sont composés d'un consortium de levures, moisissures, LAB, bactéries photosynthétiques, actinomycètes et autres (**Higa, 1991**). LAB devient généralement le groupe le plus actif et dominant dans les ferments matures des consortiums EM (**Kyan et al., 1999**). Il a été démontré que le compost inoculé avec EM produit de meilleurs rendements et une augmentation de l'absorption des nutriments pour le blé (**Hu et Qi, 2010; Hussain et al., 1999**), soja (**Javaid et Mahmood, 2010**), riz au haricot mungo (**Javaid et Bajwa, 2011**) (**Javaid, 2011**) que les plantes cultivées avec des composts non inoculés. L'augmentation de la productivité des cultures traitées avec EM-inoculé composts par

rapport aux composts non traités est probablement due à décomposition des composés organiques en nutriments disponibles pour les plantes. Il a été démontré que le LAB solubilisait le phosphate (Shrestha *et al.*, 2014; Giassi *et al.*, 2016), probablement à travers la production de acides. Trois souches de LAB isolées d'un ferment de canne à sucre peuvent fixer l'azote atmosphérique (Giassi *et al.*, 2016). Alors que LAB semble avoir pratiquement aucune exigence en Fe et qu'on pensait qu'ils ne peuvent pas produire sidérophores (Pandey *et al.*, 1994; Weinberg, 1997), Shrestha *et al.*, (2014) ont rapporté la production de sidérophores par trois souches de *Lactobacillus*.

Ils favorisent la croissance des plantes en produisent des hormones qui peuvent stimuler la croissance des plantes (Tsavkelova *et al.*, 2006); cependant, il y a peu de preuves que les hormones bactériogènes jouent un rôle significatif dans la stimulation de la croissance des plantes par LAB. *L. acidophilus* produit des cytokinines (Lynch, 1985) et certains auteurs ont démontré que des souches de *Lactobacillus* produisent de l'indole-3-acétiqueacide (IAA) (Mohite, 2013; Shrestha *et al.*, 2014; Giassi *et al.*, 2016).

On conclut que les LAB et PGPR isolés de diverses sources ont le même rôle : ils se sont avérés être des biofertilisants efficaces, agents de lutte biologique et biostimulants. En tant que biofertilisants, ils peuvent améliorer la disponibilité des nutriments provenant du compost et d'autres matériaux organiques. En tant qu'agent de biocontrol, ils se sont avéré des agents de lutte efficace; ils sont efficaces dans le contrôle d'une grande variété de phytopathogènes fongiques et bactériens. Comme biostimulants, ils peuvent favoriser la croissance des plantes ou la germination des graines.

### 4.1 Mécanisme d'action des bactéries PGPR

Les effets bénéfiques des rhizobactéries sur la croissance végétale résultent de différents mécanismes exercés par les PGPR dont les modes d'action sont directs ou indirects, bien que la différence entre les deux ne soit pas toujours évidente. Les mécanismes indirects sont, en général, ceux qui se produisent en dehors de la plante,

tandis que les mécanismes directs sont ceux qui se produisent à l'intérieur de la plante et affectent directement leur métabolisme. Ces mécanismes pouvant être actifs simultanément ou séquentiellement à différentes étapes de la croissance des plantes sont :

- 1- La production de phytohormones telles que l'acide d'indole-3-acetic (IAA)
- 2- La fixation de l'azote, la solubilisation des phosphates et les minéraux nutritifs, rendant ces aliments disponibles pour la plante.

### 4.1.1 Production d'hormones de croissance

Les régulateurs de la croissance des plantes (PGRs) sont les substances qui influencent les processus physiologique des plantes à des concentrations très faibles (**Sané et al., 2012**).

Ces composés produits par la plante ou par les PGPR sont appelés hormones végétales (**Karadeniz et al., 2006**).

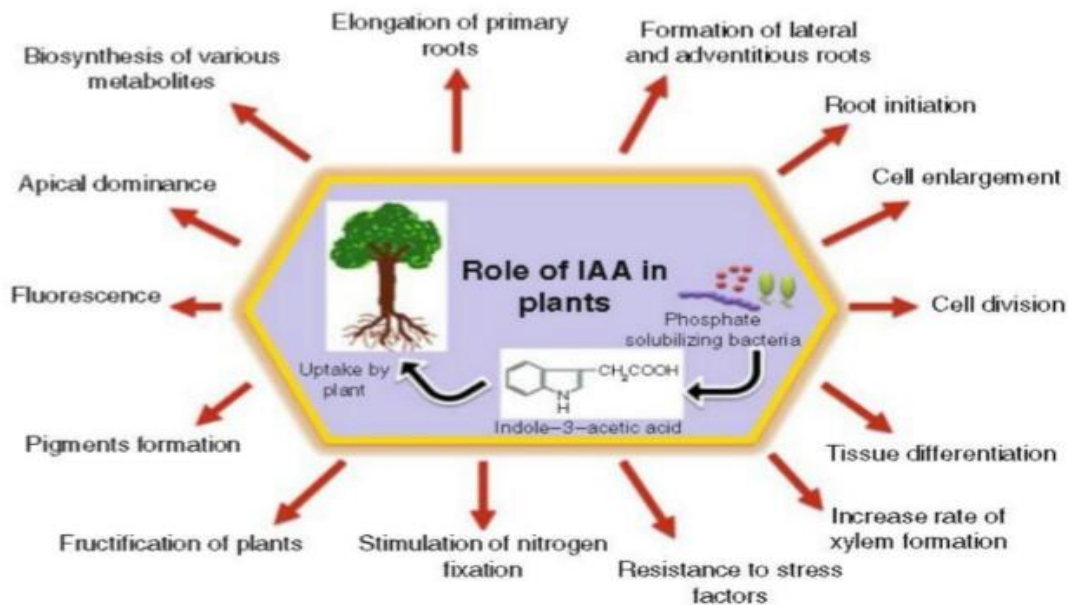
D'une façon générale, sur la base de leurs structures chimique et leurs effets subséquents sur les plantes, les substances de régulation de la croissance végétale ont été divisés en cinq groupe : les auxines, les gibbérellines, les cytokines, les l'éthylène et un groupe appelé inhibiteurs qui comprend : l'acide abscissique (ABA), des composés phénoliques et des alcaloïdes (**Ferguson et Lessenger., 2006**).

Lé production des auxines (**Glick, 1995**) par les PGPR est considéré comme une activité microbiologique commune, tandis que la synthèse de cytokines par les bactéries, est moins fréquente (**Timmusk et al., 1999**)

#### 4.1.1.1 Acide indole acétique (AIA)

Généralement, la majorité (80%) des bactéries du sol sont capables de sécréter les auxines surtout l'acide indole acétique, l'acide indole butyrique ou d'autres composés similaires via le métabolisme du tryptophane (**Ramos-Solano et al., 2010**)

La synthèse de l'AIA par des microbes implique une de ces trois **voies** (1) la formation d'acide indole acétique par l'intermédiaire de l'acide indole -3- pyruvique et des acide -3- indole acétaldéhyde (2) la conversion du tryptophane en acide -3-indole – acétaldéhyde peut constituer une voie alternative dans laquelle la tryptamine est formée (Khane *et al.*,2014). Parmi les phytohormones, les auxines sont les principaux régulateur de la croissance des plantes produites par PGPR et présentent de nombreuses fonction physiologique telles que l'élongation des racine primaire, la stimulation de la fixation de l'azote ....etc (Figure 02) (Ahmed *et al.*, 2008b ; Oves *et al.*,2013).



**Figure 02 :** Rôle de l'acide indole acétique dans l'amélioration de la croissance végétale (Khan *et al.* , 2009).

### 4.1.2 Fixation de l'azote

La fixation biologique de l'azote par les bactéries du sol est considérée comme l'un des principaux mécanismes par lequel les plantes bénéficient de l'association microbienne. L'azote est un aliment essentiel bien connu pour la croissance et le

développement des plantes. L'utilisation de bio-engrais tels que les bactéries fixatrices d'azote peut accroître la productivité et constitue une alternative viable qui contribue à réduire la pollution due aux applications d'engrais chimiques, à préserver l'environnement et à baisser le coût de la production. Ainsi, **Figueiredo et al. (2008)** ont rapporté que, au cours des deux dernières décennies, l'utilisation de PGPR pour le développement durable de l'environnement et de l'agriculture a considérablement augmenté dans plusieurs régions du monde. Les microorganismes prennent de l'importance dans l'agriculture en favorisant la circulation des éléments nutritifs (**Sahin et al., 2004; Orhan et al., 2006**). L'un des avantages des bactéries diazotrophes est de fournir aux plantes l'azote en échange du carbone libéré comme exsudats racinaires. Toutefois, la disponibilité du carbone comme source d'énergie est requise pour la fixation intensive de l'azote. Ceci impose à ces diazotrophes de vivre près des plantes soit dans la rhizosphère, le rhizoplan ou comme endophytes. Les microorganismes à associations symbiotiques produisent 80% de l'azote et le reste provient des systèmes libres ou associés (**Graham, 1988**). La fixation de l'azote non symbiotique a une grande importance agronomique (**Saxena et Tilak, 1998**). Les bactéries fixatrices d'azote associées à la rhizosphère sont de plus en plus utilisées dans les cultures des non légumineuses comme la betterave sucrière, la canne à sucre, le riz, le maïs, et le blé (**Dobereiner, 1997; Hecht-Buchholz, 1998; Sahin et al., 2004**). Parmi les bactéries fixatrices d'azote non-symbiotiques les plus importantes appartiennent à plusieurs espèces : *Azoarcus sp.*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum sp.*, *Azotobacter sp.*, *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Derrxia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* et *Xanthobacter*.

*Azospirillum* est le représentant des PGPR, ses capacités ont été évaluées dans des expériences à travers le monde (**Burdman et al., 2000; Dobbelaere et al., 2003; Vessey 2003; Lucy et al., 2004; Ramirez et Mellado 2005**). De plus, des espèces de *Pseudomonas*, *Bacillus* (**Glick et al., 1994a; Alam et al., 2001; Cakmakci et al., 2001; Kokalis-Burelle et al., 2002**), et d'autres bactéries endophytiques telles que

*Enterobacter*, *Klebsiella*, *Burkholderia* et *Stenotrophomonas*, ont attiré l'attention de nombreux chercheurs ces dernières années en raison de leur association avec des cultures importantes et leur potentiel à améliorer la croissance des plantes (**Chélius et Triplett, 2000; Verma et al., 2001; Dong et al., 2003; Ramirez et Mellado, 2005**). En outre, l'inoculation réduit de façon significative le besoin de beaucoup d'espèces végétales en fertilisant azoté, dans de nombreuses expériences menées dans les serres et sur terrain (**Bashan et Levanony, 1990; Bashan et Holguin, 1997; Bashan et al., 2004**).

### 4.1.3 Solubilisation du phosphate

Le phosphore (P) est l'un des constituants jouant un rôle-clé pour la plante (**Rifat, et al., 2010**), il forme avec l'azote et le potassium un groupe de composé essentiels pour la survie des êtres vivants.

Les bactéries solubilisant les phosphates (BSP) appartiennent au groupe hétérogène de PGPB. Elles sont caractérisées par leur capacité à solubiliser facilement et efficacement des formes minérales de phosphore inorganique (**Anand et al., 2016**).

#### 4.1.3.1 Mécanisme de solubilisation du phosphate par MSP

##### 4.1.3.1.1 Solubilisation de phosphore organique (minéralisation)

La solubilisation de phosphore organique joue un rôle essentiel dans le cycle du phosphore dans un système d'exploitation agricole et il peut constituer de 4 à 90% du phosphore totale du sol (**Khan et al., 2010**). Ce phosphore peut être libéré à partir de composés dans le sol par des enzymes de phosphatase suivant :

Phosphatase acide non spécifique, qui déphosphorylent les liaison phospho-ester ou phosphoanhydride de la matière organique (**Sharma et al., 2013**). Parmi la variété de classes d'enzymes de phosphatase libérées par MSP, les phosphomonoesterases (souvent appelées phosphatase) elles sont les plus abondants et les mieux étudiées (**Nannipieri et al., 2001**). En fonction de leur pH optimale, ces enzymes sont divisées en phosphomonoesterases acide et alcalines et les deux peuvent être produites par le

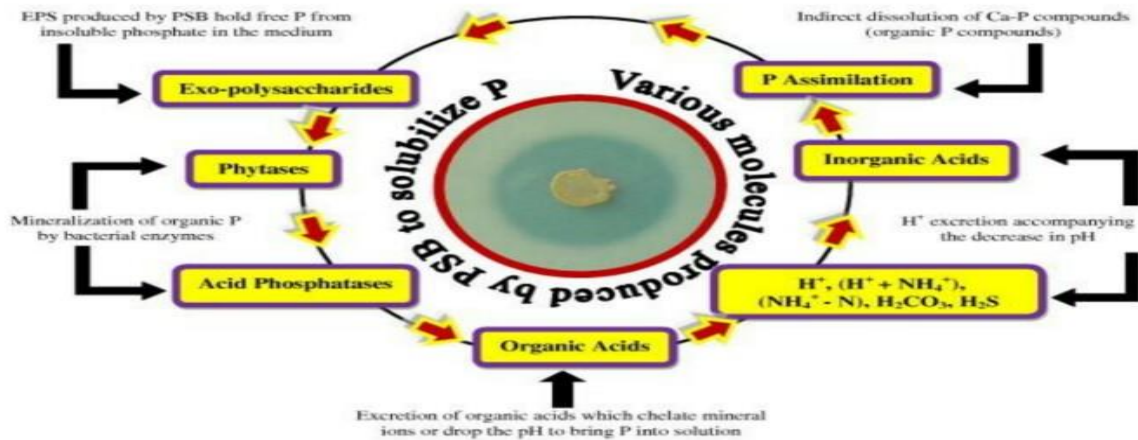
MSP en fonction des condition extérieure (**Jorquera et al., 2008**). Certains élément de preuve indiquent que les phosphatase d'origine microbienne possèdent une plus grande affinité pour les composés de phosphore organique que ceux qui sont dérivés à partir de racines de plantes (**Tarafdar et al., 2001**).

**Phytases**, qui provoquent spécifiquement la libération de phosphore de la dégradation des phytates dans sa forme de base, la phytate est la principale source de l'inositol et la principale forme de phosphore stockée dans les graines et le pollen de plants, et elle est une composante majeure du phosphore organique dans le sol (**Richardson, 1994**).

Les microorganismes sont en fait un facteur clé dans la régulation de la minéralisation des phytate dans le sol et leur présence dans la rhizosphère peut compenser une incapacité des plantes à acquérir autrement le phosphore directement à partir de phytate (**Richardson et Simpson, 2011**).

#### **4.1.3.1.2 Solubilisation de phosphore inorganique**

La solubilisation de phosphore inorganique par des microorganismes se fait principalement par la production d'acide organique soit par l'abaissement de pH ou en augmentant la chélation des cations liés au phosphore en concurrence avec le phosphore pour le site d'adsorption sur les sol et en formant des complexes solubles avec les ions métallique associés aux phosphore insolubles (Ca ; Al ; Fe) et donc le phosphore est libéré (**Sharma et al., 2013**).



**Figure 03:** Mécanismes d'action des bactéries solubilisant les phosphates (Khan *et al.*, 2009)

#### 4.1.4 Production des sidérophores

Les sidérophores sont des molécules capables de complexer le fer (littéralement : porteper). Bien que le fer soit l'un des minéraux les plus abondants sur terre, dans le sol, il est indisponible pour l'assimilation directe par les microorganismes car l'ion ferrique ( $\text{Fe}^{+3}$ ), forme prédominante dans la nature, est peu soluble (Neilands *et al.*, 1987). La quantité de fer soluble dans le sol est beaucoup trop faible (soit environ  $10^{-18}$  M à pH 7,4) pour assurer la croissance microbienne. Les microorganismes du sol sécrètent les sidérophores en vue d'assurer leur alimentation en fer à partir des composés inorganiques quasi insoluble du fer trivalent (Gobat *et al.*, 2010 ; Castignetti *et Smarrelli*, 1986), ces sidérophores lient le  $\text{Fe}^{+3}$  avec une très forte affinité et le transportent vers la cellule microbienne où il est repris par l'intermédiaire d'un récepteur cellulaire puis utilisé durant la croissance microbienne (Briat, 1992 ; Neilands *et Leong*, 1986; Castignetti *et Smarrelli*, 1986). Les bactéries ayant un grand pouvoir de chélation du fer peuvent reconnaître et utiliser les sidérophores produits par d'autres souches, alors que ces dernières ne sont pas capables d'utiliser les sidérophores qu'elles produisent (Ahmad *et al.*, 2008).

### 4.1.5 Effet sur la germination

Les PGPR sont en mesure d'exercer un effet bénéfique sur la croissance des plantes telles que l'augmentation du taux de germination des graines. De nombreux travaux ont prouvé que l'utilisation des PGPR telles que *Azospirillum spp* (Rodriguez et al., 2001), *Hafnia alvei* P3 (Vargas et al., 2001), *Pseudomonas* PMZ2 ou avec *B. japonicum* (Zaidi, 2003), *Azotobacter chroococcum* C2 (Basavaraju et al., 2002) et *Azotobacter* sp. (Reyes et al., 2008) ont donné une meilleure germination des graines de tomates, de poivre, de laitue, du radis, du maïs et des plants de soja. Bien que les études mentionnées sur l'effet des souches bactériennes sur la germination des différentes espèces végétales aient été menées dans des conditions optimales, (Kaymak et al., (2009) ont suggéré que *Agrobacterium rubi* A16, *Burkholderia gladii* BA7, *P. putida* BA8, *B. subtilis* BA142, *B. megaterium* M3 appliquées sous stress salin pourrait procurer un pourcentage de germination plus élevé.

De plus, les PGPR peuvent être employées contre des agents pathogènes. Ainsi, différents souches telles que *B. pumilus*, *subtilis*, *amyloliquefaciens* et *Brevibacillus brevis* ont servi à traiter des semences afin de supprimer les maladies causées par des champignons phytopathogènes. Ces souches augmentent la germination et la vigueur des plantules à des taux très élevés et en réduit l'incidence de la mycoflore des semences (Begum et al., 2003). Selon Araujo (2008), l'inoculation des semences avec *B. subtilis* est une technologie prometteuse pour le traitement des semences.

*Chapitre II :*  
*Matériels et méthodes*

## 1 Objectif et lieu de travail

Cette étude a pour objectif d'évaluer la tolérance des métaux lourds chez les bactéries lactiques (*Lactobacillus*) en tant que PGPR et la caractérisation des activités impliquées dans ce type d'effet afin de pouvoir appliquer ces microorganismes pour l'inoculation.

L'étude a été réalisée au sein du laboratoire de microbiologie appliquée de la faculté des sciences de l'université Djilali Liabes, durant la période, du mois de Mars jusqu'au mois de Juin - 2021.

## 2 Matériels biologiques

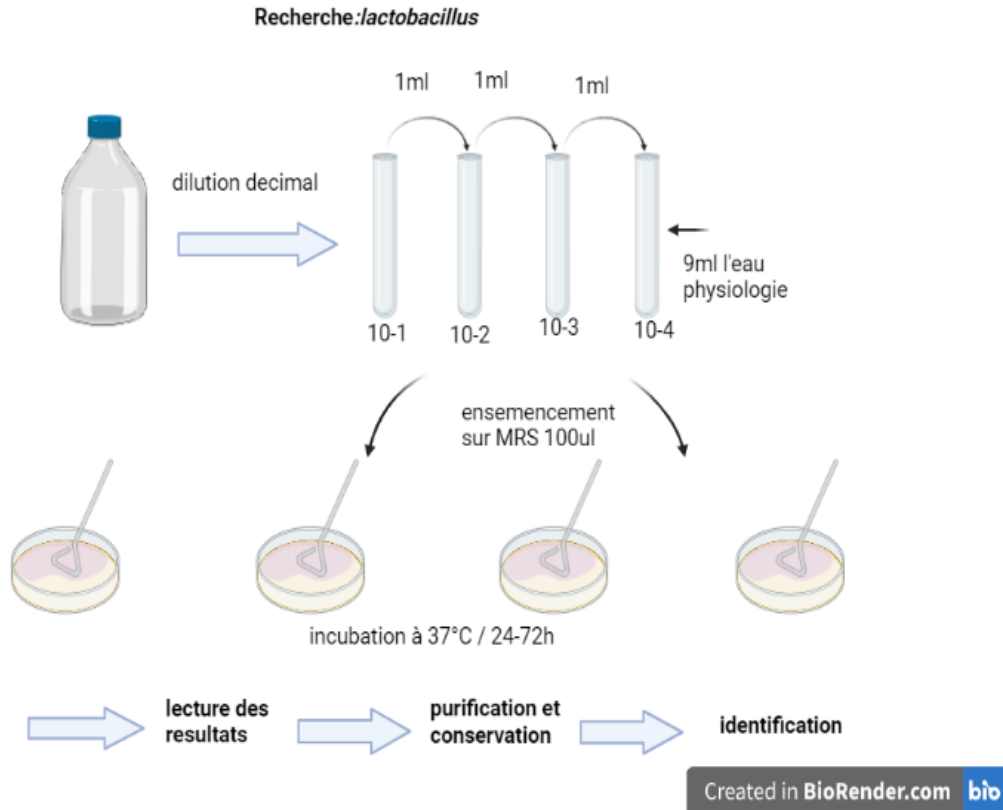
### 2.1 Échantillonnage

L'isolement des souches a été effectué à partir de produits laitiers, un échantillon de lait de vache écrémé et de lben de vache provenant de la laiterie Tassala, Willaya de Sidi Bel Abbes.

## 3 Méthodes

### 3.1 Isolement

Afin d'isoler les lactobacilles, 1ml de chaque échantillon de produit laitier traditionnel ont été mélangés avec dans 9mL d'eau physiologique. Après homogénéisation, une série de dilution décimale de 1/10 a été préparée, à partir de cette solution mère, en utilisant l'eau physiologique jusqu'à  $10^{-1}$  et  $10^{-4}$  respectivement pour les échantillons lait et lben. Un volume de 0.1mL de ces dernières a fait objet d'un ensemencement sur gélose MRS (pH 5.4), qui est par la suite incubées en aérobiose ou/et en anaérobiose à 37°C pendant, 24 – 48 à 72h. Les lactobacilles sont généralement des microaérophiles ; leur incubation en anaérobiose a été assurée par la mise des boîtes de Pétri dans la jarre.



**Figure 04:** protocole d'isolement des *lactobacillus*.

### 3.1.1 Purification et conservation

Seules les bactéries à Gram positif et catalase négatif ont été retenues. Les échantillons sont repiqués plusieurs fois sur milieu MRS en vue de leur purification puis conservées sur le même milieu en pente à 4°C pour une utilisation ultérieure

### 3.1.2 Conservation des isolats

La conservation des bactéries a été réalisée dans des tubes à essai contenant le milieu de culture gélosé MRS inclinée. Après incubation à 37 °C pendant 48h, les tubes sont conservés à +4 °C (Saidi *et al.*, 2002).

### 3.1.3 Identification préliminaire

L'appartenance des souches isolées au genre *Lactobacillus*, est explorée en réalisant quatre tests, à savoir l'aspect macroscopique des colonies sur la gélose, la coloration de Gram positive, la forme bacillaire, ainsi que la réaction négative de la catalase.

### 3.1.4 Examen macroscopique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification. Les éléments d'identification macroscopiques sont :

- La forme des colonies : rondes, irrégulières,...etc.
- La taille des colonies par la mesure du diamètre : pinctiformes ou non inctiformes.
- La chromogénèse : couleur de la colonie.
- L'élévation : convexe, concave, plate.-
- L'opacité : opaque, translucide ou transparente.
- La surface : lisse, rugueuse, sèche, dentelée,...etc.

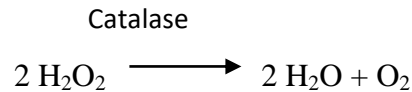
### 3.1.5 Aspect microscopique

- Observation microscopique à l'état fixé

La Coloration de Gram permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté et la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées. La coloration de Gram et l'observation microscopique permet de distinguer deux grands bactériens : Les bactéries à Gram positif se colorent en violet et les bactéries à Gram négatif apparaissent roses. (**Annexe2**) (**Marchal et Bourdon, 1982**).

## 3.1.6 Test de catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène qui se dégage.



La méthode de recherche de la catalase consiste à étaler une colonie sur une lame de verre sur laquelle on ajoute une goutte du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulle de gaz traduit la décomposition de dioxygène : le test catalase est positif et s'il n'y a pas de bulles : le test catalase est négatif (Delarras, 2007).

## 3.2 Caractérisation du potentiel de promotion de la croissance

### 3.2.1 Screening des isolats pour la solubilisation du phosphate

La solubilisation de phosphate inorganique est évaluée qualitativement sur le milieu Pikovskaya agar (PVK) (Annexe 1) contenant du tricalcium phosphate (Ca<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) comme une source insoluble de phosphate Nautiyal (1999). Les pré-cultures des isolats sont ajustées à une population bactérienne 0.5 Mc Farland, inoculées en spots (10µl) sur le milieu de culture solide de Pikovskaya (Pikovskaya, 1948) à raison 5 souches par boîte de pétri. Les boîtes ont été incubées à 37 C° pendant 7 jours.

La solubilisation de phosphate se manifeste par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie inoculée. Le taux du phosphate solubilisé est calculé par l'indice de solubilisation selon la formule suivante (Sitepu et al., 2007).

$$\text{SI} = \frac{(\text{le diamètre de la colonie} + \text{le diamètre de la zone claire})}{(\text{le diamètre de la colonie})}$$

### 3.2.2 Production d'acide indole acétique

La production de l'AIA est évaluée, selon la technique rapportée par **Acuña et al., (2011)**, sur milieu Luria-Bertani (LB) liquide additionné de glucose à 1% en présence du LB-tryptophane (5g/l) (**Annexe 1**). Le milieu de culture dilué à 1/10ème est inoculé avec un volume de 100 µl d'une suspension bactérienne d'une pré-culture bactérienne âgée de 24 heures, Les tubes sont incubés à une température de 37°C pendant 72h. Les cultures sont ensuite centrifugées à 3000 rpm pendant 10 min. Un volume de 2 ml du réactif de Salkowski (12g<sup>l</sup><sup>-1</sup> de FeCl<sub>3</sub> dans 429ml<sup>l</sup><sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) est ajouté à un volume de 1ml du surnageant. Le mélange est incubé pendant 30 mn. La lecture est effectuée par mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 535 nm. Les concentrations de l'AIA sont déterminées à l'aide d'une courbe d'étalonnage.

### 3.2.3 Fixation d'azote

La fixation d'azote a été déterminée sur le milieu Ashby (**Annexe 1**). Les pré-cultures des isolats sont déposées sous forme de spots (10 µl) sur le milieu de culture solide Ashby. Après l'incubation à 30°C pendant 5 jours, les bactéries fixatrices de l'azote, contrairement au non fixatrices, présentent une croissance sur le milieu dépourvu d'azote (**Alam et al., 2002**).

### 3.2.4 Production d'ammoniac

Tous les isolats bactériens ont été testés pour la production de l'ammoniac par la méthode décrite par **Cappuccino et Sherman (1992)** avec modification. Des cultures bactériennes jeunes ont été inoculées dans 10 ml d'eau péptonée (**Annexe 1**) et incubées à 37°C pendant 5j. Après incubation, les cultures sont centrifugées à 3000 rpm pendant 20 mn. La quantité du NH<sub>3</sub> est mesurée dans le surnageant des cultures. Un volume du réactif de Nessler est ajouté à quatre volumes du surnageant. Le développement d'une couleur jaune ou orange indique la production de NH<sub>3</sub>.

L'intensité de la couleur produite mesurée à 425 nm est directement proportionnelle à la concentration de  $\text{NH}_3$  dans l'échantillon. Une courbe d'étalonnage standard est effectuée avec une solution d'ammonium sulfate.

### **3.3 Effet des isolats sur la germination des graines de blé dur**

Dans le but d'apprécier l'effet des isolats sélectionnés fixateurs la germination des graines du blé dur, un essai de germination est effectué.

Les graines de blé dur sont désinfectées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 18° pendant 2 minutes puis rincées 6 fois à l'eau distillée stérile.

Les suspensions bactériennes sont préparées à partir des cultures sur milieu de culture bouillon LB. Les graines sont mises pour une durée de 30 min, dans les béciers contenant l'inoculum bactérien. Chaque isolat est testé séparément. Le témoin négatif est préparé à l'aide des graines trempées dans le milieu stérile.

Les graines sont déposées dans des boites de pétri de 10 cm de diamètre contenant un papier filtre imbibé d'eau distillée stérilisée. Chaque boite a reçu 5 graines.

Sept jours après le lancement du test, l'évaluation des résultats est effectuée par le relever et le calcul des paramètres : pourcentage de germination, la longueur de la radicule et de la longueur de la tige, poids et l'indice de vigueur calculé selon la formule :

**IV (%)** = (longueur moyenne de la partie racinaire + longueur moyenne de la partie aérienne)  $\times$  Le taux de germination %.

### **3.4 Identification biochimique des isolats ANS6 par la galerie API 50 CH**

A l'issus des tests réalisés, le candidat présentant un important potentiel de promotion de la croissance des plantes in vitro et in vivo et répondant aux

caractéristiques microscopiques, macroscopiques et biochimiques (catalase) des *lactobacillus* a été sélectionné pour faire l'objet d'une identification phénotypique.

La galerie API 50 CH est préparée conformément aux instructions du fabricant (bioMérieux, France). Pour la culture bactérienne de l'isolat retenue :

Le fond et le couvercle de la boîte d'incubation sont réunis, 5 ml d'eau distillée stérile sont repartis dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide et les galeries sont placées dans les boîtes d'incubation.

Des colonies bactériennes de l'isolat sont diluées dans le milieu API 50 CHB/L medium (**Annexe 1**). L'inoculum est standardisé à concentrations cellulaire préconisée par le fabricant.

La suspension bactérienne est introduite dans les tubes des galeries à l'aide d'une micropipette en évitant la formation de bulles au fond des tubes. L'anaérobiose est assurée par l'ajout d'huile de paraffine dans les cupules. La galerie ainsi inoculée est incubée à 30°C pendant 24h à 48h.

La lecture des résultats s'est faite en se rapportant aux guides d'utilisation, le changement de l'aspect de la cupule (couleur) est noté sur les fiches d'identification sous forme de signes (+) pour les tests positifs et (-) pour les tests négatifs.

L'interprétation des résultats et l'identification de l'isolat est effectuée en s'appuyant sur les caractéristiques des isolats et en utilisant le Bergey's manual of systematic bacteriology (**Brenner et al., 2005**) et en se servant de l'outil informatique Identax bacterial identification system version 1.2.

### **3.5 Estimation de la tolérance des bactéries aux métaux lourds**

#### **3.5.1 Préparation des milieux de culture à concentrations variables en métaux lourds**

Pour cette étude 6 métaux lourds différents ont été sélectionnés en état de sel : Baryum, Cuivre, Chrome, Manganèse, Zinc, et Mercure. Pour la préparation des concentrations variables (50 µg/ml ; 100 µg/ml et 200 µg/ml) ; des masses ont été mesurées 1,5 (mg), 3 (mg) et 6 (mg) successivement pour chaque métal en appliquant la formule  $C1V1=C2V2$ .

#### **3.5.2 Préparation de l'inoculum**

Des tubes à essai contenant 10 ml de milieu LB (annexe 1) ont été inoculés par quelques colonies bactériennes préalablement réactivées (culture jeune de 18h).

#### **3.5.3 Ensemencement et incubation**

10 ml de milieu de culture traités avec chaque métal à différentes concentrations, ont été inoculés avec 1 ml de l'inoculum. Les cultures bactériennes ont été incubées à 37 °C pendant 72h (3 jours).

La croissance bactérienne a été suivie par la mesure de la densité optique (DO) des cultures bactériennes à une longueur d'ondes de 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

*Chapitre III :*

*Résultats*

## 1 Isolement, purification et caractérisation des bactéries du genre *Lactobacillus*

Dix isolats ont été obtenus de lait et de l'ben de la laiterie de TASSALA dans la de wilaya de Sidi Bel Abbas, Après plusieurs repiquages, la pureté des isolats est vérifiée par l'observation de leurs caractéristiques macroscopiques et microscopiques.

Les isolats sont codés en fonction du mode d'incubation entrepris, un code AS est attribué aux isolats obtenus en aérobiose et un code ANS est attribué aux isolats obtenus en anaérobiose. Les isolats sont désignés comme suit : AS1 ; AS2 ; AS3 ; AS4 ; AS5 ; ANS1 ; ANS2 ; ANS4 ; ANS5 ; ANS6

### 1.1 Aspect macroscopique

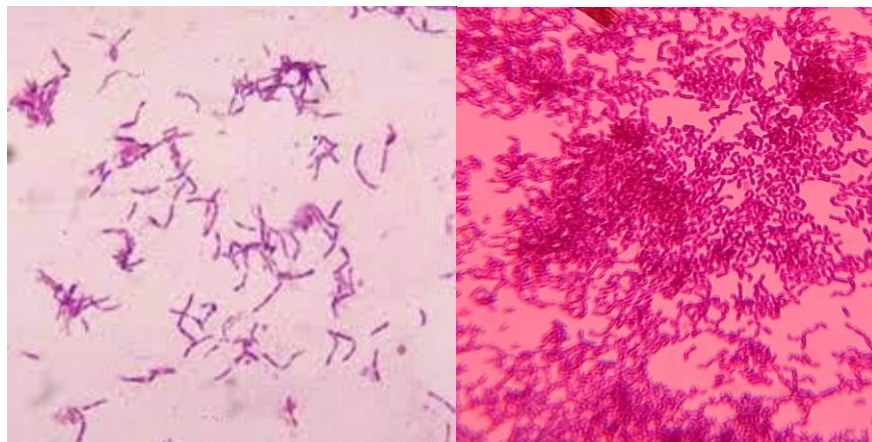
Les isolats produisent sur milieu MRS des colonies blanches, opaques, brillantes, lisses, bombées à contour irrégulier d'un diamètre d'environ 1 mm.



**Figure 5:** Aspect macroscopique des isolats.

### 1.2 Aspect microscopique

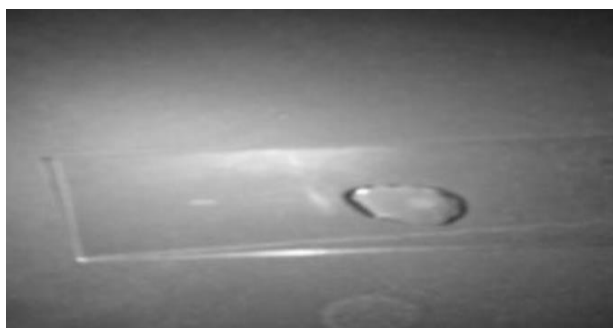
L'observation microscopique des isolats après coloration de Gram montre qu'ils sont tous des bacilles à Gram positif (**Figure 6**).



**Figure 6 :** Aspect microscopique des quelques isolats.

## 1.3 Test de catalase

La recherche de la catalase est un élément clé de l'identification des bactéries lactiques. Tous les isolats ont manifesté une réaction négative à la présence de l'enzyme catalase, traduite par une absence de dégagement gazeuse (**Figure 7**).



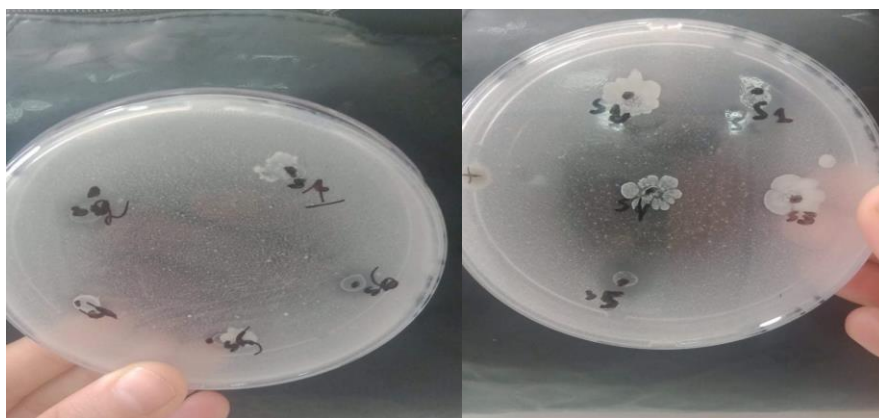
**Figure 7 :** Exemple un résultat négatif au test catalase

## 2 Caractérisation du potentiel de promotion de la croissance

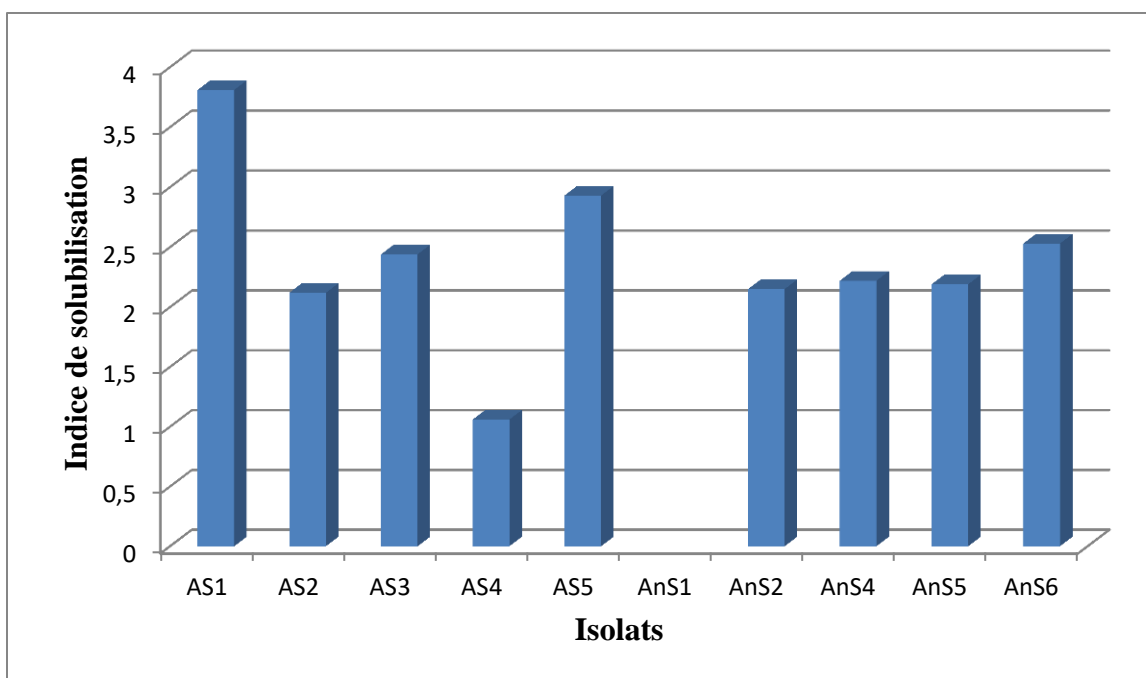
### 2.1 Solubilisation du phosphate sur milieu solide

La solubilisation des phosphates sur milieu de culture Pikovskaya (PVK) solide, révélée par l'apparition d'un halo de transparence autour de la colonie après 7 jours d'incubation à 37°C (**Figure 8**), est réalisée par 100% des isolats dont 80,5 % ont exprimé un  $IS \geq 2.24$  (**Figure 9**). L'indice de solubilisation d'isolats AS1 a atteint

(3.81) suivie des isolats AS5 (2,93) puis ANS6 (2.53) et AS3 (2.44). Le plus faible IS est enregistré avec l'isolat AS4 (1,06)



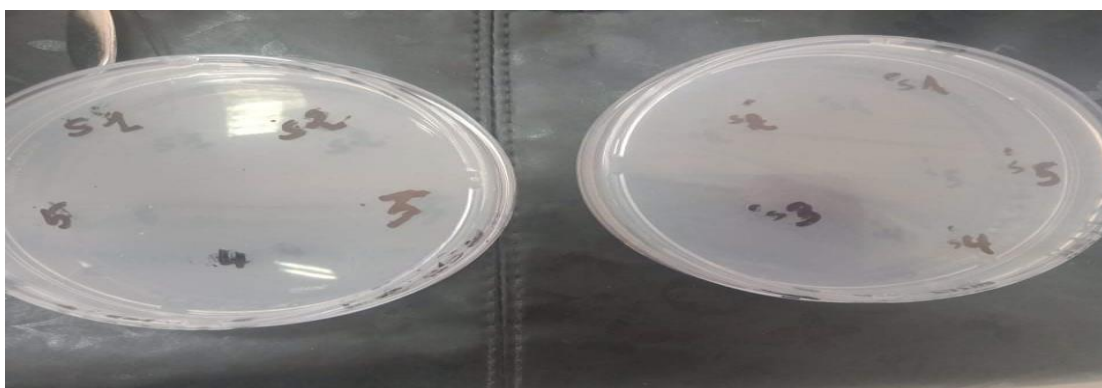
**Figure 8 :** Les résultats de screening des isolats sur milieu PVK.



**Figure 9:** Evaluation de l'activité de solubilisation du phosphate sur milieu de culture Pikovskaya solide.

## 2.2 Fixation d'azote

Les isolats sont testés pour la fixation de l'azote atmosphérique sur milieu de culture d'Ashby solide. Les résultats ont montré que ces isolats sont incapables de fixer l'azote.

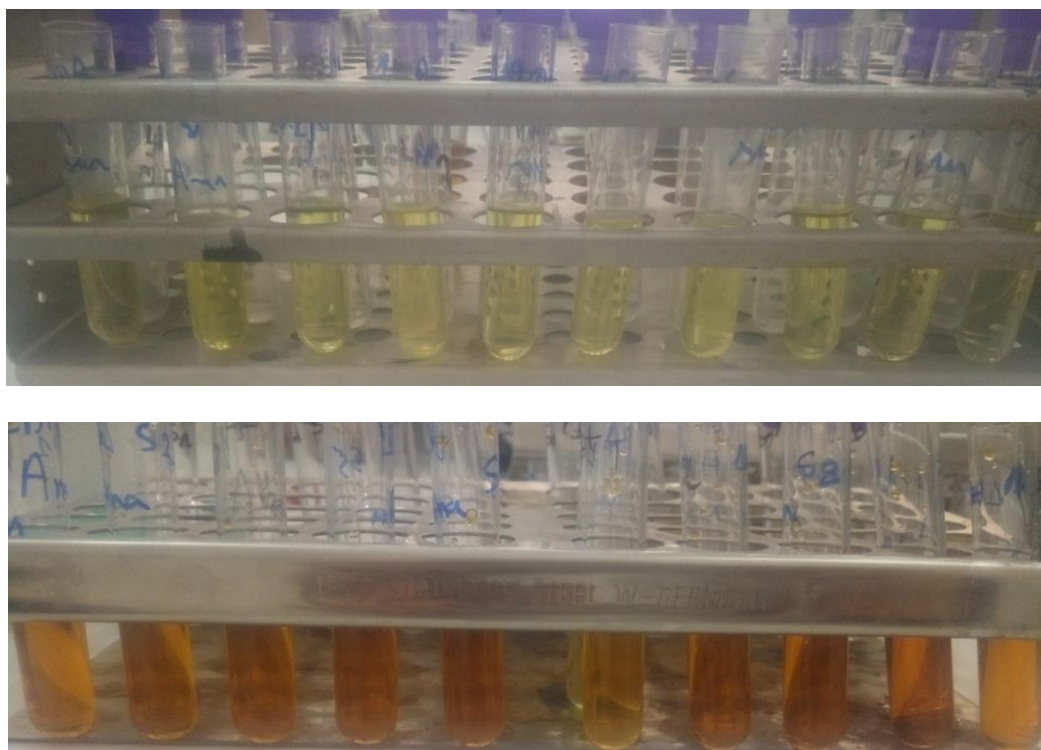


**Figure 10:** résultats de screening des isolats sur milieu Ashby.

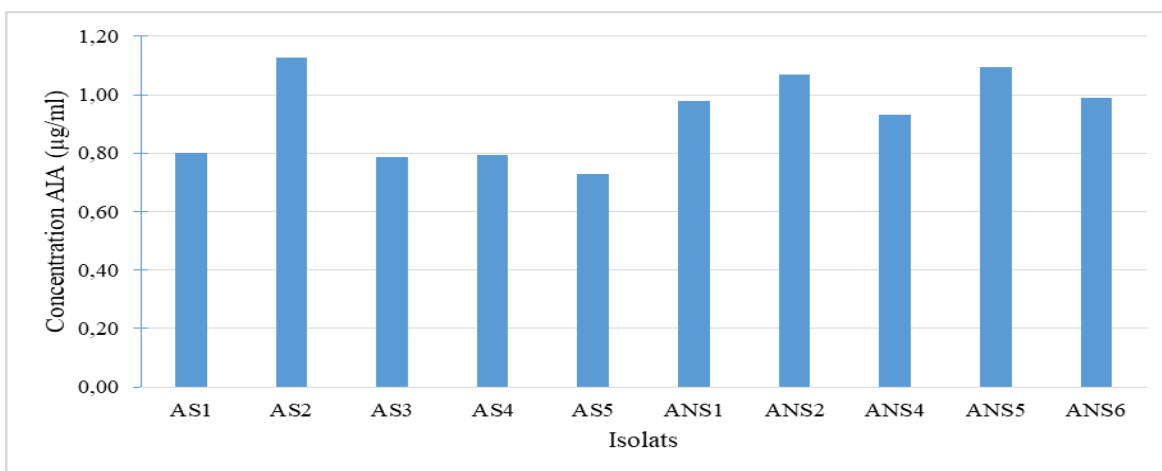
## 2.3 Quantification de la production d'acide indolo-acétique

La production de l'acide indolo-acétique est évaluée, selon la technique rapporté par (Acuña *et al.*, (2011), sur le milieu de culture de Luria-Bertani liquide en présence d'une concentration 1% de glucose, en présence et en absence du L-tryptophane (1g/l). Après 5 jours d'incubation. Les résultats obtenus ont montré une faible production d'acide indole acétique sur le milieu de culture de Luria-Bertani non additionné de L-tryptophane (LB-) (**Figure 11.A**). Les taux enregistrés ont varié de 0.73 à 1.13  $\mu\text{g/ml}$ . Les meilleurs taux étant marqués par les isolats AS1 et ANS 5 avec 1.13 et 1.09  $\mu\text{g/ml}$ , respectivement.

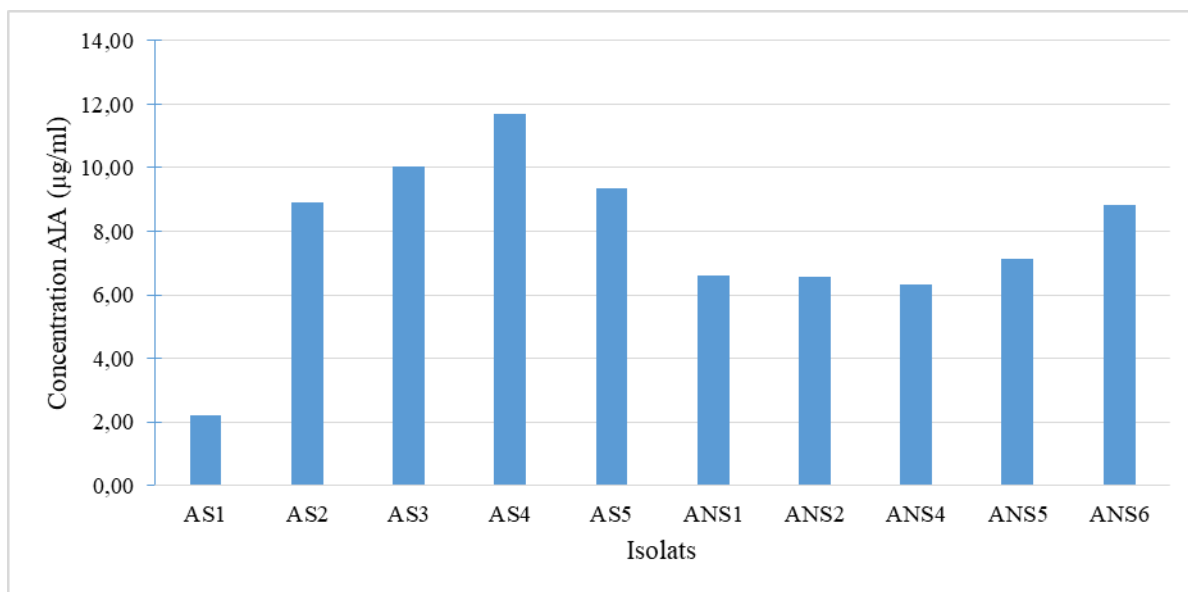
Par ailleurs, la culture des isolats sur le milieu de culture Luria-Bertani, additionné d'une concentration de (5g/l) de L-tryptophane (LB+), permet une augmentation des taux de production qui passe de 0.73 à 2.5 pour les plus faibles et de 1.13 à 11.69  $\mu\text{g/ml}$  pour le plus important (**Figure 11.B et Figure 12**). Les meilleurs taux étant marqués par les isolats AS4 et ANS 6 avec 11.69 et 8.82  $\mu\text{g/ml}$ , respectivement.



**Figure 11:** Production de l'acide indole acétique chez les isolats, inoculées sur le milieu de culture de Luria-Bertani liquide, **en haut** : en absence de L tryptophane (LB-), **en bas** : en présence de (1g/l) de L-tryptophane (LB+).



**Figure 12:** Concentrations d'AIA produites par les isolats sur milieu de culture luria-Bertani sans L-trp.

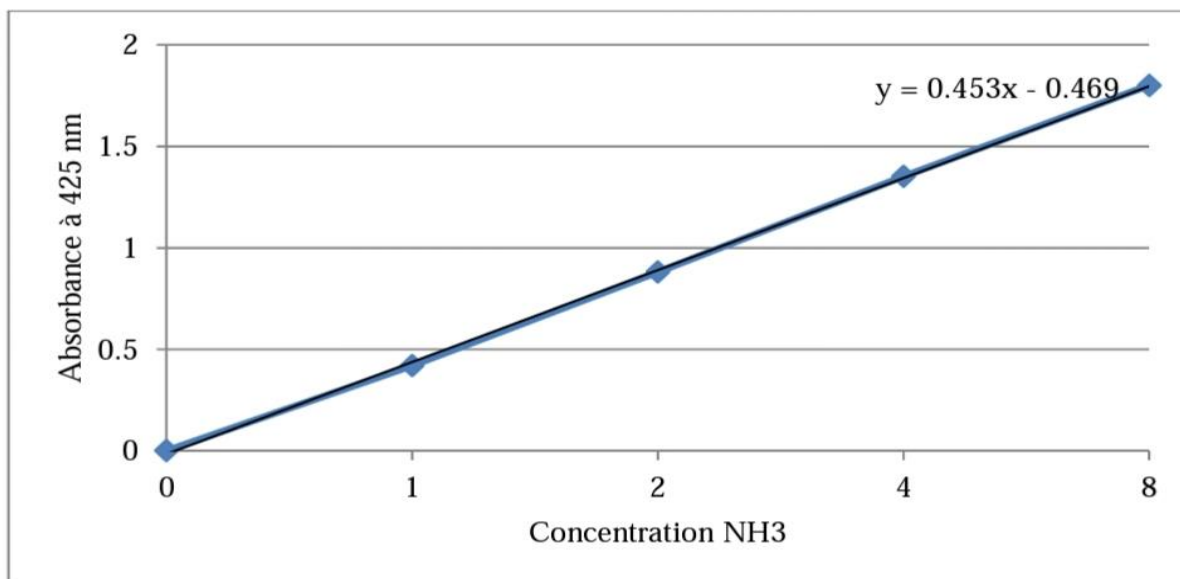


**Figure 13** : Concentrations d’AIA produites par les isolats sur milieu de culture luria-Bertani additionné de L-trp.

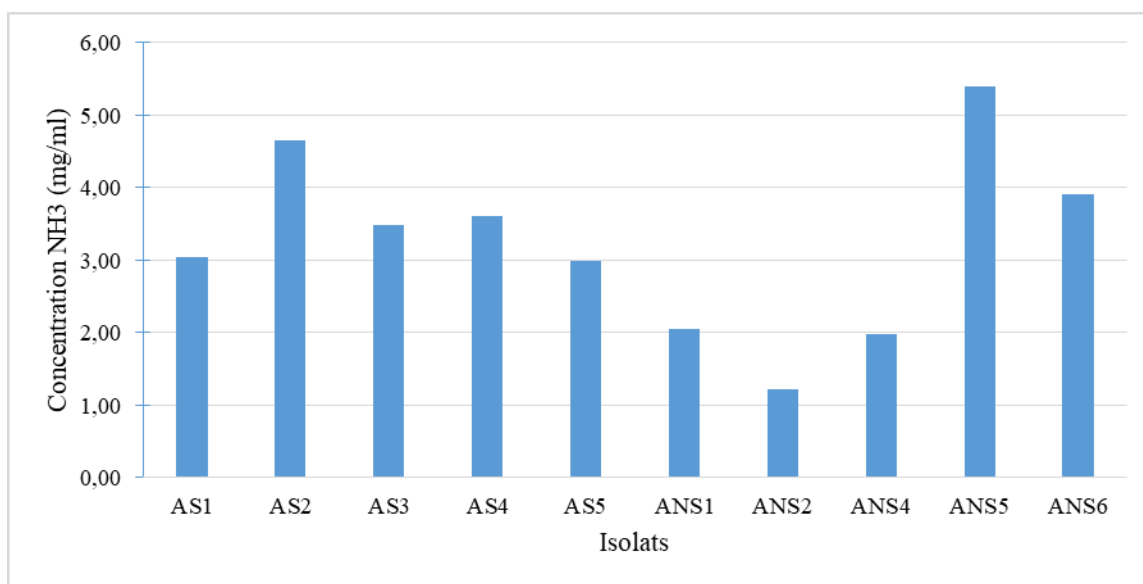
#### 2.4 Production d’ammoniac (NH<sub>3</sub>)

Ce test est réalisé selon la méthode de **Capuccino et Sherman (1992)** avec modifications. Les modifications adoptées ont permis une estimation qualitative et quantitative des taux de NH<sub>3</sub> produits (**Figure 15** et **Figure 16**), l’examen de l’aspect du milieu après inoculation, et ajout du réactif de Nessler, permet une appréciation qualitative. Les taux de production d’ammoniac NH<sub>3</sub> sont, cependant, déterminés en se rapportant au courbe étalon (**Figure 14**).

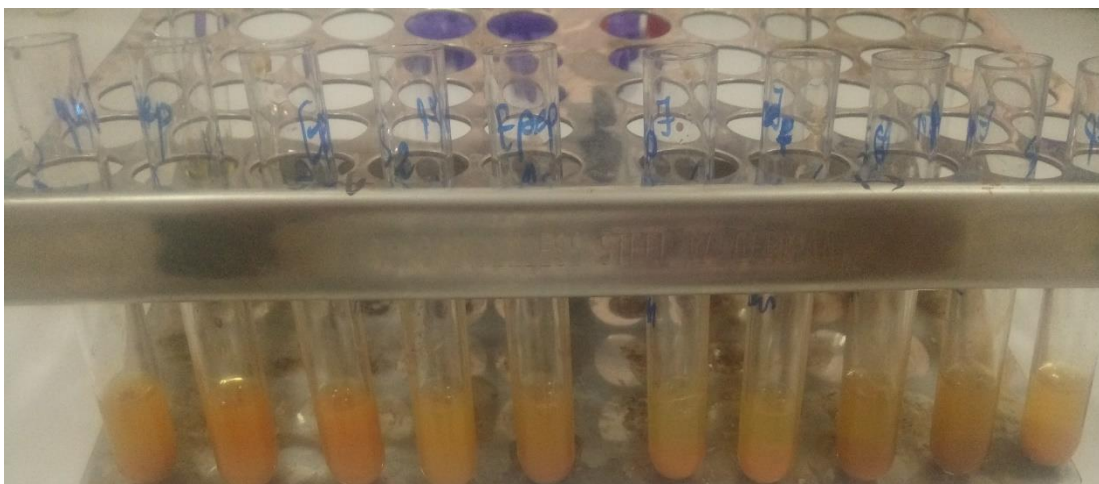
La production de NH<sub>3</sub>, révélée par le développement d’une couleur jaune ou orange, est exprimée chez 100% ces isolats (**Figure 15** et **Figure 16**).



**Figure 14 :** Courbe standard du dosage de la production d'ammoniac NH<sub>3</sub>.



**Figure 15:** Concentrations d'ammoniac NH<sub>3</sub> produites par les isolats sur milieu eau péptonée.

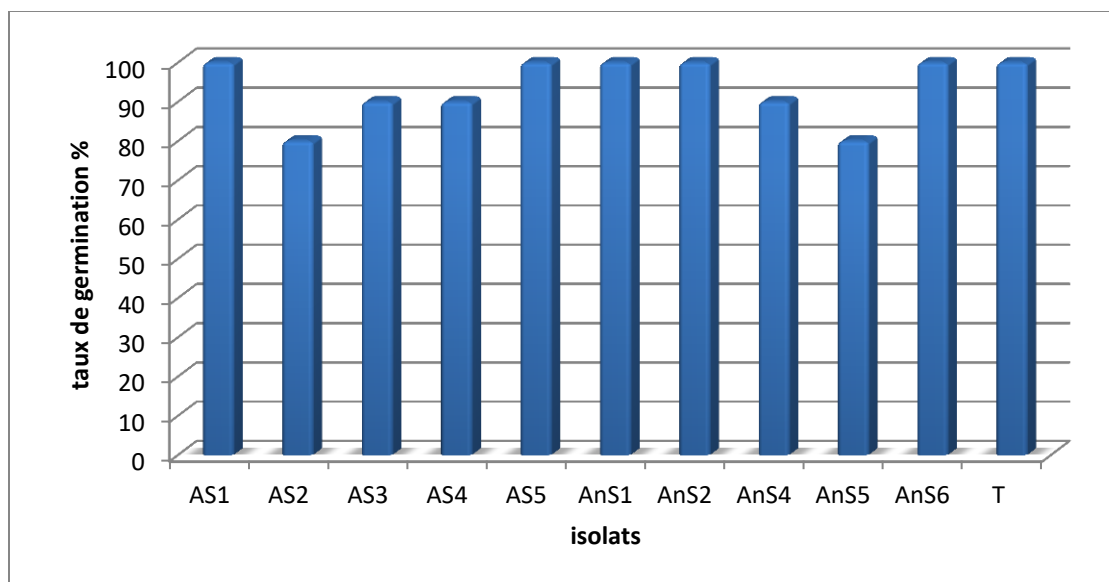


**Figure 16:** Résultats de la capacité de dix isolats à produire l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ )

Les taux de production d'ammoniac  $\text{NH}_3$  ont varié de 1.21 mg/ml à 5.39 mg/ml. Le taux maximal est observé avec les isolats **AS2** et **ANS 5** avec 4.64 et 5.39 mg/ml, respectivement. Le mode d'incubation, aérobie ou anaérobie, ne semble avoir d'effet sur la capacité des isolats à la production de  $\text{NH}_3$

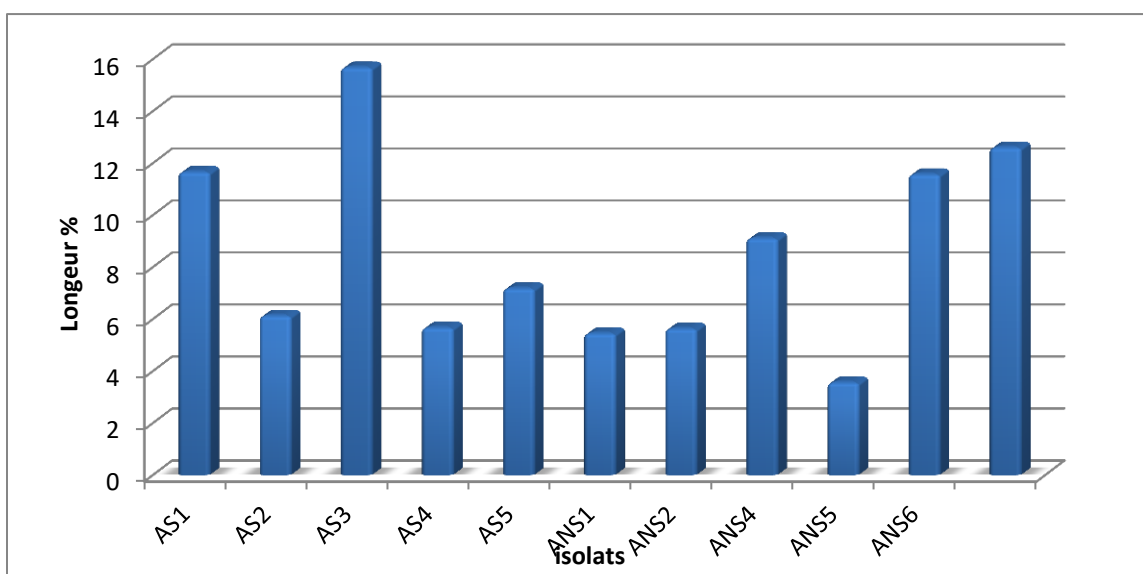
### **2.5 Mise en évidence de l'effet de promotion des isolats sur la germination du blé dur**

L'inoculation des graines a engendré des variations importantes dans le pourcentage de germination (**Figure 17**). Les isolats **AS 1**, **AS 5**, **ANS1**, **ANS 2** et **ANS 6** ont exercé un effet promoteur sur le pourcentage de germination des graines de blé dur. Par ailleurs, un effet répressif est observé avec le reste des isolats, les taux de germination de ces isolats sont inférieurs au taux de germination du témoin.



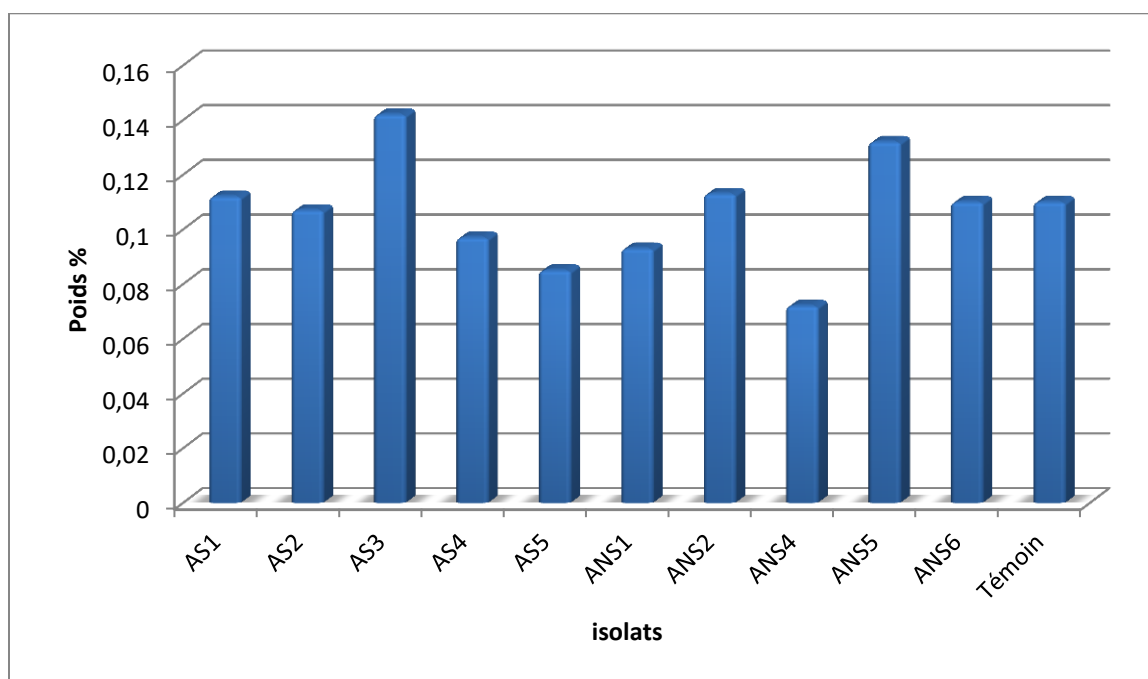
**Figure 17** : Effet des isolats sur le taux de germination du blé dur.

Les résultats obtenus pour les paramètres longueur des plantules sont peu compatibles avec ceux obtenus pour le taux de germination (**Figure 18**). Seul l'isolat AS3 a témoigné d'un pouvoir promoteur sur la croissance des plantules. En contrepartie, un effet répressif est observé avec le reste des isolats, les taux de germination de ces isolats sont inférieurs au taux de germination du témoin.



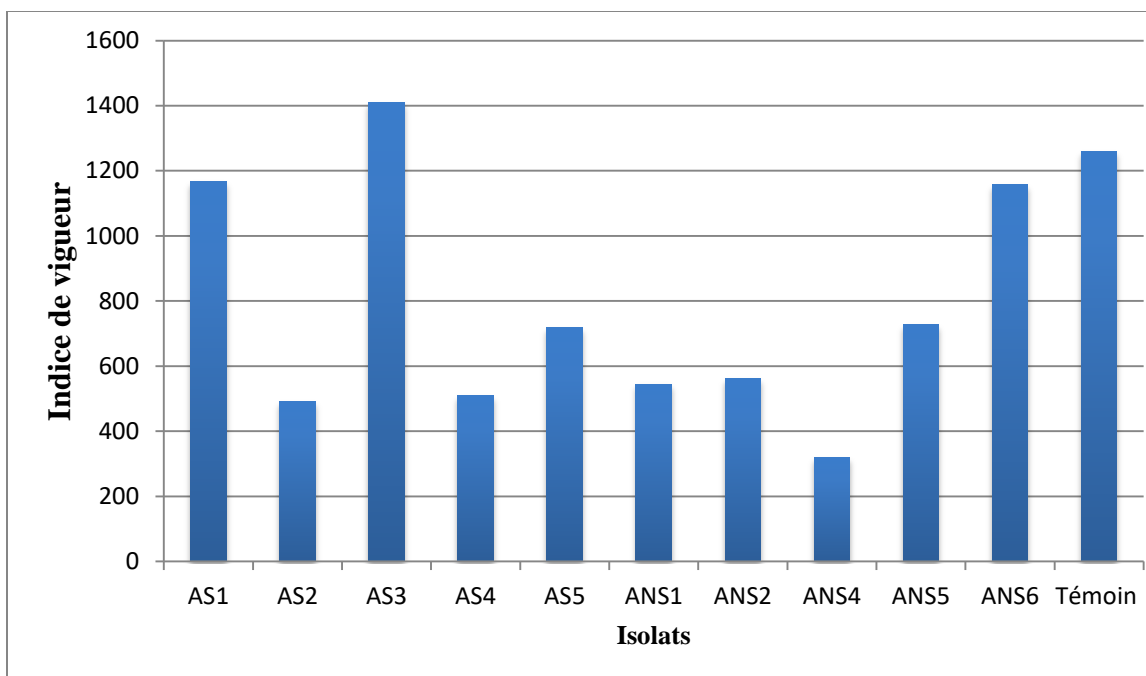
**Figure 18** : Effet des isolats sur la longueur des racines et des tiges des graines de blé dur.

L'accumulation de la matière fraîche est aussi favorisée sous l'effet des inoculations réalisées (**Figure 19**), le maximum de poids frais des est obtenus sous l'effet de l'isolat AS3 suivie de l'isolat ANS5. Les isolats AS 1, ANS 2 et ANS 6, ont permis l'obtention de taux d'accumulation de matière frais comparables au témoin. Cependant, une réduction du poids fais est observée avec le reste des isolats.



**Figure 19** : Effet des isolats sur le poids frais des plantules de blé dur.

Les indices de vigueur (**Figure 20**), paramètre renseignant sur l'état de santé des plantes, ne présente une grande corrélation avec l'étude longueur des plantules (**Figure 17**), aucune corrélation avec du taux de germination n'est observée (**Figure 17**). L'état de santé des plantules est fortement amélioré sous l'effet des inoculations réalisées avec l'isolats **AS 3**, l'IV obtenus est nettement supérieur à l'IV témoin. Une réduction des IV est provoquée par le reste des isolats.



**Figure 20** : Effet des isolats sur l'indice de vigueur des graines de blé dur.



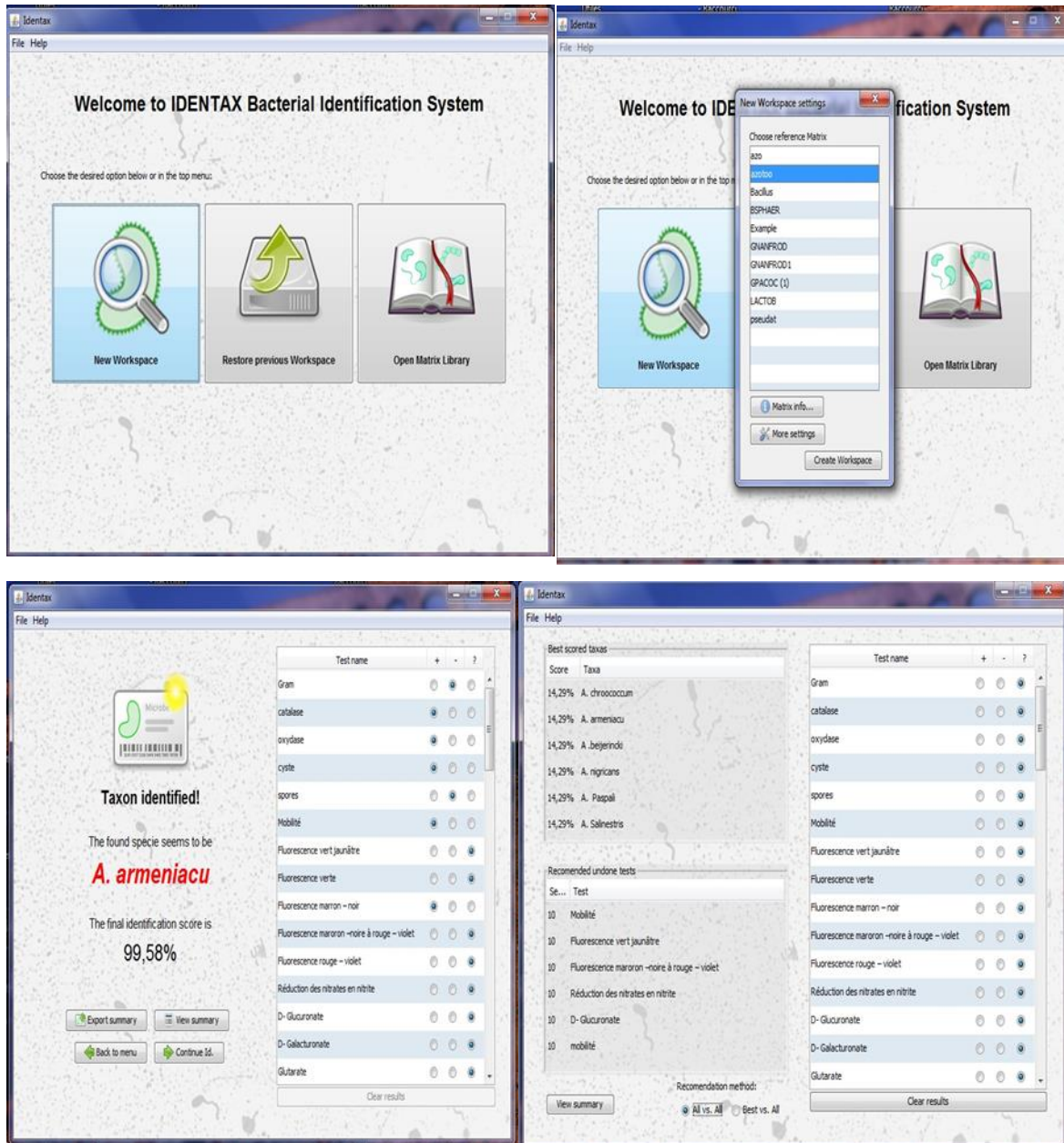
**Figure 21**: Aperçu de résultat de test de germination.

## 2.6 Identification biochimique d'isolat ANS6 par la galerie API 50 CH

A l'issus des résultats obtenus (type respiratoire, catalase, solubilisation de phosphate, production d'AIA en présence de L-trp et taux de germination) la souche ANS6 a été sélectionnée pour faire l'objet d'une identification phénotypique.

L'identification est réalisée via l'ensemencement de la galerie API 50 CH et le profil biochimique obtenu a servi à une interprétation probabiliste par l'usage du logiciel informatique Identax bacterial identification system version 1.2 (**Figure 22**).

Dans ce cas, l'identification de la souche ANS 6 est faite en se référant à une matrice d'identification élaborée à partir des tableaux d'identification fournis dans *Bergey's manual of systematic bacteriology* pour le groupe des lactobacilles (**Brenner et al., 2005**). Pour cela, un espace de travail est créé sur l'application identax, la matrice est importée et les résultats sont introduits (**Figure 22, Figure 23 et Figure 24**). A la fin, un résultat s'affiche sur l'écran et un rapport détaillé est établi (**Figure 23**).



**Figure 22 :** Identax bacterial identification system version 1.2. **a :** création de l'espace de travail. **b :** importation de la matrice d'identification. **c :** les grilles des résultats. **d :** exemple d'affichage du résultat sur écran.

Suite à l'analyse des profils biochimiques de la souche ANS6, celle-ci est identifiées comme *Lactobacillus casei subsp. casei* avec un score d'identification de **99,05%** (Figure 23).



**Figure 23** : Profiles biochimiques la souche ANS6.

```

++++ Workspace summary ++++++
Workspace name: Workspace 2021/07/01 19:53:32
Workspace info:

Reference matrix name: LACTOB
Reference matrix info:

Matrix tests: 53 (49 done)      Matrix taxa: 11

++++ Realized test summary ++++++

 1 Glycerol +
 2 Erythritol -
 3 D-arabinose -
 4 L-arabinose -
 5 Ribose +
 6 D-xylose -
 7 L-xylose -
 8 Adonitol -
 9 a methyl-D-Xyloside -
10 Galactose +
11 Glucose +
12 Fructose +
13 Mannose +
14 Sorbose -
15 Rhamnose -
16 Dulcitol -
17 Inositol -
18 Mannitol +
19 Sorbitol +
20 a-Methyl-D-mannoside -
21 a-Methyl-D-glucoside -
22 N-Acetyl-Glucoamine +
23 Amygdalin +
24 Arbutin +
25 Esculin +
26 Salicin +
27 Cellobiose +
28 Maltose +
29 Lactose +
30 Melibiose -
31 Sucrose +
32 Trehalose +
33 Inulin -
34 Melezitose -
35 Raffinose -
36 Starch -
37 Glycogen -
38 Xylitol -
39 Gentiobiose +
40 D-turanose -
41 D-lyxose -
42 D-tagatose +
43 D-fucose -
44 L-fucose -
45 D-arabitol -
46 L-arabitol -
47 Gluconate -
48 2-Keto-Gluconate -
49 5-Keto-Gluconate -

++++ Identification results ++++++

Identification OK with a threshold of 95,00%

Best scored taxon: Lactobacillus casei subsp. casei      Score: 99,05%

++++ Other taxa scores ++++++

Lactobacillus casei subsp. rhamnosus: 0,95%
Lactobacillus leichmanii: 0,00%
Lactobacillus casei subsp. alactosus: 0,00%

++++ Atypical results for the best scored taxa ++++++

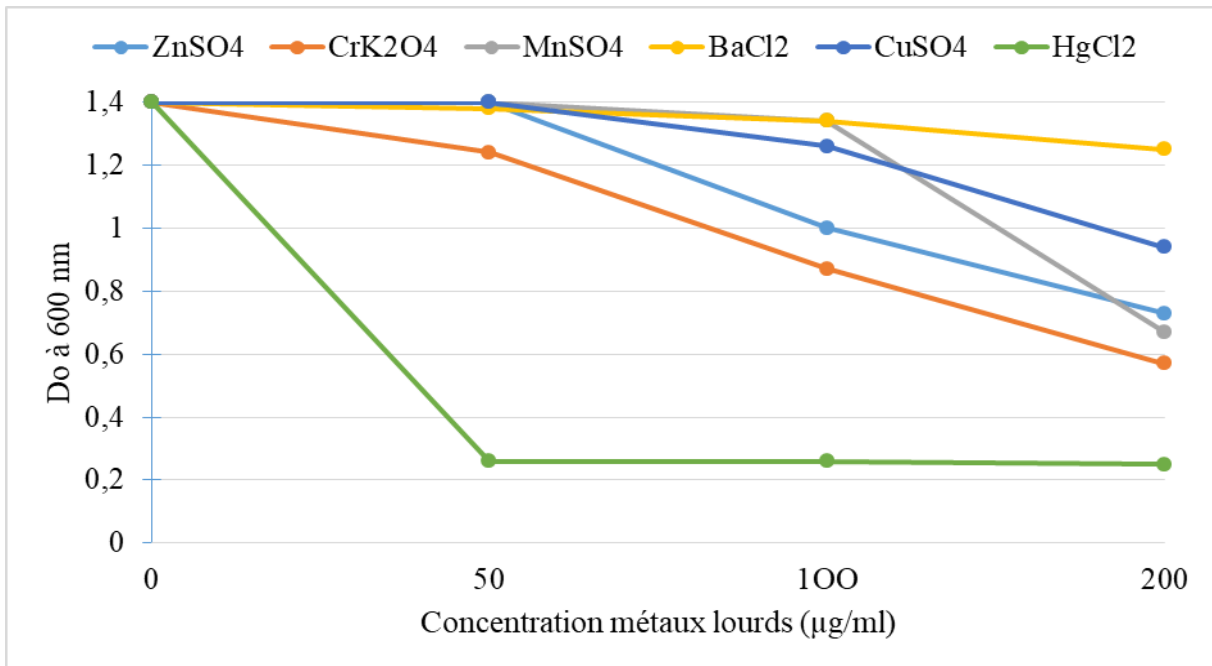
```

Figure 24 : Rapport d'identification de la souche ANS6.

### 3 L'effet des métaux lourds sur les isolats

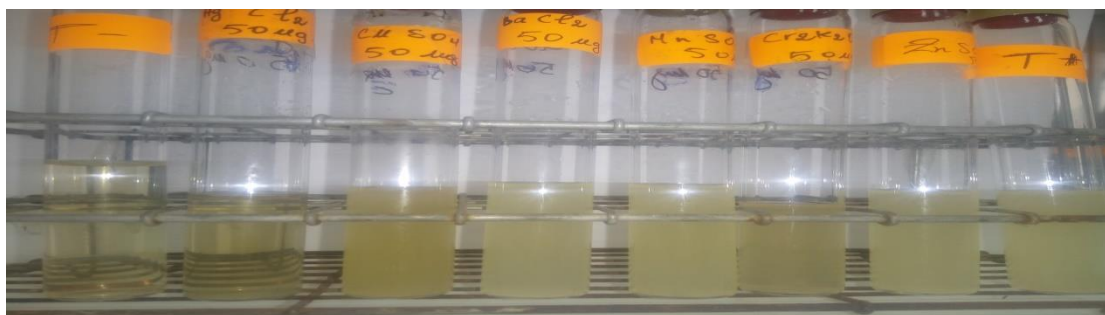
Dans cette partie, on a utilisé la souches ANS6 isolées et identifiées précédemment, pour tester sa tolérance à l'effet de six métaux lourds (Mn, Zn, Hg, Cr, Ba, Cu). L'effet des six métaux lourds est apprécié par mesure de la densité optique de chaque culture à 620 nm. Il est comparé à un témoin ensemencé par la souche ANS6 en

l'absence de métaux lourds la culture (T +). Les résultats sont illustrés dans la courbe qui représente les variations de la croissance de la souche *Lactobacillus* (Figure 24).



**Figure 25** : Effet des métaux lourds sur la croissance de la souche ANS6.





**Figure 26 :** Aspect des résultats d'effet des métaux lourds sur la souche ANS6 a différentes concentrations **A** : (50ul/ml) ; **B** (100ui/ml) ; **C** :(200ul /ml)

La souche ANS 6, semble très bien tolérer le  $MnSO_4$  et le  $BaCl_2$ , sa croissance est sub-optimale jusqu'à une concentration de 100  $\mu g/ml$ , au-delà, une intolérance, exprimée par une réduction de la croissance, est observée et le  $MnSO_4$  paraît plus toxique que  $BaCl_2$ .

L'effet toxique des restes des métaux lourds ( $ZnSO_4$ ,  $CrK_2O_4$ ,  $CuSO_4$  et  $HgCl_2$ ) apparaît dès la première concentration testée (50 $\mu g/ml$ ). Cette effet est modère avec le  $ZnSO_4$ , le  $CrK_2O_4$  et le  $CuSO_4$ , les taux de croissance, exprimé en Do, sont réduit à leur moitié comparé au témoin. La souche ne présente, cependant, aucune tolérance au chlorure de mercure, sa croissance se trouve inhibé à la plus faible concentration testé (50  $\mu g/ml$ ).

*Chapitre IV :*  
*Discussion*

### Discussion

L'utilisation généralisée des bactéries lactiques dans la transformation des aliments a généré beaucoup de connaissances sur leurs physiologies et bio-activités (**Garsa et al., 2014 ; de Vuyst et Vandamme, 1994**). Cet usage a également conduit à la désignation de bactéries lactiques comme microorganismes sûr (GRAS) et ne possédant aucun risque pour l'applications en agriculture dans la production des cultures comestibles, en les exemptant des coûteux et des longs processus d'approbation réglementaire (**Lutz et al., 2012**). De plus, les preuves empiriques combinées de l'agriculture jumelé à un recueil croissant de preuves scientifiques font un argument convaincant pour considérer les bactéries lactiques en tant que nouvelle classe de PGPR.

Le présent travail a pour objectif l'isolement de bactéries lactiques PGPR, des lactobacilles, et d'en tester la tolérance aux métaux lourds.

L'isolement des lactobacilles est fait à partir de lait de vache cru et de l'ben. Dix isolats ont été obtenu sur milieu MRS (**Man et al., 1960**), les isolats sont repartis en deux groupe selon le mode d'incubation, aérobiose ou anaérobiose. L'isolement des lactobacilles, du fait des exigences nutritionnelles de ces bactéries lactiques, doit se faire sur un milieu de culture être riches en sucre, en matière azotée et surtout en facteurs de croissance (**pilet M-F et al., 2005**).

L'étude phénotypique et la caractérisation préliminaire des isolats sélectionnés sont basées essentiellement sur la présence de trois critères tels que l'aspect macroscopique des colonies, la forme bacillaire avec une coloration de Gram positive, et la réaction négative pour la catalase.

Les isolats sélectionnés présentent des formes cellulaires similaires au genre *Lactobacillus*, colonies régulières de couleur blanchâtre et de 0,7 à 2mm de diamètre, et l'observation sous microscope après coloration de Gram, indique qu'il s'agit de bacilles apparents Gram positif (**Klein et al.,1998 ;Axelsson,2004 ;Hammes et Hertel, 2006 ; Tabasco et al.,2007**). Les *Lactobacillus* sont catalase négatif (**de Vos et al., 2009**).

Les ferments contenant des bactéries lactiques sont utilisés depuis des décennies dans les systèmes agricoles pour améliorer les sols, contrôler les maladies et favoriser la croissance des plantes, ils ont un super potentiel comme biofertilisants, agents de lutte biologique et biostimulants (**Lamont et al., 2017**). L'étude du potentiel PGPR des lactobacilles isolés est fait par la caractérisation de leur potentiel biostimulant et biofertilisant.

La capacité des souches sélectionnées à l'expression des mécanismes implique dans la biofertilisation est mise en évidence via une série de test dont : la solubilisation de phosphore, fixation d'azote, et de production d'ammoniac. La biostimulation, Quant à elle, est évaluée via production d'acide indole-acétique.

L'amélioration de la disponibilité du phosphate est une des principales activités améliorant la croissance des végétaux, 100% des isolats testés solubilisent le phosphate tricalcique en milieu solide. Les valeurs maximales de solubilisation de phosphate tricalcique ont été observées après 7 jours d'incubation, avec un indice de solubilisation de 2,53 pour l'isolat ANS6.

L'activité de solubilisation de phosphore exprimé par les isolats est comparable à celle rapporté par **Narula et al., (2002)** ; **Nosrati et al., (2014)** et **Aidouni et Mesmoudi, (2018)** qui ont enregistré des IS de 1.3 à 4 pour les souches d'*Azotobacter* testées. Cette activité est sans doute due au pouvoir acidifiant des bactéries lactiques.

Les taux de production d'ammoniac  $\text{NH}_3$  chez *lactobacillus* ont varié de 1,2 mg/ml à 5,4 mg/ml. Le taux maximal est observé avec l'isolat ANS5 (5,4 mg/ml) suivi de l'isolat AS2 (4,7 mg/ml) et ANS6 (3,6mg/ml) et AS4 (3,6 mg/ml), puis AS3 (3,5). Pour le reste des isolats, les taux de  $\text{NH}_3$  produits ne dépassent pas les 3,5 mg/ml.

La production de  $\text{NH}_3$ , propriété commune des PGPR, est fréquente chez les souches testées (100 %) et elle est comparable à celle rapportée par de nombreux auteurs pour des souches potentiellement PGPR (**Joseph et al., 2007; Ahmed et al., 2008 ; Silini, 2013 et Aouane et Hamani, 2017**).

L'AIA est synthétisé par la totalité des isolats de *lactobacillus*, sa production est indépendante de la présence ou de l'absence du précurseur dans le milieu de culture. Cependant, son taux est fortement corrélé à la concentration de ce dernier, ainsi l'ajout de 5 g/l de précurseur accroît la production en acide indole-acétique. Le seuil maximal

de production passe de 0.73 à 2.5 pour les plus faibles taux et de 1.13 à 11.69 µg/ml pour le plus important.

Les résultats sont en désaccord avec les constatations de **Lamont et al., (2017)**, l'auteur met en doute le rôle des hormones bactériogènes dans la stimulation de la croissance des plantes par les bactéries lactiques.

Ces résultats concordent avec ceux d'autres auteurs qui ont démontré que des souches de *Lactobacillus* produisent de l'indole-3-acétique acide (IAA) (**Mohite, 2013; Shrestha et al., 2014; Giassi et al., 2016**).

Selon **Barazani et Friedman (1999)**, les bactéries capables de sécréter un taux supérieur à 13,5 µg/ml de composés indoliques sont considérées comme étant des PGPR. De faibles quantités d'AIA de  $10^{-9}$  à  $10^{-12}$  M sont nécessaires pour la croissance primaire des racines (**Patten et Glick, 2002**), les taux obtenus sont donc suffisants pour stimuler la croissance végétale.

L'inoculation du blé dur a engendré des effets variables, le potentiel de promotion a différé d'un isolat bactérien à l'autre. Dans l'ensemble, peu d'isolats ont exercé un pouvoir de promotion sur la germination et sur le développement des jeunes plantules.

L'état de santé des plantules est faiblement amélioré sous l'effet des inoculations réalisées, seulement 10% des IV obtenus sont nettement supérieur à l'IV témoin. Ils correspondent à l'IV enregistrés sous l'effet de l'isolats AS3.

L'identification de la souche ANS6 est faite en se référant à une matrice d'identification élaboré à partir des tableaux d'identification fournis dans Bergey's manual of systematic bacteriology (**Brenner et al., 2005**).

Une identification à l'échelle des espèces, est réalisée grâce à l'outil informatique Identax, suite à l'analyse du profil biochimique de souches ANS6 via cet outil, la souche est identifiée comme *Lactobacillus casei subsp. casei* (avec un score d'identification de 99.05%).

La pollution par les métaux lourds est devenue l'un des problèmes environnementaux les plus grave. Le mercure ; chrome, baryum et cuivre sont la cause de perturbation chez les organismes vivants en particulier l'homme et les végétaux. Les

bactéries ont la capacité détoxifie ces contaminants par le mécanisme de la bioaccumulation.

L'effet des métaux lourds sur la souche ANS6 est montré une inhibition pour Zn, Mn, Ba, Mr, Cr, Hg, aux différentes concentrations sauf Zn, Cu, Ba qui montrent une tolérance a concentration 50ug/ml. Dans l'ensemble, la concentration du métal influence la croissance bactérienne que ce soit en présence de métaux toxiques ou non toxique.

## *Conclusion*

### Conclusion & perspectives

Parmi les contaminants les plus répandus du sol, on retrouve les métaux lourds dont la toxicité varie en fonction de leur nature. Il est donc primordial de connaître la tolérance de certains microorganismes contre certains métaux lourds afin de mieux évaluer les impacts potentiels des contaminations sur ces microorganismes d'importance environnementale.

Au cours de cette étude réalisée au niveau du Laboratoire de Microbiologie, les objectifs fixés étaient d'isoler et de sélectionner des souches de lactobacilles performantes. Pour d'étudier la tolérance de souches de bactérie lactique face à la présence des métaux.

A l'issue de ce travail, des souches de bactéries lactiques ont été isolées à partir des échantillons de quelques produits laitiers sur milieu MRS et purifiées.

Les propriétés de ces souches isolées pour produire des substance impliquées dans la promotion de la croissance des plantes ont été confirmées par des teste au laboratoire tel que la solubilisation de phosphate, la fixation d'azote, la production d'ammoniac et la production AIA.

L'étude des caractères morphologiques et culturaux (étude macroscopique et microscopique) et des caractères biochimiques (recherche de la de catalase, production de gaz) ont montré que les isolats sont des bactéries lactiques.

Les résultats ont démontré que la totalité des bactéries testées expriment des activités impliquées dans la promotion de la croissance des plantes.

L'étude la tolérance de la souche ANS6, identifiée comme *Lactobacillus casei subsp. casei*, pour certains métaux lourds a été testée par criblage en milieu liquide (LB) et différentes concentrations de métaux ont été expérimentés. L'effet toxique des métaux lourds ( $ZnSO_4$ ,  $CrK_2O_4$ ,  $CuSO_4$  et  $HgCl_2$ ) apparait dès la première concentration testée ( $50\mu g/ml$ ). Cette effet est modère avec le  $ZnSO_4$ , le  $CrK_2O_4$  et le  $CuSO_4$ . La souche ne présente, cependant, aucune tolérance au chlorure de mercure, sa croissance se trouve inhibé à la plus faible concentration testé ( $50\mu g/ml$ ).

Le présent travail ouvre une nouvelle voie dans l'axe des recherches sur les PGPR, il propose la reconsidération du rôle des bactéries lactiques non pas ou non

## *Conclusion & perspectives*

---

seulement comme probiotiques pour les êtres humains mais également pour les végétaux et l'agriculture en générale. Le terrain des recherches dans cette axe semble peu exploité même au niveaux mondial. Les énigmes sur les mécanismes de promotion des bactéries lactique ne sont pas totalement résolus et les perspectives s'ouvrent afin de mieux les comprendre. Des études approfondies doivent compléter ce modeste travail :

- L'isolement d'autres bactéries lactiques.
- Une caractérisation plus approfondie des mécanismes PGP exprimés par ces bactéries.
- L'utilisation de ces bactéries en inoculation pour évaluer leur effet PGP in vivo

## Référence bibliographiques

### Référence bibliographiques

#### - *A*

**Acuña J. J., Jorquera M. A., Martínez O. A., Menezes–Blackburn D., Fernández Ahmad B., Nigar S., Malik N. A., Bashir S. Ali J., Yousaf S., Bangash J. A., Jan I. (2013).** Isolation and Characterization of Cellulolytic Nitrogen Fixing Azotobacter species from Wheat Rhizosphere of Khyber Pakhtunkhwa. *World Appl. Sci. J.* 27 (1): 51-60.

**Adel Chahid. 2016.** Quantification des éléments traces métalliques (cadmium, plomb et mercure total) de certains produits de la pêche débarqués dans la zone Essaouira-Dakhla : Evaluation des risques sanitaires. These de doctorat . p 14

**Adriano, D.C., (2001).** Trace elements in terrestrial environments: Biochemistry, bioavailability and risks of metals. 2ed. Springer-Verlag, New York. pp 4-12, 64-65.

**Adriano, D.C., (2001).** Trace elements in terrestrial environments: Biochemistry, bioavailability and risks of metals. 2ed. Springer-Verlag, New York. pp 4-12, 64-65.

**Ahmad F., Ahmad I., Khan M.S. (2008b).** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research.* 163: 173-181.

**Akpor OB, Ohiobor GO & Olaolu TD, 2014.** Heavy metal pollutants in wastewater effluents: Sources, effects and remediation. *Advances in Bioscience and Bioengineering.* 2(4): 37-43.

**Anonyme, 2007.** Britannica Encyclopedia. Sociedad Comercial y Editorial santiago Ltda., Lima, pp.2800

**Araujo, F.F. (2008).** Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras edesenvolvimento de milho, soja e algodão. *Ciênc. Agrotec.* 32:456–462

**Axelsson L. (1993).** Lactic acid bacteria : classification and physiology. In: *Lactic acid bacteria.* Salminen S and Von Wright A. pp: 1-63 .Marcel Dekker Inc. New York.

#### - *B*

**Badis A., Laouabdia-Sellamii, N., Guetarni, D., Kihal, M. et Ouzrout, R., (2006):** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de deux population caprines locales «Arabia et Kabyle». *Sci. Tech.* 23, 30-37.

## Références bibliographiques

---

- Baize D, 1997.** Teneurs en éléments traces métalliques dans les sols (France), INRA Editions, Paris,- ISSN : 1250-5218 – ISBN : 2-7380-0747-3, pages 408
- Baize D. (1997).** Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). INRA Editions, Paris, p 408.
- Banks, M.K.; Schwab, A.P.; Henderson, C.; 2006.** Leaching and reduction of chromium in soil as affected by soil organic content and plants. *Chemosphere*, 62, 255-264.
- Basavaraju, O., A.R.M. Rao et T.H. Shankarappa (2002).** Effect of Azotobacter inoculation and nitrogen levels on growth and yield of radish (*Raphanus sativus* L.). In: Proceedings of Microbial Technology for Sustainable Development and Productivity, (Ed.,Rajak D.C.), Jabalpur, Biotechnology of Microbes and Sustainable Utilization, pp. 155-160
- Bashan, Y, et H. Levanony (1990).** Current status of Azospirillum inoculation technology: Azospirillum as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* 36:591–608
- Bashan, Y., G. Holguin et L.E. De-Bashan (2004).** Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003), *Can. J. Microbiol.* 50:521-577.
- Begum, M., VR. Rai et S. Lokesh (2003).** Effect of plant growth promoting rhizobacteria on seedborne fungal pathogens in okra. *Indian Phytopathol.* 56:156–158.
- Belarbi F. (2011) :** Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériennes, Mémoire de Magistère, Université d'ORAN Es Senia (2011)-69,84,97
- Bhattacharyya P. N. et Jha D. K. (2012).** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol.* 28:1327-1350.
- Bourrelrier P.H., Berthelin J. (1998).** Contamination des sols par les éléments traces: les risques et leur gestion. *CR. Acc. Sci.*, 42. Ed. Lavoisier, Paris.
- Bourrelrier PH and Berthelin J, 1998.** Contamination des sols par les éléments traces: les risques et leur gestion, *CR. . Rapport de l'Académie des sciences n°42*, 440 p. Ed. Lavoisier, Paris.
- Briat, J.F. (1992).** Iron assimilation and storage in prokaryotes. *J. Gen. Microbiol.*, 138: 2475-2483.
- Burdman, S., E. Jurkevitch et Y. Okon (2000).** Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture, In: *Microbial Interactions in Agriculture and*

## Références bibliographiques

---

Forestry. N. S. Subba Rao and Y. R. Dommergues, eds., Science Publishers, Enfield, USA, Vol II, pp. 229-250.

### - C

**Carr F. J., Chil, D. et Maida N. (2002).** The lactic acid bacteria: A literature survey Critical Rev. Microbiol. 28: 281-370.

**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.

**Chelius MK. Et EW. Triplett (2000).** Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. Appl. Environ. Microbiol. 66:783-787.

**Cinnirella S, Hedgecock Im & Sprovieri F, 2014.** Heavy metals in the environment: sources, interactions and human health. Environ. Sci. Pollut. Res. 21(6).

**Condon S (1987).** Responses of lactic acid bacteria to oxygen. FEMS. Microbiol. Lett.46:269-280.

**Cotte A., Duret A. (2010).** Le chrome trivalent : intérêts et limites des suppléments, thèse de doctorat, faculté de pharmacie, université Joseph Fourier, Grenoble, France, 16-17.

### - D

**Davies, F.T.; Puryear, J.D.; Newton, R.J.; Egilla, J.N.; Grossi, J.A.S.; 2002.** Mycorrhizal fungi increase chromium uptake by sunflower plants: influence on tissue mineral concentration, growth, and gas exchange. *J. Plant Nutr.*, 25, 2389-2407.

**De Roissart H et Luquet F.M. (Janvier 1994).** Bactéries lactiques Lorica Uriage. 1 ; 6-1

**De Vos P, Garrity Gm, Jones D, Krieg Nr, Ludwig W, Rainey Fa, Schleifer Kh, Whitmanet Wb (2009).** Genus *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Listeria*. In : « Bergey's manual of systematic bacteriology - The Firmicutes » Vol 3. Springer éd., New York.pp.19-511.

**Decateau, R. D. (2000).** Vegetable Crops. New Jersey, p.464

**Denis F., poly M.C., Bengen E., et. Quentin R. (2007).** Bactériologie médicale, techniques usuelles. 2ème Ed. , Elsevier Masson, paris : p.417

## Références bibliographiques

---

**Dobereiner, J. (1997).** Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. *Soil Biol. Biochem.* 29:771–774

documentation Pédagogique d'Aquitaine Boreaux, France, pp. 219-223.

### - *F*

**Federighi M., Magras C., Pilet M F. (2005).** Bactériologie alimentaire:compendium d'hygiène des aliments. 2<sup>ème</sup> édition. Paris : 220 p.

**Fendorf, S.E.; Lamble, G.M.; Stapleton, M.G.; 1994.** Mechanisms of chromium(III) sorption on silica .2. effect of reaction conditions.. *Environ. Sci. Technol.*, 28, 2, 290-297.

**Fendorf, S.E.; Lamble, G.M.; Stapleton, M.G.; 1994.** Mechanisms of chromium(III) sorption on silica .1. Cr(III) surface-structure derived by extended X-ray-absorption fine structure spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.*, 28, 2, 284-289.

**Figueiredo, MVB., HA. Burity, CR. Martinez et CP. Chanway (2007).** Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24:1187–1193.

**Foster, J.W. (1995).** Low pH adaption and the acid tolerance response of *Salmonella*

### - *G*

**Gaur N, Flora G, Yadav M & Tiwari A, 2014.** A review with recent advancements on bioremediationbased abolition of heavy metals. *Environ Sci Process Impacts*, 16(2):180-93.

**Gaur N, Flora G, Yadav M & Tiwari A, 2014.** A review with recent advancements on bioremediationbased abolition of heavy metals. *Environ Sci Process Impacts*, 16(2):180-93.

**Giassi, V., Kiritani, C., Kupper, K, C., 2016.** Bacteria as growth- promoting agents for citrus rootstocks. *Microniological Research* 190, 46-54

**Glick, B.R., 1995.** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian journal of Microbiology* 41, 109-117.

**Glick, B.R., C.B. Jacobson, M.M.K. Schwarze et J.J. Pasternak (1994b).** Does the enzyme 1-aminocyclopropane- lcarboaylate deaminase play a role in plant growth promotion by *Pseudomonas putida* GR12–2 In: Ryder MH, Stephens PM, Bowen GD (eds) *Improving plant productivity with rhizosphere bacteria.* CSIRO, Adelaide, pp 150–152

## Références bibliographiques

---

**Gounon, C. (2008).** Mobilité des éléments traces métalliques dans les sédiments : couplage et comparaison des approches chimiques et microbiologiques. Thèse de doctorat de Sciences de l'Univers et de l'Environnement. Université de Paris. 12, Val de Marne. 314p

**Graham, P. H. (1988).** Principles and Application of Soil Microbiology, pp: 322–345.

**Guiraud J.P., Rosec J.P. (2004).** Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR : 241 p.

### - *H*

**Habi S. (2007).** Etude de la métallo-résistance et de l'halo-tolérance des entérobactéries isolées des eaux de surface de la région de Sétif, thèse de doctorat, Université "Ferhat ABBAS", Sétif, Algérie, 17-23.

**Hammers W.P et Hertel C. (2009).** Genus I. lactobacillus: Dans: Bergey's manuel of Systematic Bactériology second edition, vol. 3 (The firmicutes). Springer Sciences.Busines Media, New York, p. 465-511.

**Hashida M., Semerok A, Gobert O, Petite G., Izawa Y., Wagner J.F. (2002).** Ablation threshold dependence on pulse duration for copper. Appl. Surf. Sci., 197-198.

**Hengstler J.G., Bolm-Audorff U., Faldum A., Janssen K., Reifenrath M., Gotte W., Jung D., Mayer-Popken O., Fuchs J., Gebhard S., Bienfait H.G., SCHLINK K., DIETRICH C., FAUST D., EPE B., Oesch F. (2003).** Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co- exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. Carcinogen., 24: 63-73.

**Higa, T., Kinjo, S., 1991.** Effect of lactic acid fermentation bacteria on plant growth and soil humus formation. In: Parr, J.F., Hornick, S.B., Whitman, C.E. (Eds.), Proceedings of the First International Conference on Kyusei Nature Farming. US Department of Agriculture, Washington, DC, pp. 140e147.

**Hogg T. (2005).** Essentiel Microbiology. John Wiley & sons. 14:188-190.

**Hu, C., Qi, Y., 2010.** Effect of compost and chemical fertilizer on soil nematode community in a Chinese maize field. European Journal of soil Biology 46 (3), 230-236.

**Hurlbut Jr., C.S. et Klein, C., 1982.** Manual de Mineralogía de Dana. Editorial Reverté, Barcelona, 564 pp.

## Références bibliographiques

---

**Hussain, S.S., Javaid, T., Parr, J.F., Jilani, G., Haq, M.A.,1999.** Rice and wheat production in Pakistan with effective microorganisms. *American Journal of Alternative Agriculture* 14 (01), 30-36

**Huynh T.M.D. (2009).** Impacts des métaux lourds sur l'interaction plante/ ver de terre/ microflore tellurique. Thèse de doctorat. Université Paris est, France, 7-10.

### - J

**Javaid, A., 2011.** Effects of biofertilizers combined with different soil ammendments on potted rice plants. *Chilean Journal of Agricultural Research* 71 (1), 157-163.

**Javaid, A., Bajwa, R., 2011.** Field evaluation of effective microorganisms (EM) application for growth, nodulation, and nutrition of mung beqn. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 35 (4) 443-452.

**Javaid, A.,Mahmood, N., 2010.** Growt , nodulation and yield reponse of soybean to biofertilizers and organic manures. *Pakistan Journal of Botany* 42(2), 863-871.

### - K

**Kaymak, HC., I. Guvenc, F. Yarali et MF. Donmez (2009).** The effects of bio-priming with PGPR on germination of radish (*Raphanus sativus* L.) seeds under saline conditions. *Turk J Agric Forest*, 33:173–179

**Khan MS, Zaidi A, Ahemad M, Oves M, Wani PA ,2010.** Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi - current perspective. *Arch Agron Soil Sci* 56:73-98.

**Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A., Oves, M., 2009.** Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environ. Chem. Lett.* 7, 1–19.

**Kihal, M, (1996).** Etude de la production du dioxyde de carbone par leuconostoc mesentéroïdes, élément d'application en technologie fromagère type fromage bleu thèse de Doctorat d'Etat, Université d'Oran.

**Kloepper JW, A. Gutierrez-Estrada et A. McInroy (2007).** Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.* 53:159–167.

**Koch J., Von Bohlen A., Hergenröder R., Niemax K. (2004).** Particle size distributions and compositions of aerosols produced by near-IR femto and nanosecond laser ablation of brass. *J. Anal. At. Spectrom.*, 19: 267–272.

## Références bibliographiques

---

**Kopittke, PM, Dart PJ & Menzies NW, 2007a.** Toxic effects of low concentrations of Cu on nodulation of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environ. Pollut.* 145: 309-315.

**Kurlaze, G.V. (2007).** *Environnemental Microbiology Research Trends.* Nov. Scien. Publ. Inc.

**Kyan, T., Shintani, M., Kanda, S., Sakuria, M., Ohashi, H., Fujisawa, A., Pongdit, S., 1999.** *Kyusei Nature Farming and the Technology of Effective Microorganisms,* Asian Pacific Natural Agricultural Network, Atami, Japan.

### - *L*

**Lantzy, R.J. et Mc Kenzie, F.T., 1979.** Atmospheric trace metals: global cycles and assessment of man's impact. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 43: 511-523.

**Leveau J.Y, Bouix M. (1993).** *Microbiologie industrielle : les usages d'intérêt industriel.*

**Li, Y., Park, S, Y., Zhu, J., 2011.** Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15 (1) 821-826.

**Loué, A. 1993.** *Oligo-éléments en agriculture.* Ed. Nathan (ed), 45-177.

**Lynch, J.M., 1985.** Origin, nature and biological activity of aliphatic substances and growth hormones found in soil. In Vaughan, D., Malcolm, R.E.,(Eds) . *Soil Organic Matter and Biological Activity* . Springer, Netherlands, pp. 151-174 .

### - *M*

**Mahan, B.H., 1987.** *Química. Curso Universitario. Fondo Educativo Interamericano S. A.*

**Mantelin, S. et B. Touraine (2004).** Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J. Exp. Bot.* 55:27-34

**Marchal, N., Bourdon, J.L. et Richard, CL. (1991).** *Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .3 ème Ed. , Doin éditeurs, Paris.*

**Martínez-Viveros O., Jorquera M.A., Crowley D.E., Gajardo G., Mora M.L. (2010).** Mechanisms and practical considerations Involved in plant growth promotion by Rhizobacteria. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 10 (3): 293 - 319.

**Miquel G. (2001).** *Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé*

**Mirouze, M. (2005).** Recherche de gène impliqué dans la tolérance au zinc chez l'espèce modèle hyperaccumulatrice de zinc *Arabidopsis halleri* : un nouveau rôle possible pour les défenses de plantes. Thèse de Doctorat. Université Montpellier II. 184P.

## Références bibliographiques

---

**Mohite , B., 2013.** Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of soil Science and Plant Nutrition* 13(3) , 638-649

### - N

**Nautiyal C.S. (1999).** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS. Microbiol. Lett.* 170: 265- 270.

**Neilands, J.B., K. Konopka, B. Schwyn, M. Coy, , RT. Francis, B.H. Paw (1987).** Comparative biochemistry of microbial iron assimilation. In: *Iron Transport in Microbes, Plants and Animals.* Winkelmann, G., van der Helm, D., and Neilands, J.B. (eds). Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft, pp. 3-33.

**Nelson N. (1999).** Metal ion transporters and homeostasis. *Embo. J.*, 18(16): 4361- 71.

**Nies D.H. (1999).** Microbial heavy-metal resistance. *App Microbiol. Biotech.*, 51:730-750.

**Nriagu, J.O., 1991.** Human influence on the global cycling of trace metals. In: J.D. Farmer (Ed.), *Heavy Metals in the Environment.* CEP Consultants, Edinburgh, pp. 1-5.

Orhan, E, A. Esitken, S. Ercisli, M. Turan et F. Sahin (2006) Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Sci Horti* 111:38–43

### - P

**Partanen, P., Hultman, J., Paulin, L., Auvinen, P., Romantschuk, M., 2010.** Bacterial diversity at different stages of the composting process. *BMC Microbiology* 10(1), 94.

**Pawlisz, A.V.; Kent, R.A.; Schneider, U.A.; Jefferson, C.; 1996.** Canadian water quality guidelines for chromium. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 12, 185-193.

**Pedersen MB, Kjaer C & Elmegaard N,( 2000).** Toxicity and bioaccumulation of copper to black bindweed (*Fallopia convolvulus*) in relation to bioavailability and the age of soil contamination. *Arch Environ Contam Toxicol.* 39(4):431-439.

**Peñarrubia L, Andrés-Colás N, Moreno J & Puig S, 2010.** Regulation of copper transport in *Arabidopsis thaliana* : a biochemical oscillator, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 15, 29–36.

**Perry JJ, Staley JT, Lory S (2004).** Bactéries Gram-Positives: Firmicutes et Actinobacteria. In: « Microbiologie ». Dunod éd., Paris. France. pp. 471-50.

## Références bibliographiques

---

**Pikovskaya R. L. (1948).** Mobilization of phosphorus in soil connection with vital activity of source microbial species. *Microbiologiya* 17: 362-370.

**Plumlee, G.S. et Ziegler, T.L., 2003.** The medical geochemistry of dust, soils and other earth materials. In: B.S. Lollar (Ed.), *Environmental Geochemistry. Treatise on Geochemistry.* Elsevier-Pergamon, Oxford, pp. 264-310.

### - R

**Ramirez, LEF., JC. Mellado (2005)** Bacterial biofertilizers. In: Siddiqui ZA (ed) *PGPR: biocontrol and biofertilization.* Springer, Dordrecht, Netherlands, pp 143–172.

**Reyes, I., L. Alvarez, H. El-Ayoubi et A. Valery (2008).** Selection and evaluation of growth promoting rhizobacteria on pepper and maize. *Bioagro.* 20:37–48.

**Robert M., Juste C. (1999).** Enjeux environnementaux et industriels - Dynamique des éléments traces dans l'écosystème sol. In: *Spéciation des métaux dans le sol. Les Cahiers du Club Crin,* Paris, pp. 15-37.

**Rodriguez, MN., RD. Villalonga, RAJ. Castillo, AJL. Marques, LR. Gonzalez, SP. Llanes et FM. Peguero (2001).** Influence of application of a biofertilizer based on *Azospirillum* on germination of seed and production of vegetable crops. *Centro Agrícola* 28:38–41.

**Roissart H. et Luquet F.M. (1994).** Méthodes d'Identification des Bactéries Lactiques In : « *Bactéries Lactiques ; Aspects fondamentaux et technologiques* ». Vol 2. Coquand édition, Grenoble. France. p. 141-167.

**Rooney J.P. (2007).** The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. *Toxicol.*, 234(3): 145-56.

### - S

**Sahin F, R. Cakmakci Et F. Kantar (2004).** Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N<sub>2</sub>-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant Soil*, 265:123–129.

**Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Hadadji M., Henni D. E, Prcrost H. et Kihal M. (2002).** Caractérisation des Bactéries Lactiques Isolées du lait cru de chèvre des régions arides d'Algérie. *Journal Algérien des régions arides.* , 01 : 01-14.

**Salle B. (1999).** Étude de l'interaction laser-matériau appliquée à l'analyse élémentaire des solides. Thèse de doctorat, Université d'Orléans.

## Références bibliographiques

---

**Saxena, A.K et KVBR. Tilak (1998).** Free-living nitrogen fixers: Its role in crop production. In : Microbes for Health, Wealth and Sustainable Environment, Malhotra Publ Co, New Delhi. Edited by Verma AK, 25–64.

**Shanker, A.K.; Cervantes, C.; Loza Tavera, H.; 2005.** Avudainayagam S., 2005. Chromium toxicity in plants. *Environment International* 31, 739-753.

**Sharma,S.B.,Sayyed,R.Z.,Trivedi,MH.,Gobi,T.A(2013).** phosphate Solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. Springerplus, 2(1), 587-597

**Shrestha, A.,Kim, B,S., Park,D,H.,2014.** Biological control of bacterial spot disease and plant growth – promoting effects of lactic acid bacteria on pepper . *Biocontrol science and Technology* 24(7), 763-779

**Sigg L., Behra R. (2005).** Speciation and bioavailability of trace metals in freshwater environments. *Met. Ions Biol. Syst.*, 44: 47-73.

**Singh, O. V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R., and Jain R. K. 2003.** Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 405-412.

**Sitepu I. R., Hashidoko Y., Santoso E., Tahara S. (2007).** Potent phosphatesolubilizing bacteria isolated from dipterocarps grown in peat swamp forest in central Kalimantan and their possible utilization for biorehabilitation of degraded peat swamp forest in Central Kalimantan. *Proceedings of the International Symposium and Workshop on Tropical Peatland.* Aug. 27-29, Yogyakarta, Indonesia.

**Srivastava, S.; Prakash, S.; Srivastava, M.M.; 1999.** Chromium mobilization and plant availability – the impact of organic complexing ligands. *Plant soil*, 212, 203-208.

**Sutra L., Federighi M. et Jouve J-L. (1998).** Manuel de bacteriologie alimentaire. Polytechnica. Edition, Paris. France.

**Swaider JM, GW. Ware et JP. McCollum (1992).** Producing vegetable crops. Interstate Publishers Inc, Danville, IL.

- T

**Tailliez P. (2001).** Les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a prés de 3 milliards d'années. *Lait*, 81 : 1-11

## Références bibliographiques

---

**Tailliez P. (2004).** Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. Actualités microbiologiques. pp. 35-41.

**Timmusk SNS., B. Nicander, U. Granhall Et E. Tillberg (1999).** Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. Soil Biol. Biochem. 31:1847–1852.

**Turner, M.A.; Rust, R.H.; 1971.** Effects of Chromium on growth and mineras nutrition of Soybeans. Soil Science Society of American Proceedings, 35, 5, 755.  
*typhimurium*. Critic. Rev. in Microbiol. 21, 215–237.

- V

**Vargas, DP, R. Ferrera-Cerrato, JJ. Almaraz-Suarez, AG. Gonzalez (2001).** Inoculation of plant growth-promoting bacteria in lettuce. Terra 19:327–335.

- W

**Webb R.L., Dickinson J.T., Exarhos G.T. (1997).** Characterization of particulates accompanying laser ablation of NaNO<sub>3</sub>. J. Appl. Spectrosc. 51: 700-707

**Welch RM, 1995.** Micronutrient nutrition of plants. Critical Reviews in Plant Science, 14 : 49-82.

**Williams R.J.P., Frausto Da Silva J.J.R. (2006).** The Chemistry of Evolution: The Development of Our Ecosystem.

- Y

**Young RN, 1992.** Principles of contaminant transport in soils, Elsevier, Netherland, 3-48.

- Z

**Zaidi, SFA. (2003).** Biocontrol of *Fusarium oxysporium* by plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) in soybean. Ann. Agr. Res. 24:676–678.

**Zaidi,A.,khan, M.,Ahemad,M.,Oves,M(2009).**plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria.Acta microbiologica and immunologica Hungarica,56(3),263-284

**Zandi,P., Baso, S. K. (2016).** Role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) as Biofertilizing in stabilizing Agricultural Ecosystems. In: Organic Farming for

## *Références bibliographiques*

---

Sustainable Agriculture. Nadwani, D. (Ed). Springer International Publishing, Switzerland.pp.71-87

# Annexes

## Annexes

## Annexe 1 : composition des milieux de culture

composants	Poids en g/l
<b>Milieu gélose de Man, Rogosa, Sharpe</b>	
Peptone bactériologique	10 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	4 g
Acétate de sodium	5 g
Phosphate bipotassique	2 g
Citrate d'ammonium	2 g
Sulfate de magnésium	0,02 g
Sulfate de manganèse	0,05 g
Glucose	20 g
Tween 80	1,08 g
Agar	15 g
Eau distillée pH 5,4	Qsp 1000 ml
<b>Bouillon Luria Bertani</b>	
Tryptone	10 g
NaCl	10 g
Extrait de levure	5 g
Eau distillée pH 7	Qsp 1000ml
<b>Milieu Ashby</b>	
Mannitol	20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
Na Cl	0,2 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1 g
CaCO <sub>3</sub>	5 g
Agar	15 g
Eau distillée q.s.p Ph	Qsp 1000 ml
<b>Milieu Pikovskaya agar</b>	
Extrait de levure	0,50 g
Glucose	10 g
Tricalcium phosphate	5 g
Chloride de potassium	0,50 g
Sulfate de magnésium	0,20 g

Sulfate de manganèse	0,1 g
Sulfate de fer	0,0001 g
Agar	0,0001 g
Eau distillée	15
Ph 7,2± 0,2 à 25°C.	Qsp 1000 ml
<b>Eau peptone</b>	
Peptone	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau distillée	Qsp 1000 ml
<b>Api 50 CHL medium</b>	
Polypeptone	10g
Extrait de levure	5g
Tween 80	1ml
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate de diammonique	2g
Sulfate de magnésium	0,20g
Sulfate de manganèse	0,05g
Bromocrésol Pourpre	0,17g
Eau déminéralisée	Qsp 1000 ml
pH 6,7- 7,1	

## Annexe 2 : technique

### Coloration de Gram

#### 1) Préparation de frottis

Prélever une goutte de la suspension bactérienne et la déposer au centre de la lame ;

Étaler avec la pipette sur la lame, de façon à obtenir un étalement mince ;

Sécher et fixer en portant la lame au-dessus de la flamme du Bec Bunsen.

#### 2) Coloration

Déposer quelques gouttes de solution de violet de gentiane sur le frottis fixé, et laisser agir 1min puis jeter l'excès ;

Déposer quelques gouttes de lugol, laisser agir quelques secondes ;

Rincer à l'eau

Contre-colorer en déposant la Fushine pendant 1 minute ;

Rincer à l'eau ;

Laisser sécher à l'air ;

Déposer une goutte de l'huile à émersion ;

Observer au microscope optique ( $G \times 100$ ), la forme, la disposition, et le Gram (Gram+ : couleur violette ; Gram- : couleur rose).