

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie - Microbiologie



Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de Master
Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

***Isolement de bactéries résistantes aux métaux lourds et
évaluation de leur activité antagoniste vis-à-vis des
microorganismes pathogènes***

Soutenu le : 29-09-2016

Travail réalisé par :

HAOUCHINE Tassadit

LEHAM Koceila

Devant le jury :

Président : M^F DJENANE D. Professeur à l'UMMTO

Promoteur : M^F OUELHADJ A. Maître de conférences A à l'UMMTO

Examineur : M^F MEDJKOUN N. Maître assistant A à l'UMMTO

Examineur : M^F MOUALEK I. Maître assistant A à l'UMMTO

Année universitaire : 2015 - 2016

Remerciements

*Nous remercions très chaleureusement notre promoteur **Monsieur OUELHADJ. A : Maître de conférences A à l'UMMTO**, pour avoir accepté de diriger notre travail par ses conseils, sa disponibilité et ses orientations.*

Nous sommes très honorés et tenons à remercier tous les membres du jury :

***Monsieur DJENANE. DJ : Professeur à l'UMMTO**, pour avoir accepté de présider le jury.*

***Monsieur MEDJKOUN N. Maître assistant A à l'UMMTO**, pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

***Monsieur MOUALEK. I : Maître-assistant A à l'UMMTO**, pour avoir accepté d'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.

Dédicaces

Je tiens à dédier ce travail :

Avant tout à la mémoire de celle qui a été ma mère, mon père et même mon amie, celle qui sans elle je ne serai pas ce que je suis aujourd'hui ; yemmati

A ma très chère maman qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau. Quoi que je face, je ne pourrais te rendre ce que tu as fait pour moi.

A toute ma famille

A tous mes amis (es) et camarades de la promotion

Malika

Dédicaces

A ma grand-mère qui nous a quitté en ce douloureux été 2016, tu été aimée de tous, toi dont la sagesse et générosité sont sans limite, c'est à Allâh que nous appartenons et c'est vers Lui que nous retournerons, repose en paix cher yemma azza.

A mes parents qui mon tout donné, à vous à qui ma principale préoccupation est de vous rendre aux centuples tous ce que vous m'avez offert.

A mes frères et sœur que je prends toujours en exemple.

Koceila

Dédicaces

A ma grand-mère qui nous a quitté en ce douloureux été 2016, tu été aimée de tous, toi dont la sagesse et générosité sont sans limite, c'est à Allâh que nous appartenons et c'est vers Lui que nous retournerons, repose en paix cher yemma azza.

A mes parents qui mon tout donné, à vous à qui ma principale préoccupation est de vous rendre aux centuples tous ce que vous m'avez offert.

A mes frères et sœur que je prends toujours en exemple.

Koceila

Dédicaces

A ma grand-mère qui nous a quitté en ce douloureux été 2016, tu été aimée de tous, toi dont la sagesse et générosité sont sans limite, c'est à Allâh que nous appartenons et c'est vers Lui que nous retournerons, repose en paix cher yemma azza.

A mes parents qui mon tout donné, à vous à qui ma principale préoccupation est de vous rendre aux centuples tous ce que vous m'avez offert.

A mes frères et sœur que je prends toujours en exemple.

Koceila

Liste des abréviations

ABC : ATP-binding cassette.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ARN : Acide ribonucléique.

ATCC : American Type Culture Collection.

ATP : Adénosine triphosphate.

BMSR : Réacteur à boue Bio Métal.

CDF : Cation Diffusion Facilitators.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

EDDS : Ethylene diamine disuccinate.

EDTA : Ethylene diamine tetra acetic acid.

ENIEM : Entreprise Nationale des Industries de l'Electroménager.

EPS : Exopolysaccharides.

ETM : Elément trace métallique.

LB : Lysogeny Broth ou Luria Broth (Luria Bertani).

MFP : Membrane Fusion Protein.

OMF : Outer Membrane Factor.

PMA : Phénylméthylmercure.

QS : Quorum sensing.

RN2 : Rapi nitrites 1.

RN2 : Rapi nitrites 2.

RND : Resistance-Nodulation-cell Division.

SAA : Spectromètre d'absorption atomique.

TCE : TriChloroEthylène.

VP1 : Réactif de Voges Proskauer 1.

VP2 : Réactif de Voges Proskauer 2.

CFU : Colonie forming units (unité formant colonie).

Al₂(SO₄)₃ : Sulfates d'aluminium

K₂ Cr₂ O₇ : Dichromate de potassium

Zn SO₄ : Sulfates de zinc

Cu SO₄ : Sulfates de cuivre

Index des tableaux

Numéro du tableau	Titre du tableau	page
Tableau I	Principales sources anthropiques de pollution des sols par les métaux lourds les plus fréquents	4
Tableau II	Temps de demi-vie biologique de quelques éléments	6
Tableau III	Les quantités maximales et minimales des métaux lourds en mg/kg dans un sol non pollué	12
Tableau IV	Fonctions biologiques de quelques métaux de transition	17
Tableau V	Capacité de biosorption des éléments traces métalliques (ETMs) par les EPS bactériennes.	34
Tableau VI	Les plantes les plus intéressantes en phytoremédiation recensées dans la base de données PHYTOREM	38
Tableau VII	Les souches microbiennes utilisées	43
Tableau VIII	Les antibiotiques et l'antifongique utilisés	43
Tableau IX	Gammes des concentrations des métaux utilisés pour tester la résistance des bactéries isolées.	55
Tableau X	Concentrations des métaux utilisés pour l'évaluation de la croissance des souches sélectionnées	56
Tableau XI	Résultats de l'examen macroscopique des souches isolées.	61
Tableau XII	Résultats de la coloration de Gram.	62
Tableau XIII	Résultats de la caractérisation biochimique des souches isolées.	64
Tableau XIV	Les concentrations minimales inhibitrices des métaux lourds vis-à-vis des souches testées (mg/ml).	66
Tableau XV	Activité antibactérienne des souches bactériennes isolées (diamètres des zones d'inhibition en mm) (n=2).	83
Tableau XVI	Résultats de l'antibiogramme des souches tests (diamètres des zones d'inhibition en mm).	84
Tableau XVII	Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne (moyenne \pm écart type) (n=2).	94

Index des figures

Numéro de la figure	Titre de la figure	Page
Figure 1	Structure de la géosmine, le principal produit chimique synthétisé par les actinomycètes et les cyanobactéries, qui donnent aux sols leur odeur caractéristique	15
Figure 2	Mécanisme modèle de fonctionnement des protéines RND	20
Figure 3	Modèle fonctionnel du complexe d'efflux <i>CusCBA</i>	20
Figure 4	Les systèmes <i>Pco/Cop</i> d' <i>E. coli</i> et <i>P. syringae</i>	22
Figure 5	Exemples de co-sélection de résistance	25
Figure 6	Représentation schématique du traitement d'eau polluée par des sels métalliques par précipitation	33
Figure 7	Stratégies de phytoremédiation des milieux pollués par les métaux lourds	36
Figure 8	Localisation géographique du site de prélèvement	44
Figure 9	Photos du lieu de l'échantillonnage	45
Figure 10	Schéma expérimental des dilutions métalliques au ½ dans du BHIB	54
Figure 11	Culture sur milieu gélose nutritive des souches isolées	59
Figure 12	Concentrations minimales inhibitrices des métaux en mg/ml	67
Figure 13	Détermination de la CMI du chrome en milieu liquide sur <i>Pseudomonas</i> sp. 1	67
Figure 14	Détermination de la CMI du chrome en milieu liquide pour <i>Bacillus</i> sp.	67
Figure 15	Détermination de la CMI du sulfate de zinc en milieu liquide pour <i>Pseudomonas</i> sp.3	68
Figure 16	Détermination de la CMI du sulfate d'aluminium en milieu liquide pour <i>Pseudomonas</i> sp.4	68
Figure 17	Détermination de la CMI du sulfate de cuivre en milieu liquide pour la souche 7	68
Figure 18	Croissance des souches bactérienne en différentes concentrations du dichromate de potassium	73

Figure 19	Croissance des souches bactériennes en différentes concentrations du sulfate de cuivre.	74
Figure 20	Croissance des souches bactérienne en différentes concentrations du sulfate d'aluminium	74
Figure 21	Croissance des souches bactériennes en différentes concentrations du sulfate de zinc	75
Figure 22	Effet inhibiteur de l'aluminium sur <i>Pseudomonas</i> sp.1 testé sur gélose Mueller Hinton	76
Figure 23	Effet inhibiteur du zinc sur la souche 7 testé sur gélose Mueller Hinton	76
Figure 24	Effet inhibiteur du chrome sur <i>Pseudomonas</i> sp.3 testé sur gélose Mueller Hinton	77
Figure 25	Effet inhibiteur du cuivre sur <i>Bacillus</i> sp. testé sur gélose Mueller Hinton	77
Figure 26	Croissance de <i>Pseudomonas</i> sp.1 en présence de sulfate de zinc	78
Figure 27	Croissance de <i>Pseudomonas</i> sp.3 en présence du dichromate de potassium	78
Figure 28	Croissance de <i>Pseudomonas</i> sp.4 en présence de sulfate d'aluminium	78
Figure 29	Croissance de la souche 7 en présence du dichromate de potassium	79
Figure 30	Croissance de <i>Bacillus</i> sp. en présence de sulfate de cuivre	79
Figure 31	Effet du sulfate de zinc sur la croissance de <i>Pseudomonas</i> sp.1	79
Figure 32	Effet du dichromate de potassium sur la croissance de <i>Pseudomonas</i> sp.3	80
Figure 33	Effet du dichromate de potassium sur la croissance de la souche 7	80
Figure 34	Effet du sulfate d'aluminium sur la croissance de <i>Pseudomonas</i> sp.4	81
Figure 35	Effet du sulfate de cuivre sur la croissance de <i>Bacillus</i> sp.	81
Figure 36	Témoins positifs réalisés avec l'oxytétracycline	84
Figure 37	Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition en (mm) exprimées par les isolats bactériens	85
Figure 38	Effet antagoniste des isolats bactériens contre <i>Escherichia coli</i> ATCC25922	86
Figure39	Effet antagoniste des isolats bactériens contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	87
Figure 40	Effet antagoniste des isolats bactériens contre <i>Staphylococcus aureus</i>	88
Figure 41	Effet antagoniste des isolats bactériens contre <i>S. aureus</i> ATCC43300	89
Figure 42	Effet antagoniste des isolats bactériens contre <i>Escherichia coli</i>	90
Figure 43	Effet antagoniste des isolats bactériens contre <i>Klebsiella pneumoniae</i>	91

Figure 44	Représentation graphique des diamètres des pourcentages d'inhibition des champignons testés exprimées par les isolats bactériens.	95
Figure 45	Témoin positif d' <i>Aspergillus niger</i> réalisé en présence de l'antifongique (Amphotéricine B)	96
Figure 46	Effet antagoniste des isolats bactériens contre <i>Aspergillus niger</i>	96
Figure 47	Effet antagoniste des isolats bactériens contre <i>Botrytis cinerea</i>	97
Figure 48	Effet antagoniste des isolats bactériens contre <i>Penicillium</i> sp.	98

SOMMAIRE

Sommaire

Liste des abréviations.

Index des tableaux.

Index des figures.

Sommaire

Introduction 1

Première partie : Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Les métaux lourds dans le sol

1- Définition des métaux lourds 3

2- Origine des pollutions 3

2-1- Origines naturelles 3

2-2- Origines anthropogènes 4

3- Paramètres influençant la biodisponibilité des métaux 5

4- Effet des métaux lourds sur le vivant 5

4-1- Exposition 5

4-2- Métaux lourds entre physiologie et toxicologie 6

5- Impact des métaux sur les micro-organismes du sol 8

5-1- Biomasse 8

5-2- Structure de la communauté microbienne (génétique et fonctionnelle) 9

5-3- Activité enzymatique 9

Chapitre 2 : Les microorganismes du sol

1- Définition du sol 10

2- Constituants du sol 10

2-1- Compartiment inerte 10

2-1-1- Phase gazeuse 10

2-1-2- Phase liquide 11

2-1-3- Phase solide	11
2-1-4- Eléments traces métalliques (ETMs).....	11
2-2- Le compartiment vivant.....	12
2-2-1- Les bactéries du sol	12
2-2-1-1- Bactéries photolithotrophes	13
2-2-1-2- Bactéries photoorganotrophes.....	13
2-2-1-3- Bactéries chimiolithotrophes	13
2-2-1-4- Bactéries chimioorganotrophes du sol	13

Chapitre 3 : Réactivité des bactéries vis-à-vis des métaux lourds

1- Interaction bactérie – métaux lourds.....	16
2- La résistance bactérienne aux métaux lourds.....	17
2-1- Support génétique de la métallos-résistance	17
2-2- Mécanismes de résistance.....	18
2-2-1- Résistance par intervention d'un efflux pompant	18
2-2-1-1- Les transporteurs primaires : ATPases de type P.....	18
2-2-1-2- Les transporteurs secondaires	19
2-2-1-2-1- Les systèmes Resistance-Nodulation-cell Division.....	19
2-2-1-2-2- Les systèmes Cation Diffusion Facilitators	21
2-2-2- La résistance par séquestration physique	21
2-2-3- La résistance par détoxification enzymatique	23
2-2-4- La résistance par synthèse de protéines liantes (Métallothionéines).....	23
3- Co-sélection de résistance aux antibiotiques et aux métaux	24
4- Antagonisme microbien	26

Chapitre 4 : Réhabilitation des sols pollués par les métaux lourds

1- La bioremédiation par les microorganismes	30
1-1- L'oxydation et la biolixiviation	30

1-2- La biominéralisation et la bioimmobilisation	31
1-3- Les exopolysaccharides et la bioremédiation	33
1-4- Exemple d'application en bioremédiation	35
1-4-1- Bactérie modèle : <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	35
2- Phytoremédiation	35
2-1- Phytostabilisation.....	37
2-2- Phytoextraction	37
2-2-1- Phytoextraction induite	37
2-2-2- Phytoextraction continue.....	37
2-3- Phytodégradation	38
2-4- Phytovolatilisation	39
3- Avantages et inconvénients de la bioremédiation.....	39

Deuxième partie : Partie expérimentale

Chapitre 1 : Matériel et méthodes

1- Matériel	41
1-1- Milieux de culture.....	41
1-2- Solutions et réactifs	41
1-3- Les Métaux lourds utilisés	42
1-4- Appareillage.....	42
1-5- Les souches microbiennes utilisées	43
1-6- Molécules de référence utilisées : antibiotique et antifongique	43
2- Méthode	44
2-1- Site d'échantillonnage et prélèvement.....	44
2-2- Isolement des souches bactériennes	46
2-2-1- Mise en suspension.....	46
2-2-2- Dilutions et ensemencement.....	46

2-2-3- Dénombrement de la microflore totale du sol	46
2-3- Purification et conservation des souches isolées	47
2-4- Identification des bactéries étudiées	47
2-4-1- Identification morphologique	47
2-4-1-1- Etude macroscopique	47
2-4-1-2- Etude microscopique.....	47
2-4-2- Identification biochimique	48
2-4-2-1- Etude du type respiratoire	48
2-4-2-1-1- Recherche enzymatique	48
2-4-2-1-1-1- Mise en évidence d'une respiration anaérobie	48
2-4-2-1-1-1-1- Recherche de la nitrate réductase.....	48
2-4-2-1-1-2- Mise en évidence de la respiration aérobie	49
2-4-2-1-1-2-1- Recherche de l'oxydase	49
2-4-2-1-1-2-2- Recherche de la catalase	49
2-4-2-2- Métabolisme glucidique.....	50
2-4-2-2-1- Milieu d'identification multiple.....	50
2-4-2-2-2- Caractères Mannitol-Mobilité.....	50
2-4-2-2-3- Test de l'ONPG pour rechercher la β -galactosidase	50
2-4-2-2-4- Etude du métabolisme fermentaire	51
2-4-2-2-5- Utilisation du citrate de sodium.....	51
2-4-2-3- Métabolisme protidique	52
2-4-2-3-1- Hydrolyse de la gélatine	52
2-4-2-3-2- Recherche de l'uréase, de la production d'indole et de la tryptophane désaminase... 52	
2-5- Détermination de la résistance aux métaux lourds	53
2-5-1- Ensemencement sur milieu liquide	54
2-5-2- Confirmation sur milieu solide.....	55

2-6- Suivre de l'évolution de croissance des souches	56
2-7- Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches sélectionnées	56
2-7-1- Préparation et standardisation des inoculums	56
2-7-2- Activité antibactérienne.....	57
2-7-3- Activité antifongique.....	57
2-7-3-1- Evaluation de la croissance mycélienne.....	58
2-8- Analyse statistique	58

Chapitre 2 : Résultats et discussion

1- Isolement et dénombrement de la microflore du sol pollué par les métaux lourds	59
1-1- Dénombrement de la microflore totale tellurique.....	59
2- Identification des souches isolées	60
2-1- Identification morphologique	60
2-1-1- Aspect macroscopique.....	60
2-1-2- Aspect microscopique	61
2-2- Identification biochimique.....	63
2- Résistance aux métaux lourds	65
2-1- Détermination de la concentration minimale inhibitrice des métaux	66
2-2- Confirmation sur milieu solide	76
3- Etude de l'influence des métaux sur la croissance des souches bactériennes.....	77
4- Recherche des activités antimicrobiennes	82
4-1- Activité antibactérienne	82
4-2- Activité antifongique	93
Conclusion.....	102

Références bibliographiques.

Annexes.

Résumé.

INTRODUCTION

Introduction

Actuellement, le développement durable prend de plus en plus de place dans les politiques de développement à l'échelle mondiale. Par conséquent, il est hautement incompatible avec un environnement pollué par des composés toxiques comme les métaux lourds.

Les métaux lourds, composés stables et hautement persistants, sont des contaminants de l'environnement qui peuvent être accumulés et transférés aux organismes supérieurs des réseaux trophiques, entraînant de sérieux problèmes écologiques et de santé publique (CROTEAU *et al.*, 2005 ; DE FOREST *et al.*, 2007).

Certains métaux sont souvent toxiques à faible concentration et les microorganismes sont les premiers organismes influencés par cette toxicité (GILLER *et al.*, 1998). Ces composés provoquent divers effets nuisibles tels que l'allongement de la phase de latence (MOROZZI *et al.*, 1982), l'inhibition des activités enzymatiques (NWEKE *et al.*, 2007), l'altération de la structure de l'ADN (BRUINS *et al.*, 2000 ; RATHNAYAKE *et al.*, 2009), la modification de la composition et de la structure des populations microbiennes (SATCHANSKA *et al.*, 2005) et la réduction de la diversité microbienne (SANDAA *et al.*, 1999). Du fait que les bactéries jouent un rôle clé dans l'environnement, les facteurs qui affectent donc leur diversité et leur activité peuvent menacer la fertilité des écosystèmes et par conséquent leur pérennité.

Pour faire face à la profusion des métaux lourds dans l'environnement, les bactéries ont élaboré plusieurs mécanismes qui leur permettent de persister et/ou de croître ; ces mécanismes étant dans plusieurs cas véhiculés par des plasmides (SILVER, 1996). Les plasmides qui codent pour la résistance aux métaux lourds peuvent aussi véhiculer des gènes codant pour la résistance aux antibiotiques (KARBASIZAED *et al.*, 2003). Ces caractères de résistance sont généralement associés à des plasmides transmissibles (GHOSH *et al.*, 2000 ; KARBASIZAED *et al.*, 2003 ; ÜNALDI *et al.*, 2005), donc leur dissémination nécessite une surveillance. La dissémination de la résistance aux métaux lourds représente un avantage écologique pour les bactéries spécialement dans les environnements pollués par les métaux lourds. Par contre, la prolifération des bactéries résistantes aux antibiotiques, directement à travers l'usage des antibiotiques ou indirectement via la sélection par la pollution métallique, présente un risque potentiel pour la santé publique en raison des échecs thérapeutiques.

Introduction

Le développement de techniques efficaces pour décontaminer les sites pollués est devenu indispensable. L'une d'elle est la bioremédiation exploitant les propriétés de certaines plantes à accumuler de grandes quantités de métaux lourds (la phytoremédiation) (RUFUS *et al.*, 1997 ; PRABHA *et al.*, 2007), et les propriétés de certains microorganismes à résister et à neutraliser les métaux lourds par biosorption. La mise en place et/ou l'optimisation de procédés de bioremédiation, nécessite l'isolement et la caractérisation de microorganismes à partir des milieux pollués dans le but d'envisager leur utilisation à des fins de biodépollution. Ces derniers sont aussi susceptibles d'exercer un effet antimicrobien.

Afin d'obtenir et de caractériser de telles communautés microbiennes et plus particulièrement bactériennes :

- Tout d'abord, nous avons isolé et identifié des souches bactériennes à partir de sol et de boues métalliques prélevés au niveau du site de l'ENIEM, Tizi-Ouzou.
- Ensuite, nous avons étudié la métallos-résistance et l'effet de quatre métaux à différentes concentrations sur la croissance des bactéries isolées.
- Enfin, nous avons réalisé un test d'antagonisme pour étudier le pouvoir inhibiteur des isolats bactériens sur quelques souches pathogènes.

PREMIERE PARTIE

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

LES METAUX LOURDS

DANS LE SOL

Synthèse bibliographique

1- Définition des métaux lourds

Le terme métaux lourds est un mot ambigu dont la définition varie d'une source à l'autre (BAKER et WALKER, 1990) ; il tend à être remplacé par la notion d'éléments-traces métalliques (ou ETM) (MIQUEL, 2001).

Jusqu'à présent il n'existe pas de définition générale, mais selon GADD (1992) et NIES (1999), les métaux lourds regroupent les 53 métaux dont la densité est supérieure à 5 g/cm³. Ils ont en commun les propriétés d'être cristallins à température ambiante ; à l'exception du mercure (Hg) qui est liquide, ductiles et malléables et surtout d'avoir une bonne, voire excellente conductivité thermique et électrique, ce qui explique leur utilisation dans de nombreuses industries notamment en métallurgie sous forme de divers alliages (HAMMI, 2010).

En fait, dans la plupart des cas beaucoup d'auteurs utilisent ce terme, à tort et à travers, pour caractériser l'ensemble des métaux et métalloïdes présentant un caractère toxique pour la santé et l'environnement. Le plomb (Pb), l'Hg, l'arsenic (As) et le cadmium (Cd) sont les plus souvent considérés comme toxique pour l'homme (NIES, 1999). D'autres comme le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le chrome (Cr) et le nickel (Ni), pourtant assimilés à des oligoéléments indispensables à l'état de trace pour de nombreux processus cellulaires, peuvent devenir toxiques à doses plus importantes (LOVLEY et LLOYD, 2000).

2- Origine des pollutions

Le problème majeur avec les métaux lourds comme le Pb, le Cd, le Cu et l'Hg est qu'ils ne peuvent pas être biodégradés, et donc persistent pendant de longues périodes dans l'environnement. Leur présence dans les sols peut être naturelle ou anthropogénique (ROBERT et JUSTE, 1999).

2-1- Origines naturelles

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). Ces métaux sont ensuite absorbés par les plantes via les cycles biogéochimiques ou bien par voies atmosphériques, puis les redéposent à la surface (feuilles mortes, décomposition des végétaux, etc.). Citons également la contribution des volcans (émissions

Synthèse bibliographique

d'As, Hg, Ni, Zn), feux de forêt (émission de Zn) etc. (ST-ONGE *et al.*, 2002 ; GELABERT *et al.*, 2006).

2-2- Origines anthropogènes

Les principales sources anthropiques de pollution des sols par les métaux lourds les plus fréquents sont résumées dans le tableau I. Elles sont en premier lieu liées aux activités de transformation primaire des métaux, c'est-à-dire aux industries d'extraction (mines) et de métallurgie (GELABERT *et al.*, 2006). La pollution atmosphérique est sous forme de poussières et d'aérosols issus des activités industrielles (rejets d'usines) et urbaines (gaz d'échappement ...) se déposant sur les sols, les végétaux et les eaux de surface (BAIZE, 1997).

Enfin, il faut signaler la part importante de la contamination d'origine agricole bien délimités : engrais, pesticides, boues de station d'épuration (contenant la plupart des métaux toxiques), etc. (ROBERT et JUSTE, 1999).

Tableau I : Principales sources anthropiques de pollution des sols par les métaux lourds les plus fréquents (HASHIDA *et al.*, 2002 ; LIU *et al.*, 2004).

Sources de pollution	Métaux
Batteries et autres appareils électriques	Cd, Hg, Pb, Zn, Mn, Ni,
Pigments et peintures	Ti, Cd, Hg, Pb, Zn, Mn, Sn, Cr, Al, As, Cu, Fe
Biocides (pesticides, herbicides)	As, Hg, Pb, Cu, Sn, Zn, Mn
Alliages et soudures	Cd, As, Pb, Zn, Mn, Sn, Ni, Cu
Verre	As, Sn, Mn
Engrais	Cd, Hg, Pb, Al, As, Cr, Cu, Mn, Ni, Zn
Produits dentaires et cosmétiques	Sn, Hg
Raffineries	Ni, V, Pb, Fe, Mn, Zn
Carburants	Ni, Hg, Cu, Fe, Mn, Pb, Cd
Matières plastiques	Cd, Sn, Pb

Synthèse bibliographique

3- 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).

4- Effet des métaux lourds sur le vivant

4-1- 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.

Synthèse bibliographique

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 II : Temps de demi-vie biologique de quelques éléments (WEBB *et al.*, 1997 ;
SALLE, 1999).

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

4-2- 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).

Synthèse bibliographique

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).

5- Impact des métaux sur les micro-organismes du sol

Le sol est un remarquable réservoir de microorganismes. WITHMAN *et al.* (1998) ont estimé à $2,6 \times 10^{29}$ le nombre total de cellules procaryotes vivant dans les sols. Différents types de microorganismes sont représentés dans le sol où ils jouent un rôle crucial dans les cycles biogéochimiques des éléments ; l'épuration biologique et donc le maintien de l'équilibre de cet écosystème (GADD, 2009). En moyenne, on compte 10^7 bactéries, 10^5 champignons et protozoaires et 10^4 algues par gramme de sol sec (ROBERT et CHENU, 1992). Ce point est plus détaillé dans le chapitre suivant.

Les bactéries sont en effet les acteurs principaux des grands processus de transformation de la matière et des flux d'énergie dans le sol. Leur diversité métabolique couplée à leur imposante biomasse fait qu'elles sont capables de métaboliser tous les composés naturels disponibles mais aussi la majorité des composés d'origine anthropique présents dans le sol, après un délai nécessaire à la mise en place des voies métaboliques (TORSVIK et OVREÅ, 2002).

Il est généralement admis que les microorganismes sont plus sensibles aux métaux lourds que les plantes ou les animaux vivant dans les sols pollués (GILLER *et al.*, 1998). Les impacts des métaux lourds sur les communautés microbiennes peuvent être abordés de diverses façons : la densité (colonie forming units (CFU)), la taille, la structure des communautés (génétique et fonctionnelle) et également l'activité enzymatique.

5-1- Biomasse

Le stress par les métaux lourds entraîne des modifications plus ou moins drastiques dans les populations microbiennes telluriques. Leurs effets de dénaturation des protéines ou de destruction de l'intégrité de la membrane cellulaire affectent la croissance, la morphologie et le métabolisme de ces microorganismes et évidemment leur biomasse (LEITA *et al.*, 1995). De nombreuses études montrent que la biomasse bactérienne d'un sol a tendance à diminuer suite à une contamination par un métal (KANDELER *et al.*, 1996 ; KUPERMAN et CARREIRO, 1997 ; SMITH *et al.*, 1997 ; BÅÅTH *et al.*, 1998 ; KELLY *et al.*, 1999 ; KONOPKA *et al.*, 1999 ; EKALUND *et al.*, 2003). Les expérimentations de SANDAA *et al.* (1999) ont montré qu'il y a une corrélation entre la diminution du nombre des génomes bactériens et les niveaux de concentration en métaux lourds.

5-2- Structure de la communauté microbienne (génétique et fonctionnelle)

Les études de l'impact de métaux lourds sur la diversité de la communauté bactérienne dans le sol ont montré surtout une influence négative (HIRSCH *et al.*, 1993 ; SANDAA *et al.*, 2001 ; MOFFETT *et al.*, 2003 ; HINOJOSA *et al.*, 2005). Les bactéries et les champignons isolés à partir de sols pollués sont plus tolérants à une forte contamination par les métaux lourds que ceux des sols non pollués (DOELMAN *et al.*, 1994 ; HUYSMAN *et al.*, 1994 ; MERTENS *et al.*, 2006). L'ajout de métaux lourds entraîne donc la disparition des populations les plus sensibles et subséquentement l'adaptation des populations les plus résistantes. Ainsi, les équilibres peuvent basculer et les dominances s'inverser (DIAZ-ROVINA et BÅÅTH, 1996). Il a été montré que les modifications des communautés suite à la présence du Cu pouvaient entraîner une augmentation de la proportion relative des bactéries Gram négatifs (Protéobactéries) (TURPEINEN *et al.*, 2004) ou au contraire des Gram positifs (Firmicutes) (EKALUND *et al.*, 2003).

5-3- Activité enzymatique

L'effet néfaste des métaux lourds sur les activités enzymatiques du sol a souvent été souligné (HAANSTRA et DOELMAN, 1991; HATTORI, 1992; KUPERMAN et CARREIRO, 1997; LANDI *et al.*, 2000; RENELLA *et al.*, 2003). Par exemple, il a été montré que l'activité déshydrogénase était réduite lors d'une contamination par un métal (KELLY et TATE, 1998 ; KELLY *et al.*, 1999). Cet effet, parfois sévère, peut aller jusqu'à une réduction de 95% de l'activité (KELLY *et al.*, 1999). L'activité déshydrogénase étant corrélée à l'activité respiratoire du sol, une telle réduction peut avoir des répercussions néfastes significatives sur l'ensemble de l'écosystème du sol, avec une réduction de la décomposition de la matière organique et la perturbation des grands cycles des éléments (KELLY *et al.*, 1999).

CHAPITRE II

LES

MICROORGANISMES DU

LE SOL

Synthèse bibliographique

Le développement d'approches moléculaires a permis, ces dix dernières années, d'accroître considérablement les connaissances de la biodiversité bactérienne. À l'heure actuelle, plus de 815 000 séquences de gènes d'ARN ribosomiaux 16S sont répertoriées et environ 45 000 espèces cultivables sont recensées. Dans un gramme de sol, on peut dénombrer en moyenne un milliard de cellules, correspondant à plusieurs milliers d'espèces différentes.

1- Définition du sol

Le sol est défini comme la couche supérieure de la croûte terrestre composée de particules minérales, de matières organiques, d'eau, d'air et d'organismes. En raison de sa position d'interface de l'environnement, il joue un rôle déterminant dans le devenir des polluants par le ruissellement, l'érosion, l'infiltration, etc. (NF ISO 15799,2004).

2- Constituants du sol

2-1- Compartiment inerte

Le sol est un milieu poreux où se déroulent de nombreux processus physiques, chimiques et biologiques. C'est un système multicomposant ouvert formé par trois phases : solide, liquide et gazeuse. Comme tout système ouvert, il subit un nombre important d'échange de matière et d'énergie avec l'atmosphère, la biosphère et l'hydrosphère. Les sols sont également considérés comme des milieux chimiquement réactifs où toutes les phases sont en équilibre (MOREL, 1989).

2-1-1- Phase gazeuse

La phase gazeuse du sol est constituée par les mêmes éléments que l'air atmosphérique, mais à cause de l'activité biologique, les teneurs de chaque composant peuvent changer considérablement. Sa composition dépend elle-même de la profondeur.

A la surface, l'oxygène et le dioxyde de carbone jouent un rôle important. Le dioxyde de carbone, produit par photosynthèse, a une influence significative sur l'acidité du sol ainsi que la chimie des carbonates ; l'oxygène assure les conditions aérobies et a une influence sur la mobilité des polluants dans le sol. Dans les profondeurs plus importantes, où le taux d'oxygène est très faible (conditions anaérobies), les microorganismes produisent des gaz comme NO, N₂O, NH₃, CH₄, H₂S. Ces gaz sont soit à l'état libre, soit dissous dans la solution des sols (BRADY, 1984).

Synthèse bibliographique

2-1-2- Phase liquide

La phase liquide du sol est principalement constituée d'eau, dans laquelle sont présent les ions minéraux et des molécules organiques, et qui varie dans sa composition et sa mobilité. Sa composition dépend essentiellement du milieu géologique avec lequel elle est en contact, mais également de la composition de l'eau de pluie et de l'eau de surface. La minéralisation des roches est plus effective en présence de dioxyde de carbone ou d'acides minéraux. Cela permet, par exemple, la transformation des carbonates qui sont peu solubles en bicarbonates très solubles. Dans ce cas, l'eau s'enrichit de plusieurs cations comme Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ et anions HCO_3^- , NO_3^- (CAILLERE *et al.*, 1982).

Du point de vue de la réactivité chimique et biologique, le pH de l'eau du sol est une des principales propriétés. Il détermine l'acidité ou la basicité du sol. CHAMAYOU et LEGROS (1989) ont souligné que la valeur du pH est fondamentalement donnée par l'équilibre des carbonates et varie le plus souvent entre 5,5 et 7,5.

2-1-3- Phase solide

La phase solide représente entre un demi et deux tiers du volume du sol. En générale, 90% du solide est formé par des composants inorganiques. L'une des exceptions sont les sols tourbes qui contiennent plus de 40% de matières organique. Les deux principaux éléments composant les sols sont : l'oxygène et la silice. Du point de vue minéralogique les constituants solides du sol peuvent être classés en deux groupes : Les minéraux primaires et les minéraux secondaires. Les minéraux primaires sont les silicates qui apparaissent dans les sols par désintégration physique des roches avec comme représentants dominants les minéraux sableux. Les minéraux secondaires sont le résultat de l'altération des silicates primaires. Les principaux représentants de minéraux secondaire sont les minéraux argileux, les oxydes et hydroxydes et les carbonates (DUCHAUFOR, 1984).

2-1-4- Eléments traces métalliques (ETMs)

Les ETMs présents dans les sols peuvent être classés dans deux groupes : les fonds géochimiques et les apports anthropiques.

Naturellement, le sol contient des ETMs issus de la roche mère à partir de laquelle ils se sont formés, ou bien par des apports sédimentaires (Tableau III). Les sols formés sur des sables quartzeux contiennent des quantités d'ETMs extrêmement faibles, alors que ceux qui

Synthèse bibliographique

sont formés sur des sédiments calcaires ou marneux, ou des schistes, ont des concentrations en ETMs plus importantes (SPOSITO, 1989).

Tableau III : Les quantités maximales et minimales des métaux lourds en mg/kg dans un sol non pollué (DRAGOVIC *et al.*, 2008).

Les métaux lourds en mg/kg	Minimum (Min)	Maximum (max)
Cadmium (Cd)	0,01	3,6
Chrome (Cr)	0,01	260
Cuivre (Cu)	4,3	13,4
Manganèse (Mn)	206	1742
Nickel (Ni)	3,4	771
Plomb (Pb)	1,2	71,5
Zinc (Zn)	6,6	40,3

La quantité d'ETMs issue des apports anthropiques est également très importante d'après ROBERT et JUSTE (1999), la principale source d'ETMs dans les zones urbaines est l'activité industrielle et les différents moyens de transport.

La compréhension des mécanismes impliqués dans le devenir des métaux au cours de leur transfert dans les sols revêt un triple intérêt : évaluer leur impact sanitaire et économique sur le long terme (perte de surfaces agricoles, dépollution des sols), prévoir les risques de pollution des nappes et eaux de surface (biodisponibilité et lessivage des métaux dans les sols) et concevoir des techniques de dépollution appropriées (MARTIN et RUBY, 2004 ; GUINEE *et al.*, 2006).

2-2- Le compartiment vivant

2-2-1- Les bactéries du sol

Les Bactéries à Gram positif et à Gram négatif, parfois appelées Eubactéries ou Bactéries proprement dites, sont les plus largement répandues dans le sol. En voici quelques exemples (SPOSITO, 1989) :

Synthèse bibliographique

2-2-1-1- Bactéries photolithotrophes

-Bactéries vertes : Chlorobactériacées.

-Bactéries pourpres : Thiortiodacées.

Anaérobies strictes, elles oxydent le sulfure d'hydrogène en soufre en présence de radiations rouges ou infra-rouges et ne produisent pas d'oxygène :



2-2-1-2- Bactéries photoorganotrophes

-Bactéries pourpres non soufrées : Athiorhodacées.

2-2-1-3- Bactéries chimolithotrophes

-Bactéries nitrifiantes : $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$ *Nitrosomonas*
 $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ *Nitrobacter*

-Bactéries acidifiantes du cycle du soufre : *Thiobacillus*

-Bactéries oxydant le fer et le manganèse : *Galionella*, *Leptothrix*.

Toutes ces Bactéries sont aérobies et jouent un rôle important dans les cycles minéraux.

2-2-1-4- Bactéries chimioorganotrophes du sol

- **Bactéries mobiles sans flagelle (*Myxobactéries*)**

Leur paroi souple leur permet de se déplacer par glissement. Ce sont d'actifs destructeurs de la matière organique. Elles produisent des mucus pigmentés. Bactéries cellulolytiques : *Cytophaga*.

- **Coques et bacilles à Gram-négatif aérobies**

- Pseudomonadacées, à flagelles polaires : *Pseudomonas*

- Azotobactéracées, à cils péritriches ou polaires. Elles sont capables de fixer l'azote de l'air : *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Azospirillum*

- Rhizobiacées, à flagelles polaires ou subpolaires : *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*, capables de fixer l'azote atmosphérique lorsqu'ils vivent en symbiose avec des légumineuses ; *Agrobacterium*, producteurs de galles ou de proliférations racinaires.

Synthèse bibliographique

- **Bacilles à Gram-négatif anaérobies facultatifs**

- Entérobactériacées, mobiles par cils péritriches; peuvent réduire les nitrates en nitrites: *Erwinia*, parasites de plantes.

- **Bacilles à Gram-négatif anaérobies**

- *Desulfovibrio*: réduit les sulfates en sulfures.

- **Coques et bacilles à Gram-positifs sporogènes**

- Bacillacées : *Bacillus* (aérobies), *Clostridium* (anaérobies strictes) et *Thermoactinomyces*.

Ils peuvent former des endospores.

- **Bactéries corynéformes**

Bactéries à Gram-positif de formes variées :

- Corynébactériacées :
Clavibacter, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Rhodococcus fascians* ; parasites de plantes, *Cellulomonas* ; dégradant la cellulose, *Arthrobacter* ; souvent impliqués dans la dégradation de produits organiques d'origine industrielle.

- **Actinomycètes**

Ces Bactéries à Gram positif forment des filaments ramifiés et émettent des conidies, ce qui les a fait longtemps considérer comme des Champignons. Elles jouent un rôle actif dans la décomposition des litières. Beaucoup d'entre elles synthétisent des antibiotiques :

- **Actinomycétacées** : *Actinomyces*, produisant peu de mycélium. Elles synthétisent la géosmine ; molécule qui donne au sol son odeur si caractéristique (Figure 1).
- **Streptomycétacées** : *Streptomyces*, morphologiquement très proches des Champignons;
- **Micromonosporacées** : *Micromonospora*, dégradant la cellulose et la chitine ;
- **Frankiacées** : *Frankia*, ces bactéries vivent en symbiose avec des arbres appartenant à plusieurs familles botaniques tropicales (Casuarinacées) et tempérées (Bétulacées, Eléagnacées, Rhamnacées). Elles forment des nodosités sur les racines et sont capables de fixer l'azote atmosphérique.

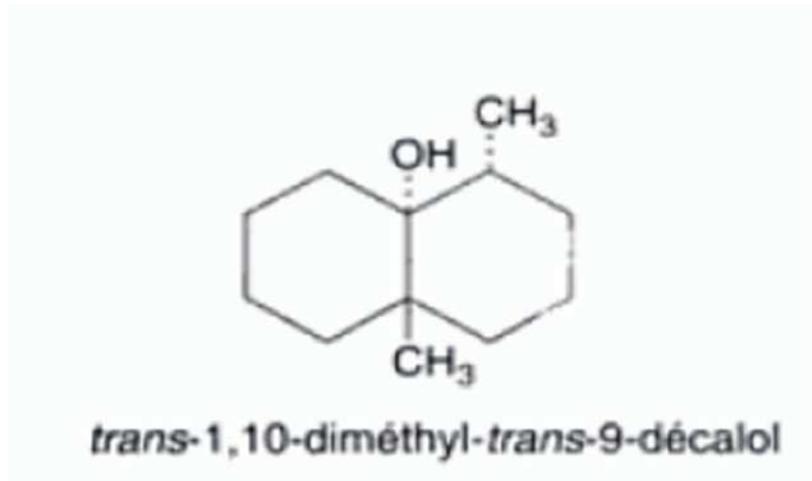


Figure 1: Structure de la géosmine, le principal produit chimique synthétisé par les actinomycètes et les cyanobactéries, qui donne aux sols leur odeur caractéristique (PRESCOTT *et al.*, 2003).

CHAPITRE III

REACTIVITE DES

BACTERIES VIS-A-VIS

DES METAUX LOURDS

Synthèse bibliographique

1- Interaction bactérie – métaux lourds

L'interaction bactéries-métaux lourds a été surtout étudiée dans les environnements extrêmes. La nature des interactions dépend du rôle biologique du métal dans la cellule (MONCHY, 2007). Certains métaux sont des cofacteurs indispensables à la bactérie pour le fonctionnement de ses enzymes mais ils deviennent toxiques à forte concentration (LOVLEY et LLOYD, 2000). Par exemple, le Zn est un cofacteur des ADN polymérases (MOFFETT *et al.*, 2003) et le Ni est nécessaire à certaines uréases (DOSANJH *et al.*, 2007) et même le Cd a été trouvé chez l'anhydrase carbonique des algues (NIES, 2013). Les fonctions biologiques de quelques métaux sont résumées dans le tableau IV. La grande variété d'éléments traces métalliques (ETMs) et de leurs effets biologiques nécessite chez la bactérie une régulation fine pour le contrôle de leur concentration intracellulaire (homéostasie) (NIES, 1999).

Cette régulation évite l'expulsion des métaux essentiels présents aux concentrations homéostatiques, ou l'entrée de métaux en quantité toxique. Les ETMs entrent dans la cellule bactérienne par deux voies distinctes :

1- La première, apparentée par une large gamme de substrats (Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , etc.), est rapide, indépendante du métal, fait intervenir des porines exprimées de manière constitutive et dépend uniquement d'un gradient chimiosmotique au travers des membranes bactériennes (HABI, 2007).

2- La seconde, spécifique et plus lente, requiert une consommation d'énergie souvent sous la forme d'hydrolyse et de l'ATP (MONCHY, 2007). Elle consiste en une internalisation à travers des transporteurs dont la synthèse et l'activation sont contrôlées au niveau génétique via divers systèmes de gènes (les transporteurs ABC (ATP-binding cassette) spécifiques du Zn^{2+} , Ni^{2+} , etc.) (GATTI *et al.* 2000). Selon NIES et SILVER (1995), ces systèmes sont inductibles en réponse à des besoins particuliers tels une carence à un élément trace.

Synthèse bibliographique

Tableau IV : Fonctions biologiques de quelques métaux de transition (PELMONT, 2005).

Eléments	Fonctions
Co	Oxydase ; transfert de groupement alkyle
Cr	Oxydase ; transfert d'oxygène ; transfert d'électrons
Cu	Oxydase ; transfert d'oxygène ; transfert d'électrons
Fe	Oxydase ; transport et stockage d'oxygène ; transfert d'électrons
Mn	Oxydase ; photosynthèse ; structure
Mo	Oxydase ; fixation d'azote; transfert d'oxygène
Ni	Hydrolase ; hydrogénase
Zn	Hydrolase ; Structure

Les bactéries peuvent également interagir avec les ETMs par la transformation de ces derniers via des processus d'oxydation/réduction ou d'alkylation ce qui modifie la toxicité et la mobilité du métal d'origine (biotransformation) ou encore par changement de phase comme dans le cas du mercure (volatilisation) (GUINÉ, 2006). BHASKAR et BHOSLE (2006) ont aussi observé l'implication de substances polymériques extracellulaires (EPS) produites par des microorganismes en milieu naturel ou artificiel. Ces EPS (composés de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques, de phospholipides, etc.) jouent un rôle important dans l'adhésion ; la formation d'agrégats cellulaires (biofilms) et protègent les cellules des agressions du milieu. Par ailleurs, il a été montré que les EPS, par leurs caractéristiques chimiques, sont potentiellement fixatrices de métaux (PAL et PAUL, 2008).

Enfin les bactéries peuvent, de manière indirecte, influencer la mobilité des métaux par des modifications physicochimiques du milieu comme par exemple la modification du potentiel redox, du pH, etc. (GUINÉ, 2006).

2- La résistance bactérienne aux métaux lourds

2-1- Support génétique de la métallo-résistance

Certains microorganismes ont su répondre au cours du temps à la toxicité des métaux lourds en devenant tolérants ou résistants à ces derniers. Ils sont ainsi devenus capables de survivre dans des milieux hautement pollués (GADD 1992). GADD (1992) a défini la tolérance comme la capacité de faire face à la toxicité des métaux au moyen des propriétés intrinsèques aux organismes. En parallèle, il décrit la résistance comme la capacité à survivre

Synthèse bibliographique

aux métaux toxiques par des mécanismes de détoxification en réponse directe à la présence de métaux dans l'environnement.

Les déterminants génétiques impliqués dans ces mécanismes sont soit présents dans le génome de la bactérie, on parle alors de résistance intrinsèque (ou naturelle) (LOZNIEWSKI et RABAUD, 2010); soit acquis suite à un transfert horizontal (via des plasmides, des transposons et tout élément mobile) ou une mutation sélectionnés sous l'effet d'une pression de sélection, on parle alors de résistance acquise (LIVERMORE, 2003).

2-2- Mécanismes de résistance

Les principaux mécanismes de résistance les plus étudiés sont :

- La résistance par intervention d'un efflux pompant ;
- La résistance par séquestration physique ;
- La résistance par détoxification enzymatique ;
- La résistance par synthèse de protéines liantes.

(SILVER et PHUNG, 1996; KIEFER, 2000; WORMS *et al.*, 2006; HAFERBURG et KOTHE, 2007).

2-2-1- Résistance par intervention d'un efflux pompant

Ce mécanisme consiste à expulser les ions toxiques qui sont entrés dans la cellule par le moyen de transport des cations divalents et des ions nutritifs (KIEFER, 2000). Les pompes à efflux les plus connues des systèmes de résistance sont codées par des gènes plasmidiques très spécifiques. Ce transport actif est principalement assuré par des transporteurs primaires et secondaires. Pour les premiers, le transport est directement couplé à l'hydrolyse de l'ATP (ATPases). Pour les seconds, le passage au travers de la membrane se fait grâce à un gradient électrochimique (systèmes RND et CDF) (SILVER et PHUNG, 1996).

2-2-1-1- Les transporteurs primaires : ATPases de type P

Les ATPases de type P forment une grande famille de transporteurs actifs dont l'énergie provient de l'hydrolyse de l'ATP. Ce type de protéine se retrouve chez tous les organismes vivant (MONCHY, 2007). Il entre dans cette catégorie les Zn-CPx-type ATPases impliquées dans le transport de Zn, Cd et le Pb principalement du cytoplasme vers le milieu extérieur ou

Synthèse bibliographique

le périplasme. La première protéine décrite fut CadA, qui est impliquée dans l'efflux de Cd^{2+} , découverte chez *Staphylococcus aureus* (NIES, 2003).

Chez *E. coli*, la protéine CopA est l'ATPase à Cu^{2+} (RENSING et GRASS, 2003). Cet ion est souvent complexé à des protéines chaperonnes durant son transit à travers le cytoplasme, de manière à ne jamais libérer l'ion (CAVET *et al.*, 2003).

La résistance à l'Ag est également due à l'extrusion de celui-ci via une ATPase codée par le gène *SilP* (GUPTA *et al.*, 1999).

2-2-1-2- Les transporteurs secondaires

2-2-1-2-1- Les systèmes Resistance-Nodulation-cell Division

Les protéines de la famille « Resistance-Nodulation-cell Division » (RND) dont la première découverte fut la protéine *CzcCBA* de la bactérie *C. metallidurans* (SAIER *et al.*, 1994) chez laquelle le plasmide pMOL30 permet la résistance au Co, Zn et Cd (*czc*). De même pour la protéine permettant la résistance au Co et Ni (*cnr*) porté par le plasmide pMOL28 (SCHMIDT et SCHLEGEL, 1994 ; SILVER, 1996).

Les protéines *CzcA*, *CzcB* et *CzcC* sont essentielles pour la résistance et forment au travers des deux membranes un complexe de rejet cationique qui agit comme un antiport cation-proton (NIES, 1995). *CzcA*, appartenant à la famille des pompes RND, assure l'antiport cation proton. *CzcB* (de la famille des MFP : Membrane Fusion Protein), assure le lien entre *CzcA*, dans la membrane interne et la protéine canal *CzcC* (de la famille OMF : Outer Membrane Factor), insérée dans la membrane externe (GOLDBERG *et al.*, 1999; RENSING *et al.*, 1997). Ce mécanisme est représenté dans la figure 2.

L'expression des systèmes RND est souvent régulée par un système senseur/régulateur (dit à deux composants). Lorsque le senseur lie un ion métallique pour lequel il a une affinité suffisante, il change de conformation, et peut phosphoryler le régulateur afin de l'activer. Le régulateur active la transcription des gènes de l'opéron qui codent pour les trois composants du système d'extrusion (DIELS *et al.*, 1995).

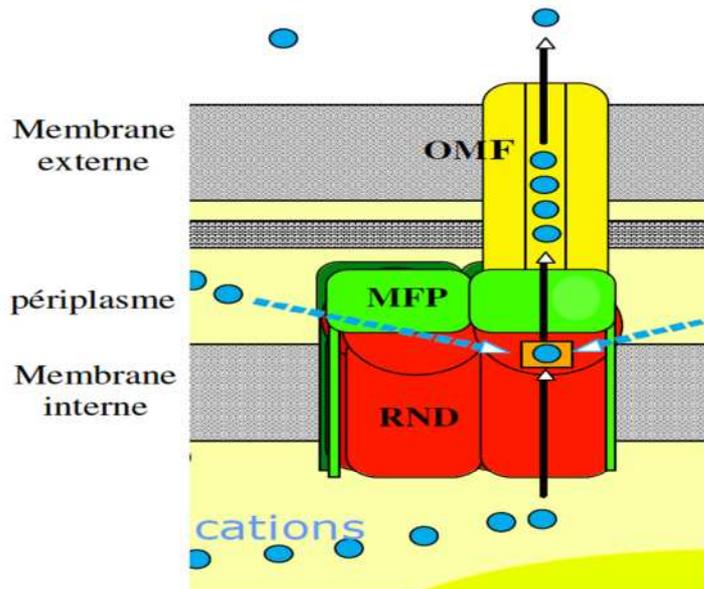


Figure 2 : Mécanisme modèle de fonctionnement des protéines RND (NIES, 2003).

Chez *Salmonella typhimurium*, le même système est utilisé pour expulser les ions d'argent (Ag) hors de la cellule. L'opéron *SilCBA* porte les gènes qui codent pour les protéines en questions (GUPTA *et al.*, 1999).

CusCBA, très similaire à *SilCBA*, est l'opéron qui confère la résistance aux cations Cu chez *E. coli* (Figure 3) (FRANKE *et al.*, 2003). La petite protéine *CusF*, localisée dans le périplasme, serait un chaperon périplasmique qui présenterait le Cu^+ à ce système d'extrusion.

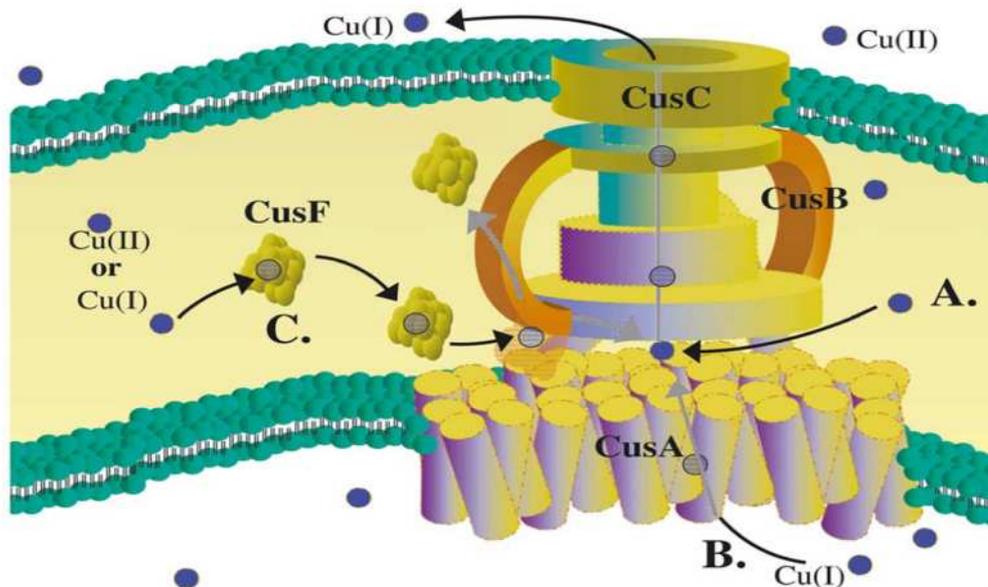


Figure 3 : Modèle fonctionnel du complexe d'efflux *CusCBA* (RENSING et GRASS, 2003).

2-2-1-2-2- Les systèmes Cation Diffusion Facilitators

Les protéines « Cation Diffusion Facilitators » (CDF) forment une famille de transporteurs de métaux présents dans tous les règnes vivants. Elles sont constituées de systèmes composés d'une seule protéine formant un canal emprunté par les ions pour sortir de la cellule par simple diffusion. Les principaux substrats sont le Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} et le Fe^{2+} . Leur transport se fait grâce à un gradient chimiosmotique (une différence de potentiel ou de pH) ou un gradient de potassium (NIES, 2003).

L'archétype de cette famille est la protéine *CzcD* chez *C. metallidurans* CH34 capable de réguler l'expression de *CzcCBA* et de permettre la résistance aux ions Zn^{2+} , Co^{2+} et Cd^{2+} en l'absence du système *CzcCBA* (NIES, 1992). La protéine *CzcD* de *Bacillus subtilis* qui appartient à cette famille agit comme un antiport Zn^{+2} / K^{+} ou Zn^{+2} / H^{+} (GUFFANTI *et al.*, 2002). Une des deux protéines CDF d'*E. coli*, *ZitB*, a été caractérisée également en tant que système de résistance au zinc (GRASS et RENSING, 2001). Elle diminue la concentration cellulaire en Zn^{2+} grâce à un gradient de potassium et la force motrice des protons.

Il existe deux autres familles de transporteurs chimiosmotiques plus spécifiques, l'un est impliqué dans l'extrusion du Chromate (ChrA) (JUHNKE *et al.*, 2002 ; SILVER et PHUNG, 2005), l'autre dans l'extrusion de l'Arsénite As(III) (ArsB) (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2002 ; SILVER et PHUNG, 2005). Ces systèmes sont uniques dans le sens où ils peuvent fonctionner aussi bien seuls comme un système d'extrusion chimiosmotique ou en combinaison avec une autre sous-unité nécessitant de l'énergie sous la forme d'ATP (tel que ArsA).

2-2-2- La résistance par séquestration physique

La séquestration peut agir comme première ligne de défense pour immobiliser rapidement les métaux et éviter leurs effets toxiques. Elle peut intervenir également en complément d'autres mécanismes de résistance (tels que les mécanismes d'efflux) évitant la réentrée du métal expulsé, en particulier dans les situations extrêmes (MONCHY, 2007).

Chez les bactéries à Gram négatif la séquestration dans un compartiment de la cellule ou la biosorption à la surface de la membrane externe s'effectue souvent en combinaison avec d'autres systèmes et nécessite parfois des protéines à hautes affinités pour les ions métalliques telles que la métallothionéine SmtA (BLINDAUER *et al.*, 2002), les sidérophores dont

Synthèse bibliographique

certaines ont une forte affinité pour les métaux lourds, même si elle reste inférieure à celle observée pour le fer, les chalkophores qui sont des ‘sidérophore à cuivre’ (CHOI *et al.* 2006).

La séquestration peut aussi se faire sous forme de cristaux (biominéralisation) lié à une alcalinisation du milieu résultant de l'activité cellulaire, et à la formation de carbonates à la surface cellulaire qui, lorsqu'il y a sursaturation, cristallisent avec les ions métalliques présents. Les cristaux formés peuvent s'adsorber de manière non spécifique sur la paroi extracellulaire (DIELS *et al.*, 1995 ; PODDA *et al.*, 2000).

Chez *Pseudomonas* et *E. coli* par exemple, l'accumulation de l'excès de cuivre dans l'espace périplasmique protège les bactéries de ce métal (SILVER et GANGYONG, 1994). Ce type de résistance est assuré par le système *Pco/Cop* chez *E. coli/Pseudomonas syringaerespectivement*. Il est gouverné par quatre gènes structuraux nommés *PcoA/CopA*, *PcoB/ CopB*, *PcoC/CopC* et *PcoD/CopD* et deux gènes régulateurs *PcoR/Cop R* et *PcoS/copS*(BROWN *et al.*, 1995). Le gène *pcoE*est transcrit à partir d'un autre promoteur également sous le contrôle de *PcoRS* (ROUCH et BROWN, 1997). Les deux promoteurs sont toutefois également induits par le Cu en l'absence du système de régulation *PcoRS*grâce au système *CusRS* nécessaire à l'expression du système d'efflux *CusCFBA*(MUNSON *et al.*, 2000 ; FRANKE *et al.*, 2003). La capacité de ces protéines à lier le Cu dans le périplasma, empêche ce dernier de pénétrer dans le cytoplasme de la bactérie (LEE *et al.*, 2002). Ce système est illustré dans la figure 4.

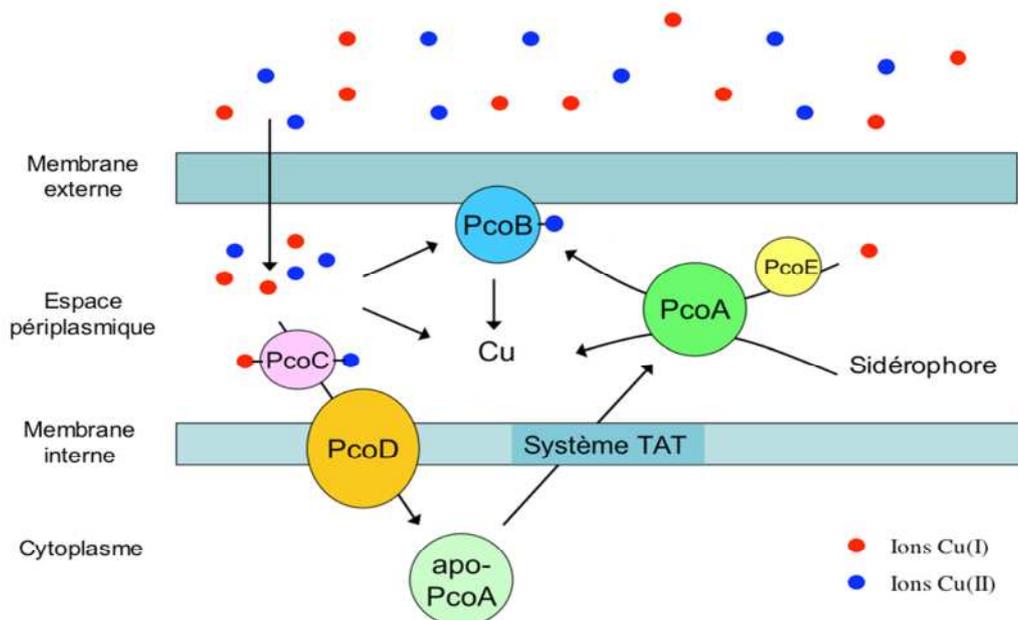


Figure 4 : Les systèmes *Pco/Cop* d'*E. coli* et *P. syringae* (MAGNANI et SOLIOZ, 2007).

2-2-3- La résistance par détoxification enzymatique

La conversion enzymatique consiste à convertir le métal en une forme moins toxique ou en une autre forme qui peut être plus facilement et plus rapidement évacuée de la cellule. Cette transformation peut se faire par voie enzymatique, par oxydation ou réduction comme pour le mercure (SUMMERS, 1995), ou encore après réaction avec un produit du métabolisme énergétique de la cellule comme la réduction du sélénium par les produits soufrés tel que les thiosulfates ou les sulfites (SARRET *et al.*, 2005). La résistance au mercure est la plus étudiée des résistances aux métaux lourds dans le monde bactérien (LIEBERT *et al.*, 1999 ; SILVER et PHUNG, 2005).

Un mécanisme complexe de résistance, bien conservé chez les bactéries est codé en majorité par des gènes portés par des éléments génétiques mobiles (SILVER et PHUNG, 1996). Il consiste en la captation des ions Hg^{2+} via la protéine périplasmique MerP et leur transport dans la cellule par la protéine MerT qui forme un canal dans la membrane interne (HOBMAN et BROWN, 1997). Ensuite, la réductase MerA, réduit, dans le cytoplasme, l'ion Hg^{2+} en Hg non toxique et qui se volatilise hors de la cellule. MerB clive les liaisons C- Hg^{2+} des composés organomercuriques afin de libérer Hg^{2+} qui sera alors réduit par la protéine MerA en Hg (MISRA, 1992).

2-2-4- La résistance par synthèse de protéines liantes (Métallothionéines)

Les métallothionéines sont des protéines fixatrices de cations métalliques divalents (Zn, Cd), riches en cystéines et homologues à celles des mammifères (KIEFER, 2000). Elles ont été largement isolées des levures, d'algues et des champignons (SILVER et PHUNG, 1996). Des études plus approfondies ont été faites sur les métallothionéines de *Cyanobacterium synecchococcus*. Il s'agit de petits polypeptides de 56 acides aminés codés par un gène appelé *smtA*.

Ces protéines liantes sont impliquées dans l'accumulation et la détoxification du métal. Au fait elles jouent une double fonction, elles offrent d'abord une protection contre le Zn et divers métaux en excès. Ensuite, elles assurent le stockage des métaux essentiels afin de constituer un réservoir où la cellule peut puiser à la demande. Leur synthèse est donc inductible en cas de stress (présence de concentration métallique élevée) et le taux est ajusté de manière précise au cours du développement (PELMONT, 2005).

3- Co-sélection de résistance aux antibiotiques et aux métaux

Il est aujourd'hui admis que l'utilisation excessive et inadaptée des antibiotiques en thérapie humaine et animal a exercé une pression favorisant l'acquisition de résistances et a largement contribué à l'émergence et la dispersion des bactéries multirésistantes aux antibiotiques (SLAMA, 2008). Cependant, Il apparait de plus en plus clairement que la présence d'autres composés entraînant des conditions de stress pour les communautés bactériennes, notamment les métaux lourds, représenterait une force évolutive importante pour la sélection des résistances aux antibiotiques dans l'environnement (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2006).

Différentes études montrent une corrélation positive entre la présence de métaux dans un écosystème et la résistance à la fois à ces métaux et aux antibiotiques chez les bactéries indigènes, ceci indépendamment du métal ou de l'antibiotique (MARTINEZ *et al.*, 2009). Cette co-sélection peut se faire selon trois mécanismes : la co-résistance, la résistance croisée et la co-régulation (Figure 5).

1- La co-résistance est observée lorsque les gènes de résistance aux métaux et aux antibiotiques sont positionnés sur le même élément génétique mobile (plasmide, transposon, îlot génomique), ainsi, la présence d'un métal pourra sélectionner les deux résistances. Par exemple, le transposon Tn21 est connu pour porter à la fois l'opéron *merRTPA* conférant la résistance au mercure et le gène *aadA1* à l'origine de la résistance à la streptomycine et à la spectinomycine (LIEBERT *et al.*, 1999).

2-La résistance croisée est observée lorsque le même mécanisme de résistance permet à la fois la résistance à un métal et à un antibiotique. C'est notamment le cas de certaines pompes à efflux telle que MexGHI-OpmD présente chez *P. aeruginosa*, qui permet d'effluer le vanadium (V) ainsi que la tétracycline et la ticarcilline associée à l'acide clavulanique (AENDEKERK *et al.*, 2002).

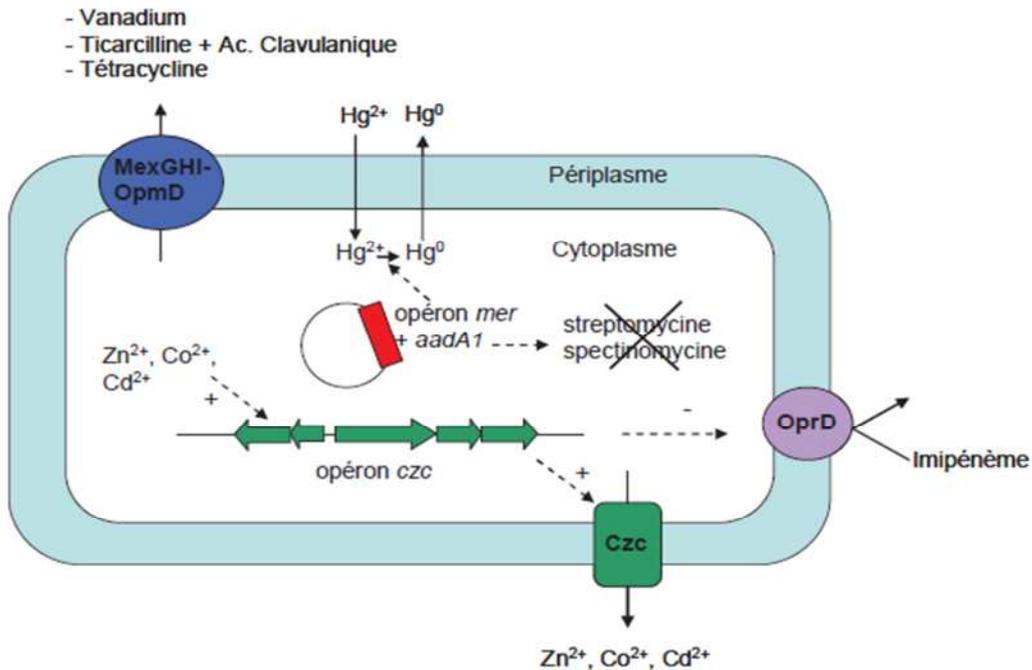


Figure 5 : Exemples de co-sélection de résistance. D'après BAKER-AUSTIN *et al.*, 2006.

3- La co-régulation, quant à elle, s'observe lorsque la régulation d'un mécanisme, induite par la présence d'un métal ou d'un antibiotique, régule également un autre mécanisme, permettant ainsi les deux résistances. Par exemple, PERRON et collaborateurs (2004) ont montré que la présence de zinc sélectionne des souches de *P. aeruginosa* résistantes à la fois à différents métaux : Zn, Cd et Co et à l'imipénème, antibiotique de la famille des carbapénèmes. Cette double résistance implique le système de régulation à deux composants CzcR/CzcS qui en présence du métal va d'une part, induire l'expression de la pompe à efflux CzcCBA permettant l'efflux du Zn, Cd et Co et d'autre part réprimer l'expression de la porine OprD, responsable notamment de l'entrée de l'imipénème dans la cellule (PERRON *et al.*, 2004). Caille *et al.* (2007) ont montré que la présence de cuivre avait le même effet sur la résistance à l'imipénème.

Ces observations sont très importantes d'un point de vue clinique car l'imipénème est fréquemment utilisé comme antibiotique de dernier recours contre les infections à *P. aeruginosa*.

Des phénomènes de co-sélection de résistance ont aussi été mis en évidence chez des souches opportunistes. Notamment, ALONSO et collaborateurs (2000) ont mis en évidence chez une souche de *S. maltophilia* d'origine clinique isolée de l'expectoration d'une personne

Synthèse bibliographique

atteinte de mucoviscidose, la présence d'un groupe de gènes potentiellement impliqués dans la résistance à l'érythromycine et au cadmium (ALONSO, *et al.*, 2000).

KARBASIZAED *et al.* (2003) ont étudié des souches d'entérobactéries impliquées dans des infections nosocomiales et ont pu isoler un plasmide conjugatif (>56.4 kb) qui véhicule la résistance à la triméthoprim-sulphaméthoxazole, à l'ampicilline et à la tétracycline.

Le transfert de ce plasmide aux cellules réceptrices s'est traduit par une augmentation des valeurs des CMI de 5,4 et 2 fois respectivement pour l'Hg, le Pb et le Cd.

Une souche isolée dans l'embouchure de l'estuaire de Seine présente une résistance associée à l'Hg et au Cd avec une antibiorésistance à 14 antibiotiques (BERTHE *et al.*, 2005).

Des souches de *Staphylococcus pasteurii* isolées du système de distribution d'eau se sont révélées simultanément résistantes à l'Hg et aux β -lactamines (FARIA *et al.*, 2009).

Cependant, des études récentes montrent que cette corrélation devient négative à haute concentration du métal; notamment YAN *et al.* (2015) ont signalé que la résistance de *P. fluorescens* ZY2 à la tétracycline était plus grande mais celle-ci diminuait avec l'augmentation dans la concentration de l'Hg jusqu'à ce que la résistance bactérienne soit perdue à 10mg/l d'Hg. De la même façon, SINGH *et al.* (2010) ont trouvé que *P. fluorescens* est résistante mais seulement à très basse concentration de l'Hg.

4- Antagonisme microbien

Les microorganismes peuvent exercer une activité antagoniste selon différents mécanismes incluant : la compétition, les interactions directes cellule à cellule, l'antibiose et la dégradation des signaux du quorum sensing (QS) (MONTESINOS *et al.*, 2009). Cette compétition sur les éléments nutritifs par exemple, peut se faire entre autres par la création de barrières physiques (biofilms) ou la sécrétion de sidérophores permettant la capture du fer. Certains antagonistes sont des hyperparasites et interviennent directement sur l'agent pathogène en interférant sa croissance cellulaire/mycélienne. Ce ci par invasion des cellules du pathogène par le microorganisme antagoniste via des enzymes lytiques tels que des glucanases, des chitinases et des lysozymes pour dégrader les parois de l'agent pathogène (CORBAZ, 1990). L'antibiose est un autre mécanisme qui consiste en la sécrétion de métabolites différents comme des enzymes lytiques, des peptides ou des protéines antimicrobiens, des composés phénoliques, etc. (DUBUIS et HAAS, 2007). Des substances

Synthèse bibliographique

responsables de l'antibiose ont pu être caractérisées chez des souches appartenant à diverses espèces d'agents de lutte biologique (notamment *Bacillus subtilis*, *Serratia plymuthica*, *Pseudomonas fluorescens*), et les gènes impliqués dans la production de certaines de ces substances ont été identifiés (RAAIJMAKERS *et al.*, 2002 ; DUFFY *et al.*, 2003). La mycosubtiline et les bacillomycines produits par *Bacillus subtilis*, par exemple, sont des lipopeptides actifs contre différents champignons et levures. Ces propriétés proviennent de leur nature amphiphile qui leur permet d'interagir avec différents constituants membranaires (NAIL *et al.*, 2013).

L'efficacité d'action et l'omniprésence des agents antagonistes, leur diversité et leur persistance dans l'environnement, permet leur utilisation dans divers domaines.

Dans le domaine alimentaire, les méthodes physico-chimiques de préservation provoquent des altérations de qualité nutritionnelle, organoleptiques des aliments et une diminution de leur utilité suite au développement des résistances par les pathogènes. La résistance est attribuable à l'utilisation abusive et souvent prolongée des produits chimiques.

La biopréservation des aliments s'avère une alternative très prometteuse (GOULD, 2000). Les bactéries lactiques, non seulement connues par leur innocuité, mais aussi pour leur activité antimicrobiennes, pourraient permettre la réduction de l'utilisation des produits chimiques dans les aliments (DJOSSOU *et al.*, 2011). Dans son étude, LAREF (2014) a démontré que certaines souches de *Lactobacillus plantarum* et de *Lactobacillus farciminis* produisent des composés antifongiques actifs contre *Aspergillus sp.*, *Fusarium roseum*, *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.* et *Stemphylium sp.*. L'application de ces souches en tant que biopréservateurs, empêcherait la croissance des moisissures et l'accumulation de leurs métabolites secondaires (mycotoxines).

Le pouvoir antagoniste des bactéries lactiques résulte de la production d'acides organiques, d'où une diminution du pH favorable à la bioconservation des denrées alimentaires, du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et des bactériocines limitant la croissance de certains germes pathogènes (AXELSSON, 2004).

En phytopathologie, l'exploitation des espèces antagonistes en vue d'enrayer le développement d'organismes pathogènes, ouvre de nouvelles perspectives dans le domaine de lutte contre les maladies des plantes maraîchères.

Synthèse bibliographique

Les *Fusarium* sont parmi les champignons telluriques les plus agressifs, causant des flétrissements et des pourritures sur de nombreuses espèces végétales cultivées, notamment la tomate infectée par l'espèce *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (BENHAMOU *et al.*, 1997). D'après les études de HIBAR *et al.* (2005) *Trichoderma harzianum* s'est avéré nettement antagoniste vis-à-vis de ce pathogène, ce qui est d'intérêt primordial de l'utiliser en tant qu'agent de lutte biologique contre la fusariose des racines et du collet de la tomate d'autant plus que les produits chimiques actifs contre ce pathogène sont en nombre relativement réduit.

Plusieurs études ont permis d'identifier des microorganismes antagonistes au champignon *Helminthosporium solani* (CHUN et SHETTY, 1994; LANGE, 1995; ELSON *et al.*, 1997 ; MICHAUD *et al.*, 2002; MICHAUD *et al.*, 2003; MARTINEZ *et al.*, 2006; RIVERA-VARAS *et al.*, 2007; AVIS *et al.*, 2010). Ces microorganismes, qui pourraient trouver des applications en lutte biologique, sont : *Pseudomonas corrugate*, *P. putida*, *Xanthomonas campestris*, *Acinetobacter* sp., *Acremonium strictum*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus cereus*, *Flavobacterium* sp., *Alcaligenes piechaudii*, etc.

P. fluorescens et *P. putida* se retrouvent naturellement dans le sol. Plusieurs souches sont utilisées comme biopesticides en raison de leurs actions antagonistes envers plusieurs phytopathogènes (HAAS et DEFAGO, 2005).

Deux *Pseudomonas* du groupe *fluorescens-putida*, à forte activité inhibitrice vis-à-vis de bactéries phytopathogènes, ont été confrontés à une gamme de 23 pathovars de *Pseudomonas syringae*. Ils ont confirmé leur activité antagoniste sur ces derniers germes. Deux essais réalisés dans des conditions normales de culture de plein champ ont démontré la potentialité de ces antagonistes comme moyen de lutte contre la moucheture bactérienne, due à *P. syringae* (COLLIN, 2008).

En effet, elles utilisent plusieurs stratégies afin de défendre leur niche écologique, notamment la synthèse de certains pigments tels que la pyoverdine, sidérophore qui en capturant des ions Fe^{3+} rends ces derniers indisponibles aux autres microorganismes (HAAS et DEFAGO, 2005). Un autre sidérophore, la pyochéline, permet de compétitionner pour le Fe mais aussi le Zn et le Cu (PHOEBE *et al.*, 2001). Quant à la pyrrolnitrine, elle a trouvé son application comme composé à usage clinique pour le traitement des mycoses cutanées plutôt que fongicide agricole (HAMMER *et al.*, 1997 ; McSPADDEN et FRAVEL, 2002).

Synthèse bibliographique

La production de molécules antimicrobiennes est largement utilisée par les *Pseudomonas* spp. afin d'inhiber la croissance d'organismes compétiteurs. Le mode d'action de certaines de ces molécules est déjà élucidé (RAAIJMAKERS *et al.*, 2002). On cite les phénazines, analogues des flavines (coenzymes), par exemple inhibent le transport des électrons (LIGON *et al.*, 2000). Pour sa part, le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), qui est un antibiotique phénolique, cause des dommages aux membranes de *Pythium* spp. et inhibe fortement la germination des zoospores de cet oomycètes (VINCENT *et al.*, 1991). Les lipopeptides produits par *P. fluorescens* jouent le rôle de surfactants et peuvent s'insérer dans les membranes microbiennes causant d'importants dommages à certains microorganismes (HAAS et DEFAGO, 2005).

En ce qui concerne la thérapie humaine, l'antagonisme microbien a permis d'ouvrir de nouvelles voies de recherche sur le traitement des maladies infectieuses.

Ces dernières années, le nombre d'infections a augmenté en raison de l'apparition de nombreux pathogènes résistants aux antibiotiques. Les recherches de solutions antifongiques innovantes se sont récemment focalisées sur certaines molécules produites par les actinomycètes du sol. Selon des chercheurs européens, ces actinobactéries peuvent vivre en symbiose avec les fourmis en leur conférant une protection antifongique. Même si quelques composés antifongiques ont déjà été identifiés, un grand nombre des métabolites produits par ces actinomycètes demeurent encore inconnus (Anonyme 1).

Récemment, des investigations ont mis en évidence le rôle crucial que joue la microflore intestinale dans le maintien et l'amélioration de la santé. Ceci a pris l'intérêt dans une quête pour de nouveaux composants bioactifs pour lutter contre les germes pathogènes notamment *Clostridium* sp. et *Bacteroides* sp.

TABAK et BENSOLTANE (2011) ont étudié le pouvoir antagoniste des deux ferments du yaourt (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*) et *Bifidobacterium bifidum* vis-à-vis d'*Helicobacter pylori*, une bactérie pathogène reconnue pour ces implications dans les maladies gastroduodénales : ulcère duodéal, ulcère gastrique et aussi du cancer gastrique (MEGRAUD, 2004). Ce pathogène, étant incapable de survivre à des pH bas, a été inhibé par les acides organiques produits, ainsi que par les bactériocines synthétisées naturellement par *Bifidobacterium bifidum*.

CHAPITRE IV

REHABILITE DES SOL

POLLUES PAR LES

METAUX LOURDS

Synthèse bibliographique

Les nombreux cas de pollution par les métaux lourds génèrent autant de sites contaminés qu'il faut réhabiliter. Les méthodes physico-chimiques de dépollution de ces sites utilisées *in situ* et *ex situ* présentent l'inconvénient d'être coûteuses et lourdes à mettre en œuvre. De plus, elles perturbent fortement l'activité biologique des sols et altèrent leur structure physique (RASKIN *et al.*, 1994 ; SALT *et al.*, 1995 ; GLICK, 2003). Le besoin de nouvelles techniques économiquement compétitives et pouvant préserver les caractéristiques du sol s'est fait sentir et l'utilisation des biotechnologies s'est avérée être une alternative intéressante.

La bioremédiation est l'approche biotechnologique qui fait intervenir des organismes vivants, des bactéries ou des plantes, afin d'éliminer les polluants récalcitrants du milieu (ABDELLY, 2007).

1- La bioremédiation par les microorganismes

Les bactéries sont capables de réduire, oxyder, séquestrer, volatiliser les polluants. L'exploitation de leurs extraordinaires capacités métaboliques permet d'envisager leur utilisation dans des procédés efficaces et peu coûteux de bioremédiation des eaux ou sols contaminés, notamment par des métaux traces. Elle concerne notamment l'aluminium (Al), le Cr, le manganèse (Mn), le Zn, le Pb, le Cu, le Ni, l'As, l'étain (Sn), le Cd, le titane (Ti), l'Hg, etc. (Anonyme 2).

Contrairement aux composés organiques, les métaux ne peuvent pas être dégradés. La dépollution des sols implique des processus qui visent à diminuer leur biodisponibilité (et donc leur toxicité), en évitant leur transfert vers les nappes phréatiques ou les chaînes alimentaires. Pour cela, on peut soit augmenter leur solubilité afin de les extraire du milieu contaminé, soit, au contraire, les immobiliser *in situ* afin de les confiner. La biodépollution de sols ou d'eaux par les microorganismes repose sur l'exploitation de leurs capacités à réaliser l'ensemble de ces réactions (BERTHOMIEU *et al.*, 2008).

1-1- L'oxydation et la biolixiviation

La biolixiviation reprends le principe de la lixiviation chimique sauf que l'acidité du milieu est générée par des microorganismes qui réduisent les composés sulfurés sous conditions aérobiques et acides (pH=4) à températures variant entre 15 et 55°C.

Synthèse bibliographique

Les micro-organismes qui participent à ces transformations sont principalement des bactéries du genre *Thiobacillus* (*ferrooxidans*, *thiooxidans*, *acidophilus*) ou *Leptospirillum* (*ferrooxidans*). Elles supportent de fortes concentrations en métaux toxiques comme le Cd, l'uranium (U) ou le thorium (Th) (CHIVIAN *et al.*, 2008). *Acidithiophilus ferrooxidans* a été découverte en 1947 dans les drainages acides de mines de houille grasse. Ces bactéries sont chimiolithotrophes : elles utilisent l'énergie issue de l'oxydation du Fe^{2+} et/ou du soufre (S^0) pour synthétiser des molécules organiques à partir du dioxyde de carbone.

La biolixiviation permet la solubilisation du métal sulfuré par oxydation, cela conduit à la formation de sulfate de métal (MULLIGAN, 2001). Cette méthode peut être statique ou dynamique. Dans le premier cas, le matériau à traiter est mis en tas, et les solutions de lixiviation contenant les microorganismes sont introduites par irrigation. Leur percolation favorise la dispersion des bactéries d'une part et la récupération des métaux dissous d'autre part (cette étape est obligatoire en aval de tout traitement). Les jus de lixiviation sont collectés à la base du tas dans des bassins pour être traités et recyclés. La biolixiviation dynamique se déroule dans des réacteurs biologiques d'oxydation. Le choix des microorganismes dépend du pH, de la source de carbone, de la vitesse d'agitation, de la température et du potentiel redox (MAROT, 1998).

Au niveau des essais de laboratoire, les *Thiobacillus* ont permis l'extraction à partir des sédiments contaminés de 70 à 75% de métaux lourds (à l'exception du Pb et de l'As) (MULLIGAN, 2001).

De nouvelles approches en bioréacteur utilisent des bactéries thermophiles ou des archées qui se développent à des températures élevées pour optimiser les réactions de biolixiviation (*Thiobacillus caldus* à 45-50 °C, *Sulfolobus metallicus* à 70-80 °C ou bien *Acidianus brierleyi* à 70-90 °C) (BERTHOMIEU *et al.*, 2008).

Cette approche est utilisée pour traiter des stériles miniers ou des eaux acides de drainage de mines (MUNIOZ *et al.*, 1995). Des opérations commerciales de biolixiviation existent au Brésil, en Chine, au Pérou et au Ghana pour des métaux comme l'or, le Co et le Ni (RAWLINGS *et al.*, 2003).

1-2- La biominéralisation et la bioimmobilisation

De nombreux articles témoignent de la capacité des bactéries à catalyser la formation de précipités minéraux insolubles contenant un métal, ce qui peut représenter un procédé intéressant pour immobiliser et confiner un métal toxique. C'est le cas notamment pour l'U puisque l'on peut obtenir des précipités insolubles même pour la forme oxydée UO_2^{2+} (CHOI et PARK, 2005). Un mécanisme connu depuis longtemps, et utilisé pour des procédés de bioremédiation, consiste en l'exploitation de la capacité des bactéries sulfatoréductrices à produire, au cours de la réduction anaérobie du soufre élémentaire ou du sulfate, du sulfure d'hydrogène (H_2S) qui fait précipiter les cations métalliques (Me^{2+}) sous forme de sulfures MeS_2 insolubles (Figure 6) (Anonyme3).

Ce mécanisme existe chez des espèces affiliées aux genres *Desulfovibrio* et *Desulfotomaculum*. Il a ainsi été montré dans des échantillons de sols et d'eau que ce couplage de réactions, initié par des bactéries sulfatoréductrices, peut entraîner la précipitation de l'U et du Zn *in situ* (LABRENZ *et al.*, 2000). Ce dispositif est utilisé dans plusieurs exploitations, en Amérique du Nord et au Mexique, pour extraire des métaux à des fins industrielles (Cu, Zn, Ni, Co) ou pour retirer des éléments toxiques comme As, Pb, Cd, Mn (Anonyme 3). Un des avantages est que le sulfure d'hydrogène généré par les bactéries coûte moins cher que sa source chimique NaHS.

Des phénomènes de biominéralisation en aérobiose ont également été décrits chez *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que chez diverses souches affiliées aux genres *Citrobacter*, *Rahnella*, *Bacillus* et *Arthrobacter*. Chez ces bactéries, la formation intra- ou extracellulaire de précipités minéraux insolubles de phosphate d'uranyle a été observée (POLLMAN *et al.*, 2006).

Dans le cas de *Citrobacter*, la réaction met en jeu une phosphatase acide membranaire qui catalyse la synthèse de phosphate dans le périplasme. Le phosphate se complexe avec le métal, formant des précipités insolubles de $NaUO_2PO_4$ ou $NH_4UO_2PO_4$. Ces complexes s'accumulent alors en microcristaux à la surface de la cellule selon un processus de nucléation impliquant les lipopolysaccharides (MACASKIE *et al.*, 2000). Chez *Citrobacter*, le phénomène de biominéralisation peut avoir lieu même si les bactéries sont mortes, ce qui permet d'envisager d'utiliser ces cellules comme pièges à uranium pour décontaminer des solutions aqueuses (RENNINGER *et al.*, 2004).

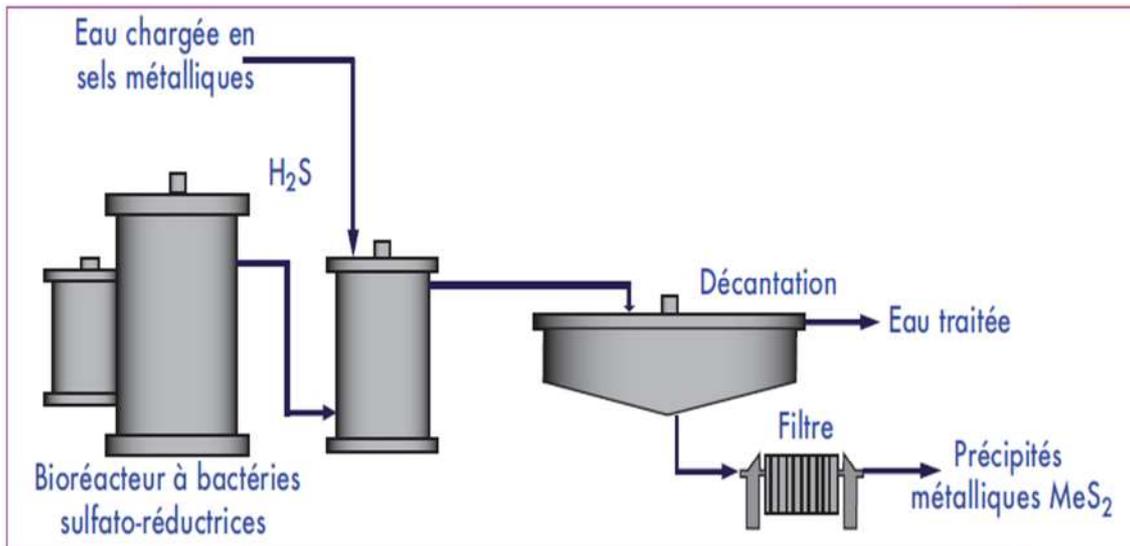


Figure 6 : Représentation schématique du traitement d'eau polluée par des sels métalliques par précipitation (Anonyme 3).

1-3- Les exopolysaccharides et la bioremédiation

Les exopolysaccharides (EPS) sont à la fois très mobiles et très réactives avec les métaux (GUIBAUD, 2003). CHEN *et al.* (1995) ont fait le bilan de la mobilisation des métaux par les polymères bactériens et ont montré que des polymères extracellulaires pouvaient être utilisés pour décontaminer efficacement les eaux souterraines et les sols pollués par des métaux. Les EPS produites par de nombreux microorganismes sont d'un intérêt important dans les processus de bioremédiation par leur participation dans la floculation et l'adhésion des ions métalliques en solution (HA, 2010).

Il a été montré que les bactéries pouvaient produire une large variété de polymères et certains auteurs ont évalué la fixation des métaux par ces polymères (Tableau V).

Synthèse bibliographique

Tableau V : Capacité de biosorption des éléments traces métalliques (ETMs) par les EPS bactériennes.

Souche bactérienne	Métal sorbé	Quantité, mg.g ⁻¹ EPS	Référence
Bactérie marine réductrice de sulfate	Mo(VI)	2.14	(BEECH et CHEUNG,1995)
	Ni(II)	0.43	
	Cr(III)	0.2	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cu(II)	320	(KAZY <i>et al.</i> , 2002)
<i>Enterobactercloaceae</i> AK-I-MB-71a	Cr(VI)	8.3	(IYER <i>et al.</i> , 2004)
<i>Chryseomonasluteola</i> TEM05	Cd(II)	64.1	(OZDEMIR <i>et al.</i> , 2005)
	Co(II)	55.2	
<i>Paenibacillusjamilae</i> CECT 5266	Pb(II)	228	(MORILLO PEREZ <i>et al.</i> , 2008)
	Cd(II)	55	
	Cu(II)	40	
	Zn(II)	37	
	Ni(II)	15	
	Co(II)	10	
<i>Pseudomonas putida</i>	Cd(II)	-	(UESHIMA <i>et al.</i> , 2008)
	Pb(II)	-	
Boues activées (consortium bactérien)	Cd(II)	-	(GUIBAUD, 2003; COMTE <i>et al.</i> , 2006 ; 2006)
	Cu(II)		
	Ni(II)		

1-4- Exemple d'application en bioremédiation

1-4-1- Bactérie modèle : *Cupriavidus metallidurans* CH34

Cupriavidus metallidurans CH34, anciennement connue sous le nom de *Wautersiametallidurans*, est une protéobactérie isolée à la fin des années 1970 de sédiments d'un bassin de décantation d'une usine de zinc près de Liège en Belgique (MERGEAY *et al.*, 1985).

Cette bactérie est un bacille non sporulant, à Gram négatif et anaérobie facultatif. Elle se développe en condition anaérobie en présence de nitrate. Elle est également capable de se développer sous conditions chimiolithotrophes en utilisant le dihydrogène (H₂) comme source d'énergie et le dioxyde de carbone (CO₂) comme source de carbone (DESAUNAY, 2011).

➤ Application en bioremédiation

C. metallidurans CH34 est tolérante aux métaux lourds ainsi qu'aux composés aromatiques présents dans l'environnement. Elle a su s'adapter à ce stress d'où son emploi en bioremédiation (DIELS *et al.*, 2009).

Des travaux ont été réalisés afin de montrer le rôle important de *C. metallidurans* CH34 dans la colonisation et la décontamination de l'environnement pollué par les métaux à des concentrations souvent toxiques pour d'autres microorganismes. La technique la plus récente dans l'emploi de *C. metallidurans* CH34 en bioremédiation, consiste à mettre dans le réacteur à boue Bio Métal (BMSR), un sol sableux contaminé par les métaux lourds (Cd, Zn, Ni, Co et Pb) (DIELS *et al.*, 2009).

Le concept général du BMSR est qu'une fois le sable inoculé par les bactéries *C. metallidurans* CH34 et mélangé avec l'eau d'effluent contaminée par les métaux lourds, les bactéries précipitent les métaux et le sable est ensuite décontaminé. Ces mêmes bactéries seront réutilisées pour d'autres cycles de dépollution.

2- Phytoremédiation

La phytoremédiation est définie comme l'utilisation des plantes pour réduire, dégrader ou immobiliser naturellement les polluants des écosystèmes terrestres, aquatiques ou aériens (MILITON, 2007). Elle est particulièrement adaptée au traitement de larges superficies contaminées par des niveaux faibles de polluant. En effet certaines plantes sont capables

Synthèse bibliographique

d'accumuler et de tolérer des concentrations extrêmement élevés de métaux dans leurs tissus et parties aériennes (GIRARD *et al.*, 2005). C'est une technique relativement simple à mettre en œuvre et particulièrement efficace lorsqu'elle est combiné à des techniques agronomiques appropriées (compostage, labourage) (HUANG *et al.*, 2004 ; OLSON *et al.*, 2008).

Les métalophytes utilisées en vue de remédier les sites pollués par les métaux doivent :

- résister aux ETMs (et éventuellement d'autres polluants) présents sur le site à traiter ;
- être capables d'accumuler des concentrations élevées en métaux (plantes hyperaccumulatrices) ;
- manifester une croissance rapide et une forte production de biomasse (GOBAT *et al.*, 2010).

Les types de stratégies de phytoremédiation, particulièrement utilisés dans la dépollution des métaux lourds sont décrits ci-dessous et illustrés dans la figure 7 :

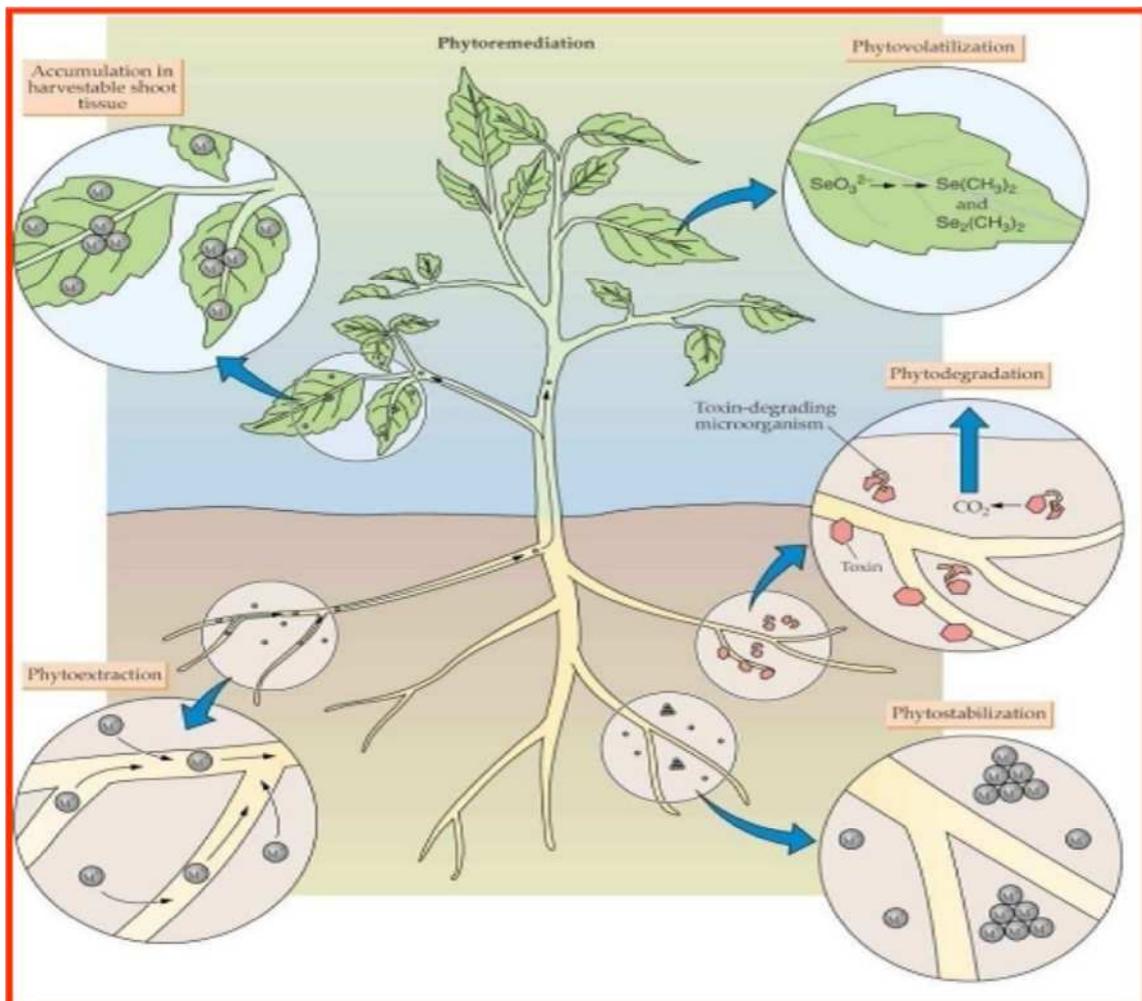


Figure 7 : Stratégies de phytoremédiation des milieux pollués par les métaux lourds (SALT *et al.*, 1998).

2-1- Phytostabilisation

Elle consiste à réduire la biodisponibilité et la mobilité des composés polluants en les liants chimiquement par précipitation, stabilisation, absorption ou piégeage de ceux-ci par la plante. Cette technique permet d'éviter la dispersion des polluants dans les eaux de surface et souterraines (CUNNINGHAM *et al.*, 1995).

Le cas de la Combe du Saut en France, ancienne mine d'or fortement polluée à l'arsenic avec un flux de 1 300 kg/an qui s'écoulait vers la nappe phréatique, et un flux de 300 kg/an qui percolait vers la rivière. Ce site a été traité à la grenaille de fer qui retient l'As, puis en plantant des espèces résistantes à ce métal, de façon à empêcher le ruissellement (programme DifPolMine de l'ADEME) (VAVASSEUR, 2014).

2-2- Phytoextraction

Il s'agit de l'utilisation des plantes qui ont la faculté d'extraire du sol les métaux lourds et de les concentrer dans les parties aériennes ou racinaires. Les métaux lourds vont se complexer avec des acides organiques ou des acides aminés synthétisés par la plante et seront ensuite récupérés en incinérant ou en compostant la biomasse de cette plante. La technique repose essentiellement sur les interactions entre les plantes, le compartiment du sol et la microflore tellurique (Rhizobactéries) (McGRATH et ZHAO, 2003).

2-2-1- Phytoextraction induite

La phytoextraction induite se fait en présence de chélateurs et de plantes à forte biomasse et à croissance rapide. Lorsque la plante a atteint un certain niveau de croissance, les chélateurs de métaux sont appliqués au sol. Ceux-ci permettent d'induire l'accumulation du métal dans la plante par augmentation de la biodisponibilité de l'élément ciblé (JARVIS et LEUNG, 2002). C'est notamment le cas de l'EDTA (Ethylene diamine tetraaceticacid) et de l'EDDS (Ethylene diamine disuccinate) pour le Pb (TANDY *et al.*, 2006).

2-2-2- Phytoextraction continue

Contrairement à l'absorption induite par des chélateurs, la phytoextraction continue est basée sur les capacités génétiques et physiologiques des plantes spécialisées dans l'absorption, la translocation et la tolérance des métaux lourds. On parle de «plante hyperaccumulatrice».

Synthèse bibliographique

Grâce à la photosynthèse, ces plantes peuvent être considérées comme de véritables pompes solaires à produits toxiques. *Thlaspi caerulescens*, par exemple, est une métalphyte capable d'accumuler dans ses parties aériennes des quantités de Zn pouvant représenter 1.7% de la masse sèche des feuilles. D'autres plantes sont capables de concentrer des quantités importantes de Cd, de Pb, de Ni, etc. (GOBAT *et al.*, 2010). Actuellement, environ 400 espèces hyperaccumulatrices ont été répertoriées (Tableau VI).

Tableau VI : Les plantes les plus intéressantes en phytoremédiation recensées dans la base de données PHYTOREM (McINTYRE,2003).

Element	Plantes présentant la plus forte concentration	Origine	Concentration la plus élevée (mg kg Ms ⁻¹)
Al	<i>Solidago hispida</i>	Canada	6820
As	<i>Sgrostistenuis (capillaris)</i>	Culture	2000
Cd	<i>Vallisneriaspiralis</i>	Inde	6242
Co	<i>Haumaniastrumrobertii</i>	Afrique	10200
Cr	<i>Medicagosativa</i>	Culture	7700
Cu	<i>Larreatridentata</i>	Etat-uni	23700
Hg	<i>Pistiastratiotes</i>	Tropiques	1100
Mn	<i>Macadamia neurophylla</i>	Nouvelle Calédonie	51800
Mo	<i>Thlaspi caerulescens</i>	Europe	1500-1800
Ni	<i>Psychotria douarrei</i>	Nouvelle Calédonie	4500
Pb	<i>Brassicajuncea</i>	Culture	26200
U	<i>Helianthusannuus</i>	Culture	>15000
Zn	<i>Thlaspi caerulescens</i>	Europe	52000

2-3- Phytodégradation

La phytodégradation emploie des plantes en association avec des microorganismes pour dégrader les polluants organiques du sol. Les polluants sont transformés en formes moins toxiques par des réactions enzymatiques catalysées par les cytochromes P450 monooxygénases, les nitroréductases, les laccases, les peroxidases, etc. (WENZEL, 2009).

Synthèse bibliographique

Les bactéries de la rhizosphère sont largement impliquées dans la dégradation *ex situ*. Par exemple, *Microbacterium sapperdae*, *Pseudomonas monteilii*, et *Enterobacter cancerogenes*, trois isolats bactériens ont été inoculés avec des graines d'une plante hyperaccumulatrice (*Thlaspi caerulescens*), et ont ainsi augmenté d'un facteur 4 la quantité de zinc accumulé, en favorisant sa disponibilité (WHITING *et al.*, 2001).

Cette technique compte améliorer le métabolisme de dégradation des composés organiques *in planta* (dans les racines). C'est le cas des tabacs surexprimant le cytochrome P450 : ils métabolisent mieux le TriChloroEthylène (TCE), le Chlorure de Vinyle et le Benzène (GIRARD *et al.*, 2005).

2-4- Phytovolatilisation

Cette stratégie consiste à utiliser des plantes qui absorbent des polluants dont les métaux lourds, transformant ceux-ci en éléments volatiles peu ou pas toxiques et les relâchant dans l'atmosphère via leurs feuilles (McGRATH et ZHAO, 2003). Chez les plantes, seuls le sélénium (Se) et l'Hg peuvent être phytovolatilisés. Les bactéries volatilisent l'Hg et l'As.

Brassicajuncea est naturellement une bonne candidate. Le sélénium est volatilisé sous forme de diméthylSélénide (volatile) via la Se-cysteine (PILON-SMITH et LEDUC, 2009).

Le métabolisme du Se implique deux gènes : selenocysteine lyase (*cpSL*) et selenocysteinemethyltransferase (*SMT*) ; leur surexpression accroît les performances de phytoremédiation du Se chez *Brassicajuncea* (BAÑUELOS, 2006).

L'Hg est accumulé dans le sol sous une forme organique (méthyl-mercure) très toxique. Les gènes bactériens *MerA* et *MerB* permettent de le transformer en Hg(0), forme peu toxique. HUSSEIN *et al.* (2007) ont transformé des tabacs par ces deux gènes (expression génome chloroplastique) et la volatilisation s'est améliorée d'un facteur de 100, dans des sols enrichis en phénylméthylmercure (PMA) ou (HgCl₂).

3- Avantages et inconvénients de la bioremédiation

En comparaison des méthodes physico-chimiques utilisées classiquement pour décontaminer les sols, mais qui conduisent à leur déstructuration et à une forte diminution de leur fertilité et de leur productivité, la bioremédiation est considérée comme une technique respectueuse de l'environnement. Un atout important de cette technique est également son coût, bien inférieur à celui des techniques traditionnelles de décontamination.

Synthèse bibliographique

Par contre, la bioremédiation ne peut être appliquée dans l'urgence, car les durées de traitement s'étalent sur plusieurs années, voire décennies, en fonction du degré de pollution. Les recherches actuelles portent donc essentiellement sur l'optimisation de ce temps de traitement(VAVASSEUR, 2014).

CHAPITRE IV

REHABILITE DES SOL

POLLUES PAR LES

METAUX LOURDS

DEUXIEME PARTIE

PARTIE

EXPERIMENTALE

1- Matériel

1-1- Milieux de culture

- Gélose nutritive (GN) : Conda Pronadisa. Espagne
- Gélatine nutritive : Conda Pronadisa. Espagne
- Bouillon nutritif : Institut Pasteur. Algérie
- Bouillon nitraté (BN) : Institut Pasteur. Algérie
- Bouillon infusion cœur-cerveau (BHIB) : Himedia. Inde
- Eau peptonnée exempte d'indole (EPEI) : Conda Pronadisa. Espagne
- Milieu Citrate de Simmons (CS) : Institut Pasteur. Algérie
- Milieu Clark et Lubs : Conda Pronadisa. Espagne
- Milieu Luria Bertani (LB) : Reconstitué au laboratoire de microbiologie UMMTO.
- Milieu Mannitol Mobilité (MM) : Conda Pronadisa. Espagne
- Milieu Mueller Hinton (MH) : Conda Pronadisa. Espagne
- Milieu Sabouraud : Institut Pasteur. Algérie
- Milieu Triple Sugar Iron (TSI) : Conda Pronadisa. Espagne
- Milieu Urée Indole (UI) : Institut Pasteur. Algérie

La composition chimique de ces milieux est décrite dans l'annexe 1.

1-2- Solutions et réactifs

- Alcool (éthanol) : Sigma Aldrich. Allemagne
- Disques d'ONPG : Biochem Chemopharma. Québec
- Disques d'oxydase : Biochem Chemopharma. Québec
- Eau distillée
- Eau oxygénée à 10 volumes (H₂O₂)
- Eau physiologique
- Fuchsine : Fluka Analytical. Allemagne
- Huile de vaseline : Biochem Chemopharma. France
- Huile à immersion : Biochem Chemopharma. France
- Perchlorure de fer
- Poudre de zinc

- Acide sulfanilique (RN1) : Sigma Aldrich. Allemagne
- Naphtylamine (RN2) : Sigma Aldrich. Allemagne
- Réactif de Kovacs : Sigma Aldrich. Allemagne
- Rouge de Méthyle (RM) : Sigma Aldrich. Allemagne
- Solution de Lugol : Biochem Chemopharma. Québec
- L'alpha naphthol (VP1) : Sigma Aldrich. Allemagne
- La potasse (VP2) : Sigma Aldrich. Allemagne
- Violet de Gentiane : Sigma Aldrich. Allemagne

1-3- Les Métaux lourds utilisés

- Sulfates d'aluminium : $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$
- Dichromate de potassium : $\text{K}_2 \text{Cr}_2 \text{O}_7$
- Sulfates de zinc : Zn SO_4
- Sulfates de cuivre : Cu SO_4

Les métaux lourds ont été fournis par le magasin de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

1-4- Appareillage

- Agitateur magnétique avec plaque chauffante : LABINCO. Allemagne.
- Autoclave : WEBECO. Allemagne.
- Bain marie : MEMMERT. Allemagne.
- Balance de précision : KERN 770. Allemagne.
- Etuve : BINDER. Allemagne.
- Four Pasteur : BINDER. Allemagne.
- Loupe binoculaire : SINAL
- Microscope optique : HONDWETZLAR. Allemagne.
- Réfrigérateur : ENIEM. Algérie.
- Spectrophotomètre : Vis-7220G. Biotech Engineering. Management CO.LTD (UK).

Matériel et méthodes

1-5- Les souches microbiennes utilisées

Les souches bactériennes utilisées (Tableau VII) ont été choisies pour leur pathogénicité et leur multi résistance aux antibiotiques. Deux d'entre elles sont des souches de référence issues de l'American Type Culture Collection (ATCC). Elles sont revivifiées à 37°C par repiquage sur milieu gélosé Mueller-Hinton (MH).

Les souches fongiques sont des espèces pathogènes responsables de mycoses chez l'homme et de maladies parasitaires chez de nombreuses plantes, repiquées sur milieu Sabouraud et incubées à 28 °C.

Tableau VII : Les souches microbiennes utilisées.

Souches microbiennes			Sources
Souches bactériennes	<i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)	Gram négatif	Laboratoire de microbiologie de la FSBSA de Tizi Ouzou
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC43300)	Gram positif	
	<i>Escherichia coli</i>	Gram négatif	Laboratoire de microbiologie du CHU de Tizi Ouzou
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positif	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram négatif	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram négatif	
Souches fongiques	<i>Aspergillus niger</i>	Champignon	Offerts par notre promoteur Dr OUELHADJ
	<i>Botrytis cinerea</i>	Champignon	
	<i>Penicillium sp.</i>	Champignon	Laboratoire de microbiologie UMMTO

1-6- Molécules de référence utilisées : antibiotique et antifongique

Tableau VIII: Les antibiotiques et l'antifongique utilisés

	Nom	Abréviation	Dose	Compagnie
Antibiotique	Oxytétracycline	O	30 µg/disque	Bioanalyse Inde
Antifongique	Amphotéricine B Fungizone®	/	10%	Haupt Pharma Allemagne

2- Méthode

2-1- Site d'échantillonnage et prélèvement

Le site est localisé à 8 Km à l'est de la ville de Tizi Ouzou. Il se situe dans l'enceinte de l'entreprise l'ENIEM (Entreprise Nationale des Industries de l'Electroménager), délimitée au nord par l'Oued Sébaou, à l'est par le village Tala-Amara et au sud par le Centre de Formation Professionnel Algérien.

L'étude a été menée sur des échantillons de sol et de boues métalliques, stockées dans des barils, qui sont issues des procédés de traitement par les métaux lourds. Des prélèvements ont été réalisés sur 7 barils différents. Nous avons remarqué la présence de végétation sur l'ensemble de la zone contaminée. Le sol a été échantillonné sur ses dix premiers centimètres, tout près des racines des plantes, après avoir écarté la couche superficielle. Les échantillons sont transportés au laboratoire pour analyse.



Figure 8 : Localisation géographique du site de prélèvement (Anonyme 4).



Figure 9 : Photos du lieu de l'échantillonnage (barils de stockage)

2-2- Isolement des souches bactériennes

2-2-1- Mise en suspension

Ayant plu le jour du prélèvement, le temps nécessaire et les conditions de séchage (dangerosité de ce sol), explique notre choix de procéder par tamisage. Ainsi, à l'aide d'un tamis, les gros débris sont éliminés (pierres, racines, etc.) et 10 g de l'échantillon homogène (obtenue à partir des 7 échantillons bien mélangés) sont suspendus dans 50 ml d'eau distillée stérile (Ouelhadj.

Après agitation manuelle, la solution obtenue est passée au travers d'une gaze stérile et le filtrat servira de suspension mère. A partir de celle-ci, deux tubes de bouillon nutritif (BN) sont ensemencés par 0,5 ml chacun, puis incubés à 37°C pendant 24 h.

2-2-2- Dilutions et ensemencement

Suite à l'incubation, nous avons effectué une série de dilutions décimales (10^{-1} à 10^{-6}) dans 9 ml d'eau physiologique stérile pour chacun des deux tubes. Du fait de sa richesse la gélose nutritive (GN) est le milieu de base utilisé. Ce qui laisse pousser un maximum de microorganismes.

200µl de chaque dilution sont déposés au fond des boîtes, ensuite le milieu est coulé en surfusion. Après refroidissement, les boîtes (deux par dilution) sont incubées renversées à 37°C pendant 72 heures.

2-2-3- Dénombrement de la microflore totale du sol

Le dénombrement des bactéries repose sur le principe selon le quelle une colonie se forme par division d'une seul cellule. Après culture de l'inoculum dilué, le comptage des colonies est réalisé directement à l'œil nu en choisissant les boîtes de la plus faible dilution où le nombre de colonies (n) est compris entre 30 et 300.

Le nombre de germes par gramme de sol est déterminé en tenant compte de la première dilution et des facteurs de dilution, selon la formule de MARCHAL et BOURDON (1982) :

$$N = n / d \cdot v$$

Où : **N**: nombre des microorganismes en UFC/ ml.

n: nombre des colonies dénombrées.

v: Volume prélevé (200µl soit 0,2ml).

d: Dilution.

2-3- Purification et conservation des souches isolées

La purification des souches est réalisée par plusieurs repiquages successifs sur gélose nutritive par la technique des trois cadrans. Le repiquage se poursuit jusqu'à l'obtention d'une culture homogène où toutes les colonies sont identiques entre elles et identiques au type de bactéries initialement ciblées.

Les souches purifiées sont ensuite conservées dans des tubes à GN inclinée mis à 4°C.

2-4- Identification des bactéries étudiées

L'identification de ces souches isolées est déterminée à base de l'aspect phénotypique des colonies, de l'examen microscopique et des caractères biochimiques spéciaux.

2-4-1- Identification morphologique

2-4-1-1- Etude macroscopique

L'observation morphologique regroupe l'analyse des critères suivants : forme de la colonie, aspect, élévation (relief), surface, consistance, opacité et couleur.

2-4-1-2- Etude microscopique

L'observation microscopique (type de Gram, forme et mode de groupement) permet une orientation préliminaire.

Cet examen consiste en la coloration différentielle de Gram qui s'effectue comme suit :

- Préparation d'un frottis à partir de chacune des souches pures obtenues : l'aliquot prélevé des colonies est délayé dans une goutte d'eau distillée, le frottis séché puis fixé est ainsi prêt pour la coloration ;
- Coloration primaire : le frottis est couvert d'une couche du violet de Gentiane pendant 1 à 2 min ;
- Mordançage : fixation du colorant à l'intérieur de la cellule bactérienne en ajoutant deux couches de lugol pendant 45s chacune ;
- Décoloration : avec de l'éthanol, laisser agir pendant 30 s. Laver abondamment à l'eau courant ;
- Coloration secondaire (de contraste) : en rajoutant de la fuchsine pendant 1 min ;
- Rincer à l'eau courant puis sécher ;
- Observation à l'immersion (Grossissement 1000).

Il est à noter que les frottis sont réalisés à partir de cultures bactériennes jeunes (culture de 18 h d'incubation à 37°C).

2-4-2- Identification biochimique

Les tests biochimiques réalisés sont : le test de l'oxydase, de la catalase, de la nitrate réductase, la gélatinase, de l'uréase, de la β -galactosidase, de la tryptophane désaminase (TDA). La dégradation de citrate; des sucres (glucose, lactose et/ou saccharose et du mannitol), le test de mobilité, la production d'indole et la réaction de Voges-Proskauer sont également réalisés.

Les caractères phénotypiques et biochimiques des souches sont déterminés et comparés à ceux décrits dans le manuel de Bergey (Bergey's manual of determinative bacteriology, 9ème édition).

2-4-2-1- Etude du type respiratoire

2-4-2-1-1- Recherche enzymatique

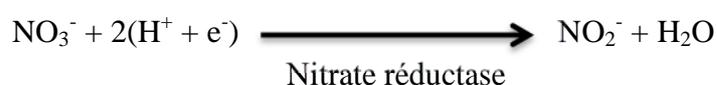
Le type respiratoire est complété par la recherche des enzymes de la chaîne d'oxydo-réduction située au niveau de la membrane plasmique des bactéries.

2-4-2-1-1-1- Mise en évidence d'une respiration anaérobie

La respiration anaérobie consiste en l'utilisation des minéraux oxydés comme accepteurs des protons et d'électrons issus de l'oxydation des substrats tels que les nitrates, les sulfates, etc.

2-4-2-1-1-1-1- Recherche de la nitrate réductase

Le nitrate est le minéral le plus utilisé comme accepteur final de protons et d'électrons (respiration nitrate). La réduction des nitrates (NO_3^-) en nitrites (NO_2^-) par la nitrate réductase peut se poursuivre chez certaines bactérie jusqu'à la production du diazote (N_2) selon les réactions suivantes :



Matériel et méthodes

La technique de Khan qui est utilisée pour ce test, réside dans l'ensemencement d'un tube du bouillon nitraté avec la souche voulue tester puis l'incuber à 37°C pendant 24 h. Après incubation, la révélation de la nitrate réductase se fait après ajout de 3 gouttes des réactifs de Griess Ilosway respectivement :

- Réactif 1 : Acide sulfanilique en milieu acétique ;
- Réactif 2 : Naphtylamine en milieu acétique.

Le test est considéré positif s'il y a virage du milieu au rose, en cas d'absence de coloration, on ajoute alors de la poudre de zinc, qui a pour rôle de réduire les nitrates en nitrites si présentes. Le virage du milieu au rose confirme l'absence de l'enzyme, mais l'absence de cette coloration confirme que la souche étudiée, possède en plus de la nitrate réductase, la nitrite réductase qui permet l'obtention du diazote (GUIRAUD, 2003).

2-4-2-1-1-2- Mise en évidence de la respiration aérobie

Appelée encore 'respiration oxydative', utilisée par d'autres bactéries et dont l'accepteur final des électrons et des protons est l'oxygène (O₂).

2-4-2-1-1-2-1- Recherche de l'oxydase

L'oxydase est une enzyme qui intervient à la fin de la chaîne d'oxydo- réduction pour catalyser la fixation de l'H₂ et des électrons sur l'O₂. Sa recherche est basée sur l'oxydation de l'oxalate de diméthylparaphénylène diamine.

Le test a été réalisé à l'aide d'un disque de commerce prêt à l'emploi, imprégné d'eau distillée sur lequel a été déposée une colonie. La réaction positive (oxydation du substrat contenu dans le disque) se traduit par l'apparition d'une coloration violette à l'endroit où la colonie a été déposée (DELARRAS, 2007).

2-4-2-1-1-2-2- Recherche de la catalase

Du fait de sa toxicité pour la cellule, l'eau oxygénée formé au cours des réactions d'oxydation est éliminé par la catalase, enzyme produite exclusivement chez les bactéries aérobies strictes et aéro-anaérobies facultatives.

Sur une lame en verre propre et sèche, l'inoculum bactérien à tester est déposé auquel sont ajoutées ensuite quelques gouttes d'H₂O₂ à dix volumes. Au contact, la présence de la catalase se manifeste par une effervescence (dégagement du dioxygène) (Zinedine, 2004).

2-4-2-2- Métabolisme glucidique

2-4-2-2-1- Milieu d'identification multiple

Il s'agit du milieu TSI (Triple Sugar Iron) permettant d'étudier la fermentation de trois sucres à la fois : glucose avec ou sans production de gaz, lactose et/ou saccharose, ainsi que la production ou non du H₂S. Ce milieu gélosé est formé par un culot et une pente.

L'ensemencement de ce milieu est en effectuant des stries serrées sur la pente puis par piqure centrale du culot. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 24h.

L'utilisation des sucres comme sources de carbone entraîne l'acidification du milieu, ceci se traduirait par le virage de l'IpH (rouge de phénol) de ce dernier au jaune. Le dégagement gazeux se manifesterait par l'apparition de bulles au niveau du culot. Quant au noircissement, il serait dû à la production du H₂S.

2-4-2-2-2- Caractères Mannitol-Mobilité

Le milieu utilisé est Mannitol-Mobilité, c'est une gélose molle conditionnée en tubes qui permet d'étudier la fermentation du mannitol ainsi que la mobilité des germes.

La souche bactérienne est ensemencée par piqure centrale jusqu'au fond du tube à l'aide d'un fil droit. La fermentation du mannitol est matérialisée par un virage du milieu au jaune. Concernant la mobilité, elle est repérée par la diffusion du germe à partir de la ligne d'ensemencement, créant un trouble du milieu.

2-4-2-2-3- Test de l'ONPG pour rechercher la β -galactosidase

Pour qu'une bactérie puisse dégrader le lactose, elle doit posséder des enzymes fonctionnelles, notamment la galactoside perméase facilitant la pénétration du lactose dans la cellule et la β -galactosidase capable de scinder cette molécule en glucose et galactose.

Il existe des germes possédant une β -galactosidase mais ne semblant pas fermenter le lactose par manque de lactose perméase. Le test de l'ONPG a été utilisé pour mettre en évidence la présence de la β -galactosidase. Il est basé sur l'action directe de cette enzyme sur un substrat artificiel, l'ortho-nitrophényl-D-galactopyranoside (ONPG) libérant l'orthonitrophénol (jaune).

Matériel et méthodes

Ce test se pratique en réalisant une suspension bactérienne épaisse dans de l'eau physiologique, puis y ajouter à l'aide d'une pince flambée mais refroidie un disque imprégné d'ONPG. Incuber 30 min à 37°C. Après incubation, le test positif se traduit par la coloration du milieu en jaune.

2-4-2-2-4- Etude du métabolisme fermentaire

Cette étude permet de distinguer les bactéries fermentaires utilisant la voie des acides mixtes de celles utilisant la voie du butylène glycol pour la dégradation du glucose.

Au cours de la première voie, il y'a production importante d'acides formique, acétique, lactique, butyrique, succinique, malique, oxalique, etc. mis en évidence par le rouge de méthyle (RM) qui devient rouge en milieu acide. Alors que durant la fermentation butanediolique, il y'a formation de l'acétyl méthyl carbinol (A.M.C.) ou acétoïne mise en évidence par la réaction de Vogues Proskauer (VP).

Clark et Lubs est le milieu glucosé peptonné utilisé pour cette étude. Il estensemencé par la bactérie à tester et incubé pendant 24 heures à 37°C. Ce milieu liquide est ensuite divisé en deux tubes stériles, l'un va servir pour la réaction RM l'autre pour le test VP :

- Test RM : on ajoute quelques gouttes du rouge de méthyle, quand le germe est RM positif la culture devient rouge instantanément.
- Test VP : l'acétoïne est détectée par l'ajout de quelques gouttes de VP1 et de VP2, sa réaction avec l'alpha naphthol donne une coloration rouge dans les cas d'un test positif.

2-4-2-2-5- Utilisation du citrate de sodium

L'utilisation du citrate comme seule source de carbone par les germes est étudiée sur le milieu Citrate de Simmons, ce milieu est coulé en tube incliné. Il contient un indicateur de pH qui est le bleu de bromothymol, ce qui confère au milieu une coloration verte à l'état acide. Les germes qui utilisent le citrate qui est un triacide et le transforme en diacide entraînant une alcalinisation du milieu, d'où le virage du vert au bleu.



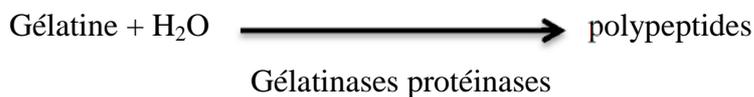
Matériel et méthodes

L'ensemencement de ce milieu par la souche à analyser se fait par stries longitudinales tout au long de la pente. Après 24 heures d'incubation à 37°C, le développement bactérien sur ce milieu ainsi que son virage au bleu confirme l'utilisation du citrate de sodium.

2-4-2-3- Métabolisme protidique

2-4-2-3-1- Hydrolyse de la gélatine

La gélatinase est l'enzyme permettant la dégradation de la gélatine qui est une substance protéique extraite, sous forme de gelée, des tissus animaux riches en collagène (cartilage, peau, os, etc.). L'hydrolyse de la gélatine en polypeptides peut se poursuivre jusqu'à l'obtention d'acides aminés ; l'irréversibilité de la réaction est le facteur clé qui permet l'identification.

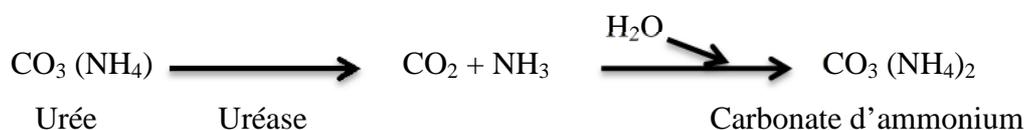


La gélatine nutritive, milieu gélosé contenue dans des tubes, est inoculée en piqûre centrale par le germe en question puis incubée à 37°C pendant 24 heures. Après culture, le milieu est mis au réfrigérateur pendant quelques heures pour confirmer l'effet de l'enzyme. Sa liquéfaction indique que l'hydrolyse de la gélatine est due à l'activité enzymatique et non à l'effet de la chaleur.

2-4-2-3-2- Recherche de l'uréase, de la production d'indole et de la tryptophane désaminase

- **Recherche de l'uréase**

L'utilisation de l'urée comme seule source d'azote est obtenue après hydrolyse de cette dernière libérant de l'ammoniaque (NH₃) qui, en se combinant avec le CO₂ et l'H₂O, donne du carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu, selon la réaction suivante :



- **Recherche de la tryptophane désaminase (TDA)**

Ce test met en évidence l'enzyme désaminase oxydative qui transforme l'acide aminé en acide cétonique :



Ce produit donne un complexe coloré avec l'ion ferrique Fe^{2+} ; celui-ci est utilisé comme réactif pour la lecture.

- **Production d'indole**

L'indole est obtenu chez les bactéries indologènes suite à l'action d'une tryptophanase active, il réagit fortement avec le para-diméthyl-amino-benzaldéhyde (réactif de Kovacs) en milieu acide pour donner un anneau coloré en rouge intense qui remonte en surface.

Après l'avoir ensemencé par le germe à tester et incubé 24 heures à 37°C, le milieu Urée-Tryptophane est le milieu liquide dans lequel on recherche les trois caractères :

- la production d'uréase qui se matérialise par le changement de la coloration jaune en rose (ou rouge violacé dans de rares cas), du fait de l'alcalinisation du milieu ;
- la présence de TDA qui se décèle par la formation d'un précipité brun chamois (marron), après addition de perchlorure de fer (FeCl_3).
- la présence d'indole qui se visualise par un anneau rouge, après addition du réactif de Kovacs. La réaction négative se détermine par la formation d'un anneau brunâtre (teinte originelle du réactif) à la surface de la suspension.

2-5- Détermination de la résistance aux métaux lourds

Sur le choix des métaux à utiliser, il aurait été plus concevable d'utiliser un spectromètre d'absorption atomique (SAA) (voir le principe de la SAA dans l'annexe 2) pour une analyse chimique de nos échantillons de sol pour aboutir aussi bien à des résultats qualitatifs qu'à des données quantitatives de son contenu en ETMs. Etant donné que notre laboratoire ne dispose pas d'un spectromètre d'absorption atomique, nous nous référons aux dires de l'ingénieur spécialisé dans le traitement de surface des pièces dans leur gamme de fabrication mis à notre disposition par l'entreprise de l'ENIEM. Lors du prélèvement des échantillons l'ingénieur nous indiquait que les boues en question contenait essentiellement du chrome, du zinc et du nickel qui résultent respectivement des procédés de chromage, zingage et du

nickelage des pièces ; du cuivre, d'aluminium et du fer après décapage et même du mercure. En tenant compte de ces informations, nous avons décidé de tester nos souches sur du chrome, zinc, cuivre et sur l'aluminium.

2-5-1- Ensemencement sur milieu liquide

La concentration minimale inhibitrice (CMI) des métaux a été évaluée pour toutes les souches isolées par la méthode de dilution en milieu liquide (bouillon BHIB).

Des solutions mères de dichromates de potassium (5 mg/ml), de sulfates de zinc ; de sulfates d'aluminium (10 mg/ml) et de sulfates de cuivre (12,5 mg/ml) ont été préparées dans du BHIB. 4 solutions filles sont obtenues, pour chacun des métaux, par dilution successive au $\frac{1}{2}$ de la solution mère correspondante (Figure 10). Après dilution des solutions mères métalliques, les concentrations de métaux se répartissent dans les solutions filles d'ordre décroissant (Tableau IX).

Les tubes sont ensuite ensemencés par 100 μ l des inoculum préablement standardisés à une densité optique (DO) de 0,08 à 0,10 soit 10^6 à 10^7 germes/ml, lue à une longueur d'onde de 620 nm. Le témoin négatif est composé de BHIB inoculé par 100 μ l de la souche à tester.

Après incubation à 37 °C pendant 18-24 h, la turbidité est mesurée dans tous les tubes. La CMI correspond à la plus faible concentration du métal pour laquelle il n'y a pas de croissance (absence de trouble). Au-delà de cette concentration la souche est dite sensible au métal ; ceci se traduit par l'absence de trouble (pas de développement bactérien).

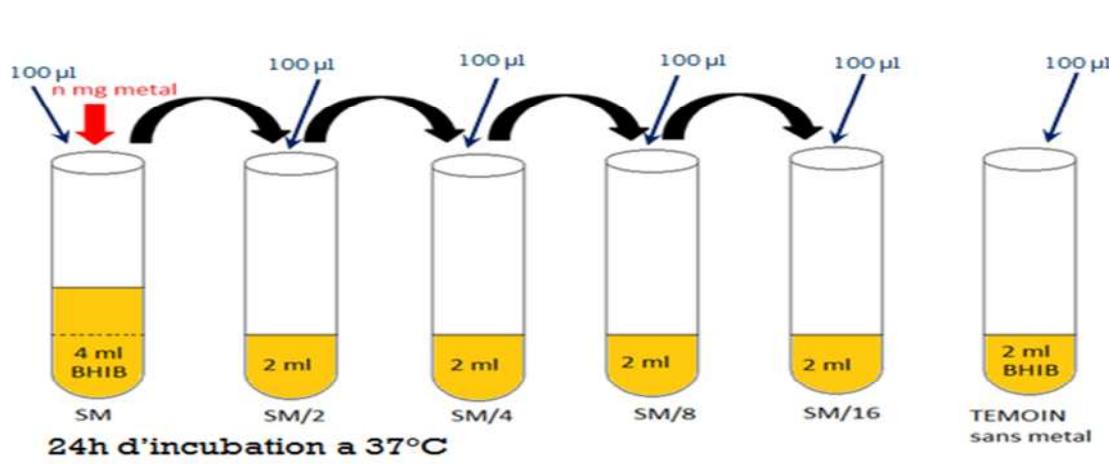


Figure 10 : Schéma expérimental des dilutions métalliques au $\frac{1}{2}$ dans du BHIB.

Matériel et méthodes

Tableau IX : Gammes des concentrations des métaux utilisés pour tester la résistance des bactéries isolées.

Dilutions des métaux	Concentrations des métaux lourds (mg/ml)			
	$K_2 Cr_2 O_7$	Zn SO_4	$Al_2(SO_4)_3$	Cu SO_4
Solutions mères	5	10	10	12,5
1 / 2	2,5	5	5	6,25
1 / 4	1,25	2,5	2,5	3,125
1 / 8	0,625	1,25	1,25	1,5625
1 / 16	0,3125	0,625	0,625	0,78125

2-5-2- Confirmation sur milieu solide

Afin de confirmer l'effet inhibiteur des métaux utilisés sur la survie des souches bactériennes isolées, 24h après le test sur BHIB, on a réalisé des ensemencements sur milieu solide MH : 100 μ l sont prélevés à partir des tubes présentant la CMI et mélangés avec le milieu MH en surfusion. Un essai à partir du tube au-dessous (inférieure) de la CMI a été également fait.

Les souches, standardisées, sont ensemencées à part comme témoins négatifs afin de permettre une comparaison. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant une durée de 24h.

Eventuellement, dans les boîtes inoculées à partir des tubes présentant les CMI, si les métaux testés ont un effet inhibiteur, soit il n'y aura pas de développement bactérien (effet bactéricide) soit il y'aura développement mais inférieur à celui qui sera observé dans la boîte témoin (effet bactériostatique).

2-6- Suivre de l'évolution de croissance des souches

Le suivi de la croissance des souches sélectionnées est effectuée dans le milieu Luria Bertani (LB), dans des ballons contenant : 100 ml du milieu, la CMI des métaux (Tableau X) et 1ml de la suspension bactérienne standardisée.

L'incubation est à 37 °C et des prélèvements stériles sont effectués périodiquement afin d'évaluer la croissance (DO) à 620 nm.

Tableau X : Concentrations des métaux utilisés pour l'évaluation de la croissance des souches sélectionnées.

Métaux	K ₂ Cr ₂ O ₇	Zn SO ₄	Al ₂ (SO ₄) ₃	Cu SO ₄
CMI des métaux (mg/100ml)	250	1000	500	312,5

2-7- Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches sélectionnées

2-7-1- Préparation et standardisation des inoculums

Les souches bactériennes à tester sélectionnées ainsi que les souches tests sont cultivées sur MH. Afin d'avoir un inoculum adéquat, la densité des suspensions bactériennes est diluée à 10⁷ UFC/ml avec de l'eau physiologique stérile.

Les champignons sont cultivés sur milieu Sabouraud. Le temps d'incubation diffère d'une espèce à une autre : 5-6 jours pour *Aspergillus niger* et *Penicillium* sp. et 7-8 jours pour *Botrytis cinerea* à 28°C.

La standardisation des inoculums fongiques a été également effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre (DO_{620 nm}). La charge de l'inoculum utilisée est de 10⁷UFC/ml.

Nous avons testé l'activité sur le milieu Muller-Hinton recommandé pour les tests d'activité antibactérienne, parce qu'il permet une meilleure diffusion des substances bioactives et la gélose de Sabouraud pour la recherche de l'activité antifongique.

2-7-2- Activité antibactérienne

Des disques d'agar bactériens de 7 mm de diamètre, issus de cultures jeunes (18h) des souches isolées sélectionnées, sont déposés au centre des boîtes de Pétriensemencées (en tapis) préalablement par les bactéries tests : *Escherichia coli* (ATCC25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC43300), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*.

Deux essais sont réalisés pour chaque test, accompagnés d'un témoin négatif ne contenant que la souche test et d'un témoin positif représenté par les souches tests inhibées par l'oxytétracycline. L'incubation a lieu à 37°C pendant 24 h.

Le résultat est positif lorsque apparaît, après incubation un halo clair autour de la bactérie présumée douée d'activité antagoniste. La croissance bactérienne des colonies est estimée après incubation par la moyenne de deux diamètres perpendiculaires.

2-7-3- Activité antifongique

La méthode de confrontation par contact direct dans des boîtes de Pétri, décrite par GERBALDO *et al.* (2012), consiste à déposer des cylindres d'agar (7 mm de diamètre) prélevés d'une culture du champignon test, autour duquel sont déposés trois cylindres, à mêmes distances, de la souche à tester supposée antagoniste. Le milieu utilisé est Sabouraud. Chaque combinaison souche à tester-champignon est répétée deux fois.

Cette méthode consiste à évaluer la croissance du champignon par mesure de diamètre (la moyenne de deux diamètres perpendiculaires en mm), après l'incubation adéquate permettant la croissance du champignon ciblé. Celle-ci est constatée à partir du témoin négatif ne contenant que le champignon ; l'incubation est interrompue lorsque la croissance mycélienne arrive aux bords de la boîte de Pétri.

Le témoin positif est constitué des champignons inhibés par l'amphotéricine B. Après incubation, le test positif se traduit par l'inhibition de la croissance du champignon autour des trois disques bactériens.

2-7-3-1- Evaluation de la croissance mycélienne

Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne des champignons tests est calculé selon la formule suivante décrite par ALBUQUERQUE (2006) :

$I (\%) = (Dt - De)/Dt \times 100$, **Dt** étant la croissance diamétrale (mm) du témoin et **De** la croissance diamétrale (mm) du champignon en présence des bactéries à tester.

2-8- Analyse statistique

Les résultats sont présentés par la moyenne suivie de l'écart-type (n=2) pour chaque extrait en utilisant le test de Student.

L'analyse statistique est réalisée par le logiciel Statistica version 7.1 en utilisant le test de l'analyse de la variance (ANOVA) à un facteur. Ce test nous permet de vérifier si les échantillons sont issus de la même population ou présentant des différences significatives.

S'il existe une différence significative, le test de l'ANOVA est suivi par le test complémentaire de Newman-Keuls afin d'établir les différents groupes homogènes. Le niveau de signification était de 5%.

CHAPITRE II
RESULTATS ET
DISCUSSION

1- Isolement et dénombrement de la microflore du sol pollué par les métaux lourds

A partir d'échantillons de boues métalliques et de sol pollué par les métaux lourds prélevés au niveau du site de l'ENIEM, on a pu isoler huit souches bactériennes.

L'isolement a été effectué sur gélose nutritive (GN) (Figure 11).

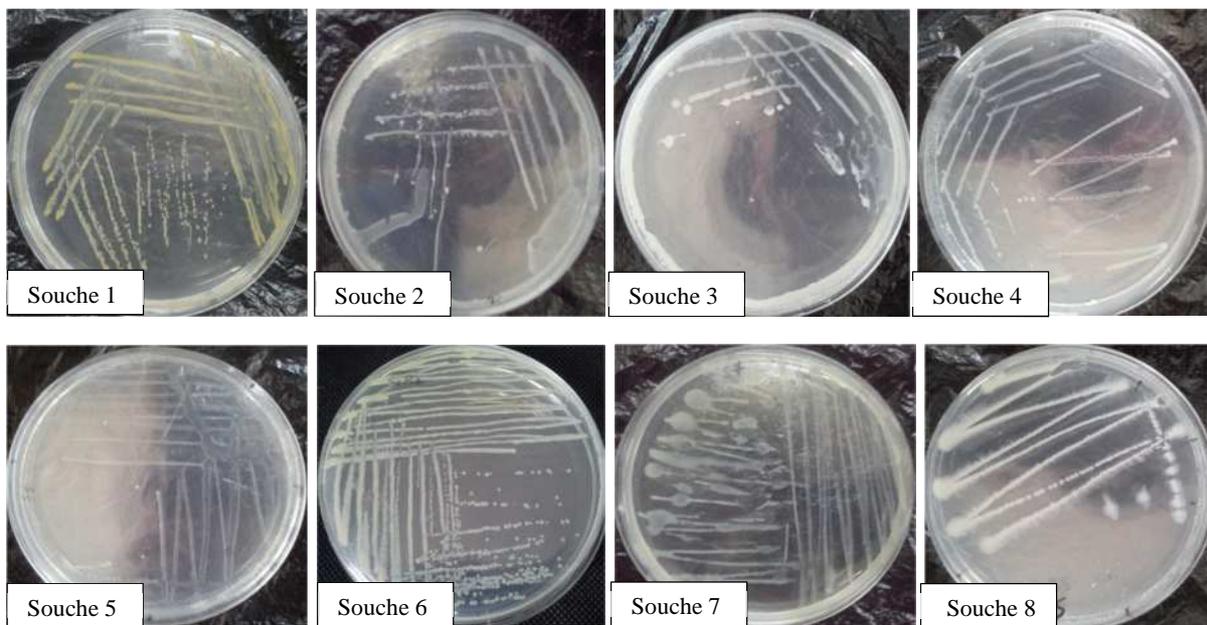


Figure 11 : Culture sur milieu gélose nutritive des souches isolées.

1-1- Dénombrement de la microflore totale tellurique

Après culture à 37°C pendant 72h, nous avons procédé au dénombrement en choisissant la boîteensemencée à partir de la plus faible dilution (dilution 10^{-6}) (voir annexe 4).

Le dénombrement de la microflore dans notre échantillon de sol fait ressortir un taux de 66×10^7 UFC/ml équivalent de $16,5 \times 10^7$ UFC/g de sol.

La valeur obtenue est du même ordre de grandeur que celle décrite sur d'autres sites soit entre 10^5 et 10^8 UFC/g sol sec (WELLINGTON *et al.*, 1992 ; POWLSON *et al.*, 2000 ; SMITH *et al.*, 2001). De nombreux auteurs ont signalé que la présence de métaux lourds diminuait la biomasse microbienne soit directement, soit indirectement en inhibant certaines propriétés biochimiques du sol indispensables à leur survie (KANDELER *et al.*, 1996 ; KUPERMAN et CARREIRO, 1997 ; SMITH *et al.*, 1997 ; BÅÅTH *et al.*, 1998 ; KELLY *et al.*, 1999 ; KONOPKA *et al.*, 1999 ; EKALUND *et al.*, 2003).

Résultats et discussion

Le dénombrement effectué montre une biomasse élevée pour un sol hautement pollué par les éléments traces métalliques (ETMs), ce qui montre les prémisses d'une microflore adaptée aux fortes concentrations en ETMs. L'abondance de la végétation pourrait en être la cause, favorisant le développement des microorganismes grâce aux exsudats racinaires où ils puiseraient les nutriments nécessaires à leur développement. Comme pourraient le confirmer les résultats de SAULNIER (2011) qui a obtenu une biomasse élevée ($9,3 \times 10^7$ UFC/g) d'un échantillon prélevé d'un sol contaminé par les métaux lourds présentant une végétation et une biomasse plus faible d'un échantillon prélevé d'un sol contaminé par les ETMs mais dépourvu de végétation ($4,3 \times 10^5$ UFC/g de sol).

2- Identification des souches isolées

Les souches isolées ont été identifiées macroscopiquement, par une observation à l'œil nu des colonies ; microscopiquement, par la coloration de Gram et enfin biochimiquement par la mini-galerie classique.

2-1- Identification morphologique

2-1-1- Aspect macroscopique

L'étude macroscopique des souches isolées a porté sur divers critères caractérisant les colonies, après repiquage sur GN. Elle a été faite à l'œil nu et grâce à la loupe binoculaire. Sept critères sont retenus : la forme, l'aspect, l'élévation, la surface ; la consistance, l'opacité et la couleur.

Les résultats de la culture sur gélose nutritive se traduisent par l'apparition de colonies présentant différents aspects (Tableau XI).

Résultats et discussion

Tableau XI: Résultats de l'examen macroscopique des souches isolées.

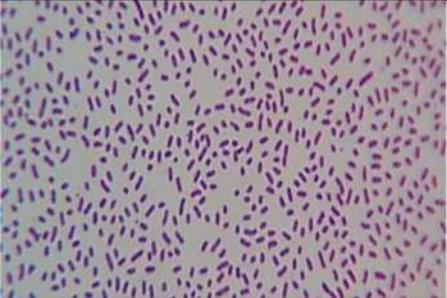
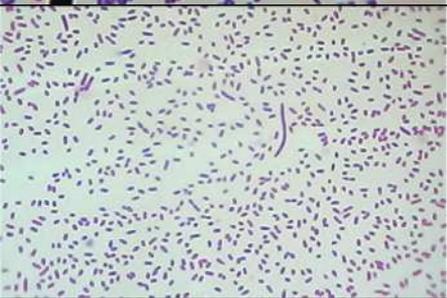
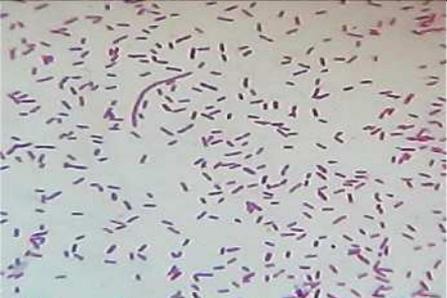
Souches	Forme	Aspect	Élévation	Surface	consistance	Couleur	Opacité
1	ronde régulière	non punctiforme	convexe	lisse brillante	humide homogène	orange	opaque
2	ronde régulière	non punctiforme	ombiliquée	rugueuse mate	Sèche homogène	blanchâtre	translucide
3	ronde régulière	non punctiforme	légèrement convexe	lisse brillante	humide homogène	transparente	transparente
4	ronde régulière	non punctiforme	légèrement convexe	lisse brillante	humide homogène	blanchâtre	translucide
5	lenticulaire	punctiforme	élevée	lisse mate	sèche homogène	blanchâtre	opaque
6	lenticulaire	punctiforme	élevée	lisse mate	Humide homogène	jaune oranger	opaque
7	ronde régulière	non punctiforme	plate	Lisse mate	Sèche homogène	transparente	transparente
8	régulière	non punctiforme	convexe	rugueuse mate	Sèche granuleuse	blanchâtre	opaque

2-1-2- Aspect microscopique

La coloration différentielle de Gram réalisée à partir des colonies développées sur GN, montre la présence majoritaire de bactéries à Gram négatif. Elles se présentent sous la forme de colibacilles, de bacilles de différentes tailles, isolés ou arrangés en palissade ou en lettre V. Seule la souche 8 qui est à Gram positif et se présente sous forme de bacilles droits ; parfois déformés par la présence de spores : il s'agit d'une espèce sporulant. Les résultats sont représentés dans le tableau XII.

Résultats et discussion

Tableau XII: Résultats de la coloration de Gram.

Souches	Formes	Arrangement		Gram
1	Colibacilles	Isolés	-	
2	Colibacilles	Isolés.	-	
3	Bacilles	Isolés	-	
4	Long bacilles fins	Isolés ; en lettre V	-	
5	Bacilles	Isolés	-	

Résultats et discussion

6	Bacilles	Isolés ; en diplobacilles.	-	
7	Petits bacilles fins	Isolés ; en palissade.	-	
8	Gros bacilles droits	Isolés ; en diplobacilles ; en palissade.	+	

2-2- Identification biochimique

L'identification est complétée par la recherche des caractères biochimiques tels que la présence d'enzymes, la source de carbone utilisée, les voies métaboliques utilisées, etc. (Tableau XIII).

Les résultats obtenus montrent que la plus part des souches isolées sont aéro-anaérobie facultatives, métabolisant les sucres (glucose, lactose et/ou saccharose et le mannitol aussi pour quelque souches) par voie oxydative et fermentaire ; avec ou sans production de gaz ; sans production d'H₂S sauf pour la souche 6. On a également noté que toutes les souches ne produisent pas d'indole, ne dégradent pas la gélatine et seules les souches 2 et 7 sont capables de dégrader le tryptophane par la tryptophane désaminase (TDA). A l'exception des souches 3 et 4, le reste des souches isolées se sont avérées capables de dégrader l'urée.

Résultats et discussion

Tableau XI : Résultats de la caractérisation biochimique des souches isolées.

Souches tests	Enzymes respiratoires			Fermentation des sucres					Métabolisme protidique					Identification					
	Nitrate réductase	Oxydase	Catalase	Glucose	Lactose et/ou Saccharose	Mannitol	Citrate de sodium	ONPG	RM	VP	H ₂ S	Production de Gaz	Mobilité		Uréase	Gélatinase	Indole	TDA	
1	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	/	-	-	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
2	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	Entérobactérie
3	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
4	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
5	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	/	-	-	-	<i>Citrobacter</i> sp.
6	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
7	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	/	-	+	+	Entérobactérie
8	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	/	-	-	-	<i>Bacillus</i> sp.

Résultats et discussion

L'identification a été sur la base des caractéristiques morphologiques et biochimiques et techniques classiques selon le manuel de Bergey de bactériologie déterminant (Bergey's manual of determinative bacteriology, 9ème édition) (BERKLEY *et al.*, 1984 ; CLAUS *et al.*, 1986).

Cependant, l'identification et la caractérisation de ces microorganismes à l'aide de ces méthodes classiques restent imprécises. Le recours à l'utilisation des outils moléculaires reste l'unique voix fiable et précise pour ce genre d'étude. De plus, vu que le laboratoire ne disposant pas de tous les réactifs nécessaires à une identification complète, nos résultats sont donc approximatifs.

Conformément à nos résultats, plusieurs auteurs ont rapporté l'isolement, à partir de sites pollués par les métaux lourds, de bactéries appartenant aux genres *Bacillus* (SHAKOORI *et al.*, 2000 ; CAMARGO *et al.*, 2003 ; MISHRA et DOBLE, 2008 ; ZAHOOR et RAHMAN, 2009 ; KACAR, 2015), *Pseudomonas* (SHILPI *et al.*, 2003 ; DEREDJIAN, 2010 ; MISHRA *et al.*, 2012 ; OVES *et al.*, 2013 ; YAN *et al.*, 2015) et des entérobactéries (BAGAI *et al.*, 2007 ; NIES, 2007 ; MACOMBER et IMLAY, 2009 ; LONG *et al.*, 2012 ; SU *et al.*, 2012).

A travers son étude, MEZAACHE (2012) a démontré que dans le sol, les *Pseudomonas* représentent une grande fraction de la communauté microbienne partageant le milieu avec des commensaux représentés principalement par les genres *Bacillus* et *Actinomyces*.

Les membres du genre *Bacillus* généralement trouvés dans le sol, représentent un large éventail de capacités physiologiques, permettant à l'organisme de se développer dans tous les milieux et de rivaliser avantageusement avec d'autres organismes dans l'environnement en raison de leur capacité à former des spores extrêmement résistantes et produire des métabolites qui ont des effets antagonistes sur les autres micro-organismes (KUTA, 2009).

2- Résistance aux métaux lourds

Parmi les huit souches isolées, cinq ont été choisies pour le test de la métallo-résistance ; et ce vis-à-vis de dichromate de potassium, sulfate de zinc, d'aluminium et de cuivre. Les souches en question sont : *Pseudomonas* sp.1 (souche1), *Pseudomonas* sp.3 (souche 3), *Pseudomonas* sp.4 (souche 4), l'entérobactérie (souche 7) et *Bacillus* sp. (souche 8).

Résultats et discussion

Des études antérieures ont rapporté la présence de souches bactériennes du genre *Bacillus* dans des environnements contaminés par les métaux lourds (KAMALA-KAANAN et LEE, 2008; GUL-SEKER et MATER 2009 ; NITHYA *et al.* 2011; KACAR et KOCYIGIT, 2013). Il est également le cas de plusieurs souches appartenant au genre *Pseudomonas* connues pour leur résistance aux ETMs (SHILPI *et al.*, 2003 ; MATYAR *et al.*, 2010 ; OVES *et al.*, 2013 ; YAN *et al.*, 2015).

2-1- Détermination de la concentration minimale inhibitrice des métaux

Nous avons testé la résistance des souches isolées aux différents métaux par la méthode de dilution en milieu liquide qui est le BHIB. Après 24h d'incubation à 37°C, les CMI sont déterminées à partir des tubes contenant les plus faibles concentrations métalliques ne présentant pas de développement bactérien. Le tableau XIV représente les résultats obtenus.

Tableau XIV : Les concentrations minimales inhibitrices (mg/ml) des métaux lourds vis-à-vis des souches testées.

Métaux lourds	Souches bactériennes				
	<i>Pseudomonas</i> sp.1	<i>Pseudomonas</i> sp.3	<i>Pseudomonas</i> sp.4	Entérobactérie	<i>Bacillus</i> sp.
CMIs des Dichromates de potassium (mg/ml)	1,25	2,5	2,5	2,5	2,5
CMIs des Sulfates de zinc (mg/ml)	10	10	10	10	10
CMIs des Sulfates d'aluminium(mg/ml)	5	5	5	5	5
CMIs des Sulfates de cuivre (mg/ml)	3,125	3,125	3,125	3,125	3,125

A partir de ce tableau, on note que les valeurs des CMI des métaux obtenues sont quasi similaires vis-à-vis de toutes les souches : 10 mg/ml (62,08 mM) de sulfates de zinc, 5 mg/ml (35,17 mM) de sulfate d'aluminium, 3,125 mg/ml (19,57 mM) de sulfate de cuivre, sauf pour le dichromate de potassium où on observe une légère sensibilité de la S1 (1,25 mg/ml) (04,24 mM) par rapport aux autres souches (2,5 mg/ml) (8,5 mM) (Figure 12).

Résultats et discussion

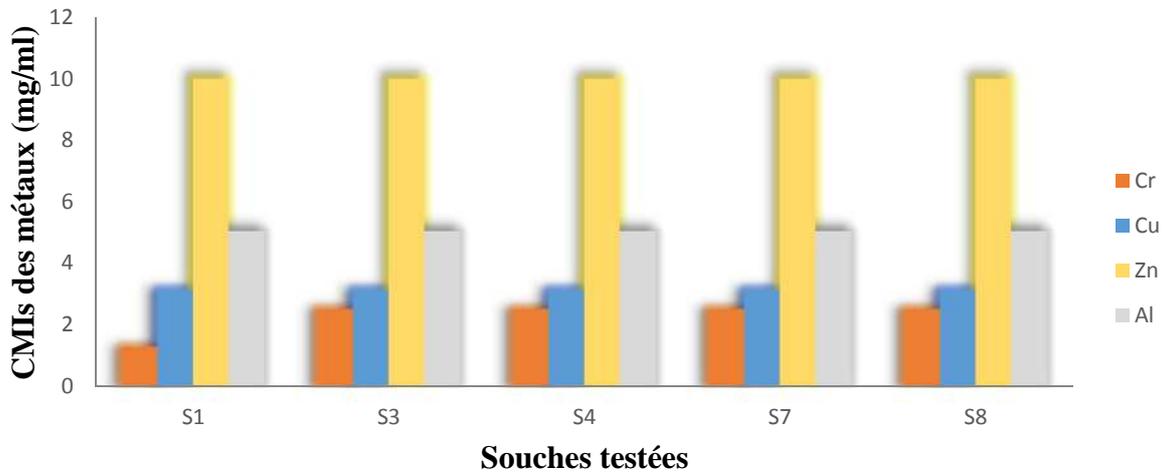


Figure 12 : Concentrations minimales inhibitrices des métaux en mg/ml.



Figure 13 : Détermination de la CMI du chrome en milieu liquide pour *Pseudomonas* sp.1.

(+) Croissance bactérienne. (-) Absence de croissance bactérienne.

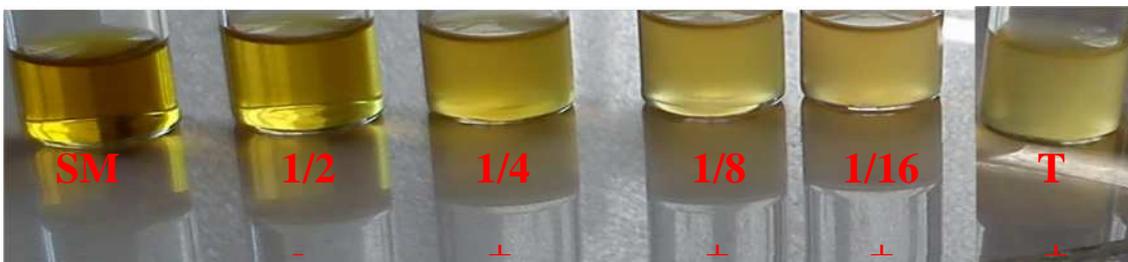


Figure 14: Détermination de la CMI du chrome en milieu liquide pour *Bacillus* sp.

(+) Croissance bactérienne. (-) Absence de croissance bactérienne.

Résultats et discussion

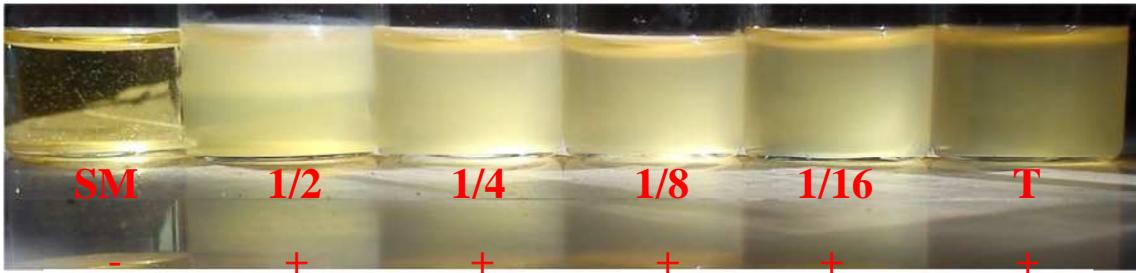


Figure 15 : Détermination de la CMI du sulfate de zinc en milieu liquide pour *Pseudomonas* sp.3.

(+) Croissance bactérienne. (-) Absence de croissance bactérienne.

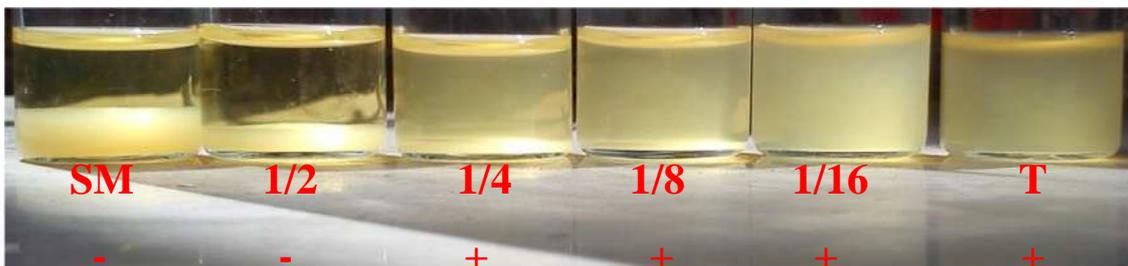


Figure 16 : Détermination de la CMI du sulfate d'aluminium en milieu liquide pour *Pseudomonas* sp.4.

(+) Croissance bactérienne. (-) Absence de croissance bactérienne.

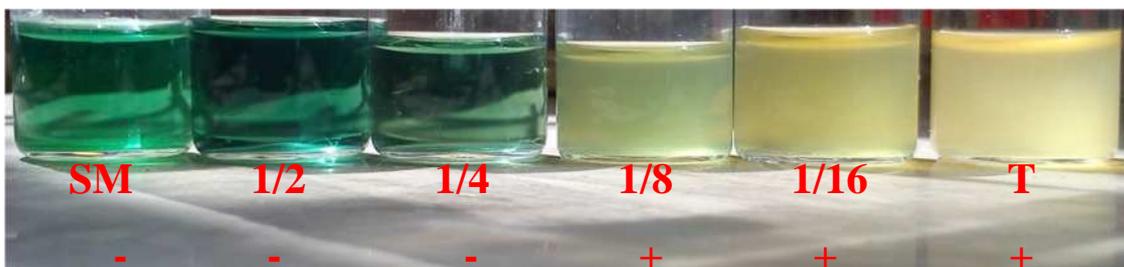


Figure 17 : Détermination de la CMI du sulfate de cuivre en milieu liquide pour la souche 7.

(+) Croissance bactérienne. (-) Absence de croissance bactérienne.

A comparer les concentrations des métaux auxquelles nos bactéries résistent, avec les CMI des mêmes métaux trouvées dans la littérature scientifique (SHILPI *et al.*, 2003 ; BAGAI *et al.*, 2007 ; OZTURK *et al.*, 2008 ; VERMA *et al.*, 2009 ; DEREDJIAN, 2010 ; HE *et al.*, 2010 ; MATYAR *et al.*, 2010 ; BECERRA-CECERRA-CASTRO, 2012 ; LONG *et al.*, 2012 ; SU *et al.*, 2012 ; OVES *et al.*, 2013 ; KACAR, 2015 ; YAN *et al.*, 2015) , on constate

Résultats et discussion

que les souches bactériennes isolées montrent une résistance accrue à des concentrations très élevées en sulfate de zinc, d'aluminium, de cuivre et du dichromate de potassium ; ainsi :

Concernant les souches de *Bacillus* sp., plusieurs auteurs ont indiqué leurs résistance au chrome (CAMARGO *et al.*, 2005) ; elles sont capables de réduire le chrome VI en chrome III (CAMPOS *et al.*, 1995 ; CAMARGO *et al.*, 2003 ; ABOU-SHANAB *et al.*, 2007 ; VERMA *et al.*, 2009).

Dans leurs études qui se portaient sur du sol contaminé par le chrome et des effluents de tannerie, SHAKOORI *et al.* (2000), SARANGI et KRISHNAN (2008) ont pu isoler des souches bactériennes de *Bacillus* sp. pouvant être inhibées à des concentrations de 2mM de chrome VI.

Pareillement, L'étude menée par MISHRA et DOBLE (2008) a indiqué qu'une souche bactérienne de *Bacillus marisflavi*, isolées à partir des tanneries et des rejets des eaux usées issues des industries métallurgiques, peut tolérer des concentrations en chrome VI allant jusqu'à 3,05 mM ; dépassant légèrement le résultat obtenu pour la souche 1 qui a résisté à 2,12 mM de K₂Cr₂O₇.

Par ailleurs, ZAHOOR et RAHMAN (2009) ont indiqué la résistance d'une souche de *Bacillus* sp., isolée à partir d'effluents industriels, à des concentrations de 4800 µg/ml (soit 4,8 mg/ml) de chrome VI. Contrairement à nos résultats, la souche *Bacillus* sp. est bien résistante au chrome VI mais pas au-delà de 1,25 mg/ml (CMI).

En accord avec nos résultats, *Vigribacillus* sp. qui est une bactérie halophile à Gram positif isolée à partir d'un sol riche en sel en Inde, a montré une résistance à 1 mg/ml de chrome VI (MISHRA *et al.*, 2012). C'est effectivement le résultat trouvé pour tous nos isolats (1,25 mg/ml) mis à part *Pseudomonas* sp.1.

Egalement, OVES *et al.* (2013) ont indiqué qu'une souche bactérienne de *Pseudomonas* sp. isolée à partir d'un sol contaminé par des métaux lourds, présente une tolérance à une concentration de 1,8 mg/ml de chrome VI.

Une étude faite par CONGEEVARAM *et al.* (2007) a signalé qu'une souche de *Micrococcus* sp. isolée à partir d'un échantillon prélevé d'une industrie métallurgique, résiste à 8 mg/ml de chrome VI.

Résultats et discussion

Il a été montré qu'une souche de *Methylobacterium mesophilium* MU141 connue pour sa résistance au chrome VI, lorsqu'elle est exposée à des concentrations de 15 et 35 ppm de chrome VI, elle produit plus d'exopolysaccharides (EPS) que ses cellules de contrôle, aboutissant ainsi à la séquestration de ce métal (OZTURK *et al.*, 2008)

Au sujet du zinc, ABOU-SHANAB *et al.* (2007) ont isolé à partir d'un sol riche en serpentine et des rhizosphères d'*Alyssum murale* des souches bactériennes résistantes à une concentration de 10 mM en sulfure de zinc (ZnSO₄).

Plus tard, les études de HE *et al.* (2010), ZHANG *et al.* (2012) encore sur des souches rhizosphériques de plantes hyperaccumulatrices de métaux lourds, ont signalé des CMI variant de 3,8 à 15,3 mM de zinc.

Les travaux de CHENG et Li (2009) et de ZAHOOR et RAHMAN (2009) sur des souches de *Bacillus* sp. ont rapporté des CMI de zinc variant entre 0,8 mg/ml et 0,7 mg/ml respectivement.

D'autres souches isolées par RYAN *et al.* (2005) se sont avérées résistantes à des concentrations allant jusqu'à 4,5 mg/ml de zinc ; ce qui est en accord avec nos résultats puisque les cinq souches que nous avons isolées ont pu résister à 5 mg/ml de ZnSO₄.

DEREDJIAN (2010) a trouvé des souches de *P. aeruginosa* environnementales capables de croître en présence de métaux lourds à des concentrations supérieures à 4,58 mg/ml de Zn²⁺ et 0,1145 mg/ml de Cu²⁺. Alors que les souches nosocomiales étaient capables de croître à la même concentration de Zn²⁺ ; approuvant nos résultats obtenus à l'égard du zinc (5 mg/ml), mais semblaient être plus résistantes à des concentrations supérieures de Cu²⁺ (0,458 mg/ml). Toutes les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ne semblent pas tolérer les mêmes concentrations en métaux, selon cet auteur, ceci est dû aux variations au niveau de la régulation des gènes codant pour les pompes à efflux participant à l'extrusion des métaux hors de la cellule.

Une autre étude réalisée en 2012 par BECERRA-CECERRA-CASTRO a rapporté la résistance au zinc de souches isolées de sol contaminé par le Zn et le Cu, à des concentrations allant jusqu'à 25 mM. Alors que les cinq isolats bactériens de sols agricoles du centre du Chili ont montré une résistance au cuivre CMI de 0,71 à 1,0763 mg/ml (ALTIMIRA *et al.*, 2012).

Résultats et discussion

Plus récemment, l'étude menée par KACAR (2015) au lac Bafa en Turquie, a rapporté des CMI de grandeurs allant jusqu'à 1,374 mg/ml pour le Cu et le Zn, et 0,687 mg/ml pour le Cr vis-à-vis de la souche *B. cereus BF1*.

Dans le but de déterminer l'importance de la pompe CusA dans la résistance au cuivre, SU *et al.* et LONG *et al.* (2012) ont remarqué que les CMI du CuSO₄ chez une souche *E. coli* portant des pompes CusA mutées été uniformément 0,5 mM, identiques à celles des souches clonées par des vecteurs vides et beaucoup moins des 2,25 mM chez le type sauvage.

Les résultats de KERMANSHAHI *et al.* (2007) indiquent que le type de bactéries le plus résistantes au cuivre est *Bacillus* à une concentration de 5 mM ainsi le niveau élevé de la CMI était probablement dû à la structure génétique de la bactérie ou les facteurs environnementaux. Des CMI de cuivre un peu plus supérieures ont été enregistré vis-à-vis d'*Escherichia coli* (10mM) (ROANE et KELLOGG, 1995).

SONGCAN *et al.* (2015) approuvent nos résultats en rapportant une CMI de 16 mM de sulfate de cuivre vis-à-vis de la souche LSJC7.

Par ailleurs, TSIRIDIS *et al.* (2006) ont démontré que la toxicité du Cu sur *Vibrio fischeri* est nettement réduite en présence d'acides humiques. Cette réduction est expliquée par la formation de complexe du cuivre avec la matière organique constituant l'humus, diminuant sa biodisponibilité.

SHILPI *et al.* (2003) ont rapporté que des isolats de la famille des Pseudomonaceae résistantes à l'aluminium et au cuivre, isolés d'un sol contaminé, ont montré un niveau de tolérance de 0,711274 mg/ml et 1,007142 mg/ml respectivement. De leur côté, SANTO *et al.* (2010) ont cité l'inhibition de *Pseudomonas oleovorans* par 0,5725 mg/ml de cuivre.

Nos résultats dépassent légèrement ceux obtenus par AL-TALIB *et al.* (2016) dans une étude qui étaye l'activité antimicrobienne du sulfate d'aluminium contre des bactéries commensales de l'homme. *Micrococcus luteus*, *B. subtilis* et *Staphylococcus epidermidis* ont montré de grandes CMI de 3,75 ; 5,00 et 7,50 mg/ml, respectivement.

Dans le cadre d'une étude sur les effets toxiques combinés de métaux lourds et d'antibiotiques sur la souche *P. fluorescens ZY2* isolée des eaux usées de porcherie, YAN *et al.* (2015) ont enregistré des CMI de Pb, Cu, Zn, Cr et d'Hg qui étaient 0,125 ; 0,1 ; 0,1 ; 0,1 et 0,025 mg/ml respectivement. La toxicité biologique de l'Hg était la plus grande et celle du

Résultats et discussion

Pb la plus petite, ce qui était différent des résultats rapportés par MATYAR *et al.* (2010) (Cu> Cd> Mn> Zn> Cr> Pb) et pouvait mettre en cause l'habitat bactérien. Ces résultats cités diffèrent également de ce que nous avons constaté puisque l'ordre de toxicité était Cr > Cu> Al> Zn.

La présence de souches bactériennes résistantes aux métaux lourds dans les échantillons de sol pollué par ces derniers, ne peut être expliquée que par la mise en place de mécanismes d'adaptation à cet environnement hostile. De telles résistances sont souvent liées à des gènes plasmidiques ou autre élément transposable (transfert horizontal) (SILVER et MISRA, 1988 ; SAULNIER, 2011).

Par ailleurs, les bactéries ont été soumises à la présence des métaux depuis leur émergence sur Terre. Il est de ce fait peu probable que les mécanismes à l'origine de résistance aient été sélectionnés suite à des pollutions anthropiques récentes mais qu'elles soient plutôt apparues au cours de leur évolution suite à une pression métallique naturelle (SILVER et PHUNG, 2005).

AL-DJEBOURI (1985), ZELIBOR *et al.* (1987) et DIAZ-RAINIA *et al.* (1994) à travers leurs études, avaient également relié la résistance des microorganismes aux métaux rencontrés dans des sites donnés, aux pressions sélectives exercées par ces polluants au sein de ce site sur les populations bactériennes qui y vivent.

Suite à la détermination des CMI des quatre métaux, la densité optique a été mesurée dans tous les tubes et à partir des résultats, des courbes sont tracées en fonction des différentes concentrations métalliques.

Globalement, la croissance des différents isolats bactériens est influencée par la présence des métaux. La diminution de la turbidité est proportionnelle à l'augmentation de leur concentration.

D'après les figures 18, 19, 20, 21 on remarque d'abord une densité optique très faible (inhibition) pour toutes nos souches pour les concentrations les plus élevées en métal : de 5 à 2,5 mg/ml pour le chrome excepté pour la souche 1 pour qui l'inhibition s'étend jusqu'à 1,25 mg/ml dû à une CMI plus faible, de 12.5 mg/ml à 3,125 mg/ml pour toutes les souches stressées avec du Cu et de 10 mg/ml à 5 mg/ml pour la totalité des souches confrontées à l'Al et à 10 mg/ml en ce qui concerne les souches en contact avec le Zn. Ensuite, on enregistre une

Résultats et discussion

importante hausse constante de la DO en fonction de la diminution de la concentration du métal. Les plus élevées sont à l'actif des souches 7 et 8, viens après la souche 3 et la souche 4 et en dernier la souche 1 pour le Cr (Figure 18). En ce qui concerne le Cu, l'Al et le Zn les souches sorties du lot en matière de DO élevées, sont respectivement la souche 8, 4 et la souche 7 (Figures 19, 20, 21).

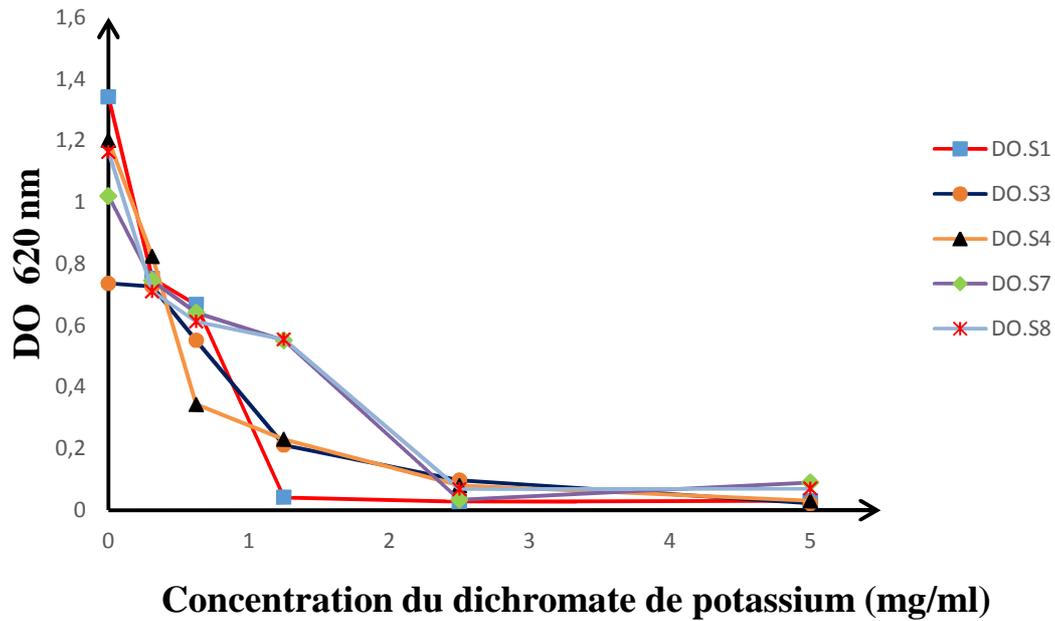


Figure 18 : Croissance des souches bactériennes en différentes concentrations du dichromate de potassium.

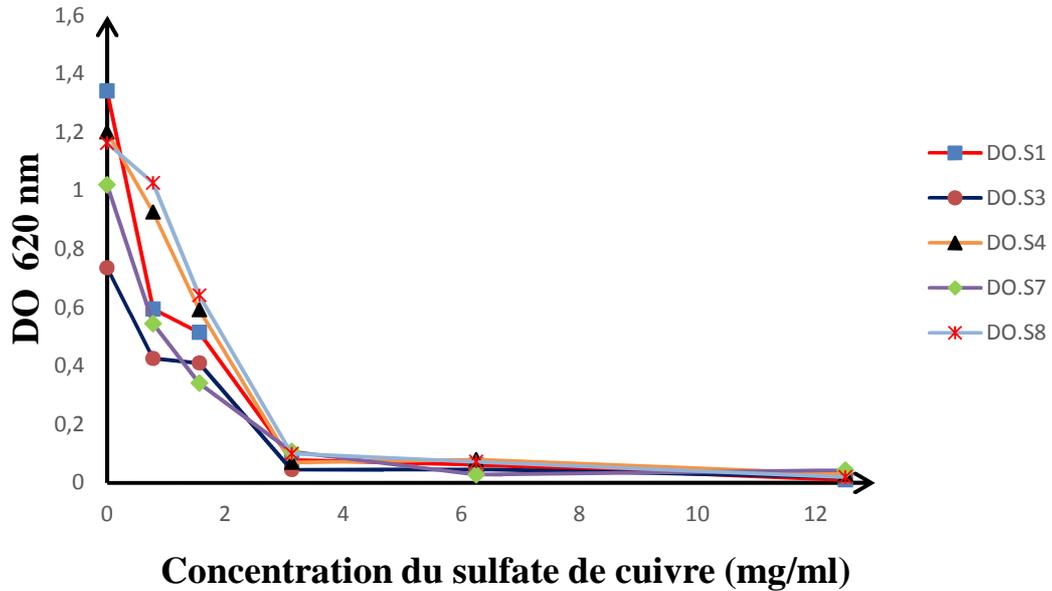


Figure 19 : Croissance des souches bactériennes en différentes concentrations du sulfate de cuivre.

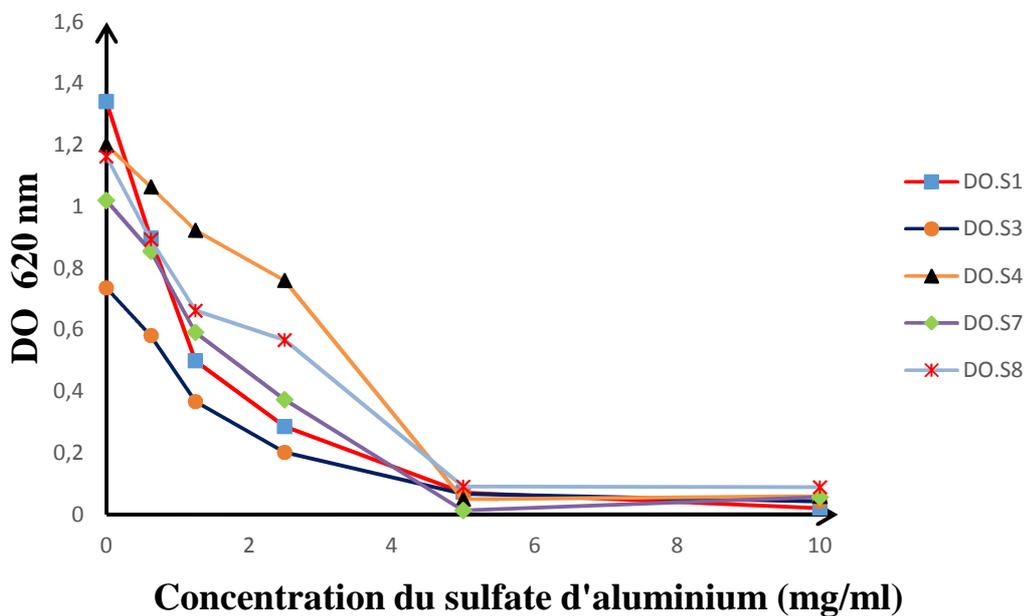


Figure 20 : Croissance des souches bactériennes en différentes concentrations du sulfate d'aluminium.

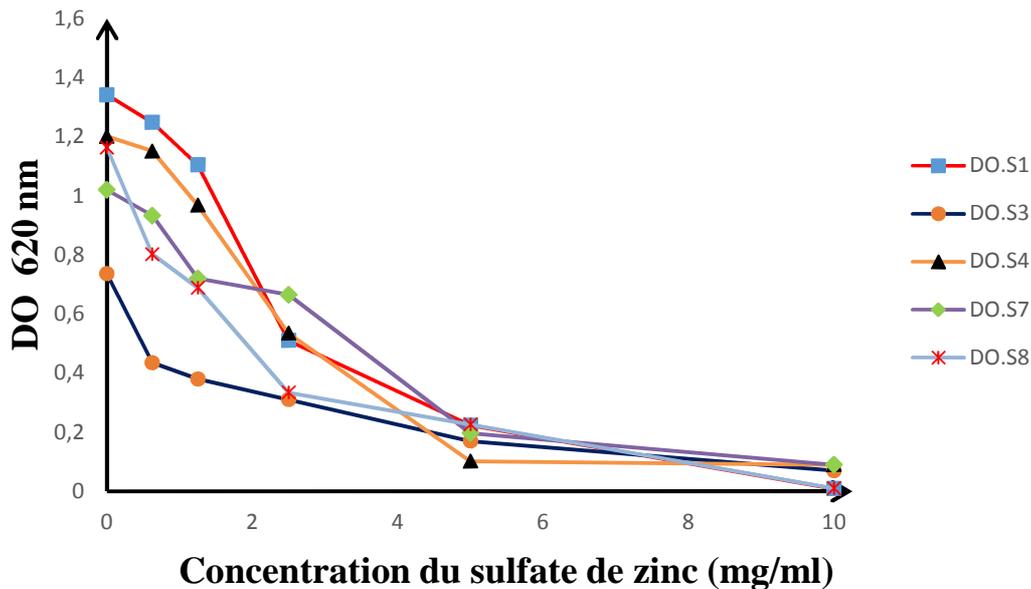


Figure 21: Croissance des souches bactériennes en différentes concentrations du sulfate de zinc.

D'après ROUX *et al.* (2001) la diminution de la croissance cellulaire des bactéries aux plus fortes concentrations des métaux lourds, est sans doute liée à une dépense énergétique plus importante liée aux mécanismes de résistance aux métaux.

Malgré la similarité des CMI des métaux, nous observons une réactivité différente des souches vis-à-vis de ces derniers en termes de biomasse. Cette réponse différente des bactéries isolées pourrait être due à une différence dans la composition de leur paroi cellulaire ou bien due aux variations des mécanismes de résistance SHRUTI *et al.* (2012).

La souche 1 soupçonnée appartenir au genre *Pseudomonas*, été un peu plus sensible à l'égard du chrome comparée aux autres souches isolées. Cette différence est attribuée au fait que les CMI sont fonction du métal et de la souche. Une hypothèse crédible est proposée par ALTMIRA (2012) qui a mis en cause les différentes affinités qu'ont les sidérophores pour les métaux.

Cependant, il est important de noter aussi, qu'il n'est pas à exclure la possibilité d'interaction des constituants du milieu de culture avec les métaux ce qui pourrait diminuer leur toxicité tels que les peptones et l'extrait de levure (GRASS *et al.*, 2011). De plus, il n'y a pas de concentrations standards pour définir une résistance à un métal quelconque.

2-2- Confirmation sur milieu solide

Les subcultures réalisées sur milieu MH suite à l'obtention des CMI ont permis d'observer une action bactériostatique de l'aluminium sur la souche 4 et 8 ; du zinc sur toutes les souches (forte action bactériostatique) , et une action bactéricide du chrome et du cuivre envers toutes les souches exceptée la souche 8.

Quelques résultats sont illustrés dans les figures suivantes :

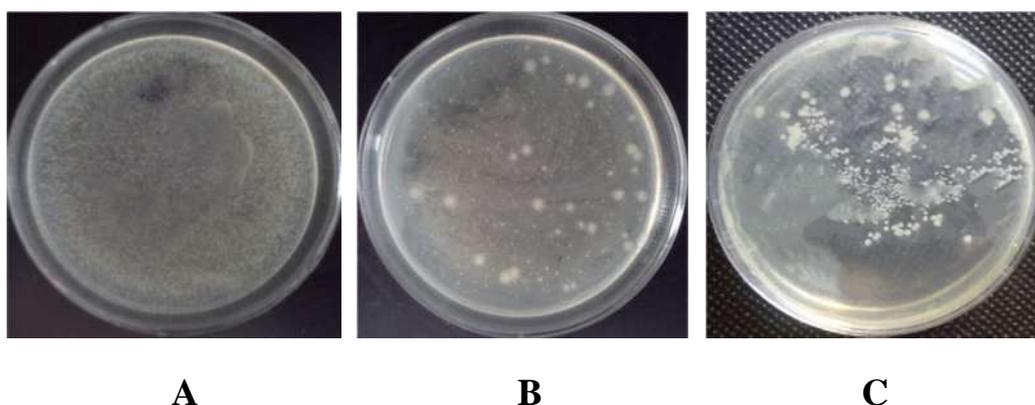


Figure 22: Effet inhibiteur de l'aluminium sur *Pseudomonas* sp.4 testé sur gélose Mueller Hinton. (A) Témoin négatif sans métal. (B) La dilution 1/4 d' $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$. (C) La dilution 1/2 d' $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ présentant la CMI.

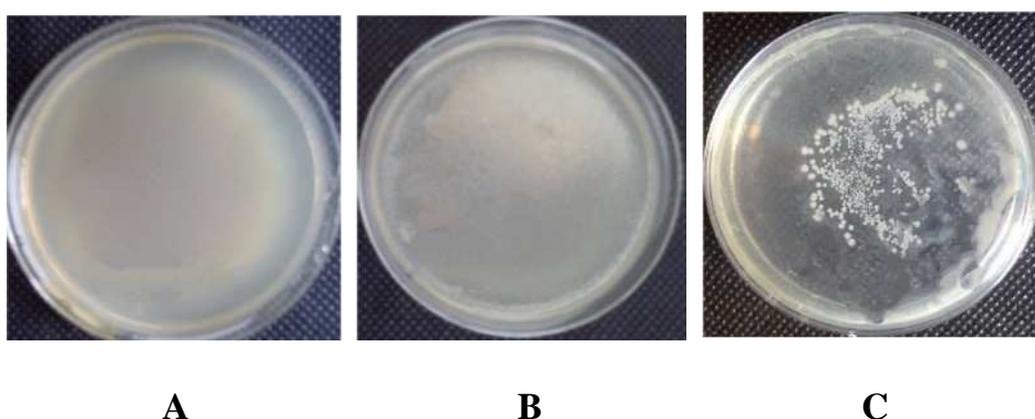


Figure 23 : Effet inhibiteur du zinc sur la souche 7 testé sur gélose Mueller Hinton. (A) Témoin négatif sans métal. (B) La dilution 1/2 de ZnSO_4 . (C) La solution mère de ZnSO_4 présentant la CMI.

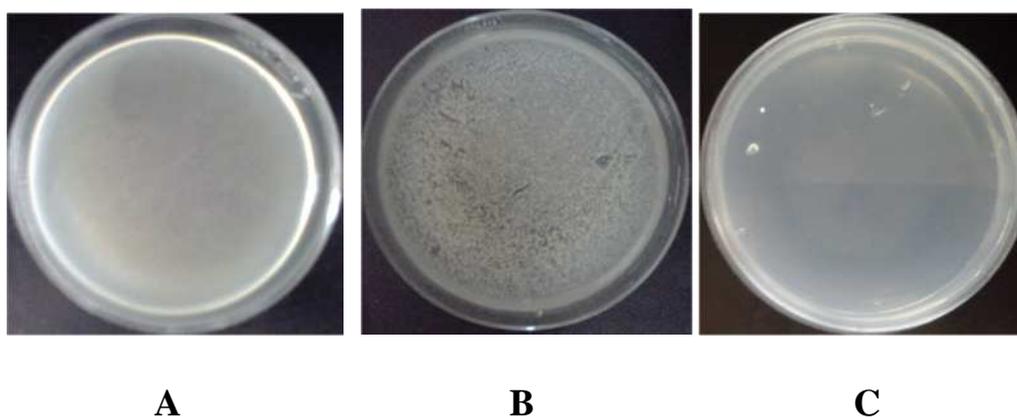


Figure 24 : Effet inhibiteur du chrome sur *Pseudomonas* sp.3 testé sur gélose Mueller Hinton. (A) Témoin négatif sans métal. (B) La dilution 1/8 de $K_2Cr_2O_7$. (C) La dilution 1/4 de $K_2Cr_2O_7$ présentant la CMI.

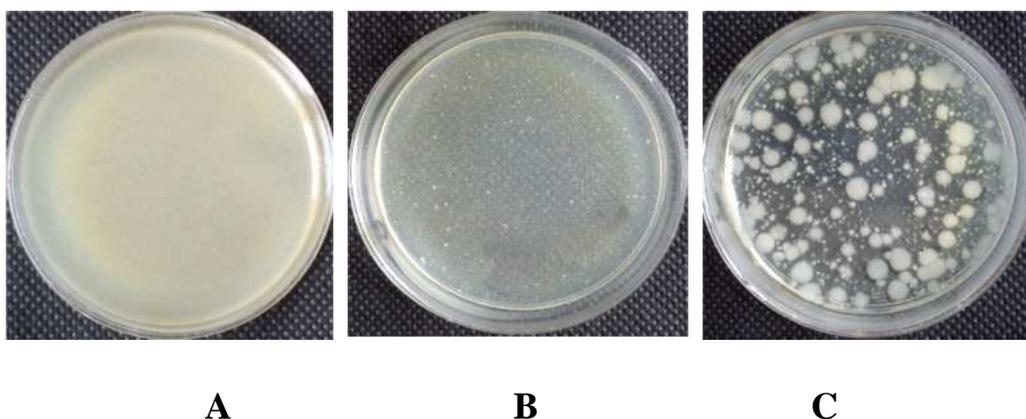


Figure 25: Effet inhibiteur du cuivre sur *Bacillus* sp. testé sur gélose Mueller Hinton. (A) Témoin négatif sans métal. (B) La dilution 1/8 de $CuSO_4$. (C) La dilution 1/4 de $CuSO_4$ présentant la CMI.

3- Etude de l'influence des métaux sur la croissance des souches bactériennes

Pour affirmer l'effet des éléments traces métalliques sur l'évolution de la croissance bactérienne, nous avons cultivé chacune de nos souches dans le milieu Luria Bertani avec les CMI des métaux obtenues de nos précédentes expériences. Le suivi de la croissance était pendant 62h en procédant à des lectures de DO à un intervalle de temps régulier dans la mesure du possible selon les horaires du laboratoire. L'expérience est illustrée dans les figures qui suivent (Figures 26 à 30).

Résultats et discussion

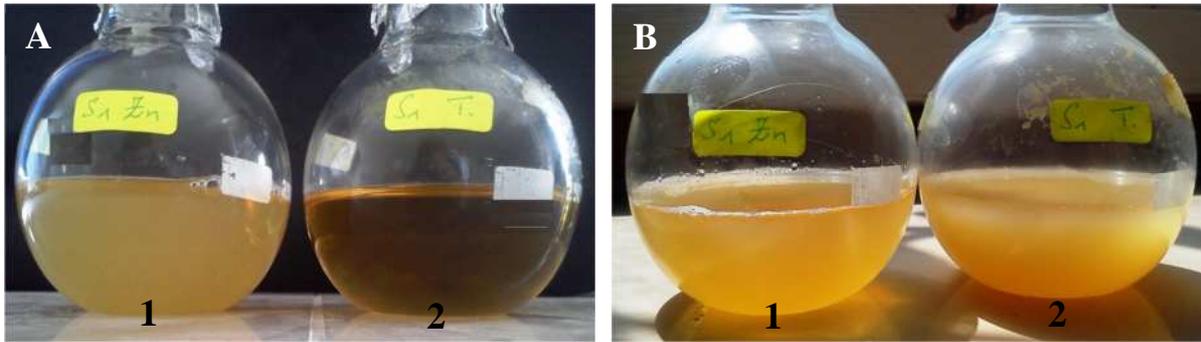


Figure 26: Croissance de *Pseudomonas* sp.1 en présence de sulfate de zinc.

(A) Avant incubation. (B) Après incubation. (1) En présence du métal. (2) En absence du métal.

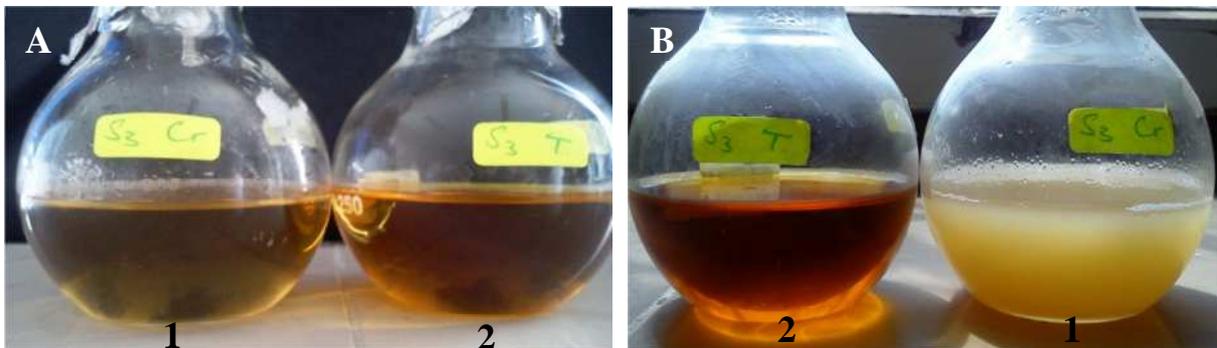


Figure 27: Croissance de *Pseudomonas* sp.3 en présence du dichromate de potassium.

(A) Avant incubation. (B) Après incubation. (1) En présence du métal. (2) En absence du métal.

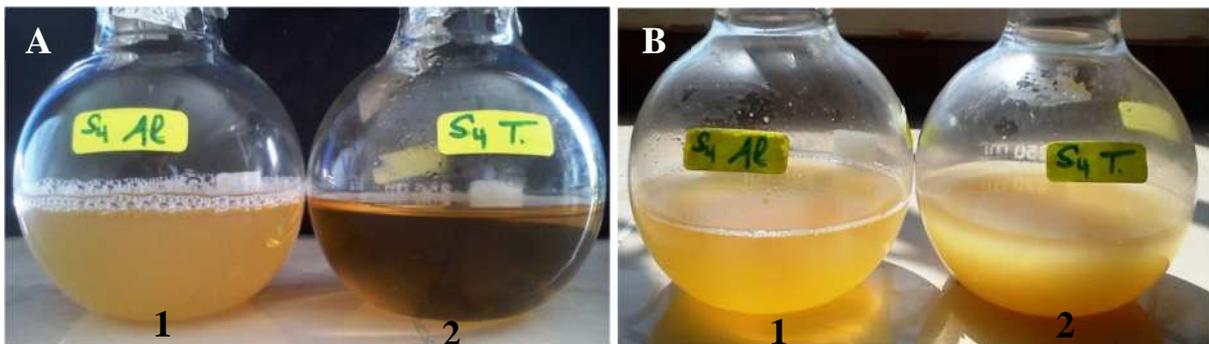


Figure 28: Croissance de *Pseudomonas* sp.4 en présence de sulfate d'aluminium.

(A) Avant incubation. (B) Après incubation. (1) En présence du métal. (2) En absence du métal.

Résultats et discussion

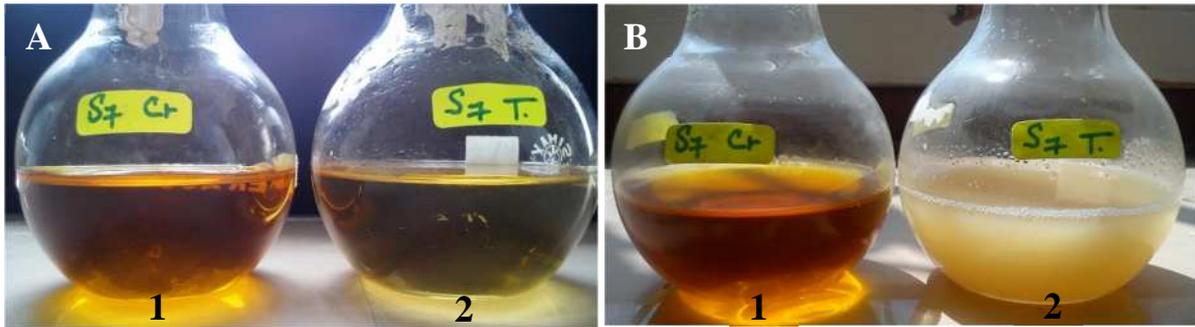


Figure 29 : Croissance de la souche 7 en présence du dichromate de potassium. (A) Avant incubation. (B) Après incubation. (1) En présence du métal. (2) En absence du métal.

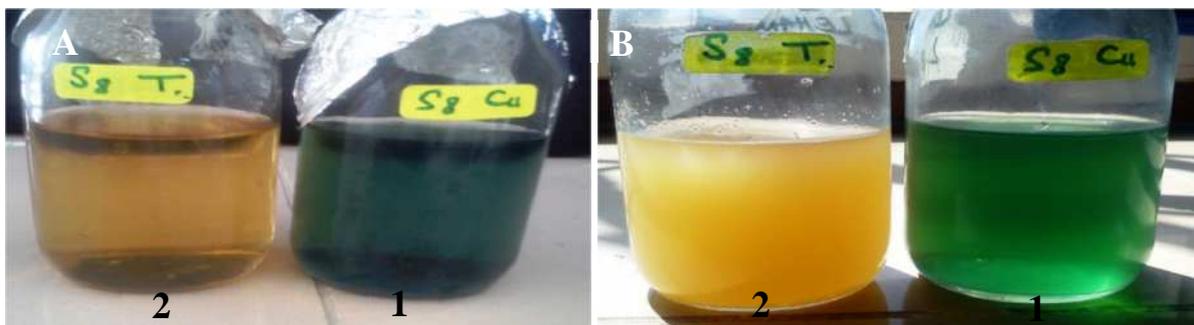


Figure 30 : Croissance de *Bacillus* sp. en présence de sulfate de cuivre. (A) Avant incubation. (B) Après incubation. (1) En présence du métal. (2) En absence du métal.

Les résultats des mesures de la turbidimétrie sont traduits en courbes de croissance, en présence ou non de métaux, et sont présentés dans les figures 31, 32, 33, 34 et 35.

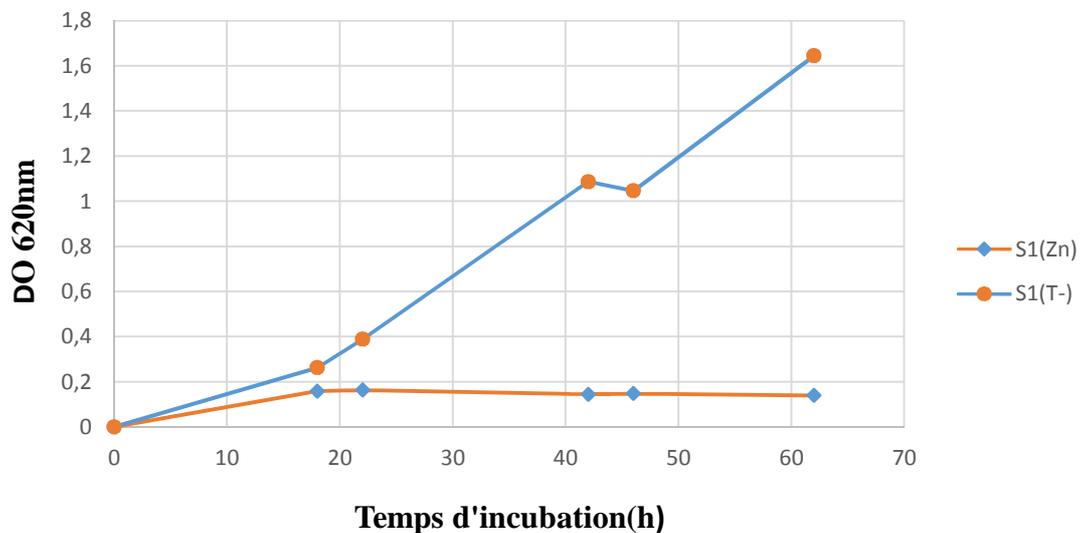


Figure 31 : Effet du sulfate de zinc sur la croissance de *Pseudomonas* sp.1.

Résultats et discussion

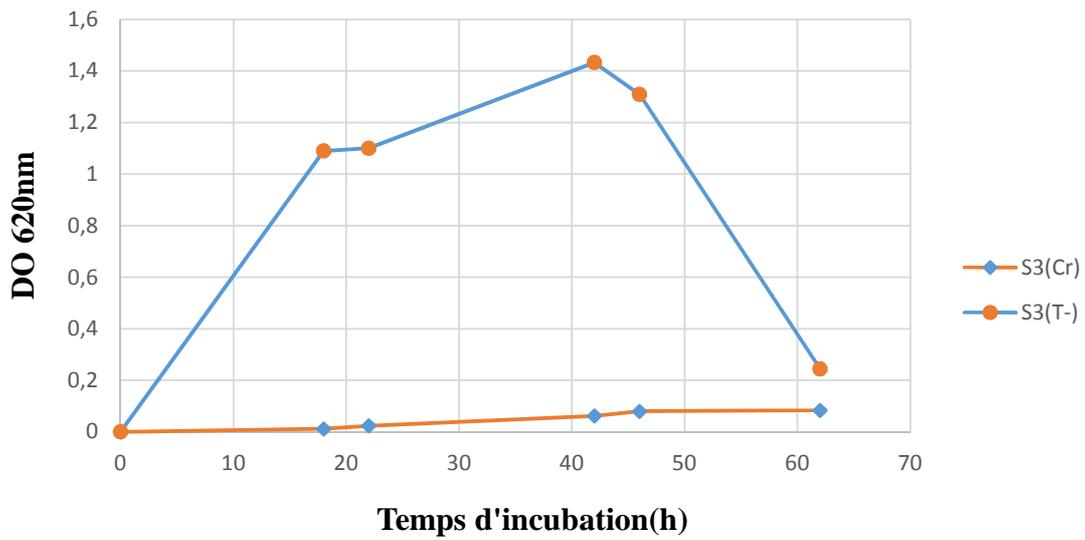


Figure 32 : Effet du dichromate de potassium sur la croissance de *Pseudomonas* sp.3.

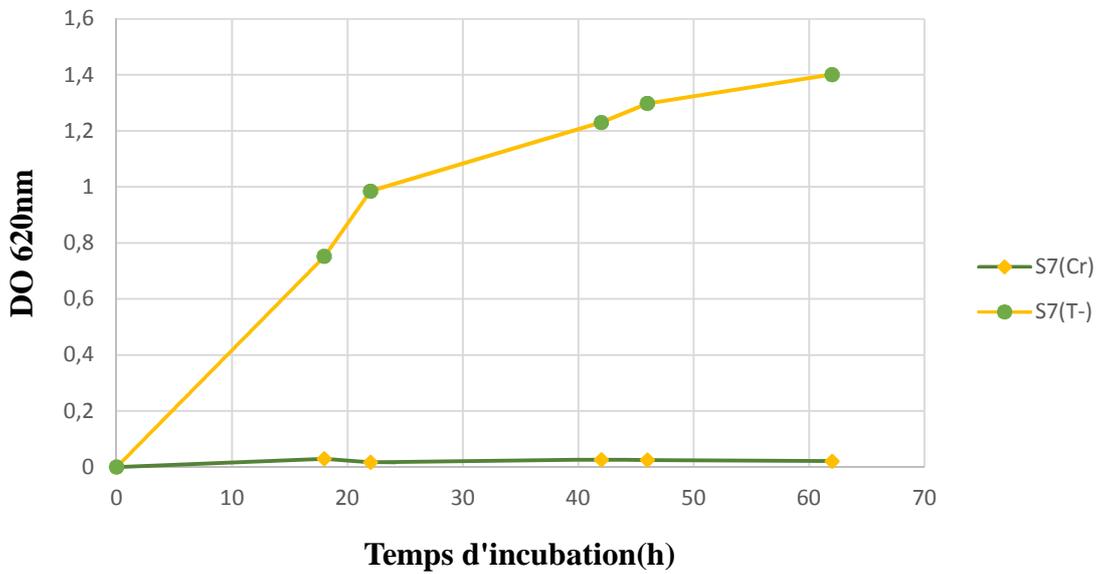


Figure 33 : Effet du dichromate de potassium sur la croissance de la souche 7.

Résultats et discussion

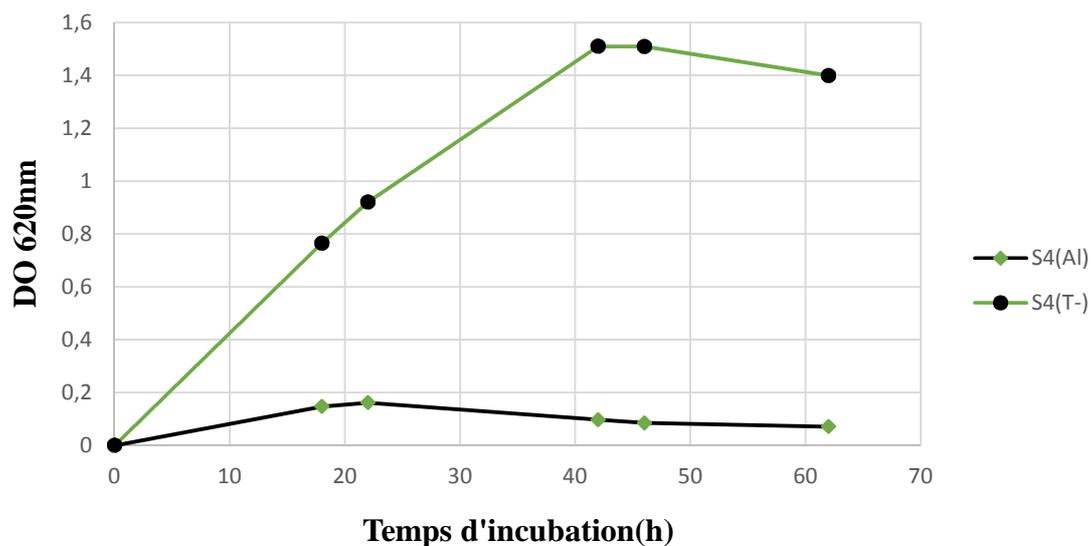


Figure 34: Effet du sulfate d'aluminium sur la croissance de *Pseudomonas* sp.4.

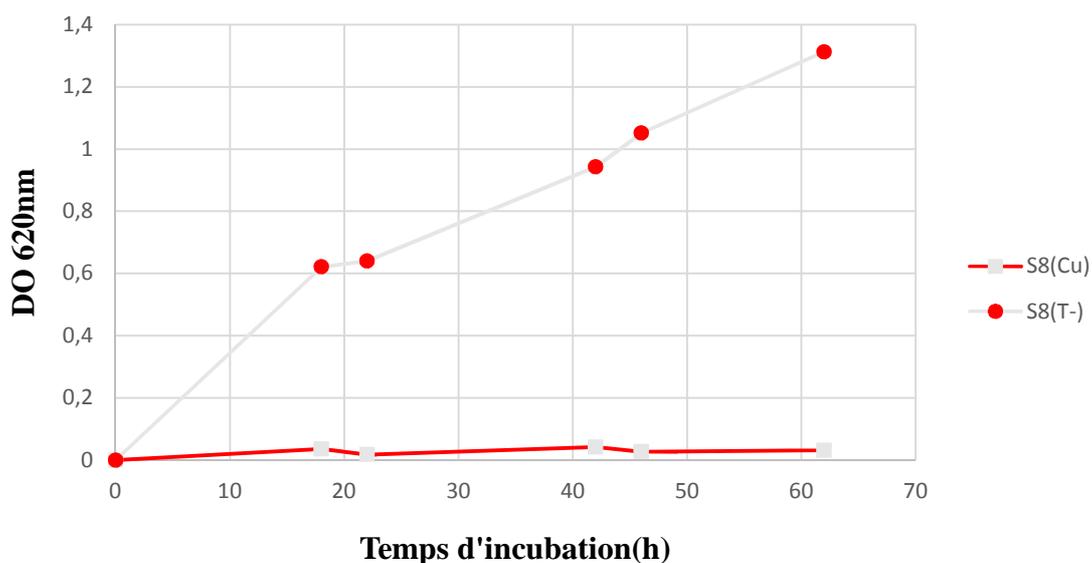


Figure 35: Effet du sulfate de cuivre sur la croissance de *Bacillus* sp.

Les courbes de croissance ci-dessus des isolats bactériens montrent des effets importants de toxicité de tous les ETMs utilisés, à leur CMI, tout le long des 62h. Les croissances en présence de métaux sont en effet absente ou bien très faibles par rapport à celle des témoins, ce qui concorde avec les résultats obtenus par DESAUNAY (2012) sur le suivi de la croissance des cellules d'*Escherichia coli* K12Dh5a dans laquelle la présence du Zn et

du Cd semble affecter la croissance de la bactérie en enregistrant de faibles taux de croissance par rapport au témoin.

Des études antérieures ont révélé que l'aluminium a une importante toxicité contre une large variété de pathogènes (DUTTA *et al.*, 1996 ; MOURUGHAN et SURYAKANTH, 2004). BNYAN *et al.* (2014) ont observé un effet bactéricide significatif du sulfate d'aluminium sur la croissance de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumonia* pendant 24 h. Quelques suppositions attribuent cette activité antimicrobienne à des effets délétères sur la paroi bactérienne (ARUL *et al.*, 2011).

GRASS *et al.* (2011) ont mis en évidence l'effet bactéricide du cuivre sur divers espèces pathogènes. D'après MEYER *et al.* (2015), cet effet sera dû à la peroxydation des lipides membranaires avec la perte de l'intégrité de la membrane et l'induction de la dégradation de l'ADN par les ions de cuivre. Ceci a été observé chez les bactéries à Gram positif (*E. coli* et *P. aeruginosa*). Par ailleurs, pour *E. coli* il a été démontré que les chélateurs de cuivre protégeaient les cellules de l'effet bactéricide de ce métal (SANTO *et al.*, 2008).

Toutefois, et malgré ces effets toxiques, les concentrations métalliques (du zinc, et aluminium) utilisées lors de cette étude ne sont pas létales pour les souches isolées indiquant que ces bactéries possèdent des systèmes de résistance ou au moins de tolérance à ces deux métaux utilisés.

4- Recherche des activités antimicrobiennes

Le criblage a permis de mettre en évidence l'aptitude des souches, isolées du sol pollué par les métaux lourds, à exercer un pouvoir antimicrobien vis-à-vis de quelques champignons et de souches bactériennes.

4-1- Activité antibactérienne

Les tests de confrontation directe réalisés *in vitro* sur gélose Mueller Hinton, ont permis de mettre en évidence l'action inhibitrice de certains de nos isolats bactériens vis-à-vis de six souches pathogènes couramment isolées d'infections nosocomiales. Il s'agit en l'occurrence de *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* ATCC43300, *Escherichia coli*, *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*.

Résultats et discussion

Les diamètres des zones d'inhibition des différentes bactéries testées sont mesurés et présentés dans le tableau XV.

Tableau XV : Activité antibactérienne des souches bactériennes isolées (diamètres des zones d'inhibition en mm) (n=2).

Souches bactériennes testées	Halos d'inhibition (mm) (moyenne de deux mesures \pm l'écart type)				
	<i>Pseudomonas sp.1</i>	<i>Pseudomonas sp.3</i>	<i>Pseudomonas sp.4</i>	Souche 7	<i>Bacillus sp.</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	13 \pm 1,41	12,25 \pm 0,35	13.5 \pm 1,41	9,75 \pm 0,35	12,5 \pm 0,70
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC43300	10,5 \pm 2,12	10,5 \pm 0,70	11,5 \pm 0,70	7,0 \pm 0,00	9,25 \pm 0,35
<i>Escherichia coli</i>	10,5 \pm 0,70	10 \pm 0,35	9,5 \pm 0,70	7,0 \pm 0,00	10 \pm 1,41
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	16 \pm 1,41	12,5 \pm 0,70	11 \pm 1,41	11 \pm 0,70	13,75 \pm 1,06
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11,75 \pm 1,06	14 \pm 0,70	11 \pm 0,70	10 \pm 1,41	13 \pm 1,76
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11 \pm 0,70	7 \pm 0,00	9,5 \pm 0,70	7,0 \pm 0,00	12 \pm 1,41

*Le diamètre des disques d'agar (7mm) est inclus dans les mesures des diamètres des zones d'inhibition.

L'oxytétracycline est l'antibiotique testé sur les six souches bactériennes tests, nous avons noté que les différentes souches réagissent différemment aux antibiotiques étudiés (Figure 36). Les diamètres des zones d'inhibition mesurés en présence de l'antibiotique sont notés dans le tableau XV.

Résultats et discussion

Tableau XVI : Résultats de l'antibiogramme des souches tests (diamètres des zones d'inhibition en mm).

Souches	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i> ATCC43300	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Zones d'inhibition (mm)	25	25	17,5	32,5	25	24,5

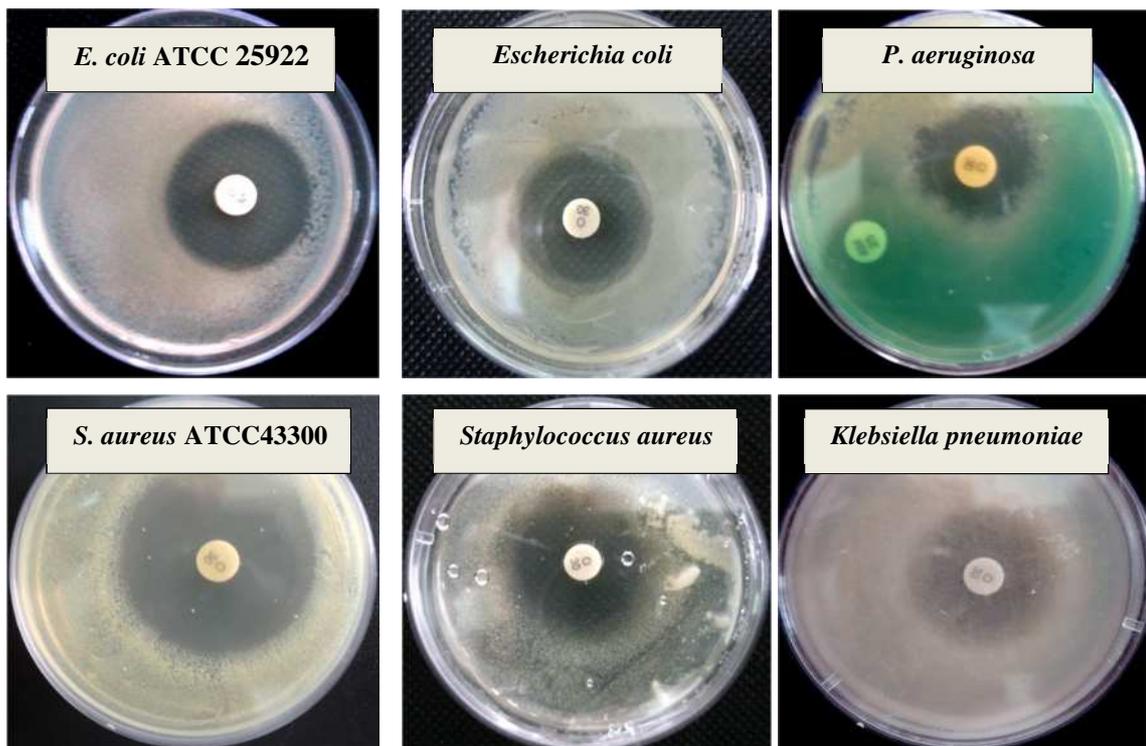


Figure 36: Témoins positifs réalisés avec l'oxytétracycline.

Résultats et discussion

La figure 37 illustre les résultats obtenus de la mesure des diamètres des zones d'inhibition.

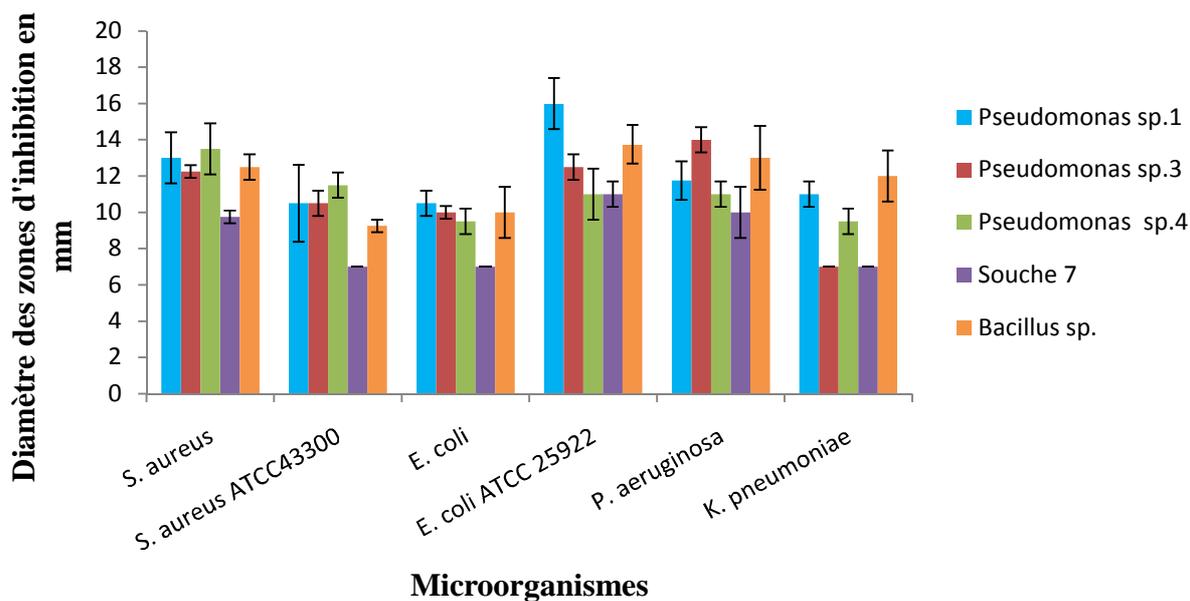


Figure 37 : Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition en (mm) exprimées par les isolats bactériens.

Les résultats indiqués dans le tableau XV et la figure 37, montrent qu'il y a une variabilité dans l'aptitude des isolats bactériens à inhiber la croissance des souches testées.

En effet, *Pseudomonas* sp.1 a montré l'effet inhibiteur le plus important et ce envers *E. coli* ATCC 25922 avec un diamètre atteignant $16 \pm 1,41$ mm (Figure 38). Ce pathogène s'est révélé être le plus sensible avec une inhibition moyenne de 13,75 mm. *Bacillus* sp. a manifesté son plus grand pouvoir inhibiteur à l'égard de celui-ci ($13,75 \pm 1,06$ mm). *Pseudomonas* sp.3 présente également une inhibition intéressante allant jusqu'à $12,5 \pm 0,70$. Enfin, pour *Pseudomonas* sp.4 et la souche 7, les diamètres enregistrés sont respectivement de $11 \pm 1,41$ mm et $11 \pm 0,70$ mm.

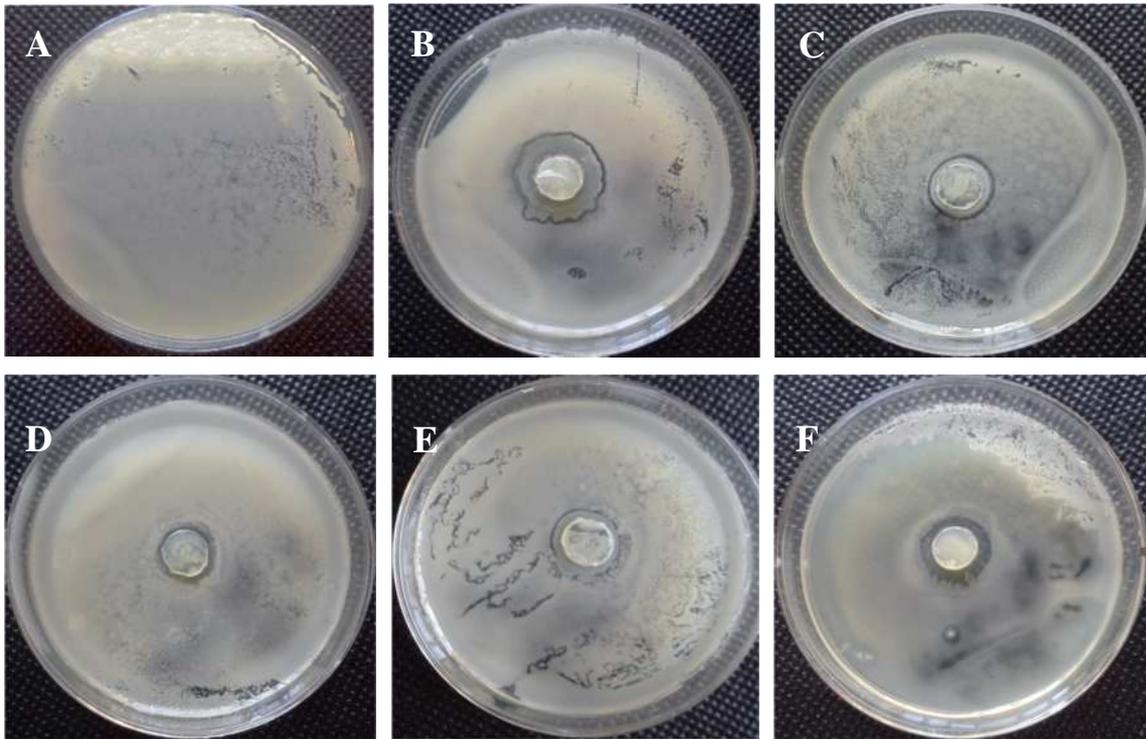


Figure 38 : Effet antagoniste des isolats bactériens contre *Escherichia coli* ATCC25922. (A) Témoin négatif de *E. coli* ATCC25922. (B) Effet de *Pseudomonas* sp.1. (C) Effet de *Pseudomonas* sp.3. (D) Effet de *Pseudomonas* sp.4. (E) Effet de la souche 7. (F) Effet de *Bacillus* sp.

Les diamètres d'inhibition enregistrés vis-à-vis de *P. aeruginosa* ne sont toutefois pas négligeables (Figure 39). Le diamètre moyen d'inhibition avoisine les 12 mm. L'action inhibitrice la plus marquée été de la part de *Pseudomonas* sp.3 qui s'est traduit par un diamètre allant jusqu'à $14 \pm 0,70$ mm ; ce diamètre est proche de celui obtenu avec l'antibiotique testé ($\emptyset = 17.5$ mm). En deuxième position, on trouve *Bacillus* sp. qui présente un diamètre de $13 \pm 1,76$ mm. En dernier, *Pseudomonas* sp.1, *Pseudomonas* sp.4 et la souche 7 présentent un spectre d'activité très proche auprès du germe cible ($11,75 \pm 1,06$ mm, $11 \pm 0,70$ mm et $10 \pm 1,41$ mm respectivement).

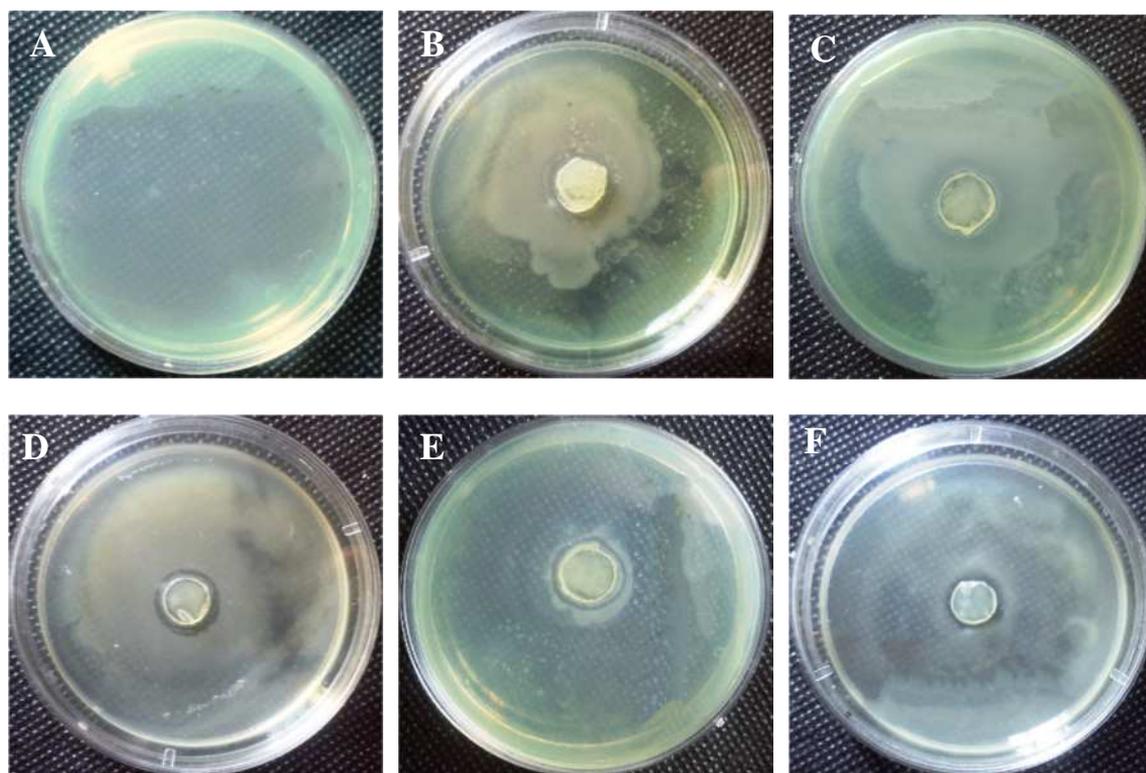


Figure 39 : Effet antagoniste des isolats bactériens contre *Pseudomonas aeruginosa*.
(A) Témoin négatif de *P. aeruginosa*. (B) Effet de *Pseudomonas* sp.1. (C) Effet de *Pseudomonas* sp.3. (D) Effet de *Pseudomonas* sp.4. (E) Effet de la souche 7. (F) Effet de *Bacillus* sp.

A l'égard de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* sp. 3 s'est montré l'isolat le plus antagoniste avec une inhibition s'élevant jusqu'à $14 \pm 1,41$ mm de diamètre contre $13 \pm 1,41$ mm exhibé par *Pseudomonas* sp.1 et $12,25 \pm 0,35$ mm exprimé par *Pseudomonas* sp.3, tandis que les autres souches ont manifesté une inhibition plus au moins modérée (Figure 40).

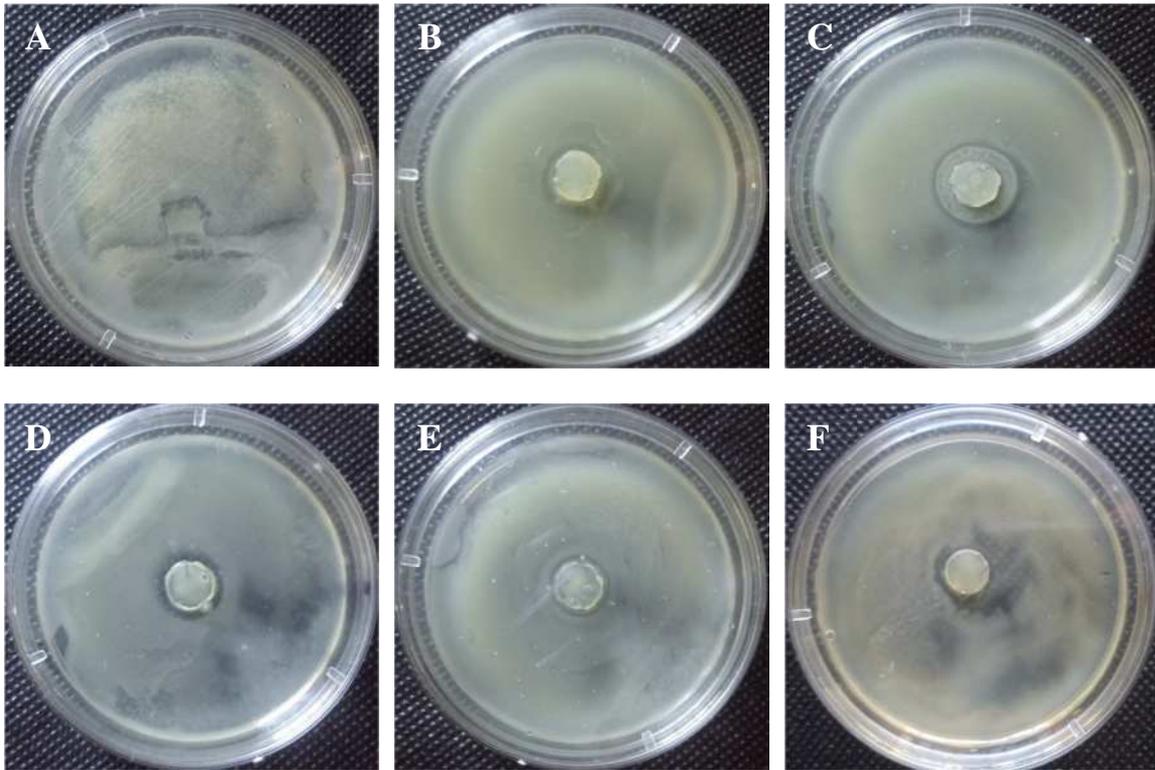


Figure 40 : Effet antagoniste des isolats bactériens contre *Staphylococcus aureus*.
(A) Témoin négatif de *S. aureus*. (B) Effet de *Pseudomonas* sp.1. (C) Effet de *Pseudomonas* sp.3. (D) Effet de *Pseudomonas* sp.4. (E) Effet de la souche 7. (F) Effet de *Bacillus* sp.

Les différentes souches ont présenté un spectre d'activité très proche envers *S. aureus* ATCC43300 où les diamètres oscillent entre $9,25 \pm 0,35$ mm et $11,5 \pm 0,70$ mm, à l'exception de la souche 7 qui n'a montré aucun pouvoir inhibiteur ($7,00 \pm 0,00$ mm) (Figure 41). Ce germe test était le plus sensible vis-à-vis de l'oxytétracycline ($\varnothing = 32,5$ mm).

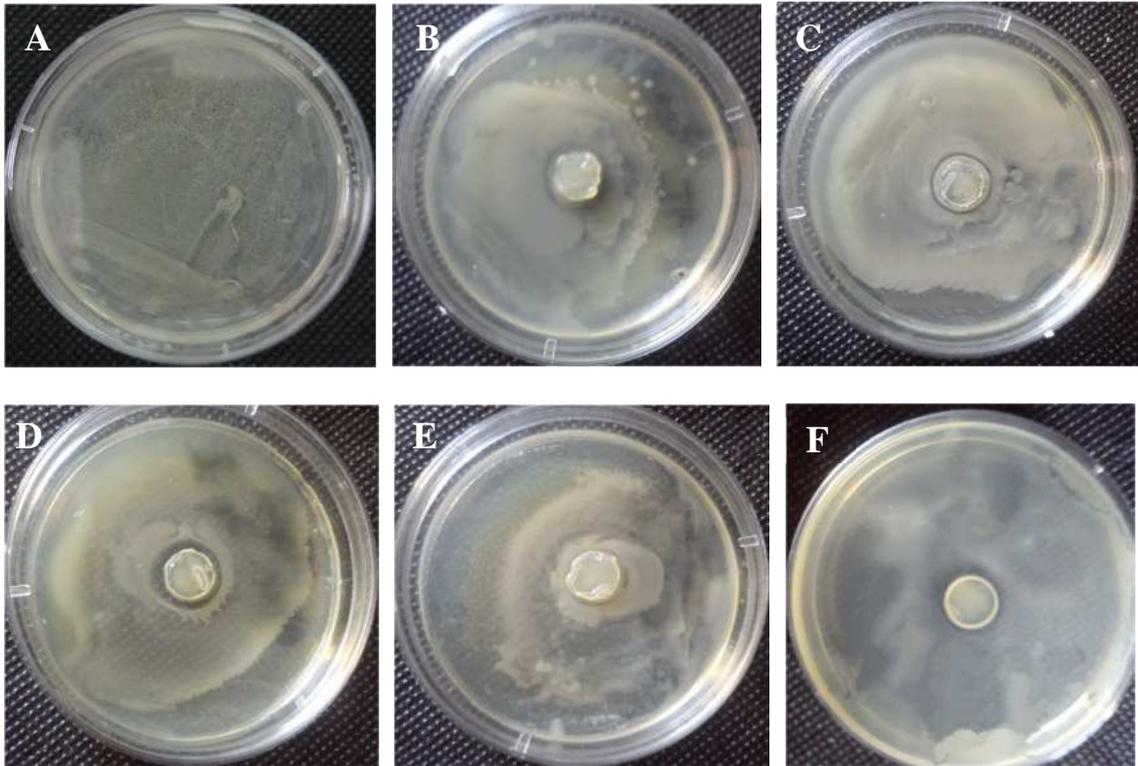


Figure 41 : Effet antagoniste des isolats bactériens contre *S. aureus* ATCC43300. (A) Témoin négatif de *S. aureus* ATCC43300. (B) Effet de *Pseudomonas* sp.1. (C) Effet de *Pseudomonas* sp.3. (D) Effet de *Pseudomonas* sp.4. (E) Effet de la souche 7. (F) Effet de *Bacillus* sp.

L'activité inhibitrice des isolats vis-à-vis d'*E. coli* clinique été également importante. Les diamètres notés sont très proches et sont situés entre $9,5 \pm 0,70$ mm et $10,5 \pm 0,70$ mm. Tandis que la souche 7 n'avait pas d'effet envers ce germe aussi (Figure 42).

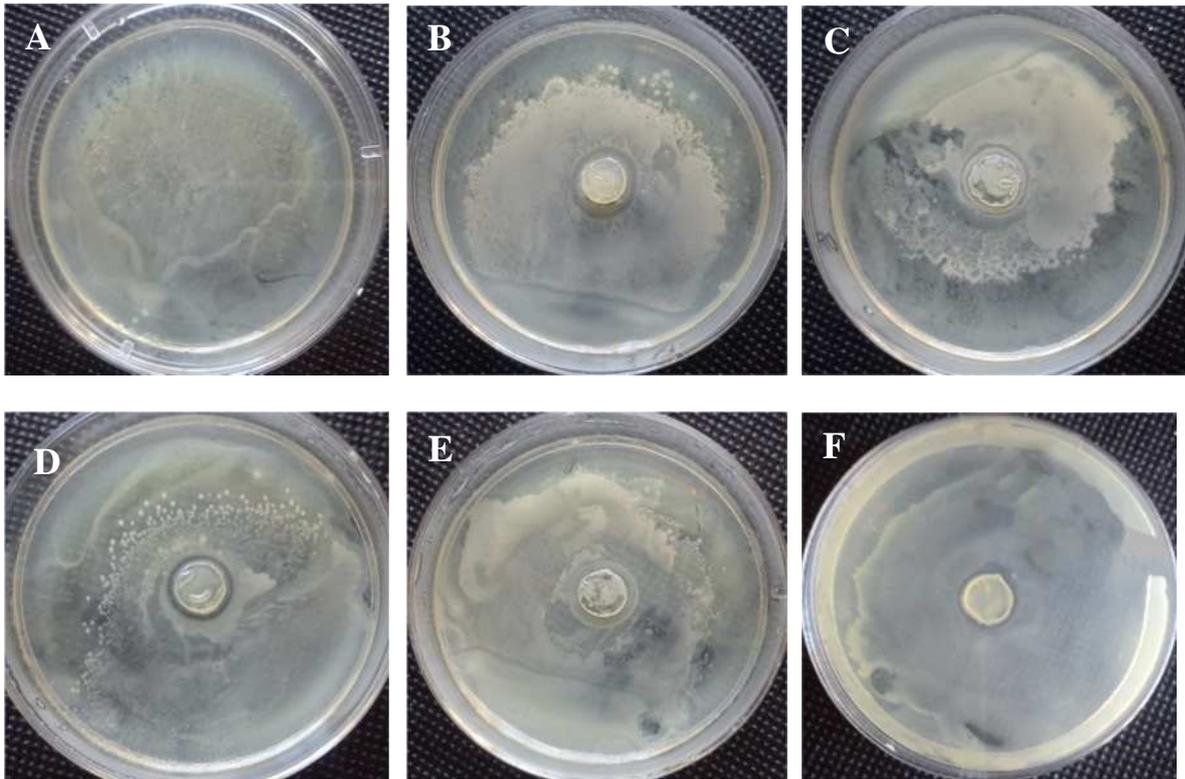


Figure 42 : Effet antagoniste des isolats bactériens contre *Escherichia coli*.
(A) Témoin négatif de *Escherichia coli*. (B) Effet de *Pseudomonas* sp.1. (C) Effet de *Pseudomonas* sp.3. (D) Effet de *Pseudomonas* sp.4. (E) Effet de la souche 7. (F) Effet de *Bacillus* sp.

Bacillus sp., *Pseudomonas* sp.1 et *Pseudomonas* sp.4 ont manifesté une bonne inhibition de l'espèce *K. pneumoniae* avec des diamètres variant entre $9,5 \pm 0,70\text{mm}$ et $12 \pm 1,41\text{mm}$ où *Bacillus* sp. a eu l'effet inhibiteur le plus important. En revanche, *Pseudomonas* sp.3 et la souche 7 n'ont révélé aucun effet vis-à-vis de ce germe ($7,00 \pm 0,00\text{ mm}$) (Figure 43).

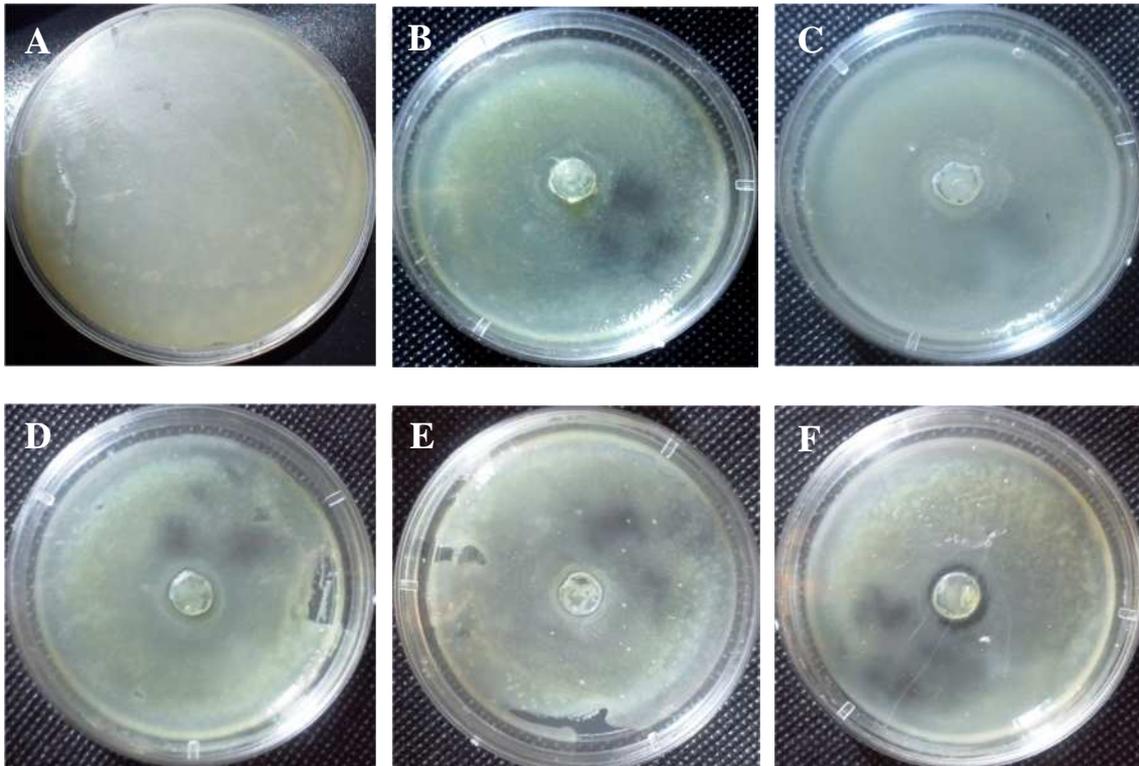


Figure 43 : Effet antagoniste des isolats bactériens contre *Klebsiella pneumoniae*.
(A) Témoin négatif de *K. pneumoniae*. (B) Effet de *Pseudomonas* sp.1. (C) Effet de *Pseudomonas* sp.3. (D) Effet de *Pseudomonas* sp.4. (E) Effet de la souche 7. (F) Effet de *Bacillus* sp.

En comparaison, le spectre d'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes retenues par BELYAGOUBI (2014) est proche de celui manifesté par nos isolats bactériens sur *S. aureus* ATCC43300. Les zones d'inhibition données par la méthode des cylindres d'agar des souches actinomycétales sont situées entre 10 et 16 mm vis-à-vis de *S. aureus* ATCC 6538.

Une autre étude portée sur des actinomycètes a rapporté l'inhibition de *K. pneumoniae* ATCC 700603 avec un diamètre allant de 17 jusqu'à 23 mm (LOUCIF, 2011). Le criblage des souches que nous avons réalisé à l'égard de *K. pneumoniae* a donné une activité plus basse ($12 \pm 1,41$ mm) que celle décrite par LOUCIF (2011).

Suite aux résultats obtenus, on constate que nos isolats bactériens ont manifesté des caractéristiques antibactériennes intéressantes sur les bactéries pathogènes testées. Ceci est en accord avec les investigations de plusieurs auteurs qui ont montré que différentes souches appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Bacillus* sont douées de propriétés antimicrobiennes.

Résultats et discussion

C'est le cas, par exemple, d'AL-AJLANI (2010) qui a déterminé que 54 des 118 souches de *Bacillus* isolées à partir d'échantillons de sol ont montré des activités antagonistes contre au moins deux ou plus de souche à partir d'un panel de micro-organismes pathogènes et non pathogènes.

Contrairement à nos résultats, ASLIM *et al.* (2002) ont souligné que les souches de *Bacillus* ont des effets plus importants sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram-négatives. Nos résultats sont plutôt en accord avec ceux de MANSOUR *et al.* (2015) qui ont démontré l'activité antagoniste des souches de *Bacillus* spp. envers des bactéries pathogènes à Gram positif mais aussi à Gram négatif.

D'autre part, ALLOUCHE *et al.* (2010) ont souligné l'importance de l'activité antimicrobienne des Lactobacilles thermophiles dans l'industrie laitière. L'activité antimicrobienne due à l'action des bactériocines pour les différentes souches de *Lactobacillus* thermophiles étudiées a révélé un spectre d'inhibition étroit, dirigé notamment vis-à-vis des germes cibles : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 54127 et *Pseudomonas aeruginosa* 165 avec des diamètres variant entre 0 et 21,5 mm, 0 et 19 mm, 0 et 22 mm respectivement.

De leur côté, METLEF et DILMI-BOURAS (2009) ont rapporté que des souches pures de *Lactococcus lactis* sont à l'origine de zones d'inhibitions importantes contre *E. coli* et *Bacteroides* spp. où les diamètres varient entre 10 et 30 mm.

Selon DACOSTA (2000), l'activité variable des bactéries lactiques vis-à-vis des bactéries cibles pourrait être expliqué soit par la perte spontanée des plasmides codant la production de bactériocines chose qui a été signalée ou par la variabilité structurale des bactériocines (RICHARD *et al.*, 1996). Dans notre étude, nous avons également noté cette variabilité de l'activité inhibitrice des isolats vis-à-vis des germes cibles.

L'activité antagoniste de nos isolats bactériens appréciée sur milieu MH suggère la production et l'excrétion dans le milieu de culture des substances inhibitrices capables d'inhiber la croissance des bactéries testées.

Les espèces de *Bacillus* sont des bactéries prédominant le sol en raison de la formation d'endospores résistantes et de la production d'antibiotiques essentiels tels que la bacitracine. En l'occurrence, PRESCOTT *et al.* (2008) ont rapporté que la bacitracine produite par *Bacillus* sp. inhibe *E. coli* et *S. aureus*. Ces pathogènes ont été également inhibé par la souche *Bacillus* sp. que nous avons isolé.

Résultats et discussion

Dans leur étude sur les propriétés antagonistes de la microflore indigène du manioc (plante tropicale), AGARRY *et al.* (2005) ont signalé que la capacité d'inhibition de *B. pumilus* contre *S. aureus* et *E. coli* est attribuée à la production de bactériocine.

Quant au genre *Pseudomonas*, l'inhibition due à la production des sidérophores est la plus habituellement citée. Les travaux de COLLIN (2008) ont montré l'implication d'un sidérophore dans l'activité antagoniste d'un *Pseudomonas* du groupe *fluorescens-putida* à l'encontre de pathovars de *Pseudomonas syringae* responsables de moucheture bactérienne.

La pyoverdine, un sidérophore à forte affinité pour le fer est produit par des bactéries telles que les *Pseudomonas*. *P. syringae* pv. *Syringae* et *P. aeruginosa*, par exemple, produisent des pyocines (FEIL *et al.*, 2005) agissant contre d'autres *Pseudomonas* (SANO *et al.*, 1993).

De plus, l'acide tétramique est spontanément produit à partir des 3-oxo-C12-AHL et est trouvé dans les surnageants de culture de *P. aeruginosa*. HONDA *et al.* (2011) ont montré que cet acide, à une concentration de 100 μ M, a également des activités antimicrobiennes contre 33 des bactéries Gram négatives telles qu'*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ou même *P. aeruginosa*.

Par ailleurs, LETOFFE *et al.* (2014) ont montré les effets à longue distance de 14 composés volatiles produits par *E. coli* sur elle-même, sur *P. aeruginosa*, *S. aureus* et sur *B. subtilis*. Plusieurs de ces molécules constituent des signaux chimiques qui influencent positivement ou négativement la croissance, l'adhésion et la motilité des bactéries exposées.

4-2- Activité antifongique

L'activité antifongique a été recherchée par la méthode de confrontation directe sur milieu solide Sabouraud. Les résultats ont montré que quelques isolats bactériens seulement avaient une activité contre les trois champignons testés : *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. et *Botrytis cinerea* avec des pourcentages d'inhibition variables selon les souches (Tableau XVII).

Globalement, la croissance mycélienne en culture de confrontation était nettement inférieure par rapport à celle des témoins, mis à part *Aspergillus niger* qui a montré une faculté de développement similaire au témoin négatif à l'exception de quelques infimes zones

Résultats et discussion

d'inhibition négligeables autour des disques. Raison pour laquelle il nous a été impossible de procéder au calcul des pourcentages d'inhibition.

Malgré le temps d'incubation prolongé, la croissance de *Botrytis cinerea* dans la boîte témoin été juste suffisante pour établir une comparaison avec les résultats des confrontations de ce champignon face aux isolats bactériens.

Tableau XVII : Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne (moyenne \pm écart type) (n=2).

Souches bactériennes	Taux d'inhibition (%)		
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Penicillium sp.</i>
<i>Pseudomonas</i> sp.1	/	55,00 \pm 0,85	70,00 \pm 1,27
<i>Pseudomonas</i> sp.3	/	46,67 \pm 0,56	75,00 \pm 1,30
<i>Pseudomonas</i> sp.4	/	50,00 \pm 0,37	69,28 \pm 3,66
Entérobactérie	/	40,00 \pm 0,70	72,14 \pm 1,85
<i>Bacillus sp.</i>	76,09 \pm 1,83	58,33 \pm 1,70	69,25 \pm 0,73

Les taux d'inhibition relevés, varient de 4,54 \pm 0,37 % (plus faible activité observée pour la souche *Pseudomonas* sp.4 contre *Botrytis cinerea*) à 76,09 \pm 1,83 % (plus grande activité observée pour *Bacillus* sp. contre *Aspergillus niger*) comme le montre la figure 44.

Résultats et discussion

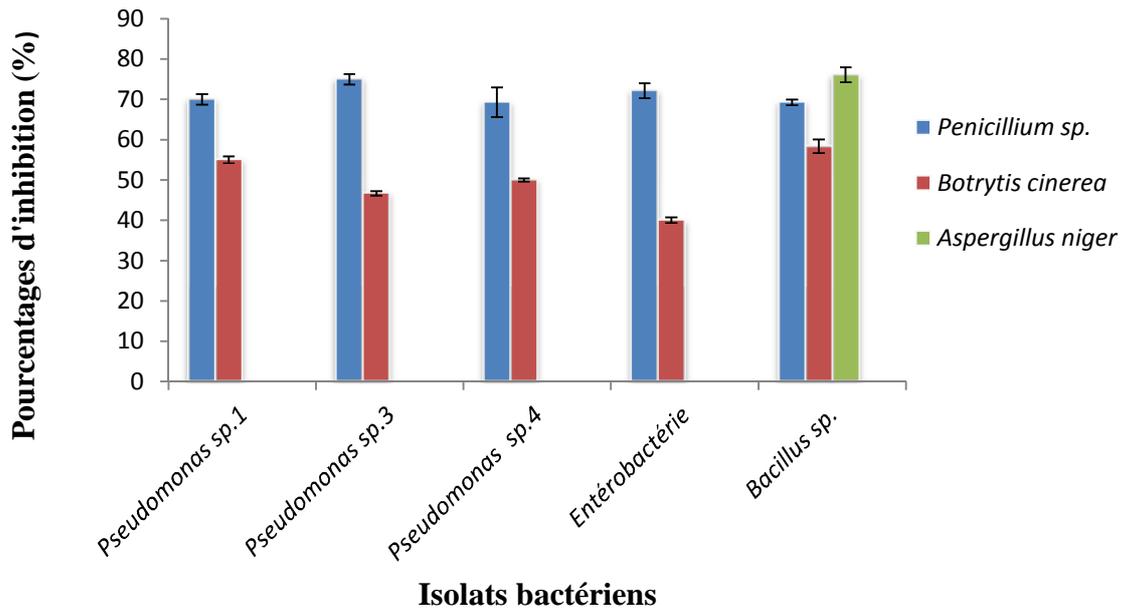


Figure 44: Représentation graphique des diamètres des pourcentages d'inhibition des champignons testés exprimées par les isolats bactériens.

Les résultats obtenus dénotent la grande sensibilité d'*Aspergillus niger* à l'égard de *Bacillus sp.* qui a manifesté l'activité inhibitrice la plus importante avec un taux de $76,09 \pm 1,83$ %.

Aspergillus niger qui a enregistré un diamètre d'inhibition de 20 mm vis-à-vis de l'amphotéricine B (Figure 45), a démontré une très faible sensibilité non matérialisée envers *Pseudomonas sp.1*, *Pseudomonas sp.3* et la souche 7 identifiée comme une entérobactérie (Figure 46). De plus, *Pseudomonas sp.4* n'a eu aucune disposition à inhiber le champignon qui a envahis toute la boîte Pétri et qui s'est développé même sur le cylindre d'agar contenant la souche en question (Figure 46 D).

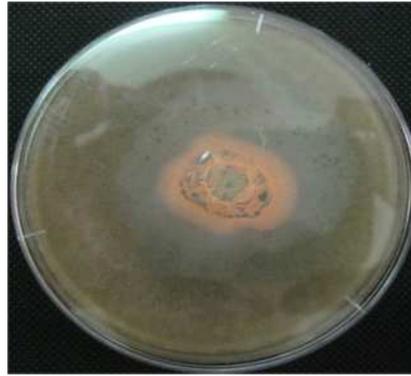


Figure 45: Témoin positif d'*Aspergillus niger* réalisé en présence de l'antifongique (Amphotéricine B).

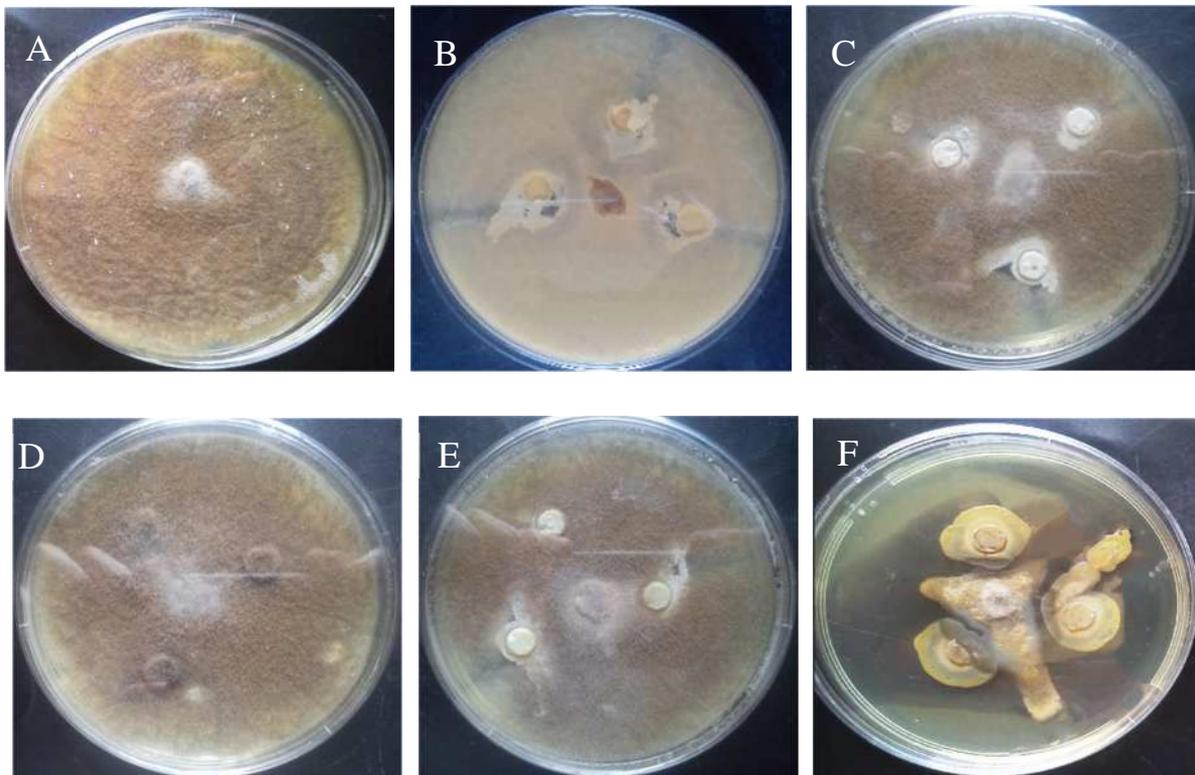


Figure 46: Effet antagoniste des isolats bactériens contre *Aspergillus niger*.
(A) Témoin négatif d'*Aspergillus niger*. (B) Effet de *Pseudomonas* sp.1. (C) Effet de *Pseudomonas* sp.3. (D) Effet de *Pseudomonas* sp.4. (E) Effet de la souche 7. (F) Effet de *Bacillus* sp.

Bacillus sp. s'est également avérée à l'origine d'une importante inhibition vis-à-vis de *Botrytis cinerea* ($58,33 \pm 1,70$ %) (Figure 47). Bien que la croissance du témoin négatif de *B. cinerea* n'a pas atteint les bords de la boîte Pétri, le champignon confronté aux isolats a

Résultats et discussion

montré une surface de croissance encore moindre. C'est ce qui nous a permis de calculer le taux d'inhibition qui oscillait entre $40,00 \pm 0,70$ % et $55,00 \pm 0,85$ % notés chez le reste des isolats comme indiqué plus haut dans le tableau XVII.

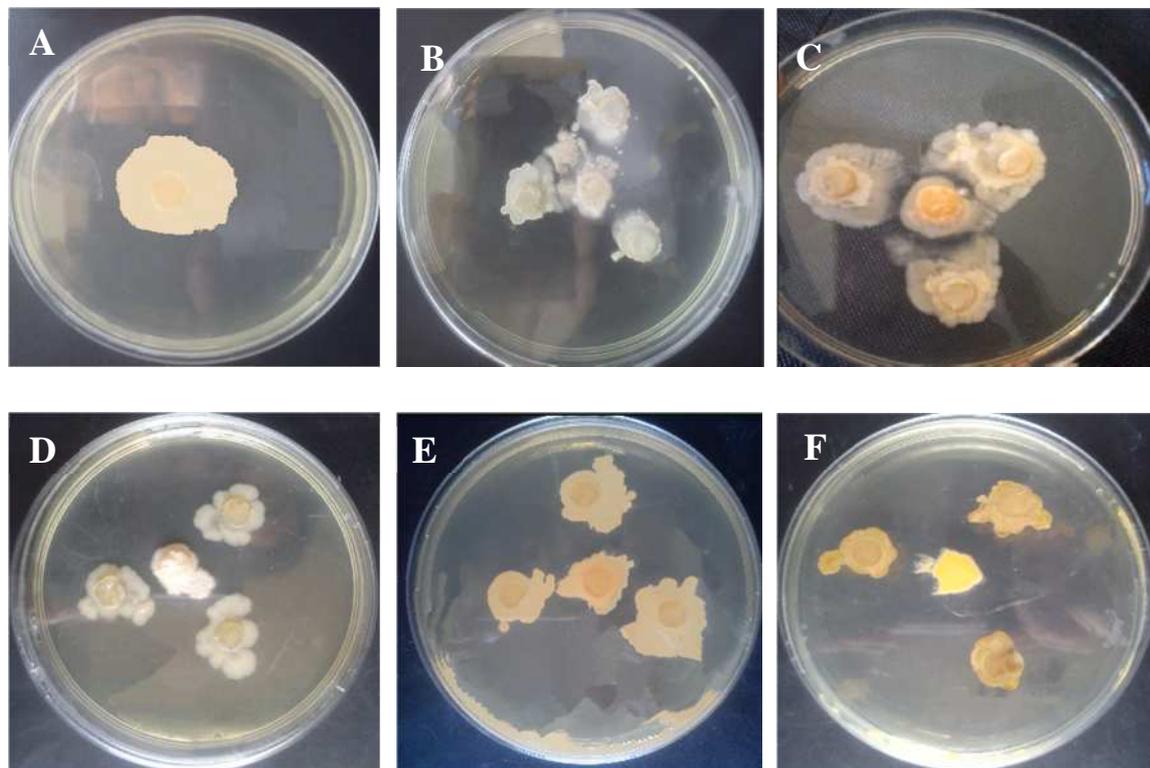


Figure 47 : Effet antagoniste des isolats bactériens contre *Botrytis cinerea*.
(A) Témoin négatif de *Botrytis cinerea*. (B) Effet de *Pseudomonas* sp.1. (C) Effet de *Pseudomonas* sp.3. (D) Effet de *Pseudomonas* sp.4. (E) Effet de la souche 7. (F) Effet de *Bacillus* sp.

Les résultats concernant *Penicillium* sp. révèlent un antagonisme intéressant de tous les isolats. Les taux d'inhibition enregistrés sur la base de la méthode des cylindres d'agar des isolats variaient de $69,25 \pm 0,73$ à $75,00 \pm 1,30$ %. L'inhibition est surtout marquée par *Pseudomonas* sp.3 comme on peut le voir sur la figure 48.

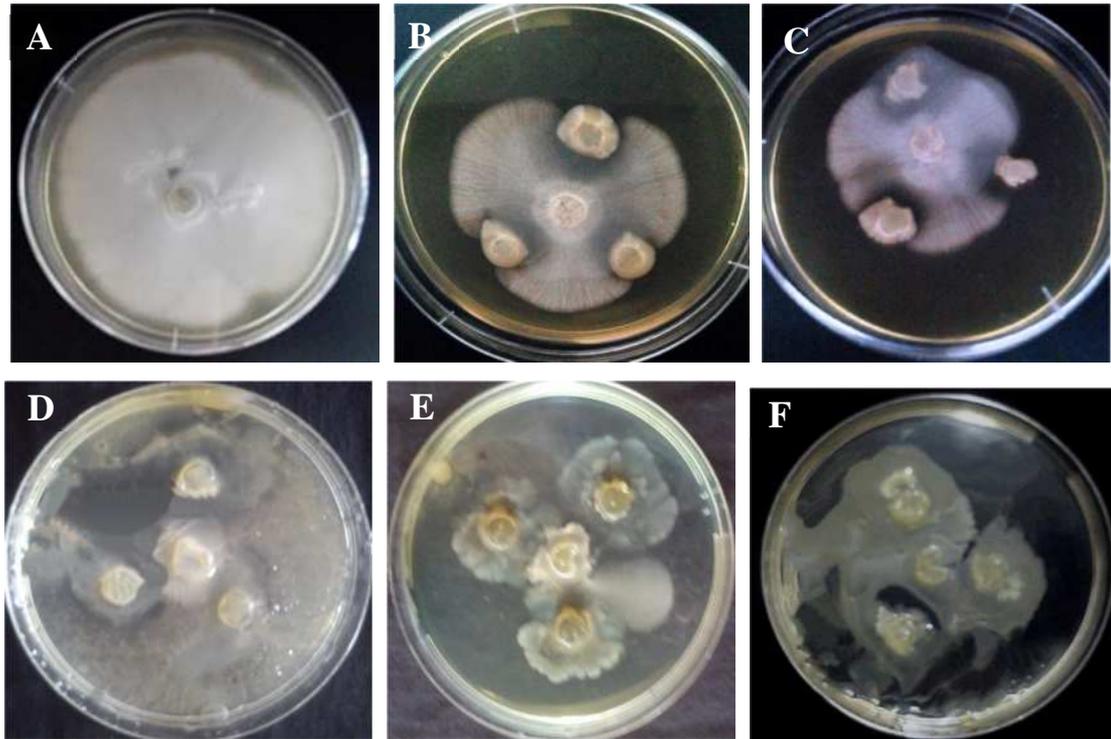


Figure 48 : Effet antagoniste des isolats bactériens contre *Penicillium* sp.
(A) Témoin négatif de *Penicillium* sp. (B) Effet de *Pseudomonas* sp.1. (C) Effet de *Pseudomonas* sp.3. (D) Effet de *Pseudomonas* sp.4. (E) Effet de la souche 7. (F) Effet de *Bacillus* sp.

Les résultats de l'analyse de la variance (ANOVA) indiquent qu'il n'y a pas de différence significative de l'activité antimicrobienne des souches isolées ($p\text{-value} > 0,05$). Les observations réalisées affirment que toutes les souches ont un spectre d'activité proche.

Plusieurs travaux ont montré que les membres des genres *Pseudomonas* et *Bacillus* sont également dotés d'un grand pouvoir antifongique. En fonction de la littérature, ces bactéries agissent généralement par le mécanisme d'antibiose (BERNAL *et al.*, 2002 ; JACOBSEN, 2006 ; KONG *et al.*, 2010).

AGARRY *et al.* (2005) ont rapporté que des espèces de *Bacillus* étaient plus efficaces à inhiber la croissance d'un panel de champignon dont *Aspergillus niger*. Il en était de même pour *P. fluorescens* qui a eu la même action sur ce champignon.

L'antagoniste *Bacillus subtilis* BCC 6327, décrit par RATTANAPORN (2013), a montré une inhibition de la croissance et la germination de spores d'*Aspergillus flavus* à un

Résultats et discussion

pourcentage de 85,0 %. Ce résultat dépasse légèrement celui que nous avons noté chez *Bacillus* sp. à l'encontre d'*A. niger* ($76,09 \pm 1,83$ %).

LAREF (2014) a rapporté que des souches appartenant au genre *Lactobacillus* produisent des composés antifongiques actifs contre *Penicillium* sp. et *Aspergillus* sp. Comparé à nos résultats, toutes les souches isolées ont manifesté une bonne activité à l'égard de *Penicillium* sp. inhibé jusqu'à $75,00 \pm 1,30$ %). Cependant, seule la souche 8 avait une forte inhibition vis-à-vis d'*Aspergillus* sp. ($76,09 \pm 1,83$ %).

Cette différence physiologique est reliée à la souche bactérienne et à la production de mycotoxines (MATEO *et al.*, 2010) (notamment l'ochratoxine B par *A. niger*). Selon FERREIRA *et al.* (2015), des bactéries comme *Bacillus* sont capables d'absorber ou dégrader les mycotoxines. Il est aussi possible que la production des mycotoxines soit inhibée. Ces hypothèses sont plausibles pour expliquer l'inhibition d'*A. niger* par *Bacillus* sp.

Les résultats obtenus dans notre cas, suggèrent donc l'existence d'agents d'inhibitions produits par les bactéries que nous avons testées. Le phénomène d'antibiose dont nous avons parlais précédemment peut se manifester soit par une inhibition de la germination des spores des champignons ; phénomène connu sous le nom de mycostase, soit par une lyse du mycélium des champignons ; c'est la mycolyse (BRAHIM, 1998).

Dans ce cas précis, on a cité que le pouvoir mycolytique est aussi bien présent chez les bactéries que les champignons, notamment chez les espèces appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Bacillus* (PODILE et PRAKASH, 1996 ; NIELSEN et SORENSEN, 1997).

Comme il est souligné antérieurement, plusieurs espèces de *Bacillus* produisent des métabolites antimicrobiens, dont certains sont thermostables (BERNAL *et al.*, 2002). Dans le cas des *Pseudomonas*, ce sont un groupe très hétérogène produisant une large gamme de métabolites secondaires incluant aussi bien les phytotoxines qui posséderaient des activités herbicides et antifongiques, des sidérophores et des antibiotiques (MEZAACHE, 1997). Ainsi, LEVY (1992) rapporte que la suppression fongique par *P. aeruginosa* serait l'action synergique de 2 produits : les phénazines et les protéases.

Il est bien documenté que la possibilité de *Bacillus* spp. de synthétiser une large variété de métabolites avec activité antifongique détermine leur capacité de contrôler des germes phytopathogènes quand elles sont appliquées comme agents du contrôle biologiques (KEANI-FEKI *et al.*, 2011).

Résultats et discussion

Pseudomonas et *Bacillus* ont déjà été signalées pour leur efficacité dans le contrôle de *B. cinerea* en traitement post-récolte (ELAD *et al.*, 1994 ; DE MEYER et HOFTE, 1997 ; GUETSKY *et al.*, 2002 ; BUCK et JEFFERS, 2004).

Il a été démontré que l'antibiotique gramicidine S secrété par l'agent de protection biologique *Brevibacillus brevis* (nommé auparavant *Bacillus brevis*) inhibe la germination et la croissance mycélienne de *B. cinerea* (EDWARDS et SEDDON, 2001 ; HAGGAG, 2008).

PAUL *et al.* (1997) avaient montré aussi que la bactérie *Bacillus circulans*, réduit *in vitro* l'activité pectinolytique de *B. cinerea* et en conséquence son infection sur la vigne. L'activité pectinolytique de ce champignon est optimale à un pH acide (MANTEAU *et al.*, 2003 ; SCHOONBEEK *et al.*, 2007). SWADLING et JEFFRIES (1998) ont rapporté qu'en modifiant le pH du milieu, *Bacillus pumilus* et *P. fluorescens*, interfèrent de façon indirecte avec le pouvoir pathogène de *B. cinerea*.

L'isolat 1-112 de la bactérie *Pseudomonas chlororaphis* et l'isolat IC1270 de la bactérie *Serratia plymuthica*, tous deux producteurs de pyrrolnitrine sont également des antagonistes de *B. cinerea* (CHERNIN *et al.*, 1996 ; GULATI *et al.*, 1999). GULATI *et al.* (1999) ont indiqué que dans des tests en boîte de Pétri, la croissance mycélienne de cet ascomycète est réduite de 85% en présence de *Pseudomonas chlororaphis* 1-112. D'autre part, KAMENSKY *et al.* (2003) a affirmé que l'application de *Serratia plymuthica* IC14 sur les feuilles de concombre réduit l'incidence de *B. cinerea* de 76 % en conditions de serre.

Par ailleurs, VENEGAS *et al.* (2005) ont rapporté que des souches bactériennes sauvages du genre *Bacillus* sont capables d'inhiber la croissance *in vitro* des pathogènes : *Fusarium solani* et *F. oxysporum*. D'après leurs données, les antagonistes ont montré une antibiose marquée qui est matérialisée par des dommages morphologiques des hyphes de *Fusarium* spp.

Dans une étude réalisée par BASURTO-CADENA *et al.* (2012), *B. subtilis* isolée du sol a montré une activité inhibitrice contre plusieurs champignons dont *Verticillium sp.* et l'agent de la «maladie Secadera». Cette étude a démontré que cette souche produit des composés extracellulaires tels que les protéases et des bactériocines qui pourraient être impliquée dans des activités antagonistes contre les champignons et les bactéries pathogènes d'origine alimentaire.

Résultats et discussion

En outre, différentes espèces du genre *Bacillus* ont été décrites comme productrices de cellulase, incluant *Bacillus* sp. (MAWADZA *et al.*, 2000), *Bacillus amyloliquefaciens* (LEE *et al.*, 2008) et *Bacillus subtilis* (KIM *et al.*, 2009).

FERREIRA *et al.* (2015) ont isolé et identifié des bactéries, dont la majorité était des entérobactéries, à partir des fruits de *Psychotria hoffmannseggiana* (plante tropicale). Ces isolats avaient le potentiel de production de cellulase et de pectinase à activité antagoniste contre *Aspergillus carbonarius* (producteur d'ochratoxine A).

Par ailleurs, REENA *et al.* (2013) ont rapporté que des bactéries productrices de sidérophores, isolées de rhizosphères, telles que *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter* présentent des activités antifongiques contre *Sclerotium* et *Fusarium*.

Une autre étude a révélé la capacité d'*Azotobacter* sp. à contrôler la croissance des agents phytopathogènes *Fusarium* sp. , *Alternaria* sp. , *Phytophthora* sp. , *Rhizoctonia* sp. *Colletotrichum* sp. et *Curvularia* sp. (MUTHUSELVAN et BALAGURUNATHAN, 2013). L'azotobactine synthétisée dans ce cas permet donc de contrer la colonisation des racines des plantes par des pathogènes bactériens et fongiques (SCHALK, 2008).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

Dans le présent travail, nous avons pu isoler des bactéries à partir de sol et de boues métalliques issus du site de l'ENIEM, Tizi-Ouzou, résistantes à quatre métaux lourds : le dichromate de potassium, sulfate de zinc, sulfate de cuivre et le sulfate d'aluminium. Nous avons identifié 8 souches dont 4 souches soupçonnées appartenir au genre *Pseudomonas*, 3 entérobactéries et un *Bacillus*. Sur les huit souches, 5 ont été sujet aux tests de la métallosensibilité et de l'antagonisme.

Toutes les souches se sont montrées résistantes à des concentrations très élevées en ces métaux lourds allant jusqu'à 10 mg/ml de zinc ; 5 mg/ml d'aluminium ; 3,125 mg/ml de cuivre et 2,5 mg/ml de chrome, exceptée *Pseudomonas* sp.1 (1,25 mg/ml). L'ordre général de sensibilité aux métaux est Cr<Cu<Al<Zn. La croissance bactérienne est affectée par la présence des ETMs; celle-ci diminue significativement avec l'augmentation de la concentration.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur six souches bactériennes et trois souches fongiques. Les résultats de l'activité antifongique obtenus par confrontation directe montre un pourcentage d'inhibition variant de $4,54 \pm 0,37$ % (plus faible activité observée pour la souche *Pseudomonas* sp.4 contre *Botrytis cinerea*) à $76,09 \pm 1,83$ % (plus grande activité observée pour *Bacillus* sp. contre *Aspergillus niger*). Quant aux résultats de l'activité antibactérienne, il en ressort que toutes les souches ont manifesté un effet antagoniste au moins sur une souche test. En effet, *Pseudomonas* sp.1 a montré l'effet inhibiteur le plus important et ce envers *E. coli* ATCC 25922 avec un diamètre atteignant $16 \pm 1,41$ mm.

Ces conditions extrêmes nous laissent penser que ces microorganismes ont mis en place des stratégies complexes (protéines spécifiques ou non spécifiques) pour s'adapter aux stress métalliques auxquels ils sont confrontés. Plusieurs de ces activités enzymatiques peuvent aujourd'hui trouver des applications en biotechnologie notamment en bioremédiation.

De plus, les résultats de cette étude sur les isolats bactériens ont montré que les bactéries résistantes aux ETMs, sont également dotées d'un pouvoir antagoniste intéressant. Ceci présente un grand intérêt actuellement, en raison de la demande croissante pour de nouvelles substances thérapeutiques de produits naturels pour combattre les pathogènes multirésistants et lutter contre les phytopathogènes dans le domaine agro-alimentaire.

Conclusion

L'étude que nous avons menée, montre que le site de l'ENIEM, Tizi-Ouzou, joue le rôle de réservoir de bactéries très résistantes aux métaux lourds avec un potentiel antagonisme. A partir de ce point, nous avons pu avoir une première base de données sur quelques genres bactériens auxquels appartiennent les souches isolées.

En perspectives, ce travail gagnerait à être approfondi par :

- a) L'identification avec précision des souches bactérienne par séquençage à l'ARN 16s.
- b) une étude du profil protéique de ces isolats bactériens avec la technique du SDS-PAGE en présence et en absence de ces métaux lourds serait d'un grand intérêt pour la révélation de l'effet de ces métaux lourds sur l'expression des protéines bactériennes.
- c) La détection et la caractérisation des mécanismes impliqués dans la résistance aux métaux lourds par l'utilisation des techniques de biologie moléculaire.
- d) Une application de ces souches dans des sites pollués afin d'évaluer leur potentiel en bioremédiation.
- e) Purifier les molécules antimicrobiennes produites par ces isolats et déterminer leur structure.
- f) Une étude du pouvoir phytoestimulant de ces bactéries isolées vis-à-vis des plantes qui peuvent être utilisées en phytoremédiation.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- **ABDELLY C. (2007).** Bioremédiation/phyto-remédiation. Institut Supérieur de l'éducation et de la Formation Continue, SN 232, Université de Tunis, Tunisie.
- **ABOU-SHANAB R.A.I., VAN BERKUM P., ANGLE J.S. (2007).** Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemos.* 68: 360-367.
- **AENDEKERK S., GHYSELS B., CORNELIS P., BAYSSE C. (2002).** Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiol.*, 148: 2371-2381.
- **AGARRY O.O., AKINYOSOYE F.A., ADETUYI F.C. (2005).** Antagonistic properties of microorganisms associated with cassava (*Manihot esculenta Crantz*) products. *African. J. Biotech.*, 4 (7): 627-632.
- **AL-AJLANI M.M, HASNAIN S. (2010).** Rédacteur en chef (s) de bactéries présentant une activité antimicrobienne. Le dépistage des antibiotiques et les études génétiques associées. 8-230.
- **ALBUQUERQUE C.C., CAMARA T.R., MARIAN R.D., WILLADINO L., MARCELLINO C., ULISSES C. (2006).** Antimicrobial action of the essential oil of *Lippiagrabilis Schauer*. *Brazilian Arch. Biol. Tech.*, 49: 527-535.
- **ALLOUCHE F.N., HELLAL A., LARABA A. (2010).** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nat. Tech.*, 03 :13- 20.
- **AL-TALIB H., SYAMIMI N. I. M. N., YAZIZ H., ZULKAFI N. F., ADANI N. A., RASHIDI A. I. N., MURUGAIAH C., SHAARI S. A. (2016).** Potassium Aluminium Sulphate (Alum) Inhibits Growth of Human Axillary Malodor-Producing Skin Flora *in Vitro*. *J. Clinic. Health Sci.* 1(1): 59-63.
- **ALTIMIRA F., DU YAÑEZ C., BRAVO G., GONZALEZ M., LUIS ROJAS A., SEEGER M. (2012).** Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. *BMC Microbiol.*, 12: 193.
- **ALONSO A., SANCHEZ P., MARTINEZ J.L. (2000).** *Stenotrophomonas maltophilia* D457R contains a cluster of genes from gram-positive bacteria involved in antibiotic and heavy metal resistance. *Antimicrob. Agent. Chemoth.*, 44: 1778-1782.

Références bibliographiques

- **AOUINE L., GHERAB S. (2013).** Caractérisation préliminaire des bactéries métallo-résistantes isolées à partir de la zone industrielle d'Oued Aissi, Tizi Ouzou. Mémoire de Master, Université Mouloude Mammeri, Tizi Ouzou, Algérie. 39-42.
- **ARUL PRAKASH F., BABU G.D., LAVANYA M, VIDHYA KS, DEVASENA T. (2011).** Toxicity Studies of Aluminium Oxide Nanoparticles in Cell Lines. *Int. J. Nanotechnol. Appl.*, 5(2):99-107.
- **ASLIM B., SAGLAM N., BEYATLI Y. (2002).** Détermination de certaines propriétés de *Bacillus* isolées du sol Turk. *J. Biol.*, 26: 41-8.
- **AVIS T.J., MARTINEZ C., TWEDDELL R.J. (2010).** Integrated management of potato silver scurf (*Helminthosporium solani*). *Canadian J. Plant Pathol.*, 32: 287-297.
- **AXELSSON L. (2004).** Classification and physiology. *In* : Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects (SALMINEN S., WRIGHT A.V., OUWEHAND A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 1-66.
- **BÅÅTH E., DÍAZ-RAVIÑA M., FROSTEGÅRD Å., CAMPBELL C.D. (1998).** Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Appl. Envir. Microbiol.*, 64 : 238-245.
- **BAIZE D. (1997).** Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). *INRA Editions*, Paris, p 408.
- **BAKER A.J.M., WALKER P.L. (1990).** Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. *In*: Shaw, J. (Ed.). Heavy Metal Tolerance in plants: Evolutionary aspects. *CRC Press*, Boca Raton, Florida, 155-178.
- **BAGAI I., LIU W., RENSING C., BLACK B. N. J., MCEVOY M. M. (2007).** Substrate-linked conformational change in the periplasmic component of a Cu(I)/Ag(I) efflux system. *J. Biol. Chem.* 282(49):35695-702.
- **BAKER-AUSTIN C., WRIGHT M.S, STEPANAUSKAS R., MCARTHUR J.V. (2006).** Co-selection of Antibiotic and Metal Resistance. *Trend. Microbiol.*, 14:176-182.
- **BAÑUELOS G. S. (2006).** Phyto-products may be essential for sustainability and implementation of phytoremediation. *Environ. Pollut.*, 144: 19–23.
- **BASURTO-CADENA M.G., VAZQUEZ-ARISTA M., GARCIA-JIMENEZ J., SALCEDO-HERNANDEZ R., BIDESHI D.K., BARBOZA-CORONA J.E.**

Références bibliographiques

- (2012). Isolation of a new Mexican strain of *Bacillus subtilis* with antifungal and antibacterial activities. *Sci. World J.*, 1 : 384-978.
- **BEECH I.B., CHEUNG C.W.S. (1995).** Interactions of exopolymers produced by sulphate reducing bacteria with metal ions. *Int. Biodeter. Biodegrad.*, 35 : 59-72.
 - **BELYAGOUBI L. (2014).** Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. *Thèse de Doctorat*, Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen, Algérie, 115-123.
 - **BENHAMOU N., REY P., CHERIF M., HOCKENHULL J., TIRILLY Y. (1997).** Treatment with the mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of defence-related reactions in tomato roots when challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathol.*, 87: 108–121.
 - **BERKELEY R.C.W., LOGAN N.A., SHUTE L.A., CAPEY A.G. (1984).** In: Berkeley R.C. W. (Ed.), *Methods in Microbiology*. Academic Press, London, vol 16, chap. 12, pp 292-323.
 - **BERNAL G., ILLANES A., CIAMPI L. (2002).** L'isolement et la purification partielle d'un métabolite à partir d'une souche mutante de *Bacillus* sp. Avec une activité antibiotique contre les agents pathogènes végétaux. *Electron. J. Biotechnol.* 5 (1).
 - **BERTHE T., TOURON A., LELOUP J. DELOFFRE J. PETIT F., (2008).** Fecal indicator bacteria and sedimentary processes in estuarine mud flats (Seine, France). *Marine pollut. Bull.*, 57 (1-5): 59 – 67.
 - **BERTHOMIEU C., CHAPON V., GILBIN R. (2008).** Utiliser des bactéries pour dépolluer les environnements contaminés par des radionucléides. *Biofutur.*, 295 : 33-36.
 - **BHASKAR P.V., BHOSLE N.B., (2006).** Bacterial extracellular polymeric substances (EPS): a carrier of heavy metals in the marine food chains. *Environ. Int.*, 32: 191- 198.
 - **BLINDAUER C.A., HARRISON M.D., ROBINSON A.K., PARKINSON J.A., BOWNESS P.W., SADLER P.J., ROBINSON N.J. (2002).** Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. *Mol. Microbiol.*, 45: 1421-1432.
 - **BNYAN I., ALTA'EE A.H., KADHUM N.H. (2014).** Antibacterial Activity of Aluminum Potassium Sulfate and *Syzygium Aromaticum* Extract Against Pathogenic Microorganisms. *J. Nat. Sc. Res.*, 4(15):11-4.

Références bibliographiques

- **BOURRELIER P.H., BERTHELIN J. (1998).** Contamination des sols par les éléments traces: les risques et leur gestion. *CR. Acc. Sci.*, 42. Ed. Lavoisier, Paris.
- **BRADY N.C. (1984).** THE NATURE AND PROPERTIES OF SOIL. 9th edition. *Macmillan Book Co.*, New York.
- **BRAHIM S. (1998).** Isolement à partir de la rhizosphère des conifères de bactéries et d'actinomycètes antagonistes aux champignons phytopathogènes. *Thèse de doctorat.* Université Laval, Canada, 8-10.
- **BRUINS M.R., KAPIL S., OEHME F.W. (2000).** Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 45:198-207.
- **BROWN N.L., BARRETT S.R., CAMAKARIS J., LEE B.T., ROUCH D.A. (1995).** Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (*pco*) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. *Mol. Microbiol.* 17: 1153-1166.
- **BUCK J.W., JEFFERS S.N. (2004).** Effect of pathogen aggressiveness and vinclozolin on efficacy of *Rhodotorula glutinis* PM4 against *Botrytis cinerea* on geranium leaf disks and seedlings. *Plant Disea.*, 88: 1262-1268.
- **CAILLERE S., HENIN S., RAUTUREAU M. (1982).** Minéralogie des argiles. *Masson*: Paris, France.
- **CAMARGO F.A.O., OKEKE B.C., BENTO F.M., FRANKENBERGER W.T. (2003).** In vitro reduction of hexavalent chromium by a cell-free extract of *Bacillus sp.* ES 29 stimulated by Cu²⁺. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 62: 569.
- **CAMARGO F.A.O., OKEKE B.C., BENTO F.M., FRANKENBERGER W.T. (2005).** Diversity of chromium-resistant bacteria isolated from soils contaminated with dichromate. *Appl. soil Eco.*, 29: 193-202.
- **CAMPOS J., MARTINEZ-PACHECO M., CERVANTES C., (1995).** Hexavalent-chromium reduction by a chromate resistant *Bacillus sp.* strain. *Ant. Leeuw.* 68: 203–8.
- **CAVET J.S., BORRELLY G.P.M., ROBINSON N.J. (2003).** Zn, Cu and Co in cyanobacteria: selective control of metal availability. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 165-181.
- **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.

Références bibliographiques

- **CHAMAYOU H., LEGROS J.P. (1989).** Les bases physiques, chimiques et minéralogiques de la science du sol. *Technique vivante. Press. Univ. France.* Paris. 212-213.
- **CHEN J.H., LION L.W., GHIORSE W.C., SHULER M.L., (1995).** Mobilization of adsorbed cadmium and lead in aquifer material by bacterial extracellular polymers. *Water Res.*, 29: 421-430.
- **CHENG G, LI X. (2009).** Bioreduction of chromium (VI) by *Bacillus* sp. isolated from soils of iron mineral area. *Eur. J. Soil Biol.*, 45:483–487.
- **CHERNIN L., BRANDIS A., ISMAILOV Z., CHET I. (1996).** Pyrrolnitrin production by an *Enterobacter agglomerans* strain with a broad spectrum of antagonistic activity towards fungal and bacterial phytopathogens. *Curr. Microbiol.*, 32: 208-212.
- **CHIVIAN D., BRODIE E.L., ALM E J., CULLEY D.E., DEHAL P.S., DESANTIS T.Z., GIHRING T.M., LAPIDUS A., LIN L.H., LOWRY S.R., MOSER D.P., RICHARDSON P.M., SOUTHAM G., WANGER G., PRATT L.M., ANDERSEN G.L., HAZEN T.C., BROCKMAN F.J., ARKIN A.P., ONSTOTT T.C.(2008).** Environmental genomics reveals a single-species ecosystem deep within Earth. *Sc.*, 322: 275-8.
- **CHOI J., PARK J.W., (2005).** Competitive adsorption of heavy metals and uranium on soil constituents and microorganism. *Geosci. J.*, 9: 53-61.
- **CHOI D.W., ZEA C.J., DO YS., SEMRAU J.D., ANTHOLINE W.E., HARGROVE M.S., POHL N.L., BOYD E.S., GEESEY G.G., HARTSEL S.C., SHAFE P.H., MCELLISTREM M.T., KISTING C.J., CAMPBELL D., RAO V., DE LA MORA A.M., DISPIRITO A.A. (2006).**"Spectral, kinetic, and thermodynamic properties of Cu(I) and Cu(II) binding by methanobactin from *Methylosinus trichosporium* OB3b." *Biochem.*, 45(5): 1442-53.
- **CLAUS D., BERKELEY R.C.W. (1986).** Genus *Bacillus* *cohn* 1872. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp. 1105–1139.
- **COLIN J.E. (2008).** Antagonisme entre les *Pseudomonas fluorescents* et plusieurs pathovars de *Pseudomonas syringae*. « Application comme méthode de lutte contre la moucheture bactérienne de la tomate », *Bull. OEPP*, 18 (1) : 47-54.

Références bibliographiques

- **COMTE S., GUIBAUD G., BAUDU M., (2006).** Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) resulting from activated sludge according to their type: Soluble or bound. *Proc. Biochem.*, 41: 815-823.
- **COMTE S., GUIBAUD G., BAUDU M., (2006).** Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation Properties Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. *Enz. Microb. Tech.*, 38: 237-245.
- **CONGEEVARAM S., DHANARANI S., PARK J., DEXILIN M. THAMARAISELVI K. (2007).** Biosorption of chromium and nickel by metal resistant fungal and bacterial isolates. *J. Hazard. Material.*, 146:270-277.
- **CORBAZ R. (1990).** L'oïdium de la tomate, une maladie nouvelle en Suisse. *Rev. Suisse Viticult. Arboricult. Horticult.*, 22: 159-61.
- **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.
- **CHUN W.W.C., SHETTY K.K. (1994).** Control of silver scurf disease of potatoes caused by *Helminthosporium solani* Dur. & Mont, with *Pseudomonas corrugata*. *Phytopathol.*, 84: 1090.
- **CROTEAU M.N., LUOMA S.N., STEWART A.R. (2005).** Trophic transfer of metals along freshwater food webs: Evidence of cadmium biomagnification in nature. *Limnol. Oceanogr.*, 50: 1511–1519.
- **CUNNINGHAM S.D., BERTI W.R., HUANG J.W. (1995).** Phytoremediation of contaminated soils. *Trend. Biotechnol.*, 13 : 393-397.
- **DACOSTA Y. (2000).** La bio-protection des aliments. L'antagonisme microbien au service de la sécurité et de la qualité microbiologique. Ed : Technique et documentation.
- **DE FOREST D.K., BRIX K.V., ADAMS W.J. (2007).** Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. *Aquatic Toxicol.*, 84 : 236–246.
- **DELARRAS C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. *Éd. Médical I.*, Lavoisier 476 p.

Références bibliographiques

- **DE MEYER G., HOFTE M. (1997).** Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathol.*, 87: 588-593.
- **DESAUNAY A. (2011).** Etude et modélisation de la biosorption des métaux par les bactéries. Application au transfert du cadmium et du zinc, seuls ou en mélange par *Escherichia coli* et *Cupriavidus metallidurans* en colonnes de sable d'Hostun. Sciences de la Terre. Université de Grenoble.
- **DÍAZ-ROVIÑA M., BÁÁTH E. (1996).** Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2970-2977.
- **DIELS L., DONG Q., VAN DER LELIE D., BAEYENS W., MERGEAY M. (1995).** The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34: from resistance mechanism to the removal of heavy metals. *J. Ind. Microbiol.*, 14: 142-153.
- **DIELS L., VAN ROY S., TAGHAVI S., VAN HOUDT R. (2009).** From industrial sites to environmental applications with *Cupriavidus metallidurans*. *Anton. Van Leeu.*, 96: 247-258.
- **DJOSSOU O., PERRAUD -GAIME I., LAKHAL M.F., RODRIGUEZ-SERRANO G., KAROU G., NIAMKE S., OUZARI I., BOUDABOUS A., ROUSSOS S., (2011).** Robusta coffee beans post-harvest microflora: *Lactobacillus plantarum* sp. as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*, *Anaerob.*, 17 : 267-272.
- **DOELMAN P., JANSEN E., MICHELS M., VAN TIL M. (1994).** Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. *Biol. Fertil. Soils* 17, 177-184.
- **DOSANJH N.S., HAMMERBACHER N.A., MICHEL S.L. (2007).** Characterization of the *Helicobacter pylori* NikR-P(ureA). DNA Interaction: Metal Ion Requirements and Sequence Specificity. *Biochem.*, 46: 2520-2529.
- **DUBUIS C., HAAS D. (2007).** Cross-species GacA-controlled induction of antibiosis in *Pseudomonas*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 650-654.
- **DUCHAUFOR P. (1984).** Abrégé de pédologie. *Masson*, Paris, 220p.
- **DUFFY B., SCHOUTEN A., RAAIJMAKERS J.M. (2003).** Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual. Rev. Phytopathol.* 41: 501-538.

Références bibliographiques

- **DUTTA S., DE S. P., BHATTACHARYA S.K. (1996).** In vitro antimicrobial activity of potash alum. *Indian J. Med. Res.*104:157-9.
- **EDWARDS S.G., SEDDON B. (2001).** Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* in vitro. *J. App. Microbiol.*, 91: 652-659.
- **ELAD Y., SHTIENBERG D., NIV A. (1994).** *Trichoderma harzianum* T39 integrated with fungicides: improved biocontrol of grey mould, p. 1109-1113, in: Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases 1994, Vol. 3. British Crop Protection Council, Farnham, UK.
- **ELSON M.K., SCHISLER D.A., BOTHAST R.J. (1997).** Selection of microorganisms for biological control of silver scurf (*Helminthosporium solani*) of potato tubers. *Plant Dis.*, 81:647- 652.
- **EKALUND F., OLSSON S., JOHANSEN A. (2003).** Changes in the succession and diversity of protozoan and microbial populations in soil spiked with a range of copper concentrations. *Soil Biol. Biochem.*, 35: 1507-1516.
- **FARIA C., VAZ-MOREIRA I., SERAPICOS E., NUNES O.C, MANAIA C.M. (2009).** Antibiotic resistance in coagulase negative *staphylococci* isolated from wastewater and drinking water. *Sc. Tot. Environ.*, 407:3876–3882.
- **FEIL H., FEIL W.S, CHAIN P., LARIMER F., DIBARTOLO G., COPELAND A., LYKIDIS A., TRONG S., NOLAN M., GOLTSMAN E., THIEL J., MALFATTI S., LOPER J.E., LAPIDUS A., DETTER J.C., LAND M., RICHARDSON P.M., KYRPIDES N.C., IVANOVA N., LINDOW S.E. (2005).** Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. *Proc Natl Acad Sci .USA.* 102:11064–11069
- **FERREIRA SILVA C., DOS REIS K.C., LOPES N.A., DIAS M., BATISTA L.R., SCHWAN R.F. (2015).** Enzymatic and antagonistic potential of bacteria isolated from typical fruit of Cerrado in Minas Gerais State, Brazil. *Acta Sci. Agronom.*, 37 (3): 367-374.
- **FRANKE S., GRASS G., RENSING C., NIES D.H. (2003).** Molecular analysis of the coppertransporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 185 : 3804-3812.
- **GADD G. M. (1992).** Metals and microorganisms: A problem definition. *FEMS Microb. Letter*, 100:197-204.

Références bibliographiques

- **GADD G.M., (2009).** Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiol.*, 156: 609-643.
- **GATTI D., MITRA B., ROSEN B.P. (2000).** Escherichia coli soft metal ion-translocating ATPases. *J. Biol. Chem.*, 275(44): 12-34.
- **GELABERT A., POKROVSKY O., VIERS J., SCHOTT J., BOUDOU A., FEURTET-MAZEL A., (2006).** Interaction between zinc and freshwater and marine diatom species: Surface complexation and Zn isotope fractionation. *Geochimic. Cosmochimic. Acta.*, 70: 839-857.
- **GERBALDO G. A., BARBERISA C., PASCUALA L., BARBERISA L. (2012).** Antifungal activity of two lactobacillus strains with potential probiotic properties. *FEMS Microbiol. Lett.*, 332: 27-33.
- **GHOSH A., SINGH A., RAMTEKE P.W., SINGH V.P., (2000).** Characterization of Large Plasmids Encoding Resistance to Toxic Heavy Metals in *Salmonella abortus equi*. *Biochem. Biophysic Res. Communi.* 272:6-11.
- **GILLER E., WITTER K., McGRATH P.S. (1998).** Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils. *Soil. Biol. Biochem.* 30, 1389-1414.
- **GIRARD M.C., WALTER C., REMY J.C., BERTHELIN J., MOREL J.L. (2005).** Sols et environnement. DUNOD, Chapitre 3.4, les sols en milieu urbain-traitement des sols urbains pollués, Chapitre 19.4, pollution organiques agricoles, urbaine ou industrielles : cas des hydrocarbures aromatiques polycycliques-traitement des sites contaminés, 75-436.
- **GLICK B.R. (2003).** Phytoremediation: Synergistic Use of Plants and Bacteria to Clean Up the Environment. *Biotech. Advanc.* 21, 383-393.
- **GOLDBERG M., PRIBYL T., JUHNKE S., NIES D.H. (1999).** Energetics and topology of CzcA, a cation/proton antiporter of the resistance-nodulation-cell division protein family. *J Biol Chem.* 274, 26065-26070.
- **GOULD G.W., (2000).** Preservation: past, present and future, *British Medical Bull.*, 56, 84-96.
- **GOULLE J-P., SAUSSEREAU E., MAHIEU L., BOUIGE D., GUERBET M., LACROIX C. (2010).** Une nouvelle approche biologique : le profil métallique. *Annal. Bio. Cliniq.*, 68 (4): 429-40.

Références bibliographiques

- **GRASS G., RENSING C. (2001).** CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286: 902-8.
- **GRASS G., RENSING C., SOLIOZ M. (2011).** Metallic Copper as an Antimicrobial Surfac. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77 (5): 1541–1547.
- **GREGOIRE P., FARDEAU M.L., GUASCO S., BOUANANE A., MICHOTÉY V., BONIN P., DUBOURG K., CAMBAR J., OLLIVIER B. (2009).** Les micro-organismes de l'extrême. *Press. Therm. Climat.* 146: 49-61.
- **GUETSKY R., ELAD Y., SHTIENBERG D., DINOOR A. (2002).** Establishment, survival and activity of the biocontrol agents *Pichia guillermondii* and *Bacillus mycooides* applied as a mixture on strawberry plants. *Biocontrol. Sci. Techno.* 12: 705-714.
- **GUIRAUD J.P. (2003).** Microbiologie alimentaire. Ed, Dunod, Paris.
- **GULATI M.K., KOCH E., ZELLER W. (1999).** Isolation and identification of antifungal metabolites produced by fluorescent *Pseudomonas*, antagonist of red core disease of strawberry, pp. 437-444, in: Modern fungicides and antifungal compounds, Vol. 2. H. Lyr, P. E. RUSSELL, H. W. DEHNE, H. D. SISLER, eds. Intercept LTD publishers, Andover, England.
- **GUFFANTI A.A., WEI Y., ROOD S.V., KRULWICH T.A. (2002).** An antiport mechanism for a member of the cation diffusion facilitator family: divalent cations efflux in exchange for K^+ and H^+ . *Mol. Microbiol.*, 45:145-153.
- **GUIBAUD G., (2003).** Relation between extracellular polymers' composition and its ability to complex Cd, Cu and Pb. *Chemos.*, 52 : 1701-1710.
- **GUINE V. (2006).** Approche expérimentale et théorique de la réactivité de surface et de la mobilité des colloïdes bactériens en milieux poreux. Institut National Polytechnique de Grenoble.
- **GUINÉE J., VAN OERS L., DE KONING A., TAMIS W. (2006).** Life cycle approaches for conservation agriculture. Leiden University, Leiden, Allemagne, 171.
- **GUL-SEKER M. AND MATER Y. (2009).** Assessment of metal and antibiotic-resistance in marine bacteria isolated from Izmir Bay and Bosphorus entrance of Marmara and Black Sea, Turkey. *Fresen. Environ. Bull.*, 18 (11): 2192-2202.
- **GUPTA A., MATSUI K., LO J.F., SILVER, S. (1999).** Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nat. Med.*, 5: 183-188.

Références bibliographiques

- **HAANSTRA L., DOELMAN P. (1991).** An ecological dose-response model approach to short- and long-term effects of heavy metals on arylsulphatase activity in soil. *Biol. Fert. Soils*, 11: 18-23.
- **HAAS D., DEFAGO G. (2005).** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonas*. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3: 307-319.
- **HA J., GÉLABERT A., SPORMANN A.M., BROWN JR G.E., (2010).** Role of extracellular polymeric substances in metal ion complexation on *Shewanella oneidensis*: Batch uptake, thermodynamic modeling, ATR-FTIR, and EXAFS study. *Geochimic. Cosmochimic. Acta.*, 74 : 1-15.
- **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.
- **HAFERBURG G., KOTHE E., (2007).** Microbes and metals: interactions in the environment. *J.Basic ,Microbiol.*, 47: 453-467.
- **HAGGAG W.M. (2008).** Isolation of bioactive antibiotic peptides from *Bacillus brevis* and *Bacillus polymyxa* against *Botrytis grey* mould in strawberry. *Arch. Phytopathol. Plant Protec.*, 41: 477-491.
- **HAMMER P.E., HILL D.S., LAM S.T., VAN PEE K.H., LIGON J.M. (1997).** Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:2147-2154.
- **HAMMI H. (2010).** La pollution des eaux par les métaux lourds, les IIIème Olympiades Tunisiennes de Chimie.
- **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.
- **HATTORI H. (1992).** Influence of heavy metals on soil microbial activities. *Soil Sci. Plant Nutr.* 38, 93-100.
- **HE L.Y., ZHANG Y.F., MA, H.Y., SU L.N., CHEN Z.J., WANG Q.Y., QIAN M. SHENG X.F. (2010).** Characterization of copper-resistant bacteria and assessment of bacterial communities in rhizosphere soils of copper-tolerant plants. *Appl. Soil Ecol.*, 44: 49–55
- **HENGSTLER J.G., BOLM-AUDORFF U., FALDUM A., JANSSEN K., REIFENRATH M., GOTTE W.,JUNG D., MAYER-POPKEN O., FUCHS J.,**

Références bibliographiques

- 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.
- **HENI (2010).** Isolement, caractérisation et valorisation de bactéries de la mine de Gafsa pour des applications en bioremédiation. Centre National des Sciences et Technologies Nucléaires (CNSTN), Sidi Thabet.
 - **HIBAR K., DAAMI-REMADI M., HAIFA K., EL MAHJOUB M. (2005).** Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum*. sp. *radicis-lycopersici*, *Bas.*, 9(3): 163-171.
 - **HINOJOSA M.B., CARREIRA J.A., GARCÍA-RUIZ R., DICK R.P. (2005).** Microbial response to heavy metal polluted soils. *J. Environ. Qual.*, 34: 1789-1800.
 - **HIRSCH P.R., JONE M.J., MCGRATH S.P., GILLER K.E. (1993).** Heavy metals from past applications of sewage sludge decrease the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum bivar trifolii* populations. *Soil Biol. Biochem.*, 25: 1485-1490.
 - **HOBMAN J.L., BROWN N.L. (1997).** Bacterial mercury-resistance genes. *Met Ions Biol. Syst.*, 34: 527-568.
 - **HONDA N.H., KIMURA S., TATEDA K., HORIKAW. M., UEDA C., ISHII Y., ISHIGURO M., MIYAGI S., YAMAGUCHI K. (2011).** Role of *Pseudomonas aeruginosa* auto-inducers and their degradation products, tetramic acids, in bacterial survival and behavior in ecological niches. *Microbes. Environ.*, 26:160–164.
 - **HUANG X. D., EL-ALAWI Y., PENROSE D. M., GLICK B. R., GREENBERG B.M. (2004).** A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Environ. Pollu.*, 130(30): 465-476.
 - **HUSSEIN H., RUIZ O.N., TERRY N., DANIELL H. (2007).** Phytoremediation of mercury and organomercurials in chloroplast transgenic plants: enhanced root uptake, translocation to shoots and volatilization. *Environ. Sci. Technol.*, 41:8439-8446.
 - **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.
 - **HUYSMAN F.W., VERSTRAETE W., BROOKES P.C. (1994).** Effect of manuring practices and increased copper concentrations on soil microbial populations. *Soil Biol. Biochem.*, 26: 103-110.

Références bibliographiques

- **IYER A., MODY K., JHA B., (2004).** Accumulation of hexavalent chromium by an exopolysaccharide producing marine *Enterobacter cloacae*. *Mar. Pollut. Bull.*, 49.
- **JACOBSEN B.J. (2006).** Biological control of plant diseases by phyllosphere applied biological control agents, p. 133-147, in: Microbial ecology of aerial plant surfaces. M. J. Bailey, A. K. Lilley, T. M. Timms-Wilson and P. T. N. Spencer-Phillips, eds. Athenaeum Press, Gateshead, UK.
- **JARVIS M.D., LEUNG D.W.M. (2002).** Chelated lead transport in *Pinus radiata*: an ultrastructural study. *Environ. Exper. Bot.*, 48: 21-32.
- **JUHNKE S., PEITZSCH N., HUBENER N., GROSSE C., NIES D.H. (2002).** New genes involved in chromate resistance in *Ralstonia metallidurans* strain CH34. *Arch. Microbiol.*, 179: 15-25.
- **KACAR A., KOCYIGIT A. (2013).** Characterization of Heavy Metal and Antibiotic Resistant Bacteria Isolated from Aliaga Ship Dismantling Zone, Eastern Aegean Sea, Turkey. *Int. J. Environ. Res.*, 7(4):895-902.
- **KACAR A. (2015).** Investigation of Heavy Metal-Resistant Sediment Bacteria and Some Water Quality Parameters: A Case Study of Lake Bafa (Turkey). *Int. J. Environ. Res.*, 9(3):813-822.
- **KAMALA-KAANAN S., LEE K. J. (2008).** Metal Tolerance and Antibiotic Resistance of *Bacillus* species Isolated from Snchon Bay Sediments, South Korea. *Biotechnol.*, 7 (1), 149-152.
- **KAMENSKY M., OVADIS M., CHET I., CHERNIN L. (2003).** Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. *Soil Biol. Biochem.*, 35: 323-331.
- **KANDELER E., KAMPICHLER C., HORAK O. (1996).** Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Boil. Fertil. Soils*, 23:299-309.
- **KARBASIZAED V., BADAMI N., EMTIAZI G., (2003).** Antimicrobial, heavy metal resistance and plasmid profile of coliforms isolated from nosocomial infections in a hospital in Isfahan, Iran. *Af. J.of Biotech.*, 2:379-383.
- **KAZY S.K., SAR P., SINGH S.P., SEN A.K., D'SOUZA S.F., (2002).** Extracellular polysaccharides of a copper-sensitive and copper-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Références bibliographiques

strain: synthesis, chemical nature and copper binding. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 18: 583-588.

- **KELANI-FEKI O., CULIOLI G., ORTALO-MAGNÉ A., ZOUARI N., BLACHE Y., JAOUA S. (2011).** Environmental *Burkholderia cepacia* Cs5 acting by two analogous alkyl-quinolones and a didecyl-phthalate against a broad spectrum of phytopathogens fungi, *Curr. Microbiol.* 62: 1490-1495.
- **KELLY J.J., HÄGGBLOM M., TATE R.L. (1999).** Changes in soil microbial communities over time resulting from one time application of zinc: a laboratory microcosm study. *Soil Biol. Biochem.* 31: 1445-1465.
- **KELLY J.J., TATE R.L. (1998).** Effects of heavy metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of a zinc smelter. *J. Environ. Qual.* 27, 609-617.
- **KERMANSHAHI R. K., GHAZIFARD A., TAVAKOLI A. (2007).** Identification of bacteria resistant to heavy metals in the soils of Isfahan province. *Iranian J. of Sci. & Technol.*, 31-38.
- **KIEFER N. (2000).** Mechanisms of microbial metal resistance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1223-1226.
- **KIM E.S., LEE H.J., BANG W.G., CHOI I.G., KIM K.H. (2009).** Functional characterization of a bacterial expensing from *Bacillus subtilis* for enhanced enzymatic Hydrolysis of cellulose. *Biotechnol. Bioengineeri.*, 102 (5): 1342-1353.
- **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.
- **KONG Q., SHAN S., QIZHENG L., WANG X., YU F. (2010).** Biocontrol of *Aspergillus flavus* on peanut kernels by use of a strain of marine *Bacillus megaterium*. *Inter. J. Food. Microbiol.*, 139, 31-35.
- **KONOPKA A., ZAKHAROVA T., BISCHOFF M., OLIVIER L., NAKATSU C., TURCO R.F. (1999).** Microbial biomass and activity in lead-contaminated soil. *Appl. Envir. Microbiol.*, 65: 2256-2259.
- **KUPERMAN R.G., CARREIRO M.M. (1997).** Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. *Soil Biol. Biochem.*, 29 : 179-190.

Références bibliographiques

- **KUTA FA. (2008).** Effets antifongiques de Calotropis Procera extrait de banque de souches contre *Trichoplyton gypseum* et *Epiderinoplyton Flocosum* .*Afr. J. Biotechnol.*, 7 (13): 2116-8.
- **LABRENZ M., DRUSCHEL G.K., THOMSEN-EBERT T., GILBERT B., WELCH S.A., KEMNER KM, LOGAN GA, SUMMONS RE, DE STASIO G, BOND PL, LAI B, KELLY S.D., BANFIELD J.F. (2000).** Formation of sphalerite (ZnS) deposits in natural biofilms of sulfate-reducing bacteria. *Sci.*, 290 : 1744-1747.
- **LANDI L., RENELLA G., MORENO J.L., FALCHINI L., NANNIPIERI P. (2000).** Influence of cadmium on the metabolic quotient, L-D-glutamic acid respiration ratio and enzyme activity: microbial biomass ratio under laboratory conditions. *Biol. Fertil. Soils.*, 32: 8-16.
- **LANGE R.M., BISHT V.S., CHEN Z., BAINS P.S., KAWCHUK L.M., LYNCH D.R. (1995).** Antibiosis of *Bacillus polymyxa* and its metabolite(s) against various potato pathogens. *Can. J. Plant, Pathol.*, 17: 325.
- **LAREF N. (2014).** Etude de l'activité antifongique des Lactobacilles et leur effet sur la croissance d'*Aspergillus sp.* thèse de doctorat, Université d'Oran, Oran, Algérie, 4-10.
- **LEE S. M., GRASS G., RENSING C., BARRETT S.R., YATES C.J., STOYANOV J.V., BROWN N.L. (2002).** The Pco proteins are involved in periplasmic copper handling in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295: 616-620.
- **LEE Y.J., KIM B.K., LEE B.H., JO K.I., LEE N.K., CHUNG C.H., LEE Y.C., LEE J.W. (2008).** Purification and characterization of cellulose produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Biores. Tech.*, 99 (2): 378-386.
- **LEITA L., DE NOBILI M., MUHLBACHOVA G., MONDINI C., MARCHIOL L., ZERBI G. (1995).** Bioavailability and effects of heavy metals on soil microbial biomass survival during laboratory incubation. *Biol. Fertil. Soils.*, 19: 103-108.
- **LETOFFE S., AUDRAIN B., BERNIER S.P., DELEPIERRE M., GHIGO J.M. (2014).** Aerial Exposure to the Bacterial Volatile Compound Trimethylamine Modifies Antibiotic Resistance of Physically Separated Bacteria by Raising Culture Medium pH. *mBio.*, 10:1128.
- **LEVY E., EYAL Z., CHET I., HOCHMAN A. (1992).** Resistance mechanisms of *septoria triticite* antifungal products of *Pseudomonas* .*Phy. Mol. Pla.path.*, 40:163-171.

Références bibliographiques

- **LIEBERT C.A., HALL R.M., SUMMERS A.O. (1999).** Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63: 507-522.
- **LIGON J.M., HILL D.S., HAMMER P.E., TORKEWITZ N.R., HOFMANN D., KEMPF H.J. VAN PEE K.H. (2000).** Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest. Management. Sci.*, 56: 688-695.
- **LIU C., MAO X.L., MAO S.S., ZENG X., GREIF R., RUSSO R.E. (2004).** Nanosecond and femtosecond laser ablation of brass: Particulate and ICPMS measurements. *Anal. Chem.*, 76: 379-383.
- **LIVERMORE D.M. (2003).** Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin. Infect. Dis.*, 36: S11-23.
- **LONG F., SU C.C., LEI H.T., BOLLA J.R., DO S.V, YU E.W. (2012).** Structure and mechanism of the tripartite CusCBA heavy-metal efflux complex. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 367:1047-58.
- **LOUCIF K. (2011).** Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes. Caractérisation préliminaire de molécules bioactives. Thèse de MAGISTER, Université Mentouri-Constantine, Algérie, 50-55.
- **LOVLEY D.R., LLOYD J.R. (2000).** Microbes with a metal for bioremediation. *Nat. Biotechnol.*, 18: 600-601.
- **LOZNIEWSKI A., RABAUD C. (2010).** Résistance bactérienne aux antibiotiques, infections associées aux soins, CCLIN.
- **MACOMBER L, IMLAY J.A. (2009).** The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 106(20):8344-49.
- **MACASKIE L.E., BONTHRONE K.M., YONG P., GODDARD D.T. (2000).** Enzymically mediated bioprecipitation of uranium by a *Citrobacter* sp.: a concerted role for exocellular lipopolysaccharide and associated phosphatase in biomineral formation. *Microbiol.*, 146: 1855-67.
- **MAGNANI D., SOLIOZ M. (2007).** How bacteria handle copper In : *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Berlin. Springer Berlin Heidelberg, pp 259-285.
- **MANSOUR A., ZEINAB R., AMANOLLAH Z.A. (2015).** Isolation and Identification of *Bacillus* Species From Soil and Evaluation of Their Antibacterial Properties. *Avic. J. Clinic. Microbiol. Infec.*, 10: 236-261

Références bibliographiques

- **MANTEAU S., ABOUNA S., LAMBERT B., LEGENDRE L. (2003).** Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 43: 359-366.
- **MARCHAL N. BOURDON J.L. (1982).** Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. *Ed. Doin*, Paris.
- **MAROT F. (1998).** Caractérisation et traitement des sédiments de dragage contenant des polluants métalliques. Paris : BRGM.
- **MARTIN T.A., RUBY M.V. (2004).** Review of In Situ Remediation Technologies for Lead, Zinc, and Cadmium in Soil. *Remed.*, 14, 35-53.
- **MARTINEZ C., AVIS T.J., SIMARD J.N., LABONTE J., BELANGER R.R. TWEDDELL R.J. (2006).** The role of antibiosis in the antagonism of different bacteria towards *Helminthosporium solani*, the causal agent of potato silver scurf. *Phytoprotection* 96: 69-76.
- **MARTINEZ J.L., FAJARDO A., GARMENDIA L., HERNANDEZ A., LINARES J.F., MARTINEZ-SOLANO L., SANCHEZ M.B. (2009).** A global view of antibiotic resistance. *FEMS. Microbiol. Rev.*, 33: 44-65.
- **MATYAR F., KAYA A., DİNÇER S. (2008).** Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey, *Sci. Tota Environ.*, 407: 279-285.
- **MATYAR F., AKKAN T., UÇAK Y., ERASLAN B. (2010).** *Aeromonas* and *Pseudomonas*: Antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). *Environ. Monit. Assess.*: 167: 309–320.
- **MATEO E.M., MEDINA A., MATEO F., VALLEALGARRA F.M., PARDO I., JIMÉNEZ M. (2010).** Ochratoxin A removal in synthetic media by living and heat-inactivated cells of *Oenococcus oeni* isolated from wines. *Food. Control.*, 21(1): 23-28.
- **MAWADZA C., HATTI-KAUL R., ZVAUYA R., MATTIASSON B. (2000)** Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *J. Biotech.*, 83. (3): 177-187.
- **MCGRATH S.P., ZHAO F.J. (2003).** Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 277-282.
- **McINTYRE T. (2003).** Phytoremediation of heavy metals from soils, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology.* 78: 97-123.

Références bibliographiques

- **McSPADDEN-GARDENER B.B., FRAVEL D.R., (2002).** Biological control of plant pathogens: Research, commercialization, and application in the USA. Online. *Plant Health Progress.*, 10 :1094
- **MEGRAUD .F (2004).** Méthode diagnostic directe et indirecte d'*Helicobacter pylori*. *Centre national de référence des Campylobacters et Helicobacters* ; Bordeaux.
- **MERGEAY M., NIES D., SCHLEGEL H.G., GERITS J., CHARLES P., VAN GIJSEGEM F. (1985).** *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol.*, 162: 328-334.
- **MERTENS J., SPRINGAEL D., DE TROYER I., CHEYNS K., WATTIAU P., SMOLDERS E. (2006).** Long-term exposure to elevated zinc concentrations induced structural changes and zinc tolerance of the nitrifying community in soil. *Env. microbiol.*, 8: 2170-2178.
- **METLEF S., DILMI-BOURAS A. (2009).** Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrêmophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente. *Natur. Tech.*, 1:33-44.
- **MEYER T. J., RAMLALL J., THU P., GADURA N. (2015).** Antimicrobial Properties of Copper in Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricult. Food Biotechnol. Enginee.*, 9 (3): 274-278.
- **MEZAACHE S. (1997).** Etude des Propriétés suppressives d'une souche de *Pseudomonas* isolée de la rhizosphère de la pomme de terre sur la croissance de deux bactéries et de deux champignons phytopathogènes. Thèse de Magister. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen, Algérie, 115-123.
- **MEZAACHE S. (2012).** Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre. Thèse de doctorat, Université "Ferhat ABBAS", Sétif, Algérie, 62-64.
- **MICHAUD M., MARTINEZ C., SIMAO-BEAUNOIR A.M., BELANGER R.R., TWEDDELL R.J. (2002).** Selection of antagonist microorganisms against *Helminthosporium solani*, causal agent potato silver scurf. *Plant Disease*, 86: 717-720.
- **MICHAUD M., MARTINEZ C., BÉLANGER R.R., TWEDDELL R.J. (2003).** Selection of microorganisms displaying the ability to reduce silver scurf development on potato tuber. *Acta Horticulturae.*, 619: 161-166.

Références bibliographiques

- **MILITON C. (2007).** Caractérisation des communautés procaryotiques impliquées dans la bioremédiation d'un sol pollué par des hydrocarbures et développement d'outils d'analyse à haut débit : les biopuces ADN, thèse de doctorat, école doctorale des sciences de la vie et de la santé, Génomique et Ecologie Microbienne, Université Blaise Pascal, Auvergne, France.
- **MIQUEL G. (2001).** Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé.
- **MISHRA S., DOBLE M. (2008).** Novel Chromium Tolerant Microorganisms: Isolation, Characterization and Their Biosorption Capacity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 71: 874-879.
- **MISHRA M., RENTSCH M., KNUST E. (2012).** Crumbs regulates polarity and prevents light-induced degeneration of the simple eyes of *Drosophila*, the ocelli. *Europ. J. Cell Biol.* 91: 706-716.
- **MISRA T.K. (1992).** Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials *Plasmid.* 27: 4-16.
- **MITTAL S., MEYER J-M, GOEL R. (2003).** Isolation and Characterization of Aluminium and Copper Resistant 'P' Solubilizing Alkalophilic Bacteria. *Indian. J. of Biotech.* 2: 583-586.
- **MOFFETT B.F., NICHOLSON F.A., UWAKWE N.C., CHAMBERS B.J., HARRIS J.A., HILL T.C.J. (2003).** Zinc contamination decreases the bacterial diversity of agricultural soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43 : 13-19.
- **MONCHY S. (2007).** Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez *Cupriavidus metallidurans* CH34. Thèse de doctorat, p 13-33.
- **MONTESINOS E., BONATERRA A. et MOSELIO S. (2009).** Pesticides, Microbial. Dans: Encyclopedia of Microbiology (Moselio, S.), Academic Press, Oxford, UK. Pp. 110-120.
- **MOREL R. (1989).** Les sols cultivés. *Lavoisier*, Paris.
- **MORILLO PEREZ J.A., GARCIA-RIBERA R., QUESADA T., AGUILERA M., RAMOS-CORMENZANA A., MONTEOLIVA-SANCHEZ M., (2008).** Biosorption of heavy metals by the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 2699-2704.
- **MOROZZI G., CIENCI G., CALDINI G. (1982).** The tolerance of an Environmental Strain of *Escherichia coli* to Some Heavy Metals. *Zbl. Bakt. Hyg.*,:189: 55-62.

Références bibliographiques

- **MOURUGHAN K., SURYAKANTH M. P. (2004).** Evaluation of an alum-containing mouthrinse for inhibition of salivary *Streptococcus mutans* levels in children controlled clinical trial. *Indian J. Soc. Pedod. Prev. Dent.* 22(3):100-5.
- **MUKHOPADHYAY R., ROSEN B.P., PHUNG L.T., SILVER S. (2002).** Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26: 311-325.
- **MULLIGAN C. N., YONG R. N., GIBBS B. F. (2001).** An evaluation of technologies for the heavy metal remediation of dredged sediments. *J Hazard Mater.* 85: 145-163.
- **MUNIOZ J.A., GONZALEZ F., BLAZQUEZ A., BALLISTER A. (1995).** A study of the bioleaching of a Spanish uranium ore. Part I: A review of the bacterial leaching in the treatment of uranium ores, *Hydrometallurgy*, 38: 39–57.
- **MUNSON G.P., LAM D.L., OUTTEN F.W., O'HALLORAN T.V. (2000).** Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 182(20): 5864-71.
- **MUTHUSELVAN I, BALAGURUNATHAN R. (2013).** siderophore production from azotobacter sp. and its application as biocontrol agent. *Int. J. Curr. Res. Rev.*, 5:23-35.
- **NAIL N.M., BESSON F., DELEU M. (2013).** Interactions des antibiotiques ituriniques avec la membrane plasmique. Apport des systèmes biomimétiques des membranes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 17(3): 505-516.
- **NELSON N. (1999).** Metal ion transporters and homeostasis. *Embo. J.*, 18(16): 4361-71.
- **NF ISO 15799 (X31-603) – Qualité du sols – Lignes directrices relatives à la caractérisation écotoxicologique des sols et des matériaux du sol, 2004.**
- **NIELSEN P., SDRENSEN J. (1997).** Multi-target and medium-independent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. *FEMS Microbiol. Eco.* 22: 1 83- 192.
- **NIES D.H. (1992).** CzcR and CzcD, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc, and cadmium (*czc* system) in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol.* 174: 8102-8110.
- **NIES D.H. (1995).** The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, 177: 2707-2712.

Références bibliographiques

- **NIES D.H. (1999).** Microbial heavy-metal resistance. *App Microbiol. Biotech.*, 51:730-750.
- **NIES D.H. (2003).** Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.*, 27: 313-339.
- **NIES D.H. (2007).** Bacterial transition metal homeostasis. In *Molecular Microbiology of Heavy Metals*, vol. 6, ed. DH Nies, S Silver, Berlin Heidelberg Springer. pp 117–42.
- **NIES DH. (2013).** RND efflux pumps for metal cations. *Microbial Efflux Pumps: Curr. Res.*, 1: 79-121.
- **NIES D.H., SILVER S. (1995).** Ion efflux system involved in bacterial metal resistance and Microbial., 14: 186-199.
- **NITHYA C., PANDIAN S.K. (2009).** Isolation of heterotrophic bacteria from Palk Bay sediments showing heavy metal tolerance and antibiotic production. *Microbiol Res.* 165: 578-593.
- **NITHYA C., GNANALAKSHMI B., PANDIAN S.K. (2011).** Assessment and characterization of heavy metal resistance bacteria in Palk Bay sediment. *Mar. Environ. Res.*, 7(1): 283-294.
- **NWEKE C.O., ALISI C.S J. C., OKOLO J.C., NWANYANWU C.E. (2007).** Toxicity of Zinc to Heterotrophic Bacteria from a Tropical River Sediment. *Appl. Environ. Res.* 5:23-132.
- **OLSON P.E., CASTRO A., JOERN M., DU TEAU N.M., PILON-SMITS E., REARDON K.F. (2008).** Effects of Agronomic Practices on phytoremediation of an Aged PAH-Contaminated Soil. *J. Env. Qual.*, 37(4): 1439-1446.
- **OVES M., KHAN MS., ZAIDI A. (2013).** Chromium reducing and plant growth promoting novel strain *Pseudomonas aeruginosa* OSG41 enhance chickpea growth in chromium amended soils. *Eur. J. Soil. Biol.* 56: 72-83.
- **ÖZTÜRK G., ÖZÖZEN O., MINARECI E., MINAREC I. (2008).** Determination of heavy metals in fish, water and sediments of avsar dam lake in turkey. *Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng.*, 6: 73-80.
- **OZDEMIR G., CEYHAN N., MANAV E. (2005).** Utilization of an exopolysaccharide produced by TEM05 in alginate beads for adsorption of cadmium and cobalt ions. *Bio Tech.*, 96: 1677-1682.
- **PAL A., PAUL A.K., (2008).** Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Ind. J. Microbiol.* 48: 49-64.

Références bibliographiques

- **PAUL B., GIRARD I., BHATNAGAR T., BOUCHET P. (1997).** Suppression of *Botrytis cinerea* causing grey mould disease of grape vine (*Vitis vinifera*) and its pectinolytic activities by a soil bacterium. *Microbiologic. Res.*, 152: 413-420.
- **PELMONT J., (2005).** Biodégradation et métabolisme ,2^{ème} édition, pp 654-689.
- **PERRON K., CAILLE O., ROSSIER C., VAN DELDEN C., DUMAS J.L., KOHLER T. (2004).** CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.*, 279: 8761-8768.
- **PHOEBE C.H.J., COMBIE J., ALBERT F.G., VAN TRAN K., CABRERA J., CORREIRA H.J., GUO Y., LINDERMUTH J., SELITRENNIKOFF N. (2001).** Extremophilic organisms as an unexplored source of antifungal compounds. *J. Antibio.*, 54: 56-65.
- **PILON-SMITH E., LEDUC D. (2009).** Phytoremediation of selenium using transgenic plants. *Curr Opinion in Biotech.*, 20: 207-212.
- **PODDA F., ZUDDAS P., MINACCI A., PEPI M. BALDI F. (2000).** Heavy metal coprecipitation with hydrozincite [Zn₅(CO₃)₂(OH)₆] from mine waters caused by photosynthetic microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 5092-5098.
- **POLLMANN K., RAFF J., MERROUN M., FAHMY K., SELENSKA-POBELL S. (2006).** Metal binding by bacteria from uranium mining waste piles and its technological applications. *Biotech. Adv.*, 24: 58-68.
- **PODILE A.R., PRAKASH A.P. (1996).** Lysis and biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* AF 1. *Canadian. J. Microbiol.* 42: 533-538.
- **PRABHA K. PADMAVA T., LORETTA Y.L. (2007).** Phytoremediation Technology: Hyper-accumulation Metals in Plants. *Water. Air. Soil. Pollut.* 184: 105-126.
- **PRESCOTT L. M., HARLEY J. P., KLEIN D. A. (2003).** *Microbiologie*. 2^e éd : De Boeck .France, 671.
- **RAAIJMAKERS J., VLAMI M. DE SOUZA J. (2002).** Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek.* 81: 537-547.
- **RASKIN I., KUMAR N.P.B.A., DUSHENKOV S., SALT D.E. (1994).** Bioconcentration of heavy metal by plant. *Curr. Opinion. biotechnol.*, 5: 285-290.

Références bibliographiques

- **RATHNAYAKE V.N., MEGHARAJ M., BOLAN N., NAIDU R. (2009).** Tolerance of Heavy Metals by Gram Positive Soil Bacteria. *W. Acad. Sc., Engin. Tech.*, 53:1185-1189.
- **RATTANAPORN T., HATAICHANOKE N. (2013).** Inhibitory Activity of *Bacillus subtilis* BCC 6327 Metabolites against Growth of Aflatoxigenic Fungi Isolated from Bird Chili Powder. *Int. J. Biosc, Biochem Bioinfo.* 3. (1): 27-31.
- **RAWLINGS D.E., DEW D., DU PLESSIS C. (2003).** Biomineralization of metal containing ores and concentrates. *Trends Biotech.*, 21 (1): 38-44.
- **REENA A., JENIFER M.A., AYSHA O.S., VALLI S., NIRMALA P., VINOTHKUMAR P. (2013).** Original Research Article Isolation of siderophore producing bacteria from rhizosphere soil and their antagonistic activity against selected fungal plant pathogens. *Int J Curr. Microbiol. App. Sci.*, 2:59–65.
- **RENELLA G., MENCH M., VAN DER LELIE D., PIETRAMELLARA G., ASCHER J., CECCHERINI, M.T., LANDI L., NANNIPIERI P. (2003).** Hydrolase activity, microbial biomass and community structure in long-term Cd-contaminated soils. *Soil. Biol. Biochem.*, 36. 443-451.
- **RENNINGER N., KNOPP R., NITSCH H., CLARK D.S., KEASLING J.D. (2004).** Uranyl precipitation by *Pseudomonas aeruginosa* via controlled polyphosphate metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70.(12): 7404-12.
- **RENSING C., GRASS G. (2003).** *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev.*, 27. 197-213.
- **RENSING C., PRIBYL T., NIES D.H. (1997).** New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter. *J Bacteriol.*, 179 : 6871-6879.
- **RICHARD J. (1996).** Utilisation de bactériocines pour la production d'aliments plus sûrs : mythe ou réalité ? *Dairy Sci. Technol.*, 76: 179-189.
- **RIVERA-VARAS V.V., FREEMAN T.A., GUDMESTAD N.C., SECOR G.A. (2007).** Mycoparasitism of *Helminthosporium solani* by *Acremonium strictum*. *Phytopathol.*, 97: 1331-1337.
- **ROANE T.M., KELLOGG S.T. (1995).** Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils. *J. Microbiol.*, 42: 593-603.
- **ROBERT M., CHENU C. (1992).** Interactions between soil minerals and microorganisms. *Soil Biochemistry.* Stotzky G., Bollag, J.M., eds. pp. 307-404. Marceil Dekker Inc, New York, Basel, Hong Kong.

Références bibliographiques

- **ROBERT M., JUSTE C. (1999).** Dynamique des éléments traces de l'écosystème sol. In Club CRIN Environnement et Ministère de l'environnement. Spéciation des métaux dans le sol. Paris: CRIN.
- **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.
- **ROONEY J.P. (2007).** The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. *Toxicol.*, 234(3): 145-56.
- **ROUCH D.A., BROWN N.L. (1997).** Copper-inducible transcriptional regulation at twopromoters in the *Escherichia coli* copper resistance determinant pco. *Microbiol.*, 143 (4): 1191-202.
- **ROUX M., SARRET G., PIGNOT-PAINTRAND I., FONTECAVE M., COVES J., (2001).** Mobilization of Selenite by *Ralstonia metallidurans* CH34. *App. Env. Microbiol.*, 67: 769-773.
- **RUFUS L.C., MINNIE M., YIN M.L., SALLY L.B., ERIC P.B., SCOTT-ANGLE J., ALAN, J.M.B. (1997).** Phytoremediation of soil metals. *Cur Opinion Biotech.*, 8. 279-284.
- **RYAN R.P., RYAN D.J., DOWLING D. (2005).** Multiple metal resistant transferable phenotypes in bacteria as indicators of soil contamination with heavy metals. *J. Soils. Sediments.*, 5: 95-100.
- **SAIER M.H., TAM R., REIZER A., REIZER J. (1994).** Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol Microbiol.*, 11: 841- 847.
- **SALLE B. (1999).** Étude de l'interaction laser-matériau appliquée à l'analyse élémentaire des solides. *Thèse de doctorat*, Université d'Orléans.
- **SALT D.E., BLAYLOCK M., KUMAR N.P.B.A., DUSHENKOV S., ENSLEY B.D., CHET I., RASKIN I. (1995).** Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotech.*, 5: 285-290.
- **SALT D.E., SMITH R.D., RASKIN I. (1998).** Phytoremediation. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49: 643-68.
- **SANDAA R.A., ENGER Ø., TORSVIK V., (1999).** Abundance and Diversity of Archaea in Heavy-Metal-Contaminated Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3293-3297.

Références bibliographiques

- **SANDAA R.A., TORSVIK V., ENGER Ø. (2001).** Influence of long-term heavy metal contaminations on microbial communities in soil. *Soil Biol. Biochem.* 33: 287-295.
- **SANDAA R.A., TORSVIK V., ENGER Ø., DAAE F.L., CASTBERG T., HAHN D. (1999).** Analysis of bacterial communities in heavy metal contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS. Microbiol. Eco.*, 30: 237-251.
- **SANO Y., MATSUI H., KOBAYASHI M., KAGEYAMA M. (1993).** Molecular structures and functions of pyocins S1 and S2 in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.*, 175: 2907-2916.
- **SANTO C. E., VASCONCELOS M. P., GRASS G. (2010).** Isolation and Characterization of Bacteria Resistant to Metallic Copper Surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76. (5): 1341-1348.
- **SANTO C.E., TAUDTE N., NIES D.H., GRASS G. (2008).** Contribution of copper ion resistance to survival of *Escherichia coli* on metallic copper surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 977-986.
- **SARANGI A., KRISHNAN C. (2008).** Comparison of in vitro Cr (VI) reduction by CFEs of chromate resistant bacteria isolated from chromate contaminated soil. *Bio. Tech.*, 99: 4130-4137.
- **SARRET G., AVOSCAN L., CARRIERE M., COLLINS R., GEOFFROY N., CARROT F., COVES J., GOUGET B. (2005).** Chemical Forms of Selenium in the Metal-Resistant Bacterium *Ralstonia metallidurans* CH34 Exposed to Selenite and Selenate. *Applied, Env., Microbiol.*, 71: 2331-2337.
- **SATCHANSKA G., PENTCHEVA E.N., ATANASOVA R., GROUDEVA V., TRIFONOVA R., GOLOVINSKY E., (2005).** Microbial Diversity in Heavy-Metal Polluted Waters. *Biotechnol. Biotechnol. Eq.*, 19: 61-67.
- **SCHALK I.J. (2008).** Metal trafficking via siderophores in Gram-negative bacteria: Specificities and characteristics of the pyoverdine pathway. *J. Inorg. Bioche.*, 102:1159–1169.
- **SCHMIDT T., SCHLEGEL HG. (1994).** Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the ncc locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *J Bacteriol.*, 176: 7045-7054.

Références bibliographiques

- **SCHOONBEEK H.J., JACQUAT-BOVET A.C., MASCHER F., METRAUX J.P. (2007).** Oxalate degrading bacteria can protect *Arabidopsis thaliana* and crop plants against *Botrytis cinerea*. *Mol Plant-Microbe Inter.*, 20: 1535-1544.
- **SHAKOORI A.R., MAKHDOOM M., HAQ R.U. (2000).** Hexavalent chromium reduction by a dichromate-resistant gram-positive bacteria isolated from effluents of tanneries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53: 48–351.
- **SHRUTI M., BALI G., SARANYA S.K., 2012.** Lead Biosorbition by a bacterium isolated from industrial effluents. *Int. J. Microbiol. Res.*, 4: 196-200.
- **SIGG L., BEHRA R. (2005).** Speciation and bioavailability of trace metals in freshwater environments. *Met. Ions Biol. Syst.*, 44: 47-73.
- **SILVER S. (1996).** Bacterial Resistances to Toxic Metal Ions. *Rev. Gen.*, 179:9-19.
- **SILVER S., GANGYONG J.I. (1994).** Newer systems for bacterial resistance's to toxic heavy metals. *Environ Health perspect.*, 102: 107-113.
- **SILVER S., PHUNG L.T. (1996).** Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu Rev Microbiol.*, 50: 753-789.
- **SILVER S., PHUNG L.T. (2005).** A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32: 587-605.
- **SINGH S.K., TRIPATHI V.R., JAIN R.K., VIKRAM S., GARG S.K. (2010).** An antibiotic, heavy metal resistant and halotolerant *Bacillus cereus* SIU1 and its thermoalkaline protease. *Microbiol. Cell Fact.*, 9: 59-65.
- **SLAMA T.G. (2008).** Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Crit.*, 4: 4.
- **SMITH E., LEEFLANG P., WERNARS K. (1997).** Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 23: 249-261.
- **SONGCAN C., XIAOMIN L., GUOXIN S., YINGJIAO Z., JIANQIANG S., JUN Y. (2015).** Heavy Metal Induced Antibiotic Resistance in Bacterium LSJC7. *Int. J. Mol. Sci.*, 16: 23390-23404.
- **SPOSITO G. (1989).** The Chemistry of Soils. *Oxford University Press.* 277.
- **ST-ONGE L., KWONG E., SABSABI M., VADAS E.B. (2002).** Quantitative analysis of pharmaceutical products by laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochim. Acta. Part B.*, 57: 1131-1140.

Références bibliographiques

- **SU C-C., LONG F., LEI H-T., BOLLA J.R, DO S.V. (2012).** Charged amino acids (R83, E567, D617, E625, R669, and K678) of CusA are required for metal ion transport in the Cus efflux system. *J. Mol. Biol.*, 422:429-41.
- **SUMMERS A.O., CASLAKE L., LIEBERT C., WIREMAN J. (1995).** The response of the bacterial plasmid mercury resistance operon to inorganic Hg exposure: transcriptional and environmental studies. *J. Ino. Bioche.*, 59: 246.
- **SWADLING I.R., JEFFRIES P. (1998).** Antagonistic properties of two bacterial biocontrol agents of grey mould disease. *Biocont. Sci. Tech.*, 8: 439-448
- **TABAK S., BENSOLTANE A. (2011).** L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales, thèse de doctorat, Université d'Oran, Oran, Algérie., 71-79.
- **TANDY S., SCHULIN R., NOWACK B. (2006).** The influence of EDDS on the uptake of heavy metals in hydroponically grown sunflowers. *Chemo.* 62. 1454-1463.
- **TORSVIK V., ØVRAÅS L. (2002).** Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.*, 5: 240-245.
- **TSIRIDIS V., PETALA M., SAMARAS P., HADJISPYROU S., SAKELLAROPOULOS G., KUNGOLOS A. (2006).** Interactive toxic effects of heavy metals and humic acids on *Vibrio fischeri*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63 (1): 158-67.
- **TURPEINEN R., KAIRESALO T., HÄGGBLUM M.M. (2004).** Microbial community structure and activity in arsenic, chromium and copper contaminated soils. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 47: 39-50.
- **ÜNALDI C.M.N., KORMAZ H., ARIKAN B., CORAL G., (2005).** Plasmid mediated heavy metal resistances in *Enterobacter spp.* isolated from Sofulu Landfill, in Adana, Turkey. *An. Microbiol.*, 55:175-179.
- **UESHIMA M., GINN B., HAACK E., SZYMANOWSKI J., FEIN J. (2008).** Cd adsorption onto *Pseudomonas putida* in the presence and absence of extracellular polymeric substances. *Geo. Cosmo. Acta.*, 72: 5885-5895.
- **VAVASSEUR A. (2014).** Bioremédiation des sols et des eaux : application aux pollutions chimique et nucléaire. *Ener. sant.*, 80-86.
- **VENEGAS E.G., LUIGI P., CIAMPI L., COLLADO G., COSTA MARCIA L., FUENTES P., JUAN M. NISSEN R., SCHÖBITZ T., SCHOEBITZ C.(2005).**

Références bibliographiques

Isolation and identification of native bacteria of the genus *Bacillus* Cohn antagonistic to pathogenic strains of *Fusarium* Link. in calla. *agro sur.*, 2: 33

- **VERMA T., GARG S.K., RAMTEKE P.W. (2009).** Genetic correlation between chromium resistance and reduction in *Bacillus brevis* isolated from tannery effluent. *J. Appl. Microbiol.*, 107: 1425-1432.
- **WANG T.S., KUO C.F., JAN K.Y., HUANG H. (1996).** Arsenite induces apoptosis in Chinese hamster ovary cells by generation of reactive oxygen species. *J. Cell. Physiol.*, 169: 256-268.
- **WEBB R.L., DICKINSON J.T., EXARHOS G.T. (1997).** Characterization of particulates accompanying laser ablation of NaNO₃. *J. Appl. Spectrosc.* 51: 700-707.
- **WENZEL W.W. (2009).** Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant and Soil.*, 1: 385-408.
- **WHITING S., DESOUZA M., TERRY N. (2001).** Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. *Environ. Sci. Technol.* 35: 3144-3150.
- **WILLIAMS R.J.P., FRAUSTO DA SILVA J.J.R. (2006).** The Chemistry of Evolution: The Development of Our Ecosystem.
- **WITHMAN W.B., COLEMAN D.C., WIEBE W.J. (1998).** Procaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 6578-6583.
- **WORMS I., SIMON D.F., HASSLER C.S., WILKINSON K.J., (2006).** Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake. *Bioch.*, 88: 1721-1731.
- **YAN Z., YAN-BIN X., JIA-XIN X., XIAO-HUA Z., SHI-HUI X., QING-PING D. (2015).** Combined Toxic Effects of Heavy Metals and Antibiotics on a *Pseudomonas fluorescens* Strain ZY2 Isolated from Swine Wastewater. *Int. J. Mol. Sci.*, 16: 2839-2850.
- **ZAHOOR A., REHMAN A. (2009).** Isolation of Cr (VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater. *J. Environ. Sci.*, 21: 814-20.
- **ZHANG W.H., HUANG Z., HE L.Y., SHENG X.F., (2012).** Assessment of bacterial communities and characterization of lead resistant bacteria in the rhizosphere soils of metal-tolerant *Chenopodium ambrosioides* grown on lead zinc mine tailings. *Chemos.*, 87: 1171-1178.

Références bibliographiques

- **ZINEDINE A. (2004)**. Détermination des mycotoxines dans les aliments et étude de la réduction des aflatoxines par les bactéries lactiques isolées des ferments panaires traditionnels. Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah. Maroc. 162.

Sites internet

- **Anonyme 1** : CORDIS (2015) : Les bactéries: une nouvelle source d'agents antifongiques.
- **Anonyme 2** : <http://sites-pollues.ecologie.gouv.fr>
- **Anonyme 3** : www.bioteq.ca

ANNEXES

Annexe 1 : Composition des solutions et milieux de culture utilisés

Milieux liquides

- **Eau physiologique stérile**

- Chlorure de sodium (NaCl)..... 9g.
- Eau distillée..... 1000 ml.

pH=7, autoclaver à 120°C pendant 20 min.

- **Bouillon nitraté**

- Infusion cœur-cervele..... 25 g.
- Nitrate de sodium..... 10 g.
- Eau distillée..... 1000 ml.

pH=7, autoclaver à 120°C pendant 20 min.

- **Bouillon Brain Heart infusion (BHIB)**

- Protéose peptone..... 10g.
- Infusion cerveau de veau..... 12,5g.
- Infusion cerveau de bœuf.....5g.
- Chlorure de sodium..... 5g.
- Phosphate disodique..... 2,5g.
- Glucose..... 2g.
- Eau distillée..... 1000 ml.

pH=7, autoclaver à 120°C pendant 20 min.

- **Milieu Clark et Lubs**

- peptone..... 10g.
- Phosphate di-sodique.....2g.
- Glucose..... 5g.
- Eau distillée..... 1000 ml.

pH=7, autoclaver à 120°C pendant 20 min.

- **Eau péptonée exempte d'indole (EPEI)**

- Peptone exempte d'indole..... 10,0 g.
- Chlorure de sodium..... 5,0 g.
- Eau distillée..... 1000 ml.

pH = 7,2

Milieus solides

- **Gélose Nutritive (GN)**

- extrait de viande.....1g.
- extrait de levure2g.
- peptone..... 5g.
- chlorure de sodium5g.
- Agar.....15g.
- Eau distillée1000 ml.

pH=7, autoclaver à 120°C pendant 20 min.

- **Gélatine nutritive**

- peptone.....10g.
- extrait de viande.....4g.
- chlorure de sodium2,5g.
- Gélatine..... 120g.
- Eau distillée..... 1000 ml.

pH=7, autoclaver à 120°C pendant 20 min.

- **Bouillon nutritif**

- Tryptone..... 10,0 g.
- Extrait de viande..... 5,0 g.
- Chlorure de sodium5,0 g.
- Eau distillée..... 1000 ml.

pH=7, autoclaver à 120°C pendant 20 min.

- **Milieu Luria Bertani (reconstitué au laboratoire)**

- Peptone.....10g.
- Extrait de levure.....5g.
- NaCl.....10g.
- Eau distillée1000 ml.

pH=7, autoclaver à 120°C pendant 20 min.

- **Milieu Citrate de Simmons (CS)**

- Ammonium dihydrogénophosphat..... 1g.
- phosphate dipotassique..... 1g.
- Chlorure de sodium5g.
- Citrate de sodium2g.
- Sulfate de magnésium..... 0,2g.
- Bleu de bromothymol0,08g.
- Eau distillée1000 ml.

pH=6,9, autoclaver à 120°C pendant 20 min.

- **Milieu Mannitol Mobilité**

- peptone de viande15g.
- Extrait de viande3g.
- Mannitol10g.
- Potassium nitrate.....1g.
- Rouge de phénol0.05g.
- Agar.....5g.
- Eau distillée1000 ml.

pH=8,1 autoclaver à 120°C pendant 20 min.

- **Milieu Mueller Hinton**

- Extrait de viande2g.
- Hydrolysate acide de caséine17,5g.
- Amidon1,5 g.
- Agar10g.
- Eau distillée1000 ml.

pH=7,4 autoclaver à 120°C pendant 20 min.

- **Milieu Sabouraud**

- Peptone10 g.
- Glucose massé20 g.
- Agar-agar15 g.
- Eau distillée1 000 ml.

pH=6 autoclaver à 120°C pendant 20 min.

- **Milieu Triple Sugar Iron (TSI)**

- Peptones de caséine.....15g.
- Peptones de viande..... 5g.
- Extraits de viande3g.
- Peptones de levure3g.
- NaCl5g.
- Lactose10g.
- Saccharose10g.
- Glucose1g.
- Citrate ammoniacal de Fer (III)0,5g.
- Thiosulfate de sodium0,5g.
- Rouge de phénol..... 0,024g.
- Agar12g.
- Eau distillée1 000 ml.

pH=7,4 autoclaver à 115°C pendant 15 min.

- **Milieu Urée-tryptophane**

- L-tryptophane3 g.
- Urée20 g.
- Monophosphogénophosphate de potassium1 g.
- Dihydrogénophosphate de potassium1 g.
- Chlorure de sodium5 g.
- Éthanol à 95 °10 ml.
- Rouge de phénol a 1%25 mg
- Eau distillée1000 ml

pH=7,2 autoclaver à 120°C pendant 20 min.

Annexe 2 : Principe de la Spectrométrie d'Absorption Atomique (SAA)

La Spectrométrie d'Absorption Atomique (SAA) est basée sur le principe que les atomes libres peuvent absorber la lumière d'une certaine longueur d'onde. L'absorption de chaque élément est spécifique. La SAA est une méthode basée sur un élément unique, utilisé pour reconstituer l'analyse des métaux d'échantillons biologiques, métallurgiques, pharmaceutiques et atmosphériques par exemple. La détermination spectroscopique d'espèces atomiques peut seulement être réalisée à partir d'un échantillon à l'état gazeux, dans lequel les atomes individuels comme l'aluminium (Al), le calcium (Ca), le magnésium (Mg), le fer (Fe) sont nettement séparés les uns des autres. L'intensité de l'absorption dépend directement du nombre de particules absorbant la lumière selon la loi de Beer Lambert selon laquelle l'absorbance est proportionnelle au coefficient d'absorption spécifique, au trajet optique et à la concentration (HENI, 2010) :

$$A = \log I_0/I = k \cdot C$$

A : Pseudo-Absorbance, **I** : Intensité du rayonnement émis, **I₀** : Intensité du faisceau incident, **K** : Constante de proportionnalité relative à l'élément à doser, **C** : Concentration de l'élément à doser.

Annexe 3 : Photo correspondant au dénombrement de la biomasse bactérienne du sol

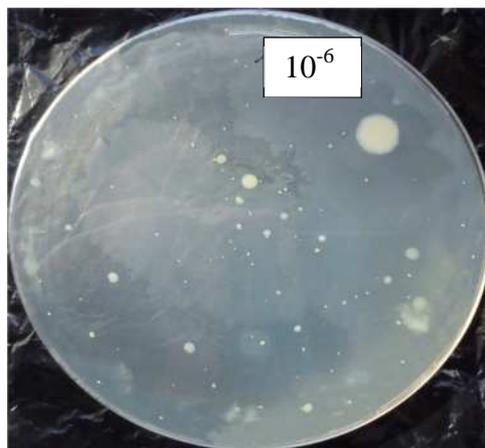


Figure 1 : La dilution décimale pour le dénombrement de la biomasse bactérienne.

Annexe 4 : Résultats de la détermination des CMI sur milieu liquide



Figure 1 : Série de dilution du chrome avant ensemencement par les souches bactériennes.

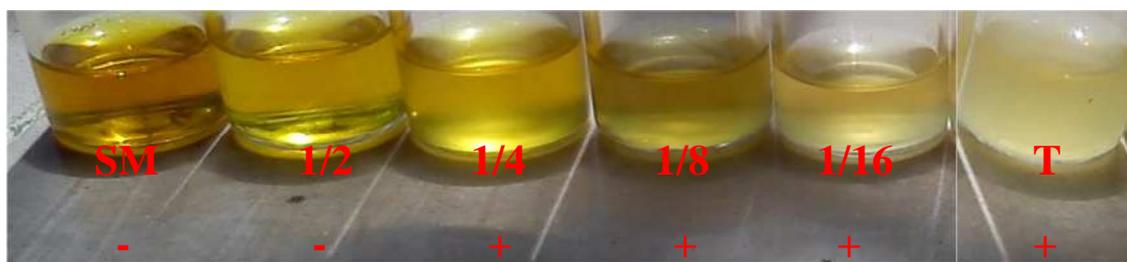


Figure 2 : Détermination de la CMI du chrome en milieu liquide sur *Pseudomonas* sp.3.

(+) Croissance bactérienne. (-) Absence de croissance bactérienne.



Figure 3 : Détermination de la CMI du chrome en milieu liquide sur *Pseudomonas* sp.4.

(+) Croissance bactérienne. (-) Absence de croissance bactérienne.

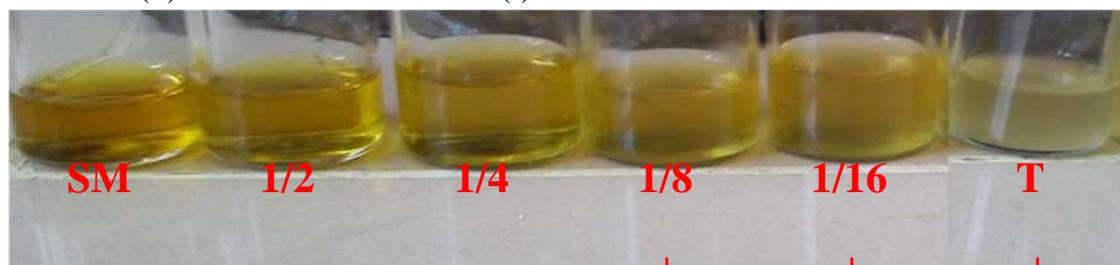


Figure 4 : Détermination de la CMI du chrome en milieu liquide sur *Pseudomonas* sp.7.

(+) Croissance bactérienne. (-) Absence de croissance bactérienne.

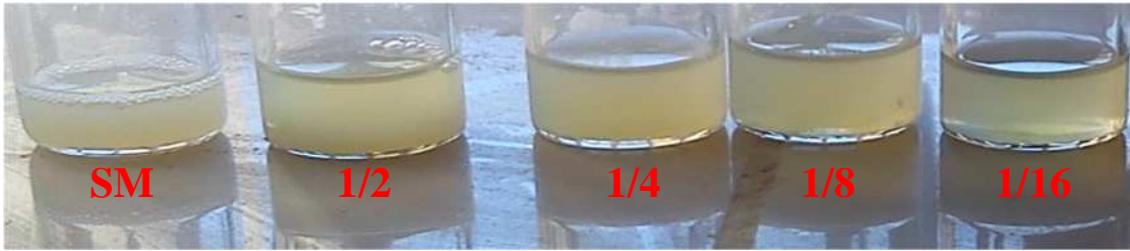


Figure 5 : Série de dilution du sulfate de zinc avant ensemencement par les souches bactériennes.

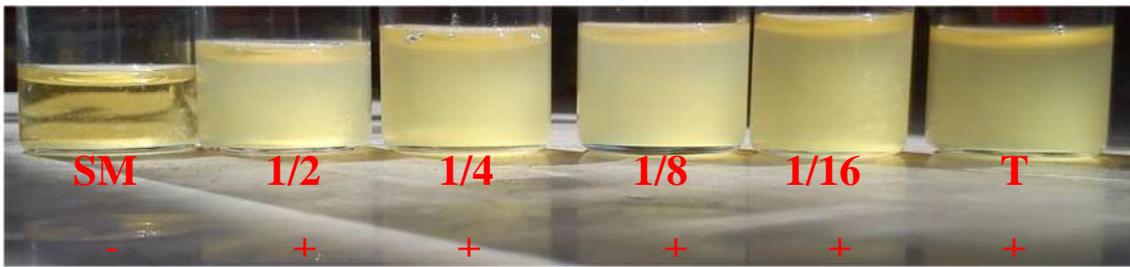


Figure 6 : Détermination de la CMI du sulfate de zinc en milieu liquide sur *Pseudomonas* sp.1.

(+) Croissance bactérienne. (-) Absence de croissance bactérienne.

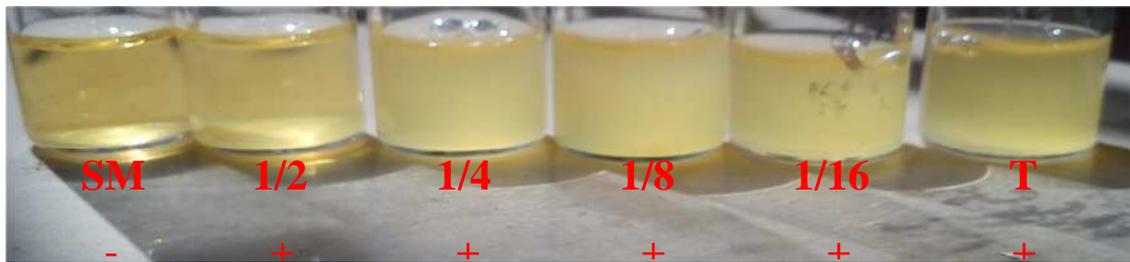


Figure 7 : Détermination de la CMI du sulfate de zinc en milieu liquide sur *Pseudomonas* sp.4.

(+) Croissance bactérienne. (-) Absence de croissance bactérienne.

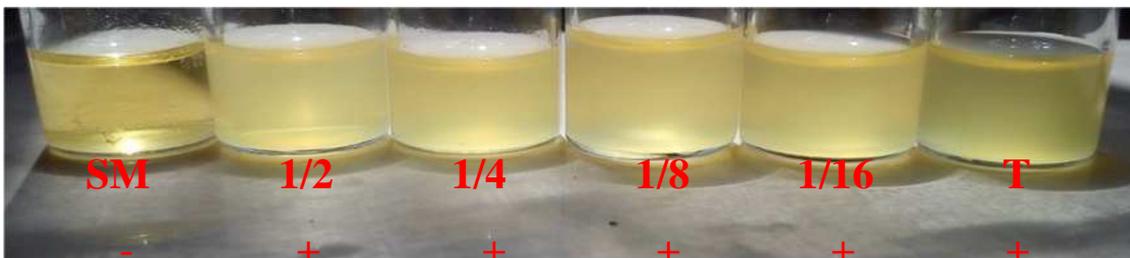


Figure 8 : Détermination de la CMI du sulfate de zinc en milieu liquide sur la souche 7.

(+) Croissance bactérienne. (-) Absence de croissance bactérienne.

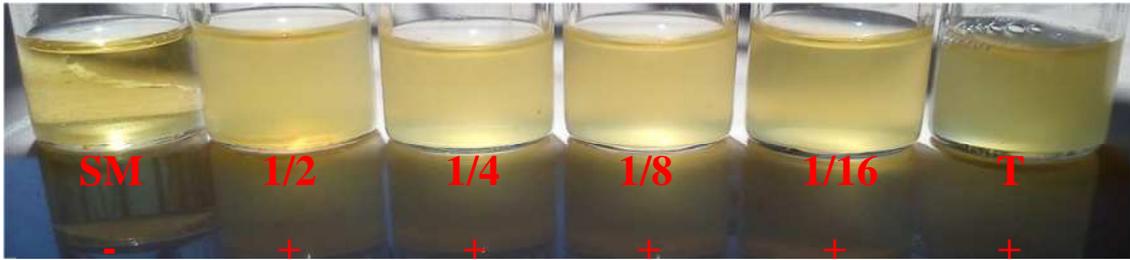


Figure 9 : Détermination de la CMI du sulfate de zinc en milieu liquide sur *Bacillus* sp.

(+) Croissance bactérienne. (-) Absence de croissance bactérienne.

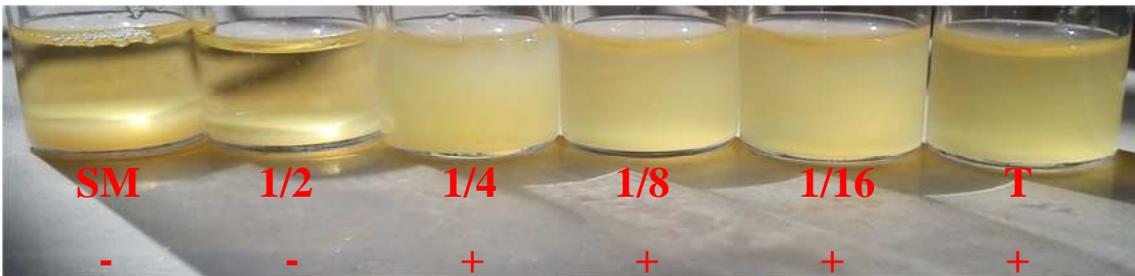


Figure 10 : Détermination de la CMI du sulfate d'aluminium en milieu liquide sur

Pseudomonas sp.1.

(+) Croissance bactérienne. (-) Absence de croissance bactérienne.

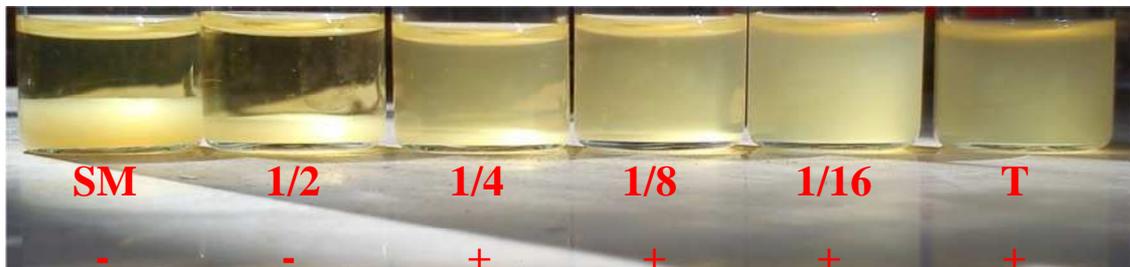


Figure 11 : Détermination de la CMI du sulfate d'aluminium en milieu liquide sur

Pseudomonas sp.3.

(+) Croissance bactérienne. (-) Absence de croissance bactérienne.

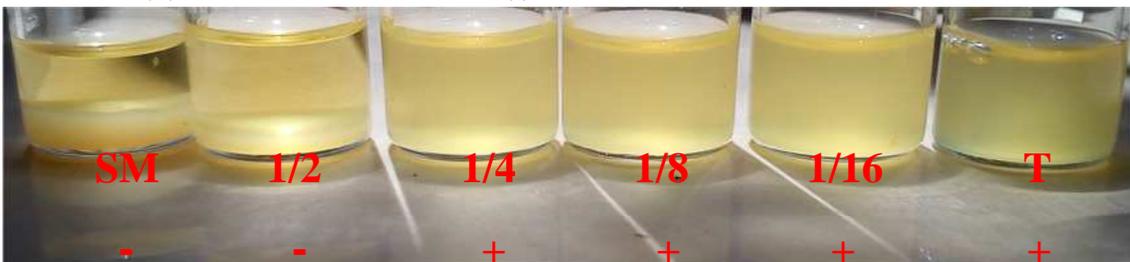


Figure 12: Détermination de la CMI du sulfate d'aluminium en milieu liquide sur la souche

7.

(+) Croissance bactérienne. (-) Absence de croissance bactérienne.

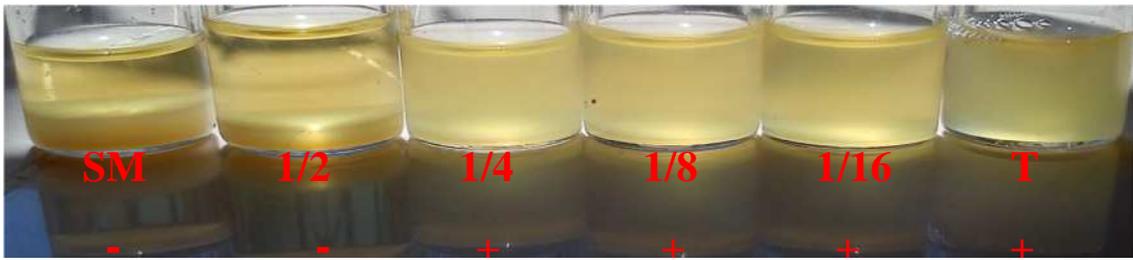


Figure 13 : Détermination de la CMI du sulfate d'aluminium en milieu liquide sur *Bacillus* sp.

(+) Croissance bactérienne. (-) Absence de croissance bactérienne.

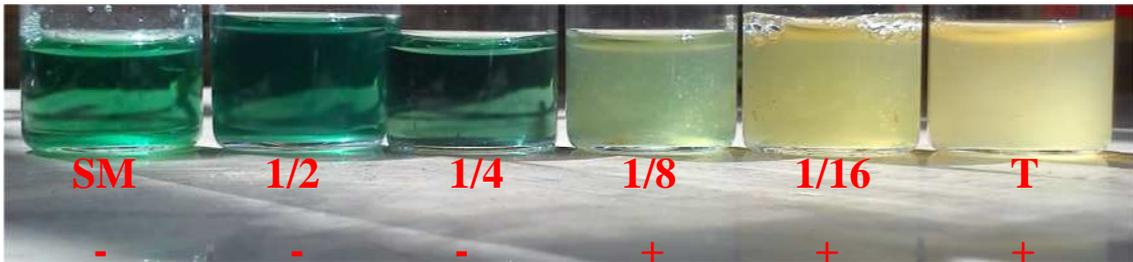


Figure 14 : Détermination de la CMI du sulfate de cuivre en milieu liquide sur *Pseudomonas* sp.1.

(+) Croissance bactérienne. (-) Absence de croissance bactérienne.

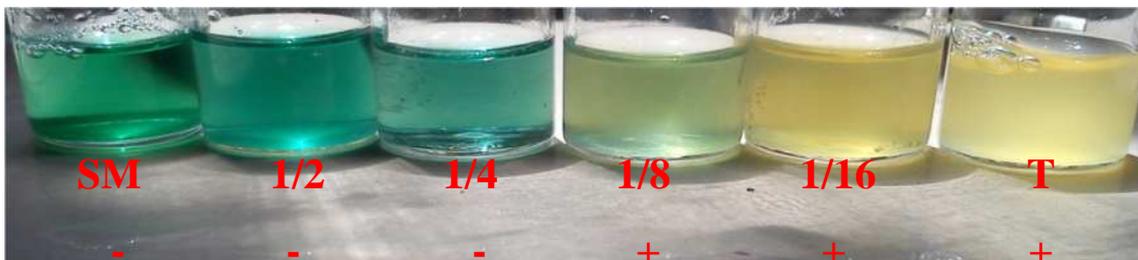


Figure 15 : Détermination de la CMI du sulfate de cuivre en milieu liquide sur *Pseudomonas* sp.3.

(+) Croissance bactérienne. (-) Absence de croissance bactérienne.

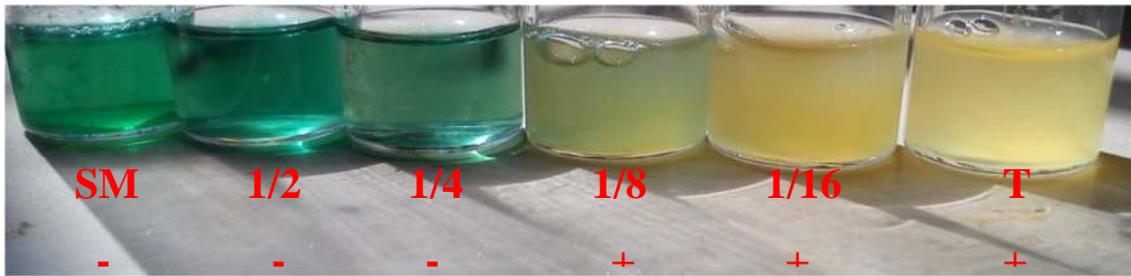


Figure 16 : Détermination de la CMI du sulfate de cuivre en milieu liquide sur *Pseudomonas sp.4*.

(+) Croissance bactérienne. (-) Absence de croissance bactérienne.

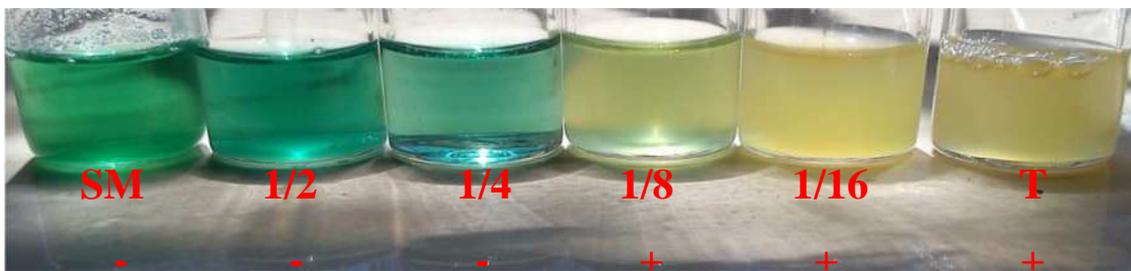


Figure 17 : Détermination de la CMI du sulfate de cuivre en milieu liquide sur *Bacillus sp.*

(+) Croissance bactérienne. (-) Absence de croissance bactérienne.

Annexe 5 : Résultats des analyses statistiques

Effet	Tests Univariés de Significativité pour Diamètre (annooovaa 2) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	10898,25	1	10898,25	110,1944	0,000000
Souches	86,30	4	21,58	0,2182	0,926538
Erreur	3461,51	35	98,90		

Figure 1 : Table de l'ANOVA pour les résultats de l'activité microbienne.