

THESE

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

Centre de Recherche : Eau, Ressources Naturelles, Environnement et Développement Durable

Structure de Recherche : Lombricidés, Amélioration de la Productivité du Sol et Environnement

Discipline : Biologie

Spécialité : Microbiologie et Biotechnologies

Présentée et soutenue le : 06/07/2022 par :

Sofia HOUIDA

**Bactéries isolées du tissu chloragène du ver de terre *Aporrectodea molleri* :
identification moléculaire et caractérisation de leurs potentiels à promouvoir la
croissance (PGP) et la phytoremédiation de *Spinacia oleracea* cultivée sous stress de
métaux lourds**

JURY

Mr. Benaji Brahim	PES	Ecole Nationale Supérieure des Arts et Métiers, Université Mohammed V de Rabat	Président/ Rapporteur
Mme. Belkadi Bouchra	PES	Faculté des Sciences, Université Mohammed V de Rabat	Rapporteur
Mme Bessi Hlima	PES	Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan II de Casablanca	Rapporteur
Mr. Fekhaoui Mohammed	PES	Institut Scientifique, Université Mohammed V, Rabat	Examiner
Mr. Raouane Mohammed	PH	École Normale Supérieure, Université Mohammed V de Rabat	Examiner
Mr. Bilen Serdar	PES	Faculté d'Agriculture, Université Atatürk, Erzurum, Turquie	Examiner
Mr. El Harti Abdellatif	PES	École Normale Supérieure, Université Mohammed V de Rabat	Co-directeur de thèse
Mme Amghar Souad	PES	École Normale Supérieure, Université Mohammed V de Rabat	Directrice de Thèse

Année Universitaire : 2021/2022

Avant-propos

Nom et prénom de l'auteur

Houida Sofia

Intitulé du travail

Bactéries isolées du tissu chloragène du ver de terre *Aporrectodea molleri* : identification moléculaire et caractérisation de leurs potentiels à promouvoir la croissance (PGP) et la phytoremédiation de *Spinacia oleracea* cultivée sous stress de métaux lourds

Directeur des travaux de recherche

- Madame Souad AMGHAR

Professeur de l'Enseignement Supérieur en microbiologie et biochimie à l'École Normale Supérieure – Université Mohammed V de Rabat. Co-directrice de la structure de recherche « Lombricidés, Amélioration de la Productivité du Sol et Environnement » faisant partie du centre de recherche « Eau, Ressources Naturelles, Environnement et Développement Durable (CERNE2D) ».

Co-directeur

- Monsieur Abdellatif EL HARTI

Professeur de l'Enseignement Supérieur en microbiologie et biochimie à l'École Normale Supérieure – Université Mohammed V de Rabat. Directeur de la structure de recherche « Lombricidés, Amélioration de la Productivité du Sol et Environnement » faisant partie du centre de recherche « Eau, Ressources Naturelles, Environnement et Développement Durable (CERNE2D) ».

LABORATOIRES OÙ LES TRAVAUX ONT ÉTÉ RÉALISÉS

- Laboratoire de l'équipe de recherche « Lombricidés, Amélioration de la Productivité du Sol et Environnement » à l'École Normale Supérieure de Rabat – Maroc.
- Groupe d'écologie animale (GEA), Université de Vigo, Vigo – Espagne.
- Centre National de la Recherche Scientifique et Technique, Division UATRS, Plateforme de Biologie Moléculaire et de Génomique Fonctionnelle, Rabat – Maroc.
- Département des sciences du sol et de la nutrition des plantes, Faculté d'agriculture, Université Atatürk, Erzurum – Turquie.

SOUTIEN FINANCIER

Bourse d'excellence de recherche octroyée par le Centre National de la Recherche Scientifique et Technique, édition 2018, sous le numéro : 39UM5R2018.

PUBLICATIONS

- Publications acceptées et publiées (7)

Yakkou, L., **Houida, S.**, Bilen, S., Kaya, L.O., Raouane, M., Amghar, S., El Harti, A.

Assessment of earthworm (*Aporrectodea molleri*)'s coelomic fluid-associated bacteria on different plant growth-promoting traits and maize germination and seedling growth
Biocatalysis and Agricultural Biotechnology (2022). [10.1016/j.bcab.2022.102341](https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102341)

Houida, S., Yakkou, L., Kaya, L.O., Bilen, S., Fadil, M., Raouane, M., El Harti, A., Amghar, S.

Biopriming of Maize seeds with plant growth-promoting bacteria isolated from the earthworm *Aporrectodea molleri*: Effect on seed germination and seedling growth
Letters in Applied Microbiology (2022). <https://doi.org/10.1111/lam.13693>

Houida, S., Yakkou, L., Raouane, M., El Harti, A., Amghar, S.

Effect of earthworms' extracts (*Aporrectodea molleri*) on yeast growth: *in vitro* study.
Iraqi Journal of Agricultural sciences (2022). <https://doi.org/10.36103/ijas.v53i1.1522>

Houida, S., Yakkou, L., Bilen, S., Raouane, M., El Harti, A., Amghar, S.

Taxonomic and functional characteristics of aerobic bacteria isolated from the chloragogenous tissue of the earthworm *Aporrectodea molleri*.
Archives of Microbiology (2021). <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02396-2>

Yakkou, L., **Houida, S.**, Raouane, M., Amghar, S., El Harti, A.

Study of the Effect of the Earthworm (*Aporrectodea molleri*) Cutaneous Excreta on Bacterial Growth.
International Journal of Ecology (2021). <https://doi.org/10.1155/2021/5518568>

Yakkou L., **Houida S.**, Domínguez J., Raouane M., Amghar S., El Harti A.

Identification and characterization of earthworm (*Aporrectodea molleri*)'s coelomic fluid microbial community.
Microbiology and Biotechnology Letters (2021). <https://doi.org/10.48022/mb1.2104.04013>

Yakkou L., **Houida S.**, Amghar S., Raouane M., Domínguez J., El Harti A.

The effect of endogenous earthworm extracts (*Aporrectodea molleri*) on the growth of beneficial soil bacteria.
Acta Microbiologica Bulgarica (2021).

- Publications soumises et en cours de révision (3)

Houida, S., Yakkou, L., Kaya, L.O., Bilen, S., Raouane, M., El Harti, A., Amghar, S.
Heavy metal resistant – plant growth-promoting bacteria isolated from the earthworm *Aporrectodea molleri*: prospect bioaugmentation agents for the growth of *Spinacia oleracea* in multi-metal-contaminated soil.

Soumise au journal : *Environmental Pollution*

Yakkou, L., **Houida, S.**, Bilen, S., Kaya, L.O., Raouane, M., Amghar, S., El Harti, A.
The effect of earthworm *Aporrectodea molleri* (*Oligochaeta*)’s coelomic fluid-associated bacteria on soil biochemical properties and different plant growth parameters of corn (*Zea mays* L) under abiotic stress conditions.

Soumise au journal : *Soil & Tillage Research*

Chelkha, M., Yakkou, L., **Houida, S.**, Raouane, M., Amghar, S., El Harti, A. Campos-Herrera, R.

“Could earthworm extract promote the growth of nematophagous fungi (*Arthrobotrys musiformis*, *Purpureocillium lilacinum*) and entomopathogenic fungi (*Beauveria bassiana*)?”

Soumise au journal : *Journal of Invertebrate Pathology*

COMMUNICATIONS ORALES (5)

Heavy metals-resistant bacteria isolated from the earthworms *Aporrectodea molleri* enhanced the phytoremediation of contaminated soil using *Spinacia oleracea* plant

La 8ème édition de l'École Internationale de Recherche : "Biodiversité, Biotechnologies, Durabilité & Innovation". Faculté des Sciences – Agadir, Maroc. 20 – 22 Decembre 2021.

The potential use of bacteria isolated from the earthworms *Aporrectodea molleri* to promote spinach (*Spinacia oleracea*) growth under heavy metals stress

1er Congrès International en Agriculture Durable AgriNov2021. Université Sultan Moulay Slimane Faculté des Sciences et Techniques, Beni Mellal – Maroc. 27 – 30 Octobre 2021.

***In vitro* study of earthworm's post-mortem effect on the growth of soil yeasts.**

La 7ème édition de l'École Internationale de Recherche : "Biodiversité, Biotechnologies & Développement Durable" Faculté des Sciences – Agadir, Maroc. 25 – 27 Avril 2019.

Earthworms' cocoons harbor beneficial bacteria for soil fertility.

La 1ère édition des journées doctorales : « Water, Energy & Environnement Nexus » organisées par le Centre de Recherche Eau, Ressources Naturelles, Environnement et Développement Durable – Université Mohammed V de Rabat, Maroc. 12 – 14 Juin 2019.

Isolation of phosphate solubilizing bacteria from the earthworm *Aporrectodea molleri*.

Conférence AGBIOL Edirne, Université de Trakya - Turquie. 02 - 05 Septembre 2018.

COMMUNICATION PAR AFFICHE (2)

Isolation and identification of the bacterial community of earthworm cocoons (*Aporrectodea molleri*) : Role of isolated microorganisms in soil fertilization.

Conférence AGBIOL Edirne, Université de Trakya - Turquie. 02 - 05 Septembre 2018

Isolation and identification of the aerobic bacterial community in the chloragogenous tissue of the earthworm *Aporrectodea molleri*.

La quatrième conférence internationale américano-marocaine des sciences agricoles - conférence AMAS IV. Qualipole – Agropoles, Meknès - Maroc. 09 - 11 Mai 2018

Dédicaces

*À ma défunte grand-mère, M'barka.
Que Dieu lui accorde sa pleine miséricorde.*

*À mes parents et mon frère Oussama.
Merci pour votre amour inconditionnel, votre soutien et vos
encouragements constants tout au long de mes années d'études, du processus
de recherche et de rédaction de cette thèse.
Je n'aurais sans doute pas pu le faire sans vous !*

*À mes tantes et mes oncles plus précisément Rabia, Hicham, Kébir, Fouad et
Fouzia.
Merci de m'avoir toujours offert votre aide et votre soutien, même lorsque je
ne le demandais pas.*

*À tous mes cousins, en particulier Fatima Zahra, Fatima, Elías, Layla et
Ibtissam, ainsi qu'à mes meilleures amies Lamia, Yasmina et Nohaïla.
Merci pour votre amour et votre soutien, et pour avoir supporté mes sautes
d'humeur. Excusez-moi d'avoir annulé des plans à la dernière minute et
d'avoir manqué tant de rassemblements.*

*À mes amis que j'ai rencontrés pendant mon séjour en Turquie : Chaïmae,
Youssef, Mehdi, Leïla et Elif.
Merci d'avoir rendu mon séjour confortable et plein de bons souvenirs,
même pendant la période de la pandémie.*

*Enfin, et surtout, j'aimerais exprimer ma sincère gratitude à tous les
malheureux vers de terre qui sont morts sous mes ciseaux, dans
l'homogénéisateur et dans le congélateur.*

Remerciements

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien et les conseils de nombreuses personnes.

J'écris pour exprimer ma sincère gratitude à tous les Professeurs du Laboratoire « Lombricidés, Amélioration de la Productivité des Sols et Environnement » de l'Ecole Normale Supérieure et le centre de recherche « Centre Eau, Ressources Naturelles, Environnement et Développement Durable », domicilié à la faculté des sciences de Rabat. Il était primordial pour moi de me situer dans un environnement de travail optimal, non seulement de point de vue scientifique mais également relationnel.

Avant tout, je voudrais exprimer ma sincère gratitude à ma directrice de thèse, Madame **Souad AMGHAR**, PES à École Normale Supérieure, Université Mohammed V de Rabat, pour ses conseils et son soutien continus tout au long de mon travail doctoral. De la phase initiale à la phase finale de ma thèse, sa motivation et son enthousiasme ont été déterminants pour l'accomplissement de ce travail. Merci d'avoir eu foi en mes capacités, pour vos encouragements constants, votre soutien total, et d'avoir été une directrice de thèse unique en son genre !

Un grand merci à mon co-directeur de thèse, Monsieur **Abdellatif EL HARTI**, PES à École Normale Supérieure, Université Mohammed V de Rabat : je vous remercie d'avoir accepté de te lancer dans cette aventure, de m'avoir fait confiance pendant ces années, de m'avoir prodigué vos conseils et le partage de ses connaissances, indispensables à ma maturation scientifique.

Je suis également très sensible à l'honneur que me fait Monsieur **Brahim BENAJI**, PES à Ecole Nationale Supérieure des Arts et Métiers de Rabat pour avoir consacré de son temps et de ses compétences, en tant que rapporteur, à juger ce travail et d'assurer la présidence de ce jury de thèse.

J'adresse aussi ma reconnaissance à Madame **Bouchra BELKADI**, PES de la Faculté des Sciences de Rabat, pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail en acceptant la charge d'être rapporteur. Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de ma très haute estime.

Que Madame **Hlima BESSI**, PES de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Hassan II de Casablanca, trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour avoir consacré

de son temps et de ses compétences, en tant que rapporteur, à juger ce travail et participer au jury.

Je prie Monsieur **Mohammed FEKHAOU**, Directeur de l'Institut Scientifique de l'Université Mohammed V de Rabat, de bien vouloir accepter le témoignage de ma reconnaissance pour l'honneur de faire partie du jury de thèse

Je remercie tout particulièrement Monsieur **Mohammad Raouane**, PH à École Normale Supérieure, Université Mohammed V de Rabat, pour ses vastes connaissances et ses commentaires pertinents, ainsi que pour m'avoir guidé et soutenu. Durant ces années, les échanges multiples que nous avons eus ont toujours été riches et très constructifs. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour avoir consacré de son temps et de ses compétences, en tant qu'examineur, à juger ce travail et participer au jury.

Ma profonde gratitude à Monsieur **Serdar BILEN**, PES à la Faculté d'Agriculture de l'Université Atatürk de Erzurum en Turquie, qui a accepté de m'accueillir dans son équipe au laboratoire de microbiologie des sols. Merci pour sa grande disponibilité, ses conseils pertinents, sa sympathie, sa bonne humeur, sa patience et pour avoir toujours su répondre à mes nombreuses questions. Sans son encadrement, je n'aurais pu mener à bien mon travail de thèse. Également, tous mes remerciements à l'équipe du Département des Sciences du Sol, c'était fabuleux d'avoir l'occasion de travailler avec un groupe aussi multidisciplinaire.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur **Mustafa Canbolat**, directeur du Département des Sciences du Sol de la Faculté d'Agriculture de l'Université Atatürk (Erzurum – Turquie), pour son hospitalité et son aide dans les tâches administratives.

Je tiens également à exprimer ma gratitude à l'administration de l'Ecole Normale Supérieure de Rabat pour son soutien et son assistance indéfectibles et constants.

Je tiens à exprimer ma gratitude à tous ceux qui m'ont aidé, directement ou indirectement, à mener à bien ce travail, notamment mes chères collègues Lamia Yakkou et Mariame Chelkha. Je tiens à souligner le plaisir que j'ai eu à travailler avec elles, tous les échanges et les conversations approfondies que nous avons au quotidien.

Résumé

Les vers de terre sont considérés comme un micro-habitat riche pour la croissance et la prolifération de diverses bactéries du sol. Les bactéries associées aux vers de terre ont suscité l'intérêt en raison de leur profil métabolique élevé et de leurs avantages pour la fertilité et la restauration des sols et la croissance des plantes. L'objectif de cette thèse était d'isoler, d'identifier et de caractériser, pour la première fois les bactéries aérobies du tissu chloragogène du ver de terre. De plus, nous avons investigué leur pouvoir promoteur de la croissance PGP et leur utilisation potentielle comme agents de bioremédiation pour atténuer la toxicité des métaux lourds et améliorer le pouvoir de phytoremédiation de *Spinacia oleracea* cultivée dans un sol hautement contaminé par du cadmium (70 mg kg^{-1}) et par du nickel (100 mg kg^{-1}), du cuivre (80 mg kg^{-1}), du zinc (150 mg kg^{-1}) et du manganèse (600 mg kg^{-1}). L'identification moléculaire a permis d'identifier l'espèce de ver de terre comme étant *Aporrectodea molleri* et les quinze isolats bactériens ont été assignés à six genres bactériens majeurs sur la base du séquençage du gène de l'ARNr 16S : *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Terribacillus*. Ces souches présentaient diverses caractéristiques favorisant la croissance et étaient résistantes à une variété de métaux lourds. Ils ont démontré leur efficacité en tant qu'inoculant des graines, en augmentant la germination et la croissance des graines semées dans un sol normal ou contaminé par des métaux. De manière surprenante, l'inoculation du sol avec divers isolats a amélioré la tolérance des épinards au stress des métaux lourds de manière significative en augmentant leur croissance tout en augmentant l'activité enzymatique et la teneur en nutriments du sol. Deux isolats, *Pseudomonas* sp. TC33 et *B. subtilis* TC34, ont augmenté la mobilité des métaux, réduit efficacement les concentrations de métaux dans le sol étudié, et favorisé la bioaccumulation des métaux dans les tissus des épinards tout en atténuant la toxicité du cadmium, ce qui indique leur utilisation potentielle comme agents de bioaugmentation, pour aider à la phytoremédiation des sols contaminés par les métaux lourds.

Mots-clefs : Ver de terre, tissu chloragogène, bactéries PGP, métaux lourds, phytoremédiation.

Abstract

Earthworms are considered a rich microhabitat for the growth and proliferation of various soil bacteria. Earthworm-associated bacteria have attracted interest due to their high metabolic profile and benefits for soil fertility and restoration and plant growth. The objective of this thesis was to isolate, identify and characterize, for the first time, aerobic bacteria from the chloragogenous tissue of earthworms. In addition, we investigated their PGP growth-promoting abilities and their potential use as bioremediation agents to mitigate heavy metal toxicity and enhance the phytoremediation power of *Spinacia oleracea* cultivated in soil highly contaminated with cadmium (70 mg kg^{-1}), nickel (100 mg kg^{-1}), copper (80 mg kg^{-1}), zinc (150 mg kg^{-1}) and manganese (600 mg kg^{-1}). Molecular identification identified the earthworm species as *Aporrectodea molleri* and the fifteen bacterial isolates were assigned to six major bacterial genera based on 16S rRNA gene sequencing: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, and *Terribacillus*. These strains exhibited various plant growth-promoting characteristics and were resistant to a variety of heavy metals. They demonstrated efficacy as seed inoculants, increasing germination and growth of seeds sown in normal or metal-contaminated soil. Surprisingly, soil inoculation with various isolates improved spinach tolerance to heavy metal stress significantly by increasing growth while increasing enzyme activity and soil nutrient content. Two isolates, *Pseudomonas* sp. TC33 and *B. subtilis* TC34, increased metal mobility, effectively reduced metal concentrations in the studied soil, and promoted metal bioaccumulation in spinach tissues while alleviating cadmium toxicity, indicating their potential use as bioaugmentation agents, to aid in phytoremediation of heavy metal contaminated soils.

Key Words : Earthworm, chloragogenous tissue, PGP bacteria, Heavy metals, phytoremediation.

تعتبر ديدان الأرض موطنًا صغيرًا غنيًا لنمو وانتشار بكتيريا التربة المتنوعة والبكتيريا المرتبطة بديدان الأرض التي جذبت الاهتمام نظرًا لخصائصها الأيضية العالية وفوائدها على خصوبة التربة ونمو النبات. الهدف من هذه الأطروحة هو عزل وتعريف وتوصيف البكتيريا الهوائية من الأنسجة الكلوروجينية لديدان الأرض لأول مرة. بالإضافة إلى ذلك، قمنا بالتحقيق في قدراتهم على تعزيز نمو PGP واستخدامهم المحتمل كعوامل معالجة بيولوجية للتخفيف من سمية المعادن الثقيلة وتعزيز قوة المعالجة النباتية في *Spinacia oleracea* المزروعة في التربة شديدة التلوث بالكاديوم (70 مجم / كجم) جنبًا إلى النيكل (100 مجم / كجم) والنحاس (80 مجم / كجم) وزنك (150 مجم / كجم) ومنجنيز (600 مجم / كجم). سمح التحديد الجزيئي بتحديد نوع دودة الأرض كـ *Aporrectodea molleri* وتم تعيين خمسة عشر عزلة بكتيرية لستة أجناس بكتيرية رئيسية بناءً على تسلسل الجين *Enterobacter:16S rRNA* و *Citrobacter* و *Aeromonas* و *Pseudomonas* و *Bacillus* و *Terribacillus*. أظهرت هذه السلالات العديد من الخصائص المعززة لنمو النبات وكانت مقاومة لمجموعة متنوعة من المعادن الثقيلة. لقد أثبتوا فعاليتهم في تلقيح البذور، وزيادة إنبات ونمو البذور المزروعة في التربة العادية أو الملوثة بالمعادن. من المثير للدهشة أن تلقيح التربة بالعزلات المختلفة أدى إلى تحسين تحمل السبانخ لإجهاد المعادن الثقيلة بشكل كبير عن طريق زيادة النمو مع زيادة نشاط الإنزيم ومحتوى التربة من المغذيات. اثنين من العزلات *Pseudomonas* *sp.* TC33 و *B. subtilis* TC34، زادوا من تنقل المعادن، وقللوا بشكل فعال تركيزات المعادن في التربة المدروسة، وعززوا التراكم الأحيائي للمعادن في أنسجة السبانخ مع التخفيف من سمية الكاديوم، مما يشير إلى استخدامها المحتمل كعوامل زيادة بيولوجية، للمساعدة في المعالجة النباتية للتربة الملوثة بالمعادن الثقيلة.

الكلمات الدلالية: دودة الأرض، الأنسجة الكلوروجينية، بكتيريا PGP، المعادن الثقيلة، المعالجة النباتية.

Table de matière

Avant-propos.....	i
Dédicaces	v
Remerciements	vi
Résumé.....	viii
Abstract	ix
ملخص.....	x
Liste des tableaux.....	xvii
Liste des figures	xix
Liste des abréviations.....	xxiv
Introduction générale	1
Première partie : Revue bibliographique	5
I. Biodiversité et contributions fonctionnelles des organismes du sol	6
I. 1. Biodiversité du sol	6
I. 2. Les vers de terre : agents cruciaux du sol	8
I. 2. 1. Taxonomie et Classification	9
I. 2. 2. Morphologie et anatomie	9
I. 2. 3. Cycle de vie	13
I. 2. 4. Ecologie.....	14
I. 2. 5. Groupes écologiques	15
I. 2. 6. Effet sur les propriétés du sol	17
I. 3. Bactéries du sol.....	19
I. 3. 1. Diversité de la communauté bactérienne.....	20
I. 3. 2. Microenvironnement et interactions écologiques	24
I. 3. 3. Fonctions bactériennes dans le sol	25
I. 3. 4. Contribution bactérienne dans la rhizosphère	25
I. 3. 5. Mécanismes favorisant la croissance bactérienne.....	26
I. 4. Bactéries associées aux vers de terre.....	32

I. 4. 1. Bactéries du tube digestif-----	33
I. 4. 2. Bactéries des néphridies -----	34
I. 4. 3. Bactéries du cocon-----	34
I. 4. 4. Bactéries des turricules -----	35
II. Présence des métaux lourds dans les sols	36
II. 1. Sources de pollution des sols-----	36
II. 2. Législations -----	38
II. 3. Pollution des sols au Maroc -----	39
II. 4. Mobilité et biodisponibilité des polluants métalliques dans les sols -----	42
II. 5. Effets des métaux sur la santé humaine-----	43
II. 6. Effets des métaux sur les composantes du sol -----	44
III. Techniques de dépollution des sols.....	45
III. 1. Techniques physiques -----	46
III. 2. Techniques chimiques-----	46
III. 3. Techniques biologiques : bioremédiation par des bactéries -----	47
III. 3. 1. Toxicité-----	47
III. 3. 2. Tolérance et Résistance -----	48
III. 3. 3. Bioremédiation-----	50
III. 4. Techniques biologiques : phytoremédiation -----	50
III. 4. 1. Essentialité-----	50
III. 4. 2. Phytotoxicité -----	52
III. 4. 4. Tolérance -----	56
III. 4. 5. Phytoremédiation -----	58
III. 5. Phytoremédiation couplée à la bioaugmentation -----	61
IV. Techniques d'analyse	66
IV. 1. Techniques d'identification des vers de terre -----	66
IV. 1. 1. Identification morphologique -----	66
IV. 1. 2. Identification moléculaire -----	68
IV. 2. Techniques d'étude des bactéries du sol-----	69
IV. 2. 1. Techniques basées sur la culture des bactéries -----	69
IV. 2. 2. Techniques d'étude moléculaire-----	71

IV. 3. Techniques d'identification des bactéries -----	71
IV. 4. Techniques de mise en évidence des performances de PGPB-----	72
IV. 5. Techniques de la mise en évidence de la résistance aux métaux lourds -----	74
IV. 6. Techniques d'inoculation des plantes par des bactéries multibénéfiques----	74
IV. 6. 1. Inoculation des semences-----	75
IV. 6. 2. Inoculation des racines-----	75
IV. 6. 3. Inoculation du sol-----	76
 Deuxième partie : partie pratique.....	77
 Chapitre 1 : Matériel et Méthodes	78
I. Caractérisation des vers de terre	78
I. 1. Récolte des échantillons -----	78
I. 2. Identification morphologique de l'espèce de ver de terre-----	79
I. 3. Identification moléculaire de l'espèce du vers de terre-----	79
I. 4. Préparation des extraits de vers de terre -----	80
I. 4. 1. Extraits bruts -----	80
I. 4. 2. Excrétions cutanées (EXC)-----	81
I. 5. Effet des extraits de vers de terre sur la croissance des levures -----	82
I. 5. 1. Préparation de milieux de culture exclusivement à partir d'extraits de vers de terre -----	82
I. 5. 2. Milieu de culture conventionnel-----	83
I. 5. 3. Culture de levures et évaluation de la croissance -----	83
II. Isolement, identification moléculaire et caractérisation biochimiques des microorganismes isolés du tissu chloragène	84
II. 1. Dissection de vers de terre et prélèvement du tissu chloragène -----	84
II. 2. Isolement des bactéries et purification-----	85
II. 3. Caractérisation biochimique-----	86
II. 4. Identification moléculaire -----	92
III. Caractérisation du potentiel PGP des bactéries isolées et résistance aux métaux lourds	96

III. 1.	Préparation des inocula bactériens-----	96
III. 2.	Production des sidérophores-----	96
III. 3.	Fixation d'azote -----	97
III. 4.	Production d'ammonium et de nitrate -----	97
III. 5.	Production de l'Acide Indole Acétique -----	98
III. 6.	Solubilisation du phosphate tricalcique-----	100
III. 7.	Solubilisation du potassium -----	101
III. 8.	Resistance aux métaux lourds-----	102
III. 9.	Analyses statistiques-----	102
IV.	Effet de l'enrobage (bio-priming) des semences de <i>Spinacia oleracea</i> L avec des isolats bactériens sur la promotion de la croissance des plantules et leur résistance aux métaux lourds	103
IV. 1.	Préparation de l'inoculum bactérien -----	103
IV. 2.	Résistance des isolats bactériens aux mélanges de métaux lourds -----	103
IV. 3.	Contamination artificielle du sol par des métaux lourds -----	104
IV. 4.	Enrobage des semences des épinards avec les isolats bactériens -----	104
IV. 5.	Germination des graines et croissance des plantules -----	104
IV. 6.	Analyses statistiques-----	105
V.	Étude du pouvoir des isolats à biore médier le sol et à assister la phytoremédiation des métaux lourds par <i>Spinacia oleracea</i> L.....	106
V. 1.	Préparation du sol-----	106
V. 2.	Effet des isolats bactériens sur la mobilité des métaux du sol-----	106
V. 3.	Influence des souches bactériennes sur la croissance de <i>Spinacia oleracea</i> sous stress métallique -----	107
V. 4.	Analyses bio-physico-chimiques du sol -----	109
V. 4. 1.	Activité enzymatique-----	109
V. 4. 2.	Analyses physicochimiques-----	110
V. 5.	Efficacité de la phytoremédiation -----	112
V. 6.	Analyse des données -----	112
Chapitre 2 :	Résultats et Discussion	113

I. Caractérisation des vers de terre	113
I. 1. Identification de l'espèce de vers de terre -----	113
I. 2. Effet des extraits bruts de vers de terre sur la croissance des levures -----	117
I. 2. 1. Milieux à base d'extraits de vers frais VF -----	117
I. 2. 2. Milieux à base d'extraits de vers jeûnés VJ-----	117
I. 3. Effet des excréments cutanées des vers de terre sur la croissance des levures ---	118
II. Isolement, identification moléculaire et caractérisation biochimiques des bactéries vivantes au niveau du tissu chloragène TC	122
II. 1. Isolement et criblage des bactéries -----	122
II. 2. Caractérisation biochimique des isolats -----	123
II. 3. Identification moléculaire par séquençage du gène ARNr 16S -----	125
III. Caractérisation du potentiel PGP des microorganismes isolés et résistance aux métaux lourds	129
III. 1. Caractérisation qualitative des souches isolées à produire des éléments bénéfiques à la croissance des plantes-----	129
III. 1. 1. Production des sidérophores -----	129
III. 1. 2. Fixation d'azote-----	129
III. 1. 3. Solubilisation du phosphate et du potassium insolubles -----	130
III. 2. Caractérisation qualitative des souches isolées à produire des éléments bénéfiques à la croissance des plantes-----	131
III. 2. 1. Production d'Acide Indole Acétique AIA-----	131
III. 2. 2. Production de l'ammonium et de nitrate -----	131
III. 2. 3. Solubilisation du phosphate et du potassium insolubles -----	132
III. 3. Tolérance des bactéries aux métaux lourds : détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice CMI-----	134
III. 4. Analyse Catégorielle en Composantes Principales (Cat-PCA)-----	136
IV. Effets des isolats bactériens sur la promotion de la croissance des plantules et leur résistance aux métaux lourds.....	138
IV. 1. Résistance et croissance des souches sous stress des métaux lourds -----	138

IV. 2. Effet de l'enrobage des semences des épinards avec les isolats bactériens sur le taux de germination et la croissance des plantules -----	141
V. Étude du pouvoir des isolats à bioremédier le sol et à assister la phytoremédiation des métaux lourds par <i>Spinacia oleracea</i> L.	144
V. 1. Effet des isolats bactériens sur la mobilité des métaux du sol-----	144
V. 2. Influence de la contamination du sol par des métaux lourds sur la croissance de <i>Spinacia oleracea</i> -----	145
V. 3. Influence de l'inoculation du sol par les différents isolats bactériens (Bioaugmentation) sur la croissance de <i>Spinacia oleracea</i> sous stress métallique --	147
V. 4. Effet des métaux lourds et de l'inoculation du sol sur les activités enzymatiques du sol -----	150
V. 5. Effet des métaux lourds et de l'inoculation du sol sur les propriétés physicochimiques du sol -----	153
V. 6. Pouvoir remédiateur des métaux lourds du sol -----	154
V. 7. Accumulation des métaux lourds dans les tissus de <i>Spinacia oleracea</i> -----	155
V. 7. 1. Assimilation du calcium et du fer par des épinards cultivés sous différents traitements-----	160
V. 7. 2. Liens plante – métaux-----	160
Chapitre 3 : Discussion générale et perspectives	165
Références bibliographiques	171

Liste des tableaux

Tableau 1 : Taxonomie des vers de terre (Edwards et al., 1996).....	9
Tableau 2 : Principaux phylums bactériens détectés par leurs gènes d'ARNr 16S dans des extraits d'ADN de sols de surface (Lal, 2017).	22
Tableau 3 : Plages de concentrations maximales autorisées pour les métaux lourds dans les sols agricoles (mg Kg ⁻¹)	38
Tableau 4 : Concentrations de métaux lourds (mg Kg ⁻¹) dans les sols de différentes régions du Maroc.	40
Tableau 5 : Liste de quelques études dans différents sols contaminés par des métaux lourds pour améliorer la capacité de phytoremédiation en utilisant des bactéries du sol.	64
Tableau 6 : Séquences d'amorces et longueur (pb) des régions géniques amplifiées, utilisées dans l'identification moléculaire des vers de terre (Pérez-Losada et al., 2009)	79
Tableau 7 : Concentration en matière sèche par milieu de culture à base d'extraits de vers de terre	83
Tableau 8 : Composants, principes et interprétation des tests du système Thermo Scientific™ RapID™ (https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R8311006).....	92
Tableau 9 : Propriétés physicochimiques du sol utilisé durant cette étude.....	106
Tableau 10 : Caractères morphologiques du ver de terre isolé.....	114
Tableau 11 : Affiliation de l'espèce après identification par l'ARN en utilisant les séquences des gènes COI, ARNr 16S, ND1 et ARNr 28S.....	115
Tableau 12 : Nombre de colonies formées (NCF) de <i>Candida tropicalis</i> et <i>Filobasidium uniguttulatum</i> dans des milieux préparés avec des dilutions d'extraits bruts de vers de terre par rapport au milieu témoin SDA. Les lettres différentes (a, b, c, et d) indiquent les traitements qui diffèrent significativement au niveau P<0,05.	118
Tableau 13 : Nombre de colonies formées (NCF) de <i>Candida tropicalis</i> et <i>Filobasidium uniguttulatum</i> dans des milieux préparés avec des dilutions d'excrétions cutanée de vers de terre par rapport au milieu témoin SDA. Les lettres différentes (a, b, c, et d) indiquent les traitements qui diffèrent significativement au niveau P<0,05.	120
Tableau 14 : Nombre d'isolats bactériens du tissu chloragène par milieu de culture.....	123
. Tableau 15 Caractéristiques biochimiques des isolats.....	124
Tableau 15 : Affiliation taxonomique des bactéries isolées du tissu chloragène du ver de terre <i>Aporrectodea molleri</i>	127

Tableau 17 : Caractères favorisant la croissance des plantes exprimées par 15 les bactéries isolées.....	130
Tableau 18 : Concentration minimale inhibitrice (CMI, ppm) des métaux lourds pour les 15 isolats bactériens	136
Tableau 19 : Effet des 5 traitements bactériens sur le taux de germination des graines par rapport au contrôle (graines non enrobées).....	142
Tableau 20 : Effets de l'inoculation des 5 souches bactériennes sur la solubilisation de Mn, Zn, Cu, Cd et Ni dans le sol contaminé.....	145
Tableau 21 : Propriétés physico-chimiques des échantillons de sol à la fin de la période de culture des plantes.....	154
Tableau 22 : Effet des différents 5 souches bactériennes sur les concentrations de métaux lourds Métal (mg Kg ⁻¹ Poids sec) dans les racines et les pousses d'épinards récoltés après 42 jours de transfert dans un sol contaminé par des métaux lourds.	158
Tableau 23 : Moyenne ± erreur standard (n = 3) des facteurs de bioaccumulation (BAF) et des facteurs de translocation (TF), des métaux lourds dans des épinards cultivés dans un sol contaminé.....	159

Liste des figures

Figure 1 : Biodiversité du sol (FAO et al., 2020)	7
Figure 2 : Anatomie du ver de terre – vue dorsale d’un ver de terre vivant (Lów et al., 2016).	10
Figure 3 : Anatomie du ver de terre – caractères externes. (Modifiée à partir de https://www.brainkart.com/article/Earthworm---Lampito-mauritii_33172)	11
Figure 4 : Anatomie du ver de terre – coupe transversale (Modifiée à partir de https://biocyclopedia.com/index/general_zoology/class_oligochaeta.php).....	12
Figure 5 : Cycle de vie d’un ver de terre. (Modifiée à partir de (Davidson et al., 2006 ; Parthasarathi, 2007)).....	14
Figure 6 : Trois principaux groupes écologiques de vers de terre : épigés, anéciques et endogés (https://www.earthwormsoc.org.uk/earthworm-ecology).....	17
Figure 7 : Schéma représentant le rôle des vers de terre dans le sol à différentes échelles de temps et d’espace (modifié à partir de (Cunha et al., 2016)).	18
Figure 8 : Principaux mécanismes par lesquels les vers de terre affectent la croissance des plantes. (créé à partir de (Edwards, 2004))	19
Figure 9 : Biodiversité des phylums bactériens du sol.	21
Figure 10 : Mécanismes d’action des bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPB) dans la rhizosphère (Créée à partir de Ferreira et al. (2019)).	27
Figure 11 : Abondances relatives des phylums microbiens signalés dans les sols ou les substrats transformés par des vers de terre de différents groupes fonctionnels (Medina-Sauza et al., 2019).	33
Figure 12 Source des polluants métalliques dans l’environnement (Mitra et al., 2022).	37
Figure 13 : Effets de la toxicité des métaux lourds sur les bactéries (Thakare et al., 2021)....	48
Figure 14 : Mécanismes de résistance aux métaux développés par les bactéries (A) ; Principales familles de transporteurs impliqués dans la résistance aux métaux lourds (B) ; M représente le cation métallique (Etesami, 2018).	49
Figure 15 : Rôles des métaux lourds, à concentrations optimales, dans la synthèse des protéines, des acides nucléiques et des pigments photosynthétiques, et à l’intégrité structurelle et fonctionnelle des membranes cellulaires. (Modifie a partie de Arif et al., (2016))......	52
Figure 16 : Effets toxiques des métaux à forte concentration sur les cellules végétales de blé (Rizvi et al. 2020).	53

Figure 17 : Représentation schématique des processus physiologiques et moléculaires d'absorption/translocation des métaux dans les plantes (Angulo-Bejarano et al., 2021). Les acides organiques sont représentés par des cercles orange (OA) ; PC, phytochélatine ; MT, métallothionéine.....	55
Figure 18 : Absorption, translocation et séquestration des métaux lourds dans les plantes (Yan et al. 2020). HMs : Métaux lourds (Heavy metals) ; PC, phytochélatine ; MT, métallothionéine.	58
Figure 19 : Mécanismes impliqués dans la remédiation des sols contaminés par des métaux lourds HM par l'interaction entre les bactéries tolérantes aux métaux lourds et favorisant la croissance des plantes (HMT-PGP) et les plantes (Mishra et al., 2017).....	62
Figure 20 : Clé taxonomique d'identification du ver de terre.....	67
Figure 21 : Méthodes d'inoculation de bactéries favorisant la croissance des plantes dans la plante hôte (Lopes et al., 2021).....	76
Figure 22 : Carte du lieu d'échantillonnage des vers de terre avec les coordonnées géodésiques. Image prise par l'application Mobile Topographer	78
Figure 23 : Face ventrale avec incision longitudinale avant l'épingleage (Lów et al., 2016) ...	84
Figure 24 : Ver de terre disséqué et épinglé ouvert montrant les organes internes (Lów et al., 2016)	85
Figure 25 : Tissu chloragogène (cellules jaunâtres) entourant la face interne du tube digestif (Lów et al., 2016).....	85
Figure 26 : Test d'oxydase : la bande de droite montre une réaction violette due à la production d'oxydase et la bande de gauche montre une culture négative à l'oxydase (Brown et Smith, 2010).	87
Figure 27 : Test de catalase : (-) catalase-négatif ; (+) des bulles vigoureuses se produisent lorsque la catalase est présente (Brown et Smith, 2010).	87
Figure 28 : Utilisation du citrate (+) test positif, bleu de Prusse ; (-) contrôle non-inoculé (Brown et Smith, 2010).....	88
Figure 29 : Test de motilité au mannitol : Couleur rouge = Mannitol - ; Couleur rouge = Mannitol +. (a) Immobile ; (b) et (c) Mobile (Brown et Smith, 2010).	89
Figure 30 : Réactions de fermentation et production de sulfure d'hydrogène sur milieu Hajna-Kligler. (a) Alcalin/ acide ; (b) acide/acide avec gaz ; (c) alcalin/pas de changement ; (d) non inoculé ; (e) production de sulfure d'hydrogène (H ₂ S) (Brown et Smith, 2010).....	90

Figure 31 : Galeries biochimiques du système Thermo Scientific™ RapID™ (https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R8311006)	91
Figure 32 : Schéma d'extraction de l'ADN génomique bactérien suivant le kit Bioline « ISOLATE II GENOMIC DNA KIT » (https://www.bioline.com/downloads/dl/file/id/1197/nucleic_acid_isolation_guide.pdf)	93
Figure 33 : Dosage par Nanodrop des ADN extraits	94
Figure 34 : Milieu solide CAS pour la détection des sidérophores	96
Figure 35 : Présence du halo jaune autour de la colonie signifiant la production des sidérophores	97
Figure 36 : Détermination $\text{NH}_4\text{-N}$ et $\text{NO}_3\text{-N}$ — Virage du vert à un violet pâle lors de la titration par H_2SO_4	98
Figure 37 : Production de l'AIA — la couleur rose indique la production de l'AIA ; la couleur jaune est synonyme d'un résultat négatif.....	99
Figure 38 : Courbe étalon de la production de l'acide indole acétique AIA	99
Figure 39 : Résultat positif de la solubilisation du phosphate tricalcique par les isolats sur milieu solide.....	100
Figure 40 : Courbe étalon de la solubilisation du phosphate tricalcique	101
Figure 41 : Résultat positif de la solubilisation du potassium — halo transparent apparent autour des colonies.....	101
Figure 42 : Espèce de vers de terre la plus abondante dans la région, choisie pour les études ultérieures.....	113
Figure 43 : Arbres phylogénétiques construits par méthode « Maximum Likelihood » suite à 1000 répétitions, montrant la proximité de notre spécimen de ver de terre VTG par rapport à des espèces connues en utilisant quatre gènes différents : COI, ARNr 16S, ND1 et ARNr 28S.	116
Figure 44 : Culture des bactéries aérobies du tissu chloragène sur les trois milieux de culture : BHI ; Urée (Milieu à base d'urée et sans source d'azote) ; VT (Milieu exclusivement à base d'extraits de vers de terre).....	122
Figure 45 : Electrophorèse réalisée par la migration des produits de PCR sur un gel d'agarose à 1 % avec un marqueur de poids moléculaire de 1 kb. Photo visualisée par le système de documentation photo « G Box ».	125
Figure 46 : Analyse phylogénétique moléculaire par la méthode Neighbor-Joining de la séquence complète d'ARNr 16 S.....	126

Figure 47 : Production d'AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$) par 7 souches isolées du ver de terre <i>Aporrectodea molleri</i>	131
Figure 48 : Production d'ammonium et de nitrate dans un milieu dépourvu de source d'azote par les isolats bactériens.....	132
Figure 49 : Solubilisation du phosphate tricalcique en milieu liquide par les 15 isolats bactériens. Résultats présentés par moyenne de trois répétitions, la barre d'erreur représente l'erreur standard.	133
Figure 50 : Solubilisation du potassium du feldspath en milieu liquide par les 15 isolats bactériens. Résultats présentés par moyenne de trois répétitions, la barre d'erreur représente l'erreur standard.	134
Figure 51 : CAT-PCA illustrant le profil des isolats bactériens par rapport à leur différent trait PGP et leur résistance aux métaux lourds.....	137
Figure 52 : Courbes de croissance des souches bactériennes TC7 (A), TC33 (B), TC34 (C), TC4 (D), et TC45 (E) sur les milieux de croissance Sucrose Low Phosphates SLP et SLP supplémentés avec différents mélanges de métaux lourds.	139
Figure 53 : Changements de pH après 72 heures de croissance des 5 souches bactériennes sur les milieux de culture Sucrose Low Phosphates SLP et SLP supplémentés avec différents mélanges de métaux lourds.....	140
Figure 54 : Effet du traitement des graines par les 5 souches bactériennes sur la croissance des plantules de <i>Spinacia oleracea</i> cultivée dans un sol normal et un sol contaminé par les métaux lourds : Longueur des plantules (A), poids frais (B) et poids sec (C).	143
Figure 55 : Différences de croissance entre les épinards cultivés dans un environnement stressant sous présence de métaux lourds (Contrôle positif) et les épinards cultivés dans un environnement sain (Contrôle négatif).	146
Figure 56 : Différences de croissance entre les épinards stressés par les métaux lourds cultivés dans le contrôle positif (sol contaminé, non inoculé) et les épinards cultivés dans le contrôle négatif (sol non contaminé, non inoculé).....	146
Figure 57 : Influence de la contamination du sol par des métaux lourds sur la teneur en chlorophylle a+ b. Contrôle négatif : sol non contaminé ; Contrôle positif : sol contaminé.	147
Figure 58 : Effet apparent de l'inoculation du sol avec les cinq souches bactériennes sur la croissance des épinards cultivés dans un sol contaminé par des métaux lourds, comparé aux plantes cultivées dans les mêmes conditions dans un sol non inoculé (contrôle positif) et aux épinards cultivés dans un sol non inoculé et non contaminé (contrôle négatif).	148

Figure 59 : Effets de l'inoculation du sol avec les cinq souches bactériennes sur la croissance des épinards cultivés dans un sol contaminé par des métaux lourds, comparés aux plantes cultivées dans les mêmes conditions dans un sol non inoculé (contrôle positif). Les attributs ont été comparés aux épinards cultivés dans un sol non inoculé et non contaminé (contrôle négatif).	149
Figure 60 : Effet de l'inoculation du sol avec les différents traitements bactériens sur la teneur en chlorophylle des épinards cultivés dans un sol contaminé par des métaux lourds, comparé aux plantes cultivées dans les mêmes conditions : dans un sol non inoculé (contrôle positif) et dans un sol non inoculé et non contaminé (contrôle négatif).	150
Figure 61 : Effet des métaux lourds et de l'inoculation des 5 souches bactérienne sur l'activité des enzymes du sol, par rapport au sol normal (contrôle négatif). À : phosphatase alcaline, B : phosphatase acide et C : activité uréasique.	153
Figure 62 : Concentration en métaux lourds (mg Kg^{-1}) dans le sol initial et dans chaque traitement à la fin de l'expérience après 6 semaines.	155
Figure 63 : Effet de 5 souches bactériens sur les concentrations du calcium et du fer dans les racines et les pousses d'épinards cultivés dans un sol contaminé par les métaux lourds.	160
Figure 64 : Heatmap montrant les corrélations entre les paramètres de croissance des épinards et l'absorption de métaux lourds, la translocation des métaux TF et leur bioaccumulation BAF (totale).	161
Figure 65 : Analyse en composantes principales catégorielles (Cat-PCA) de divers paramètres de croissance des plantes et de facteurs de bioaccumulation des métaux (BAF), représentés par les cercles bleus, mesurés dans les traitements, représentés par les carrés rouges	164

Liste des abréviations

- ABC : ATP-binding cassette
- ACC : 1-aminocyclopropane-1-carboxylate
- AcdP : Acid Phosphatase
- ADN : Acide DésoxyriboNucléique
- ADP : Adenosine Di-Phosphate
- AIA : Acide Indole-Acétique
- Al : Aluminum
- AlkP : Alkaline phosphatase
- ARN : Acide RiboNucléique
- ARNr : Acide RiboNucléique Ribosomique
- As : Arsenic
- ATP : Adenosine Tri-Phosphate
- BAF : BioAccumulation Factor
- Be : Béryllium
- BHI : Brain Heart Infusion
- BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
- Ca : Calcium
- CAS : Chrome Azurol S
- CAT : Catalase
- CAT-PCA : Categorical Principal Components Analysis
- CAX : Cation/H⁺ Exchanger
- CCME : Canadian Council of Ministers of the Environment
- Cd : Cadmium
- CDF Cation Diffusion Facilitator
- CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
- Co : Cobalt
- COI : Cytochrome C Oxidase Subunit I
- COII : Cytochrome C Oxidase Subunit II
- Cr : Chromium
- Cu : Copper
- DAPG : 2,4-DiAcétylPhloroGlucinol
- DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
- dNTP : deoxyNucleotide TriPhosphate
- DO : Densité Optique
- EC : Electrical Conductivity
- EPS : Extracellular Polymeric Substance
- EXC : Excrétions
- FAO : Food and Agriculture Organization
- gpm : gallons par minute
- GR : Glutathion Réductase
- GT : Tumescence Génitale
- HCN : Hydrogen Cyanide
- HDTMA : HexaDécylTriMéthylAmmonium
- Hg : Mercure
- HM : Heavy Metal
- HMA : Heavy Metal ATPase
- HSD : Honestly Significant Difference
- ICP-AES : Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy
- K : Potassium
- kb : kilobase
- LB : Luria-Bertani
- LPS : LipoPolySaccharides
- Mix : mixture
- Mn : Manganese

-
- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - Mo : Molybdate - MT : MétalloThionéines - MTP : Metal Tolerance Proteins - MUB : Modified universal buffer - N : Nitrogen - NADH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide - NB : Nutrient Broth - NCBI : National Center for Biotechnology Information - NCF : Nombre de Colonies Formées - ND : NADH déshydrogénase - Ni : Nickel - NPK : Nitrogen Phosphate Potassium - NRAMP : Natural Resistance-Associated Macrophage Protein - OMS : Organisation Mondiale de la Santé - OTU : Operational Taxonomic Unit - P : Phosphore - pb : paire de base - PCA : Principal Components Analysis - PCR : Polymerase Chain Reaction - PCs : PhytoChélatine - PGP : Plant Growth Promotion - PGPB : Plant Growth-Promoting Bacteria - PLFA : Phospholipid fatty acid analysis - p-NP : p-NitroPhénol - p-NPP : p-NitroPhényl Phosphate - POD : Peroxydase | <ul style="list-style-type: none"> - ppm : partie par million - ROS : Reactive Oxygen Species - rpm : Rotation Per Minute - S.E : Standard Error - Sb : Antimoine - SDA : Sabouraud Dextrose Agar - Se : Sélénium - SLP : Sucrose Low Phosphate - Sn : Étain - SOD : superoxyde dismutase - TC : Tissu Chloragogène - Te : Tellure - TF : Translocation Factor - THAM : Tris-Hydroxyméthyl AminoMéthane - TP : Tubercule Pubertaire - TSI Tolérance Systémique Induite - UFC : Unité Formant Colonie - V : Vanadium - VF : Vers de terre Fraîchement récoltés - VJ : Vers à jeûne - VT : Vers de terre - WGS : Whole Genome Sequencing - YEM : Yeast Extract - Manitol - ZIP : ZRT, IRT-like Protein (IRT: Iron-Regulated Transporter) - Zn : Zinc - ZNT : Zinc Transporter - ZRT : Zinc-Regulated Transporter |
|---|---|

Introduction générale

Les vers de terre (classe *Oligochaeta*) sont l'une des biomasses les plus abondantes (~ 90 %) dans le sol (Brown et al., 2004), ils favorisent la décomposition de la matière organique, le recyclage des nutriments et l'infiltration de l'eau. Grâce à leurs habitudes d'alimentation et d'enfouissement, les vers de terre construisent des habitats pour d'autres organismes, prouvant leur statut des ingénieurs de l'écosystème et composantes clés de la biodiversité du sol. (Edwards, 2004 ; Bohlen, 2017). Les vers de terre ont un impact direct et significatif sur le microbiote du sol, ils peuvent soit digérer les microorganismes, réduisant ainsi la biomasse microbienne, notamment celle des champignons, ou bien sélectionner ou stimuler la croissance d'autres microorganismes qui les aident à la digestion de la matière organique (Medina-Sauza et al., 2019). En revanche, par le biais de leur activité vitale les vers de terre assurent le transport et la dispersion des microorganismes tout au long du sol (Kuzakov et al., 2015 ; Wani et al., 2017).

Au cours des dernières décennies, plusieurs études se sont intéressées aux microorganismes associés aux vers de terre, plus particulièrement aux bactéries symbiotiques que ce soit de manière permanente ou transitoire. Le tube digestif des vers de terre est l'organe le plus étudié, les bactéries qui y habitent semblent être liées au régime alimentaire spécifique de chaque espèce de vers de terre et leur abondance relative est influencée par la qualité et la disponibilité des ressources alimentaires (Drake et al., 2007 ; Wani et al., 2017). En dehors du tube digestif, la présence de symbiotes microbiens spécifiques aux vers de terre a été confirmée dans les néphridies. Il s'agit d'une branche monophylétique du genre *Acidovorax*, elle pourrait être impliquée dans l'absorption de peptides et d'acides aminés en utilisant leur activité protéolytique (Schramm et al., 2003 ; Davidson et al., 2013 ; Viana et al., 2018). L'intérêt pour les bactéries isolées des vers de terre ne cesse de croître du fait que la majorité des isolats sont métaboliquement plus actifs et possèdent une variété de propriétés bénéfiques (Singh et al., 2015). De nombreuses études ont rapporté le potentiel des isolats intestinaux des vers de terre à agir comme des bactéries favorisant la croissance des plantes (PGP), à éliminer les métaux lourds et/ou à biodégrader les polluants (Banerjee et al., 2019 ; Biswas et al., 2018 ; Mudziwapasi et al., 2016 ; Singh et al., 2016 ; Verma et al., 2011). En outre, les vers de terre sont caractérisés par la présence d'un tissu chloragène, une couche de cellules enveloppant le tube digestif qui est en contact permanent avec le fluide coelomique, lui-même en contact

permanent avec le milieu extérieur. Le tissu chloragogène est constitué de chloragocytes, qui sont des cellules de stockage du glycogène et des lipides et peuvent accumuler d'autres métabolites (Fischer, 1978 ; Fischer et al., 1992 ; Roubalová et al., 2015). Ils ont la capacité de neutraliser les métaux lourds et jouent le rôle d'échangeurs de cations dans ces processus ainsi que la régulation ionique (Vogel et al., 1992 ; Roubalová et al., 2018). La localisation du tissu chloragogène pourrait constituer un habitat et un support favorables à la croissance de bactéries provenant de l'environnement extérieur qui auraient résisté à l'effet immunitaire du fluide coelomique ou auraient dépassé la paroi intestinale. Il serait intéressant qu'une éventuelle présence d'une communauté bactérienne au sein du tissu chloragogène soit explorée puisqu'aucune étude dans ce sens n'a été réalisée auparavant.

À l'ère actuelle, la contamination des sols par les métaux lourds est devenue un problème environnemental majeur, nuisant à la santé des plantes, des animaux et des humains à l'échelle mondiale (Bhatti et al., 2018). Cette pollution est le résultat d'activités anthropiques telles que l'utilisation excessive de produits chimiques agricoles, l'irrigation par les eaux usées, l'activité minière et les déchets rejetés par l'industrie, ainsi que de processus naturels (Etesami, 2018 ; Ahemad, 2019). En outre, la concentration totale de métaux dans l'environnement ne reflète pas toujours leur toxicité biologique ou leur biodisponibilité, car divers facteurs tels que le pH, la matière organique du sol, la texture et les nutriments du sol affectent leur rétention et leur mobilité, ce qui rend difficile une évaluation appropriée du risque lié aux métaux (Xu et al., 2012). Les métaux lourds dans l'environnement du sol, contrairement à d'autres contaminants, ne peuvent pas être minéralisés ou décomposés en formes moins toxiques. Plusieurs approches physico-chimiques conventionnelles ont été utilisées, cependant, ces traitements ont une utilité limitée, en raison de leur prix élevé, des exigences importantes en matière de main-d'œuvre, des modifications irréversibles de la structure du sol et de la perturbation du microbiote du sol (RoyChowdhury et al., 2018). Par conséquent, trouver des solutions rentables, durables et écologiquement responsables pour la remédiation des métaux lourds est une préoccupation majeure.

La phytoremédiation est l'une des techniques respectueuses de l'environnement, qui utilise les plantes pour éliminer les métaux du sol, soit en absorbant et en retenant les métaux dans leurs racines (phytostabilisation), soit en transportant les métaux vers les tissus aériens (phytoextraction). Peu d'espèces végétales sont capables de survivre dans des sols contaminés par des métaux lourds. Certaines, dotées de propriétés d'extraction des métaux, peuvent

absorber les métaux lourds et les accumuler jusqu'à des concentrations anormalement élevées (Adeoye et al., 2022). Mais comme la majorité de ces hyperaccumulateurs ont une croissance lente et une faible biomasse, il est tentant d'améliorer le potentiel de phytoremédiation des plantes non hyperaccumulatrices qui atteignent une biomasse importante même sous les conditions de stress (Mishra et al., 2017). Par conséquent, la combinaison de la phytoremédiation et de la bioaugmentation du sol à l'aide de bactéries tolérantes aux métaux et capables de favoriser la croissance des plantes a donné lieu à une stratégie potentielle pour accroître l'efficacité de la phytoremédiation.

Les bactéries, en tant que composante intégrale du sol, sont capables de créer des relations mutuellement bénéfiques avec la majorité des plantes terrestres. Elles peuvent protéger les plantes des effets nocifs des métaux lourds par le biais d'une série de processus, notamment la biosorption des métaux, la bioaccumulation, la précipitation, la complexation, la réduction et l'oxydation (Ma et al., 2016 a ; Etesami, 2018). Ces bactéries sont bénéfiques aux plantes, à travers une variété de processus directs et indirects, en influençant la mobilité et la disponibilité des métaux lourds. D'autres peuvent produire des acides organiques et des sidérophores, augmentant la disponibilité des nutriments, ainsi que celle des métaux lourds. En outre, ils peuvent améliorer le développement des plantes en modulant les niveaux des phytohormones et en augmentant l'absorption des nutriments (Chen et al., 2014 ; Ma et al., 2016 a). Cependant, les bactéries peuvent augmenter ou réduire la biodisponibilité des métaux lors de l'inoculation du sol, il peut y avoir une accélération de la phytoremédiation (une augmentation de la mobilisation et de la phytoextraction des métaux lourds) dans les sols métallifères ou une réduction de l'absorption des métaux lourds (une augmentation de l'immobilisation des métaux lourds) par les plantes (Ngugi et al., 2021). Toutefois, les paramètres qui modulent l'interaction plante-bactérie et l'absorption des métaux restent méconnus.

La quête de ces isolats multi-bénéfiques aux propriétés intrigantes s'est étendue au-delà du sol rhizosphérique ou des zones minières, pour arriver à la biomasse invertébrée la plus répandue du sol — les vers de terre. En fait, les vers de terre ont la capacité de survivre dans des sols contaminés par des métaux lourds, ils fixent les métaux dans le tissu chloragogène en créant des complexes organométalliques (Roubalová et al., 2018). De nombreux chercheurs ont prouvé l'efficacité de nombreux isolats PGP de vers de terre pour tolérer et éliminer, *in vitro*, de multiples métaux lourds (Biswas et al., 2018 ; Banerjee et al., 2019 ; Šrut et al., 2019 ; Liu et al., 2020 b ; Sun et al., 2020). Cependant, peu d'études mettent l'accent sur leurs capacités

en tant qu'agents bioremédiateurs, lorsqu'ils sont appliqués dans un environnement complexe contaminé tel que le sol.

Les épinards (*Spinacia oleracea* L.) sont des légumes-feuilles populaires, cultivés et consommés dans le monde entier, connus pour leur richesse en minéraux tels que la vitamine C, le calcium, le fer, le phosphore, le sodium et le potassium (Ferreira et al., 2018). La comestibilité de cette plante a été remise en question, en raison de sa capacité à résister et à accumuler des métaux lourds, lorsqu'elle est cultivée dans un environnement contaminé (Salaskar et al., 2011 ; Suthar et al., 2013 ; Yin et al., 2016 ; Eid et al., 2017 ; Zafar-ul-Hye et al., 2020). Néanmoins, la capacité de phytoremédiation des épinards cultivés dans un sol métallifère, hautement contaminé par le cadmium, ainsi que l'utilisation possible de bactéries multi-bénéfiques pour augmenter ses capacités, est peu étudiée. Par conséquent, la réaction physiologique des épinards aux différents métaux lourds, ainsi que les mécanismes ayant un impact sur leur absorption, leur translocation et leur accumulation, doivent être investigués.

Les objectifs de nos travaux :

- Objectif général

L'isolement et la caractérisation de la communauté bactérienne vivante, au niveau du tissu chloragène du ver de terre et investigation de leur potentiel d'utilisation comme agents bioremédiateurs, pour assister la phytoremédiation des sols contaminés par des métaux lourds.

- Objectifs spécifiques

- Identification de l'espèce de ver de terre la plus abondante au niveau du barrage d'eau de la région de Akrach, Rabat — Maroc.
- Etude du rôle des extraits de vers de terre sur la croissance des levures.
- Isolement et identification des bactéries aérobies du tissu chloragène du ver de terre.
- Caractérisation des souches isolées : traits favorisant la croissance des plantes et résistance aux métaux lourds.
- Étude de l'effet de l'enrobage des graines des épinards avec les isolats bactériens, sur la germination et la croissance des plantules, cultivées sous stress métalliques.
- Investigation du potentiel des bactéries isolées pour mobiliser les métaux du sol, pour améliorer les propriétés bio-physico-chimiques du sol, pour améliorer la croissance de *Spinacia oleracea* L. cultivée dans un sol métallifère (hautement contaminé par le cadmium), et pour améliorer son potentiel de phytoremédiation.

Première partie :

Revue bibliographique

I. Biodiversité et contributions fonctionnelles des organismes du sol

I. 1. Biodiversité du sol

La biodiversité, qui est devenue un concept très populaire parmi les scientifiques et le grand public depuis plusieurs décennies, est principalement utilisée pour évaluer l'état ou la qualité d'un écosystème donné (Dighton et al., 2015). La biodiversité est définie comme étant « la diversité biologique présente dans les écosystèmes terrestres, marins et autres écosystèmes aquatiques, ainsi que dans les complexes écologiques auxquels ils appartiennent. Elle englobe à la fois la diversité au sein des espèces et entre ces dernières, ainsi que la diversité des écosystèmes » (Jeffery et al., 2010).

Le sol constitue une matrice tridimensionnelle extrêmement complexe qui varie considérablement dans l'espace et dans le temps (Ferris et al., 2015). Contrairement à l'eau ou à l'air, qui sont également considérés comme des composantes essentielles des écosystèmes, les sols sont vivants ; leur existence même est définie par la présence d'organismes vivants. Ceux-ci ne font pas qu'habiter les sols ; ils les créent presque entièrement, du moins pour la partie supérieure du sol dont nous dépendons pour la production végétale. Depuis la création et la formalisation de la science des sols, l'importance et la signification fonctionnelle de la vie dans les sols ont été reconnues (Dighton et al., 2015 ; Ferris et al., 2015). En effet, le biote était considéré comme l'un des cinq facteurs influençant la formation du sol. Les sols se forment lorsque les roches se fracturent et se dissolvent sous l'effet de forces physiques et chimiques, mais aussi grâce à la contribution constante des organismes du sol. Ainsi, les sols sont le résultat d'une variété de processus biologiques et, contrairement à l'air ou à l'eau, ils dépendent d'organismes vivants pour leur structure et leur fonction.

En raison de son haut degré d'hétérogénéité, le sol contient un nombre énorme de niches écologiques, ce qui a donné lieu à une biodiversité étonnante. En utilisant une approche taxonomique pour quantifier la biodiversité, on affirme souvent que les forêts tropicales humides abritent plus de la moitié des dix millions d'espèces de plantes, d'animaux et d'insectes estimées dans le monde. Cependant, lorsque cette approche est appliquée au sol, le niveau de diversité est souvent de l'ordre de centaines de milliers, voire de millions d'espèces vivant dans une seule poignée de sol (Figure 1).



Figure 1 : Biodiversité du sol (FAO et al., 2020)

Plus que tout autre composant des écosystèmes terrestres et aquatiques, les sols sont soumis à la métabiose, car la majorité des organismes du sol dépendent indirectement des autres par le biais de la modification de l'environnement et de la chaîne alimentaire (Lavelle et al., 1995 ; Jeffery et al., 2010 ; Delgado-Baquerizo et al., 2020). Cependant cette différenciation fonctionnelle est l'une des principales raisons de la grande biodiversité du sol. Une classification généralisée par taille, illustre un dispositif couramment utilisé pour séparer la faune du sol en quatre classes : microfaune, mésofaune, macrofaune et mégafaune. Cette classification englobe la gamme des plus petits de 20 nm aux plus grands à 20-30 cm de largeur de corps (Paul 2015 ; FAO et al. 2020) :

- i. Les **microorganismes** tels que les virus, les bactéries, les Archaea et les champignons (20 nm à 10 µm) et la **microfaune** telle que les protozoaires et les nématodes du sol (10 µm à 0,1 mm) vivent principalement dans les solutions du sol dans l'eau gravitationnelle, capillaire et hygroscopique, où ils contribuent à la décomposition de la matière organique et à l'altération des minéraux du sol. Leur diversité est déterminée par les conditions du microhabitat et les propriétés physico-chimiques des horizons du sol.
- ii. La **mésafaune** est constituée de microarthropodes du sol dont la taille varie de 0,1 à 2 mm (par exemple, acariens, collemboles, enchytraeides, aptérygotes, petites larves d'insectes). Ils habitent les cavités du sol remplies d'air, où ils forment des microagrégats coprogènes, qui augmentent la surface des interactions biochimiques actives dans le sol et contribuent à la transformation de la matière organique.
- iii. La **macrofaune** est constituée de grands invertébrés du sol dont la taille varie de 2 à 20 mm (par exemple, vers de terre, cloportes, fourmis, termites, coléoptères, arachnides, myriapodes, larves d'insectes). Ils comprennent des transformateurs de litière, des prédateurs, certains herbivores de plantes et des ingénieurs de l'écosystème qui se déplacent dans le sol, le perturbant, augmentant la perméabilité à l'eau et l'aération, et établissant de nouveaux habitats pour les organismes les plus petits. Leurs turricules sont des endroits favorables pour la croissance des microorganismes.
- iv. Les vertébrés d'une longueur supérieure à 20 mm sont appelés **mégafaune** (mammaliens, reptiliens et amphibiens). Par leurs déplacements, ils génèrent une hétérogénéité spatiale à la surface du sol.

I. 2. Les vers de terre : agents cruciaux du sol

Les vers de terre sont les animaux du sol les plus importants en termes d'impact sur la décomposition de la matière organique, le développement de la structure du sol et le cycle des nutriments, en particulier dans les écosystèmes productifs. Bien qu'ils ne soient pas numériquement dominants, leur grande taille en fait un contributeur important de la biomasse des invertébrés du sol. Leurs activités sont essentielles à divers égards pour le maintien de la fertilité des sols dans les agroécosystèmes (Edwards et al., 1996).

Aristote a été l'un des premiers à souligner l'importance des vers de terre dans le retournement du sol ; il les a judicieusement surnommés « les intestins de la terre ». Toutefois, ce n'est qu'à la fin du XIX^e siècle que Charles Darwin, dans son ouvrage fondamental « The Formation of Vegetable Mould by the Action of Worms », a souligné le rôle essentiel des vers de terre dans

la décomposition des matières végétales et animales mortes qui pénètrent dans les sols, ainsi que dans le renouvellement continu et le maintien de la structure, de l'aération, du drainage et de la fertilité des sols (Edwards, 2004 ; Lal, 2017).

I. 2. 1. Taxonomie et Classification

Les vers de terre sont classés sous l'embranchement des Annélides et de la classe des Oligochètes (Tableau 1), qui contient jusqu'à 36 familles à l'échelle mondiale. Environ deux tiers des familles d'oligochètes sont composés de vers aquatiques ou semi-aquatiques, tandis que les autres familles sont principalement composées de vers terrestres — les vers de terre (Bohlen, 2017).

Tableau 1 : Taxonomie des vers de terre (Edwards et al., 1996)

Règne	<i>Animalia</i>
Embranchement	<i>Annelida</i>
Classe	<i>Clitellata</i>
Ordre	<i>Oligochaeta</i>
Famille	<i>Lumbricidae</i>

Les vers de terre comprennent plus de 8000 espèces appartenant à environ 800 genres et sont présents dans la majorité des régions du monde, à l'exception de celles au climat extrême, comme les déserts et les zones recouvertes de neige et de glace permanentes. Certains genres et espèces de vers de terre, notamment ceux appartenant aux *Lumbricidae*, sont extrêmement répandus et sont qualifiés de pérégrins (Edwards et al., 1977 ; Edwards, 2004).

I. 2. 2. Morphologie et anatomie

Les vers de terre sont des membres de la famille des annélides (vers segmentés). Le corps d'un annélide est souvent divisé en segments bien définis qui sont séparés les uns des autres par des septa, ou parois de séparation. Tous les segments, à l'exception de la queue et de la tête, sont pratiquement identiques et présentent une fine cuticule pigmentée avec une présence de soies, leurs caractéristiques externes (Figure 2) qui sont les principales clés d'identification des vers. Ainsi les vers de terre ont les structures anatomiques suivantes (Edwards et al., 1977 ; Jeffery et al., 2010 ; Löw et al., 2016) :

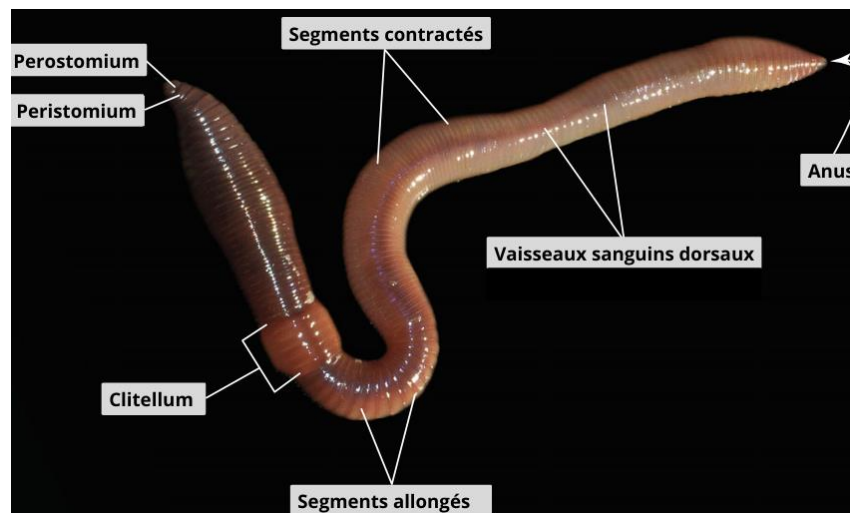


Figure 2 : Anatomie du ver de terre – vue dorsale d'un ver de terre vivant (Lów et al., 2016).

- Le péristomium est le premier segment, il porte la bouche, qui est soutenue par un lobe charnu appelé prostomium.
- Les vers de terre adultes (sexuellement matures) possèdent une bosse distincte et bien visible en forme de selle appelée clitellum. Le clitellum crée une gaine de mucus, qui entoure les vers pendant l'accouplement, et est chargé de créer le cocon dans lequel les œufs fécondés sont déposés. La surface ventrale du ver de terre est généralement plus claire que sa surface dorsale.
- Les pores génitaux mâles de la surface ventrale de ces organismes monoïques sont des ouvertures bien visibles, des canaux spermatiques d'où sortent les spermatozoïdes. Entre les pores génitaux mâles et le clitellum, ils possèdent une paire de longs sillons séminaux. Sur la face ventrale, où les oviductes évacuent les œufs, les petits pores génitaux femelles sont discrets. Le tubercule pubère est une autre structure clé, trouvée sur le clitellum, qui est utilisée pour identifier les vers de terre matures. Les tubercules pubertaires sont des renflements glandulaires que l'on trouve des deux côtés du clitellum. Le motif et l'emplacement des soies génitales sont également utiles pour identifier les différentes espèces de vers de terre (Figure 3).

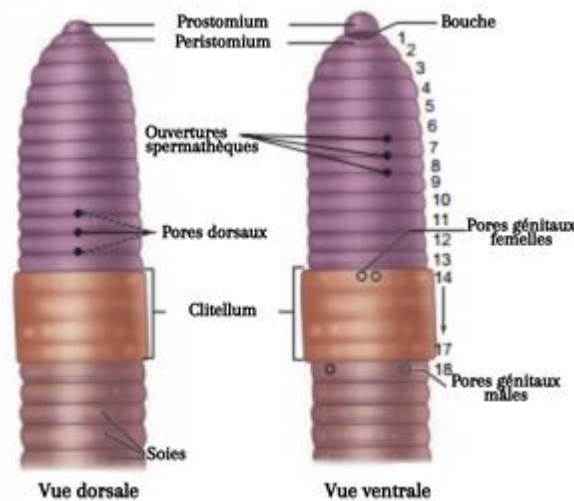


Figure 3 : Anatomie du ver de terre – caractères externes. (Modifiée à partir de https://www.brainkart.com/article/Earthworm---Lampito-mauritii_33172)

- La paroi des vers est constituée de la cuticule externe, de l'épiderme, de la couche de tissu nerveux, des couches de muscles circulaires et longitudinaux, et enfin du péritoine, qui sépare la paroi corporelle du cœlome (Figure 4).
- Les annélides sont les organismes les plus simples à posséder un véritable cœlome. Le cœlome est une grande cavité du corps, remplie de liquide cœlomique, qui s'étend sur toute la longueur des vers. Le péritoine de la paroi corporelle l'entoure à l'extérieur, et le péritoine recouvrant le canal alimentaire l'entoure à l'intérieur. Il est divisé en segments par des septa transversaux. La cavité cœlomique est métamérique, avec des septa transversaux séparant les segments, des canaux contrôlent le flux du liquide cœlomique entre les segments, une paire de néphridies et un pore dorsal ouvrant chaque segment de la cavité cœlomique au monde extérieur. La cavité cœlomique (Figure 4) est remplie de liquide cœlomique, qui contient des cellules libres errantes appelées cœlomocytes, des cellules immunitaires de ver de terre, qui sont impliquées dans les réactions de défense et possèdent de fortes propriétés phagocytaires. En outre, le liquide cœlomique possède une grande variété de propriétés biologiques, notamment antimicrobiennes, protéolytiques, hémolytiques, etc. En cas d'irritation mécanique ou chimique, ou en cas d'exposition à des conditions extrêmes de chaleur ou de froid, de nombreux vers de terre éjectent le liquide cœlomique par les pores dorsaux.

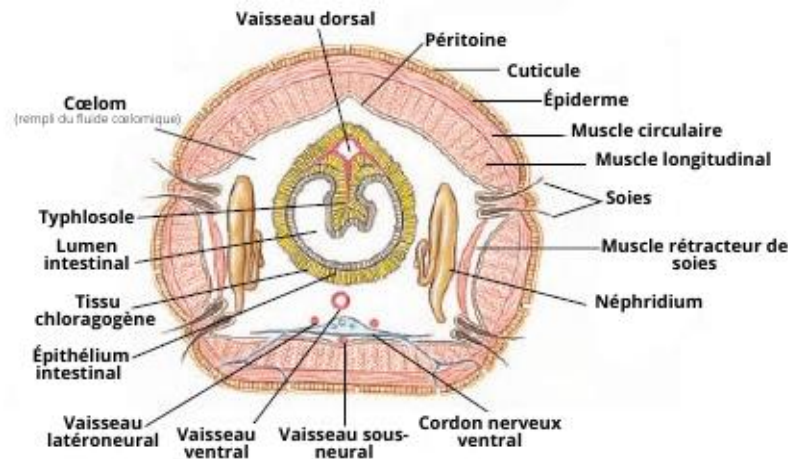


Figure 4 : Anatomie du ver de terre – coupe transversale (Modifiée à partir de https://biocyclopedia.com/index/general_zoology/class_oligochaeta.php)

- Entre la paroi du corps et l'intestin, il existe une couche, la plus externe, de recouvrement de l'intestin. Cette couche est constituée de cellules chloragènes, donnant lieu à un tissu chloragène. Les cellules chloragènes se distinguent par la présence de chlorosomes, qui sont des globules jaunes ou jaune verdâtre. Ces cellules sont similaires au foie des vertébrés et jouent un rôle important dans les fonctions métaboliques. Ces cellules jouent un rôle crucial dans l'excrétion et sont d'importants centres de synthèse. C'est là que sont stockés le glycogène et les graisses. Le tissu chloragène a aussi le rôle de neutralisation des métaux lourds, qui sont transportés par les métallothionéines (une famille de protéines riches en cystéine).
- Chaque segment du ver de terre possède son propre sac coelomique. Les organes excréteurs du ver de terre sont de minuscules néphridies tubulaires (métanéphridies). Les néphridies sont des organes excréteurs du ver de terre, qui se répètent par segments et sont appariés. Il commence par un entonnoir cilié qui dirige le fluide coelomique dans un tubule néphridien plié. Un réseau capillaire entoure le tubule, permettant la réabsorption des matières nécessaires à l'urine. L'urine contenant des déchets s'accumule dans la vessie, qui se vide à l'extérieur par un néphridiopores.
- Le ver de terre est un type d'annélide herbivore butineur, qui se nourrit en se frayant un chemin dans le sol et en extrayant les nutriments lors de son passage dans le tube digestif. La bouche du ver de terre, qui constitue le début du tube digestif, absorbe un mélange de terre et de matière organique. Le pharynx musclé est la première partie après la bouche. L'œsophage mince relie le pharynx au grand jabot à paroi mince, qui stocke temporairement la nourriture. Le gésier musculaire, qui suit le jabot, se connecte à l'intestin (intestin

moyen), qui est droit et responsable de la digestion en offrant une grande surface pour la production d'enzymes et l'absorption des nutriments.

- Le système circulatoire du ver de terre est fermé et consiste en un réseau continu de vaisseaux sanguins à doublure endothéliale. Le sang est pompé dans les vaisseaux principaux par leur propre musculature. Les pseudo-cœurs sont des vaisseaux répétitifs qui relient les vaisseaux principaux dans les directions dorsale et ventrale (sous-intestinale). Ils sont les organes de pompage du système circulatoire.
- Le ver de terre ne possède pas d'organes respiratoires (branchies ou poumons). A travers la peau humide, les gaz sont échangés entre le système circulatoire et l'environnement.
- Le système nerveux comprend la masse bilobée de tissu nerveux, connue sous le nom de ganglions supra-pharyngiens, qui est située sur la paroi dorsale du pharynx dans le troisième segment et que l'on appelle le « cerveau ». Un ensemble de fines cellules cylindriques reliées par des nerfs stimulent les récepteurs du ver de terre. Sur la face dorsale du corps se trouvent les photorécepteurs. La cavité buccale contient des récepteurs gustatifs et olfactifs. Le prostomium et la paroi du corps comprennent des récepteurs tactiles, des chimiorécepteurs et des thermorécepteurs.

I. 2. 3. Cycle de vie

Bien que les cycles de vie de nombreuses espèces de vers de terre n'aient pas été étudiés de manière approfondie, il est reconnu que les vers de terre ont le potentiel de vivre extrêmement longtemps, jusqu'à 10 ou 12 ans, toutefois, de nombreuses espèces ne vivent qu'une ou deux saisons sur le terrain en raison de leur sensibilité à un large éventail de prédateurs (Edwards et Bohlen 1996). En effet, étant donné leur longévité et leur fécondité potentielles, de très grandes populations pourraient se développer rapidement en l'absence de prédation ou de conditions environnementales défavorables. Comme de nombreux autres cycles de vie, celui du ver de terre commence par un œuf. Un jeune ver de terre se développe dans l'œuf jusqu'à ce qu'il soit prêt à éclore. L'œuf est enfermé dans un cocon, qui est une sorte d'enveloppe de l'œuf (Figure 5). Le nombre d'œufs contenus dans un cocon varie selon les espèces, allant d'un à vingt chez les espèces de vers de terre appartenant à la famille des *Lumbricidae*.

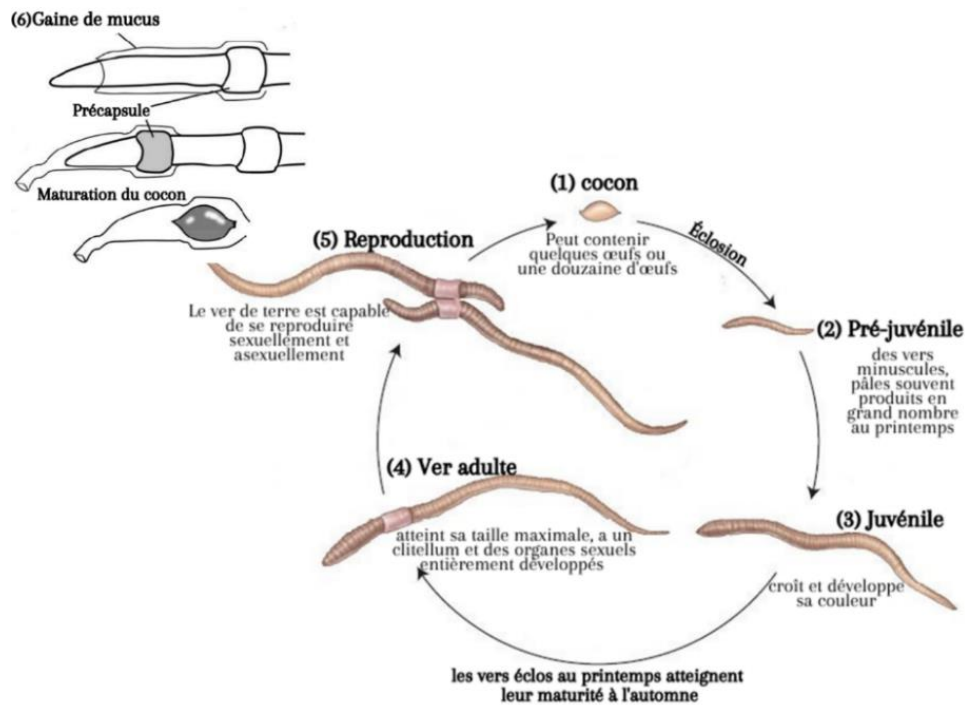


Figure 5 : Cycle de vie d'un ver de terre. (Modifiée à partir de (Davidson et al., 2006 ; Parthasarathi, 2007))

I. 2. 4. Ecologie

La taille des vers de terre varie de quelques millimètres à près de deux mètres de long, leur poids varie entre 10 mg et près d'un kilogramme, et leur diamètre peut atteindre 40 mm. Le spécimen record était un *Microchaetus sp.* de 7 mètres de long et de 75 mm de diamètre (Edwards, 2004). Les plus gros vers de terre vivent dans les latitudes méridionales, notamment en Amérique du Sud, en Afrique du Sud, en Asie du Sud-Est, en Australie et en Nouvelle-Zélande. Aucun autre invertébré terrestre ne présente un tel éventail de tailles entre ses plus petits et ses plus grands individus.

Les populations de vers de terre varient considérablement en termes de taille, de biomasse et de diversité. Les densités de population vont de quelques individus à plus que 1000 par mètre carré. La taille de la population est déterminée par divers facteurs, notamment le type de sol, le pH, la capacité de rétention d'eau du sol, les précipitations et les températures ambiantes, mais surtout par la disponibilité de la matière organique. En effet, les vers de terre bénéficient des interactions entre la matière organique et les microorganismes. Généralement, les plus grandes populations de vers de terre sont des lumbricidés, qui semblent être beaucoup plus résistants aux conditions défavorables du sol et de la litière que de nombreuses autres familles

de vers de terre. Dans la plupart des sols, la biomasse des vers de terre dépasse celle de tous les autres invertébrés vivant dans le sol (Edwards et al., 1977 ; Bohlen, 2017).

La diversité des espèces de vers de terre varie considérablement d'un endroit à l'autre, et les sols des pays tempérés sont nettement moins diversifiés que les sols abritant d'autres familles de vers de terre, sous des latitudes plus chaudes. Cependant, même dans les systèmes de sols les plus complexes, la diversité des espèces de vers de terre semble être limitée, dépassant rarement dix, et avec une moyenne de trois à cinq espèces par site. Il est établi que, les espèces qui occupent la même niche écologique ne coexistent pas toujours, au même degré d'abondance sur un site donné (Edwards, 2004 ; Bohlen, 2017). L'activité des vers de terre varie considérablement d'une saison à l'autre dans les régions tempérées. Dans ces régions, les vers de terre sont plus actifs au printemps et en automne. Ils pénètrent plus profondément dans le sol pendant l'hiver, où ils sont beaucoup plus protégés des températures froides et rigoureuses de l'hiver. Ils s'enfoncent également plus profondément dans le sol, pendant les périodes de sécheresse estivale et construisent parfois des cellules tapissées de mucus, dans lesquelles ils estivent en position enroulée jusqu'à ce que les conditions environnementales s'améliorent à nouveau (Edwards et al., 1977)..

I. 2. 5. Groupes écologiques

Les vers de terre sont classés en trois groupes écologiques (Figure 6) en fonction de leurs habitudes alimentaires, de leurs caractéristiques morphologiques et de leur répartition spatiale (Bouché, 1977):

- i. Les **espèces épigées**, également connues sous le nom d'espèces de litière ou d'espèces surfaciques, se trouvent à la surface du sol, dans la litière de feuilles, les couches d'humus, le fumier et le compost, et parfois dans les premiers centimètres du sol. Ils sont généralement petits, mesurant entre 1 et 5 cm de long, et fortement pigmentés. Les espèces épigées se nourrissent de la litière de la couche supérieure du sol et de la microflore qui y est attachée. En augmentant la surface du sol et en interagissant avec d'autres organismes du sol, elles contribuent de manière significative à la décomposition de la matière organique et au cycle des nutriments. Elles ne creusent que peu ou pas de terriers. Leur courte durée de vie est atténuée par leur taux de reproduction élevé (100 cocons par an) et leur maturation rapide (45 jours). Ils sont capables de survivre à la sécheresse pendant leur stade de cocon. Ils subissent une prédation importante de la part des oiseaux, des mammifères (sanglier,

taupe et blaireau) et des arthropodes prédateurs. *Dendrobaena octaedra*, *Lumbricus castaneus* et *Eisenia fetida* sont les principales espèces représentatives (Jeffery et al., 2010 ; Bohlen, 2017).

- ii. Les **espèces anéciques**, également connues sous le nom d'espèces fousseuses, vivent dans des terriers permanents et verticaux (ou presque), qui sont reliés à la surface du sol et peuvent atteindre une longueur de 5 à 6 mètres. Les espèces anéciques sont les plus longs vers de terre, mesurant entre 10 et 110 cm de long. Ils sont de différentes couleurs, notamment rouge, gris foncé et brun. Ils remontent à la surface du sol, généralement la nuit, pour se nourrir de matières organiques en décomposition (litière, feuilles), qui se mélangent à la terre ingérée, formant ainsi des turricules, et contribuent de manière significative au mélange de la matière organique du système pédologique. Ils vivent relativement longtemps, mais se reproduisent à un faible taux (12 cocons par an) et ont un long temps de génération (9 mois), ils sont des proies lorsqu'ils sont à la surface du sol. Parmi les espèces anéciques, on trouve *Aporrectodea giardi*, *Lumbricus terrestris* et *Lumbricus rubellus* (Jeffery et al., 2010).
- iii. Les **espèces endogées** vivent sous la surface du sol et ne l'atteignent presque jamais. Ces espèces sont de taille moyenne à grande, mesurant entre 1 et 20 cm de long. Elles sont généralement légèrement pigmentées, allant d'une couleur rose à un gris clair. Ils se nourrissent du sol « géophage » et de la matière organique humifiée du sol. Au cours de leur activité vitale, ils construisent un système de terriers temporaires, orientés horizontalement, qu'ils remplissent de leurs déjections (190 T/ha/an), ce qui donne une structure granuleuse au sol. Ils ont une durée de vie modérée et un temps de génération court et sont soumis à une prédation relativement faible, limitée aux oiseaux terrestres, aux arthropodes prédateurs et aux mammifères. *Allolobophora icterica*, *Octolasion cyaneum*, et *Aporrectodea caliginosus* font des espèces endogées (Jeffery et al., 2010). Les vers endogés ont été subdivisés en groupes polyhumiques, mésohumiques et oligohumiques, qui se distinguent respectivement par la diminution de l'importance de la matière organique dans leur régime alimentaire et par l'augmentation de leur taille (Bohlen, 2017).

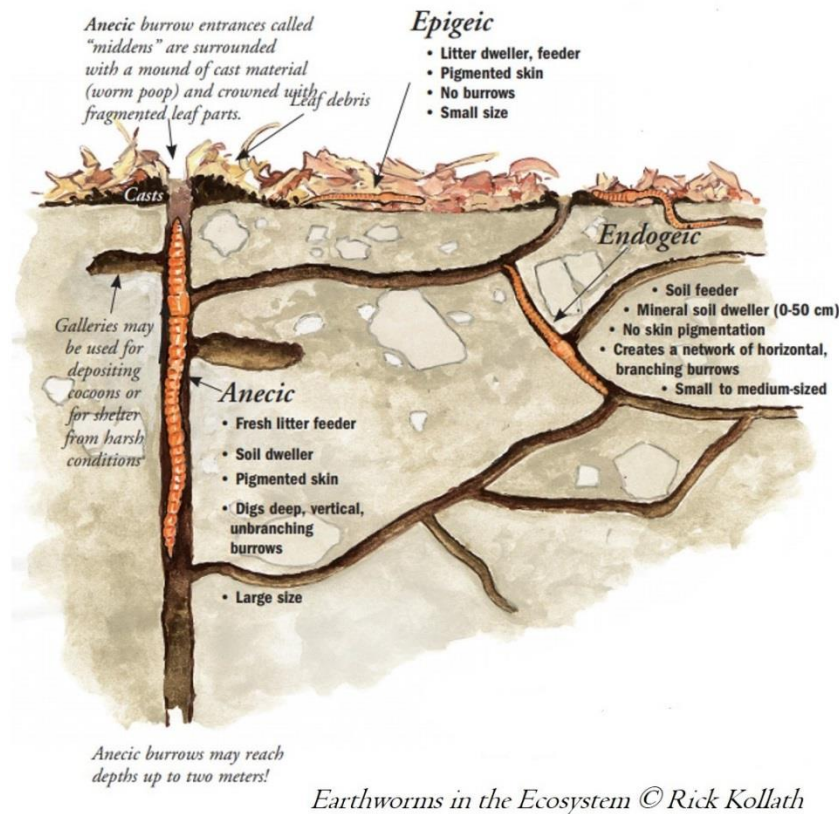


Figure 6 : Trois principaux groupes écologiques de vers de terre : épigés, anéciques et endogés (<https://www.earthwormsoc.org.uk/earthworm-ecology>).

I. 2. 6. Effet sur les propriétés du sol

Les vers de terre consomment de vastes volumes de sol pour répondre à leurs besoins physiologiques de nourriture, d'aération, d'abri et de reproduction, avec des taux annuels de consommation de sol qui peuvent atteindre des niveaux importants, tels que 1 250 mg ha⁻¹ en Côte d'Ivoire (Lavelle et al., 2006). Par le biais de leur forte activité, les vers de terre modifient radicalement l'écosystème environnant, altérant de manière significative la biodiversité du sol et les processus associés. Ils influencent les propriétés du sol par deux activités majeures : premièrement, ils modifient les profils du sol par la bioturbation, et deuxièmement, ils affectent la décomposition et le cycle des nutriments. La bioturbation, qui se produit lorsque des matériaux sont déplacés dans et entre les horizons du sol, par le creusement et la coulée, mélange les fractions organiques et inorganiques (Tondoh et al., 2019). De plus, elle dégrade et régénère les agrégats, ce qui affecte la porosité, l'aération et l'infiltration de l'eau (Figure 7). Le ver de terre qui se nourrit d'une variété de matières organiques accélère la fragmentation, stimulant l'activité microbienne et influençant les taux de décomposition et le cycle des nutriments. De plus, l'abrasion et le mélange du sol dans le jabot et le gésier, en conjonction

avec les enzymes digestives et l'activité microbienne dans le passage intestinal (effet inducteur intestinal), influencent l'altération minérale et l'orientation des plaquettes d'argile (Cunha et al. 2016 ; Bohlen 2017).

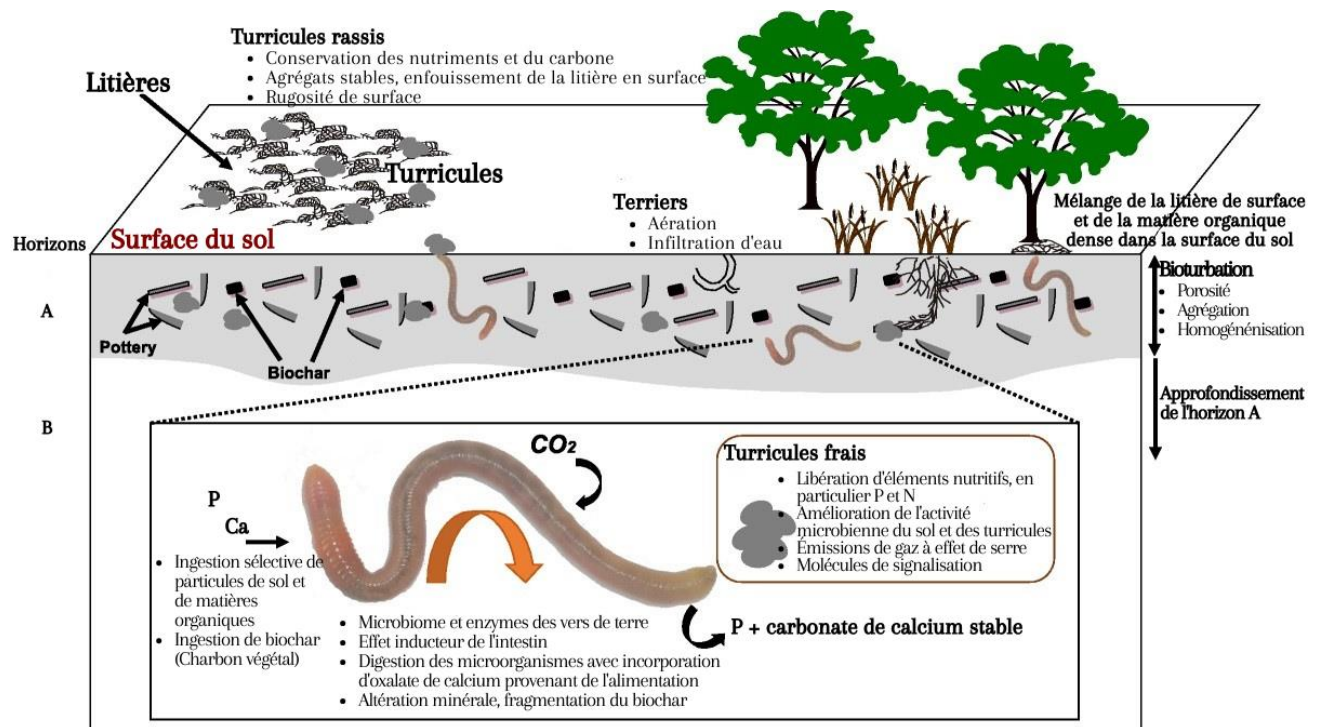


Figure 7 : Schéma représentant le rôle des vers de terre dans le sol à différentes échelles de temps et d'espace (modifié à partir de (Cunha et al., 2016)).

Les vers de terre sont l'un des organismes du sol qui agissent bénéfiquement sur l'amélioration de la qualité des sols et à l'augmentation du rendement des plantes, certaines espèces de vers de terre peuvent contribuer à la restauration de la fertilité des sols dégradés par l'agriculture intensive (Al-Maliki et al., 2021). De nombreux mécanismes par lesquels les vers de terre peuvent agir, ont été proposés (Xiao et al., 2018). Le premier mécanisme représente la production de molécules de signalisation impliquées dans la symbiose entre les créatures du sol et les plantes (Tamartash et al., 2021). Deuxièmement, les produits chimiques bioactifs diffusifs perturbent les voies de signalisation des phytohormones, altérant les réponses des vers de terre aux défenses des plantes (Liu et al. 2020 a ; Al-Maliki et al. 2021). Troisièmement, l'activation des microorganismes bénéfiques du sol favorisant la croissance (Li et al. 2019 ; Tamartash et Ehsani 2021). Quatrièmement, le contrôle de l'expression des gènes de réponse au stress par les plantes (Medina-Sauza et al. 2022 ; Wang et al. 2022). En outre, Edwards (2004) a constaté que l'effet bénéfique des vers de terre sur le rendement des plantes est dû à sept mécanismes principaux, directs ou indirects (Figure 8). Les vers de terre peuvent avoir un effet direct ou indirect sur la croissance des plantes et le développement des racines. Ainsi, les

moyens par lesquels les vers de terre affectent la productivité des plantes peuvent être classés comme physiques, chimiques ou biologiques. Ces effets peuvent être directs ou indirects (Edwards, 2004 ; Bohlen, 2017). Les effets indirects font référence aux changements dans l'environnement physique, chimique ou biologique du sol ou de l'enracinement causés par les vers de terre ; les effets directs font référence aux changements dans la croissance et la productivité des racines causés directement par les vers de terre ou leurs activités (Figure 8).

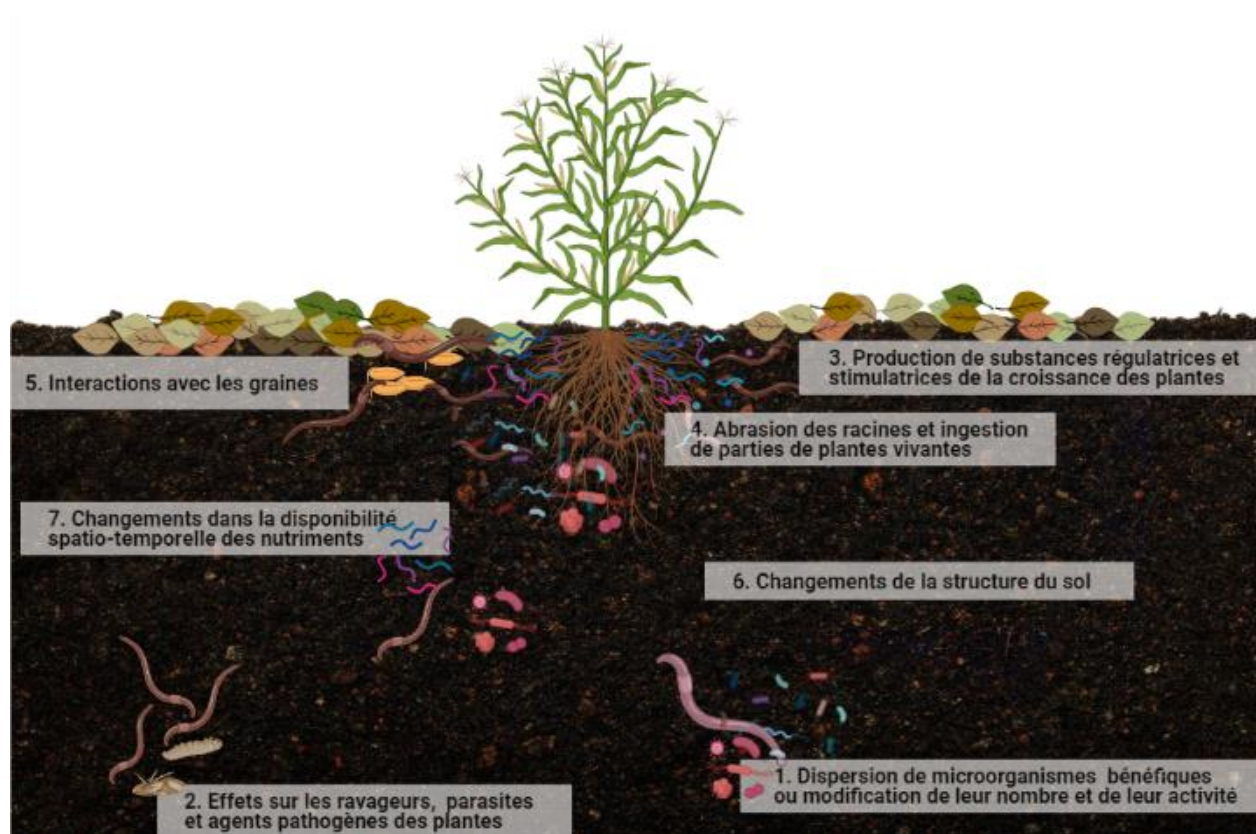


Figure 8 : Principaux mécanismes par lesquels les vers de terre affectent la croissance des plantes (créée à partir de (Edwards, 2004)).

I. 3. Bactéries du sol

Les sols contiennent une myriade d'organismes microscopiques issus des trois domaines de la vie (*Bacteria*, *Archaea* et *Eukarya*), les bactéries étant les plus nombreuses. Dans un seul gramme de terre, des milliards de bactéries peuvent cohabiter avec des millions d'archées et des milliers d'eucaryotes (Lal, 2017). Les bactéries ont évolué des milliards d'années avant la présence des plantes et des animaux sur la Terre. Elles peuvent prendre diverses géométries, notamment des cellules sphériques, en forme de bâtonnet ou en spirale, et ont un profil métabolique diversifié, ce qui les rend très adaptables à diverses situations environnementales (Madigan et al., 2021). La Terre devrait compter environ $2,5 \times 10^{30}$ de cellules bactériennes.

La teneur totale en carbone de toutes ces cellules bactériennes est comparable à celle de toutes les plantes sur Terre, et leurs teneurs totales en azote et en phosphore sont nettement supérieures à celles de toute la végétation (Wang et al., 2017 a ; Madigan et al., 2021), ce qui fait de ces microorganismes la principale source de nutriments essentiels à la vie.

Les bactéries jouent un rôle essentiel dans le cycle du carbone (C) et de l'azote (N) terrestres. Sur le plan fonctionnel, les bactéries sont classées en trois grands groupes : Les photoautotrophes, telles que les cyanobactéries, utilisent le CO₂ atmosphérique comme source de carbone et fixent le CO₂ en utilisant l'énergie lumineuse, produisant des composés organiques, qui peuvent être utilisés par d'autres organismes (similaire à la photosynthèse des plantes) ; les hétérotrophes ou chimioorganotrophes utilisent les matières organiques à la fois comme source d'énergie et de carbone (comme les animaux) ; les chimiohétérotrophes travaillent en coopération avec les champignons, pour décomposer les restes végétaux, animaux et microbiens et en tirer du carbone et de l'énergie, et leurs produits de décomposition organique accélèrent l'altération des roches et la formation d'argile tout au long du développement du sol. Les bactéries qui décomposent la majorité de la matière organique dans les sols sont des chimiohétérotrophes aérobies — elles respirent de l'oxygène (O₂) pour briser les liaisons chimiques des molécules organiques, afin d'obtenir de l'énergie et du carbone. Les bactéries du sol sont donc essentielles au recyclage des nutriments pour permettre la production primaire et la croissance des plantes (Lal, 2017 ; Madigan et al., 2021).

I. 3. 1. Diversité de la communauté bactérienne

La vie bactérienne a considérablement progressé au fil des ans, depuis la microscopie et l'étude de cultures pures, jusqu'à la découverte fondamentale par Carl Woese de trois domaines de vie, basés sur l'acide ribonucléique ribosomal (ARNr). Depuis cette découverte, les approches basées sur l'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'acide ribonucléique (ARN) ont révélé la présence de nombreux taxons bactériens (groupements génétiquement apparentés), dans des sols qui n'ont jamais été cultivés en laboratoire (Delmont et al. 2011 ; Uksa et al. 2015 ; Nannipieri et al. 2020). Les communautés bactériennes du sol sont constituées d'un ensemble varié d'espèces appartenant à divers phylums (Figure 9).

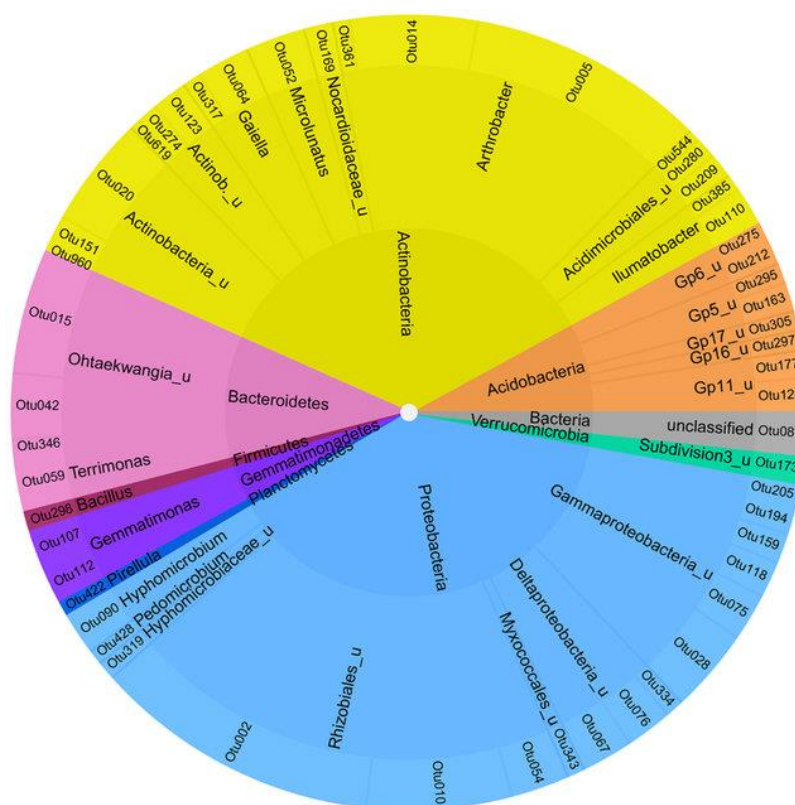


Figure 9 : Biodiversité des phylums bactériens du sol.

L'anneau intérieur correspond au niveau de l'embranchement ; l'anneau du milieu correspond au niveau de classification suivant ; et l'anneau extérieur correspond au niveau de l'unité taxonomique opérationnelle (OTU) individuelle (Uksa et al., 2015).

Les *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, et *Verrucomicrobia* sont les plus répandus et abondants dans les sols (Tableau 2). Les *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, et *Cyanobacteria* sont tous présents, mais en moindre abondance. D'autres phylums reconnus tels que *Nitrospirae*, *Thermi*, *Chlorobi*, et *Fibrobacteres*, ainsi que les phylums OP11 et TM7, sont détectés de manière constante, mais à des pourcentages nettement inférieurs (Lal, 2017). Les espèces bactériennes trouvées en faible cadence sont appelées organismes de la « biosphère rare » et peuvent présenter des réactions de croissance uniques dans les sols. L'utilisation croissante du séquençage du génome entier (Whole genome sequencing, WGS) de l'ADN environnemental, a révélé de nouvelles informations concernant des microorganismes non cultivables, dans des phylums candidats tels que TM7 et OP11. Ces taxons ont de petites cellules (<0,2 micron de diamètre), de petits génomes et des compositions de ribosomes peu communes (Delmont et al. 2011 ; Murugkar et al. 2020 ; Sheremet et al. 2020).

Tableau 2 : Principaux phylums bactériens détectés par leurs gènes d'ARNr 16S dans des extraits d'ADN de sols de surface (Lal, 2017).

Phylum	Sous-groupes présents dans les sols et exemples de caractéristiques et de fonctions connues
<i>Proteobacteria</i> Bien représentées par des isolats cultivables, mais beaucoup restent non cultivables	Gram négatives ; quatre classes sont abondantes dans les sols : - <i>Alphaproteobacteria</i> (fixent le N₂, endophytes, proies de bactéries, oxydent les nitrites, oxydent le méthane). - <i>Betaproteobacteria</i> (fixent le N₂, oxydent l'ammoniac, dénitrifient, se nourrissent de bactéries, oxydent le CH₄). - <i>Gammaproteobacteria</i> (dénitrifie, ammonifie les nitrites, pathogènes des plantes, solubilise les phosphates). - <i>Deltaproteobacteria</i> (beaucoup d'anaérobies, réduisent les sulfates, se nourrissent de bactéries).
<i>Acidobacteria</i> Les membres de la subdivision 1 sont faciles à cultiver	Gram négatives ; au moins huit sous-groupes, avec seulement quelques représentants cultivables ; les sous-groupes 1, 4 et 6 sont les plus répandus dans les sols, le sous-groupe 3 (<i>Solibacters</i>) étant abondant dans certains sols ; tous aérobies, sauf le sous-groupe 8.
<i>Actinobacteria</i> Auparavant nommées « actinomycètes »	Gram positives ; morphologies filamenteuses ou pléomorphes ; trois sous-groupes présents dans le sol : - <i>Actinobacteridae</i> (les plus abondants, très cultivés, hétérotrophes aérobies qui produisent des antibiotiques) ; - <i>Acidimicrobidae</i> (peu cultivables, y compris les acidophiles qui oxydent le fer ferreux) ; - <i>Rubrobacteridae</i> (quelques hétérotrophes aérobies cultivables).
<i>Verrucomicrobia</i>	Gram négatives ; Cinq classes principales ; la classe 2 <i>Spartobacteria</i> est la plus commune, hétérotrophes aérobies, certaines sont des symbiotes de nématodes ; de nombreux membres non cultivés avec des physiologies inconnues.
<i>Chloroflexi</i>	Le phylum peut être aussi diversifié que les protéobactéries ; possiblement huit sous-groupes majeurs ; un seul isolat du sol (hétérotrophe aérobie).

Phylum (suite)	Sous-groupes présents dans les sols et exemples de caractéristiques et de fonctions connues
<i>Bacteroidetes</i>	Gram négatives ; de quatre sous-groupes, trois sont communs dans le sol : - <i>Sphingobacteria</i> les plus communes (aérobies, anaérobies, ou facultatifs ; dégradent la chitine) ; - <i>Flavobacteria</i> (hétérotrophes aérobies) ; - <i>Cytophagia</i> (hétérotrophes aérobies, dégradent la cellulose) ; - <i>Bacteroidetes</i> (peu fréquents, mais peuvent être des symbiotes ou des commensaux dans la faune du sol).
<i>Planctomycetes</i>	Absence de paroi cellulaire ; morphologie bourgeonnante ; peut posséder des compartiments intracellulaires liés à une membrane ; deux sous-groupes principaux : <i>Phycisphaerae</i> (rhizosphère) et <i>Planctomycetes</i> (comprends les isolats du sol ; bactéries qui oxydent le NH ₃ en anaérobiose).
<i>Firmicutes</i>	Parois cellulaires à Gram positives ; forment des spores résistantes à la chaleur ; deux sous-groupes principaux : <i>Bacilli</i> (facilement cultivables en aérobiose ; fermenteurs lactiques) et <i>Clostridia</i> (anaérobies).
<i>Gemmatimonadetes</i>	Gram négatives ; hétérotrophes aérobies ; un groupe majeur ; peu cultivés ; physiologies peu connues.
<i>Cyanobacteria</i>	Gram négatives ; Photosynthétique ; fixe le N ₂ ; morphologies unicellulaire, coloniale ou filamenteuse ; peut former des biofilms sur les surfaces du sol ; partenaires symbiotiques avec les champignons dans les lichens.
<i>Nitrospirae</i>	Comprend les <i>Nitrospira spp.</i> qui oxydent les nitrites et les <i>Leptospirillum spp.</i> qui oxydent le fer ferreux pour obtenir de l'énergie.
<i>Deinococcus - Thermi</i>	Comprend des membres thermophiles et résistants aux radiations ; physiologies et fonctions dans le sol inconnues.
<i>Chlorobi</i>	« Bactéries vertes du soufre » photoautotrophes anaérobies qui oxydent le sulfure ou le soufre ; physiologies et fonctions dans le sol inconnues.
<i>Fibrobacteres</i>	Anaérobie, certains chitinolytiques, inclus les habitants de l'intestin des termites.
<i>OP11, TM7</i>	Lignées dans le rayonnement des phylums candidats caractérisés par une petite taille de cellule ; petits génomes indiquant des physiologies fermentaires.
<i>Phylums candidats</i>	BRC1, NKB19, OP10, OS-K, SC3, SC4, TM6, WS2, WS3 (pas d'isolats cultivés)

I. 3. 3. Microenvironnement et interactions écologiques

Les bactéries sont distribuées d'une manière inégale dans les sols, étant plus communes dans les horizons de surface, près des racines des plantes et dans les zones riches en matière organique (Li et al., 2021 a). La biomasse bactérienne dans le sol tend à imiter la distribution de la matière organique, les populations bactériennes diminuant rapidement à mesure que la profondeur du sol augmente (Nunan et al., 2020). La majorité des bactéries du sol existent sous forme de microcolonies (2 à 10 cellules), adhérant étroitement aux surfaces, plutôt que sous forme d'organismes planctoniques (flottant librement) dans la solution du sol. Les bactéries peuvent commencer à s'agréger au sol, en produisant des polysaccharides mucilagineux. Les bactéries qui adhèrent aux surfaces du sol, à l'intérieur des pores, sont protégées de la dessiccation et du broutage par les protozoaires et autres prédateurs fauniques. Les habitats bactériens du sol sont influencés par la structure du sol, qui est définie comme l'organisation tridimensionnelle du sable, du silt, de l'argile et des matières organiques en agrégats et en pores (Ramirez et al., 2018 ; Li et al., 2021 a). Les conditions optimales de croissance bactérienne sont assurées par des sols bien structurés, présentant une forte proportion de macro-agrégats (> 250 microns) et de macropores (> 60 microns). Comme les gros agrégats peuvent présenter des gradients élevés en O₂ et en potentiel redox, les sols bien structurés peuvent offrir des habitats plus variés pour des métabolismes bactériens distincts (Curd et al., 2018 ; Upton et al., 2019).

Les bactéries présentes dans le sol sont impliquées dans une grande variété d'interactions écologiques (Hassall et al., 2006), comme les prédateurs d'autres bactéries, les sources de nourriture pour les protozoaires, les pathogènes, les parasites ou les antagonistes d'autres espèces (par exemple, les producteurs d'antibiotiques), et les commensaux ou symbiotes des plantes (Jeffery et al., 2010). Par rapport aux sols quiescents couverts de végétation pérenne, les sols qui sont régulièrement perturbés (par exemple, par le travail du sol), offrent des habitats moins idéaux pour les espèces plus grandes et plus sensibles à la dessiccation, ce qui entraîne une moindre complexité trophique. En outre, la végétation pérenne alimente les sols en exsudats racinaires, pendant plus longtemps que les cultures annuelles, ce qui entraîne une augmentation de la biomasse et de l'activité microbiennes (Zheng et al. 2018 ; Li et al. 2021a).

I. 3. 4. Fonctions bactériennes dans le sol

Les bactéries, qui sont les principaux hétérotrophes du sol, jouent un rôle clé dans la transformation du carbone et le cycle des nutriments, améliorant ainsi la fertilité et la structure du sol. Pour leur croissance et leur reproduction, la majorité des bactéries du sol ont besoin de sources externes de carbone et d'azote réduits. Les cyanobactéries constituent une exception, dans la mesure où elles peuvent utiliser l'énergie lumineuse, pour réduire le CO₂ au cours de la photosynthèse. Les cyanobactéries jouent donc un rôle pionnier, essentiel à la surface des roches, notamment en symbiose avec des champignons (comme les lichens), ou en partenariat avec des tapis de mousse. Le CO₂ que les cultures pionnières respirent, se dissout dans les pluies, pour générer de l'acide carbonique, qui contribue à la solubilisation et à l'altération des roches. Les nutriments métalliques libérés lors de l'altération des roches, peuvent réagir avec d'autres acides organiques, générés par les bactéries et leurs partenaires pour former des ligands. Les ligands organométalliques maintiennent les nutriments en solution et les rendent accessibles, tout en initiant la création de minéraux secondaires colloïdaux, nécessaires au développement du sol (Lal, 2017 ; Ramirez et al., 2018 ; Zheng et al., 2018).

I. 3. 5. Contribution bactérienne dans la rhizosphère

Les bactéries sont les organismes les plus abondants connus et leur distribution n'est pas uniforme. La population bactérienne à proximité des racines des plantes, est généralement beaucoup plus élevée, que celle que l'on trouve dans le sol en général (Kour et al., 2019). Cela s'explique par le fait que les racines des plantes libèrent ou produisent des substances, qui induisent la chimiotaxie, ou le mouvement des microorganismes vers les racines, ainsi que les molécules (les sucres, les acides organiques et les acides aminés), libérées par les racines des plantes en grande quantité (c'est-à-dire 5 à 30 % de tout le carbone fixé par photosynthèse), qui sont fréquemment utilisées comme sources de nutriments pour les bactéries (Tapia-Torres et al., 2019). Les bactéries du sol peuvent coloniser les surfaces des racines, ou pénétrer dans les racines via les jonctions épidermiques, pour devenir des endophytes (Shahzad et al., 2017). Certaines bactéries présentes dans le sol peuvent être phytopathogènes (provoquer des maladies) ; par exemple, *Agrobacterium tumefaciens*, qui provoque la galle du collet, et *Erwinia carotovora*, qui provoque des pourritures molles. De nombreux phytopathogènes, en revanche, sont transmises dans le sol par des semences ou d'autres matériels de plantation infectés, et les bactéries en tant que groupe causent moins de dommages économiques aux

cultures que les champignons pathogènes, les protistes ou les virus (Setubal et al. 2005 ; Mansfield et al. 2012). Certains sols, présentant un niveau élevé d'activité biologique, ont été décrits comme supprimant les maladies en raison de la présence de concurrents et d'antagonistes microbiens des maladies des plantes (Arya et al., 2018 ; Jiao et al., 2021). Récemment, plusieurs recherches se sont intéressées à la possibilité d'utiliser des bactéries, qui favorisent la croissance des plantes (Plant Growth-Promoting Bacteria, PGPB), comme inoculant des semences ou du sol. Bien que des résultats quantitatifs considérables, dus à l'inoculation des graines ou des racines aient été établis dans des conditions contrôlées en serre (O'Callaghan 2016 ; di Salvo et al. 2018), des résultats équivalents sur les champs peuvent ne pas être reproduits, en raison de la grande hétérogénéité régionale des sols. La capacité des cellules viables, inoculées dans une culture à survivre et à se développer dans la rhizosphère, dépend d'une variété de facteurs, y compris l'état physico-chimique du sol et la compétition ou la coopération avec les organismes du sol résidents (Verma, 2019 a).

I. 3. 6. Mécanismes favorisant la croissance bactérienne

Les PGPB peuvent stimuler la croissance des plantes, à la fois directement et indirectement. Les mécanismes directs sont décrits comme l'utilisation de caractéristiques bactériennes, qui favorisent directement la croissance des plantes. Ils comprennent la synthèse de l'auxine, de l'ACC désaminase, la fixation de l'azote, la solubilisation du phosphate et la séquestration du fer par les sidérophores bactériens. Les mécanismes indirects font référence aux caractéristiques bactériennes, qui interfèrent avec la fonction d'un ou plusieurs champignons ou bactéries phytopathogènes. L'ACC désaminase, les antibiotiques, les enzymes dégradant la paroi cellulaire, la compétition, le cyanure d'hydrogène (HCN), les sidérophores, sont tous des exemples de méthodes indirectes. De nombreux PGPB présentent fréquemment une ou plusieurs des caractéristiques susmentionnées (Figure 10), ce qui donne lieu à un spectre diversifié de PGPB, dont les activités varient en fonction des conditions environnementales et du sol (Ferreira et al. 2019 ; Tapia-Torres and Morón-Cruz 2019 ; Vishwakarma et al. 2020 ; Jiménez-Mejía et al. 2022).

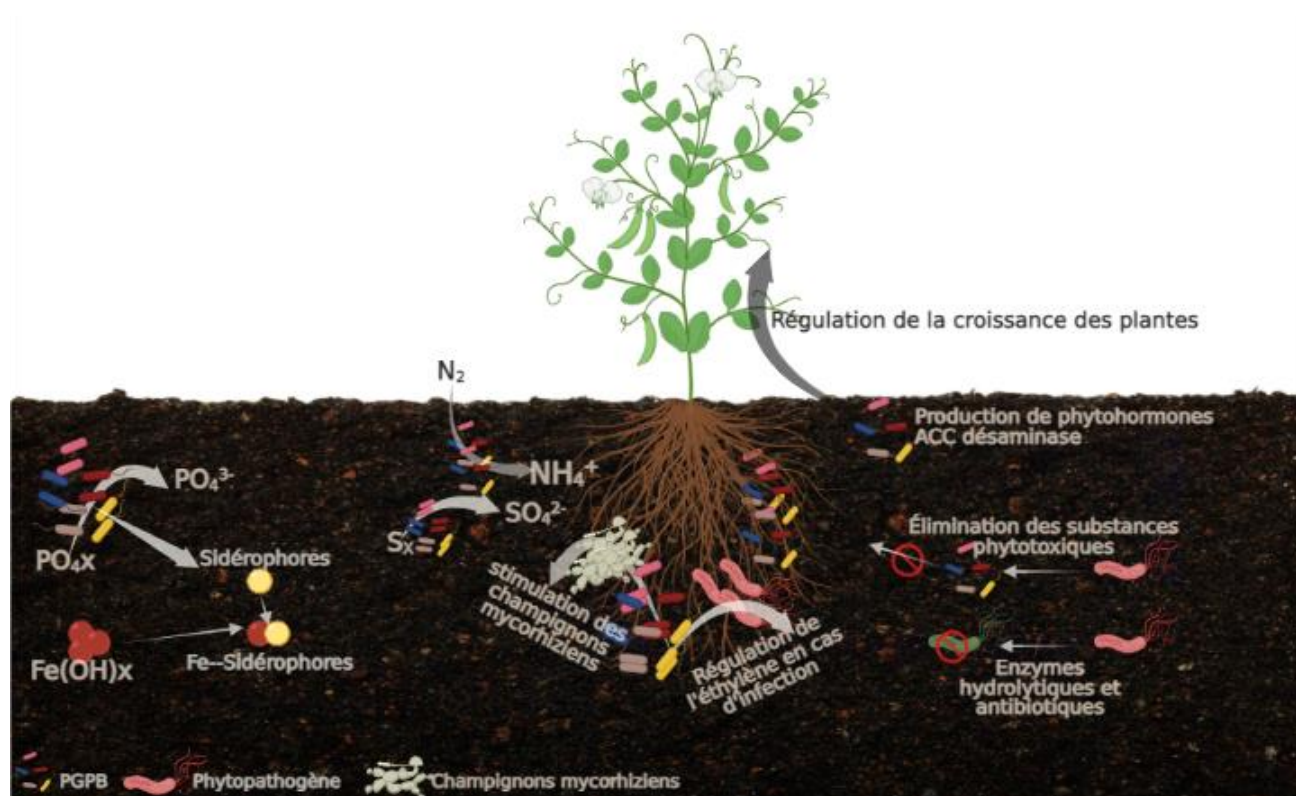


Figure 10 : Mécanismes d'action des bactéries favorisant la croissance des plantes (PGPB) dans la rhizosphère (Créée à partir de Ferreira et al. (2019)).

I. 3. 6. 1. Fixation d'azote

Malgré le fait que l'azote constitue environ 78 % de l'atmosphère terrestre, cette forme d'azote gazeux N_2 est inaccessible à la majorité des organismes, c'est-à-dire qu'elle ne peut être absorbée par les plantes, qu'après avoir été transformée en ammoniac (Olanrewaju et al., 2017). Certaines bactéries sont capables de fixer le dioxyde d'azote (en convertissant l'azote atmosphérique en ammonium) et de fournir de l'azote aux plantes. Plusieurs genres, dont *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Azorhizobium* et *Rhizobium*, sont connus pour favoriser la croissance des plantes par la fixation de l'azote. Dans la catégorie des bactéries fixatrices d'azote, certaines vivent librement et n'ont pas besoin d'hôte pour effectuer le processus (par exemple, *Azotobacter spp.*, *Agrobacterium spp.* et *Azospirillum lipoferum*), tandis que d'autres sont symbiotiques et fixent l'azote uniquement en association avec certaines plantes, comme les légumineuses (par exemple, *Rhizobium spp.* et *Azorhizobium spp.*) (Nagatani et al. 1971 ; Wang et al. 2017 b ; Thi Thuy Ha et al. 2018).

I. 3. 6. 2. Solubilisation du phosphate

Bien que le phosphore soit présent dans le sol sous forme de phosphates, il se trouve généralement sous des formes insolubles, qui ne sont pas accessibles aux plantes (Kour et al., 2019). Certaines bactéries sont capables de dissoudre les phosphates inorganiques, aidant ainsi les plantes à satisfaire leurs besoins en phosphore. Les effets des bactéries solubilisatrices du phosphate sont influencés par les facteurs environnementaux, les conditions des plantes et du sol, et les souches bactériennes. Les solubilisatrices de phosphate les plus puissantes appartiennent aux genres *Bacillus*, *Rhizobium* et *Pseudomonas* (Rawat et al., 2021).

L'utilisation de composés dissolvant les minéraux tels que : les ions hydroxyle, les acides organiques, les protons, les sidérophores et le dioxyde de carbone (CO₂) qui sont le principaux mécanismes de solubilisation des phosphates inorganiques. Les acides organiques, qu'il s'agisse d'acides gluconiques ou cétogluconiques, sont excrétés par les bactéries solubilisatrices du phosphate, ce qui entraîne l'acidification des cellules microbiennes et de leur environnement et donc la libération d'ions phosphates. Le pH est réduit en raison de la libération de protons/bicarbonate et des échanges gazeux O₂/CO₂. Par conséquent, le pH de la rhizosphère et la disponibilité du phosphore sont inversement liés. La relation symbiotique entre les racines des plantes et les champignons, connue sous le nom de mycorhizes, est un mécanisme important d'absorption du phosphore chez plus de 80 % des espèces végétales. La capacité de certains PGPB, comme *Streptomyces spp.*, ou *Rhizobium spp.*, à favoriser les champignons mycorhiziens contribue à ce que les plantes reçoivent suffisamment de phosphore (Ferreira et al., 2019).

I. 3. 6. 3. Solubilisation du potassium

Le potassium (K) est un élément nutritif essentiel à la croissance des plantes. Il intervient dans les changements de la pression osmotique des cellules végétales et dans le mouvement des produits chimiques à l'intérieur des plantes. Il stimule l'activation des enzymes, l'utilisation de l'azote (N) et les fusions protéine-sucre. En outre, il contribue au processus de photosynthèse des plantes. Le K existe essentiellement dans quatre pools distincts dans le sol, à savoir le K minéral, irremplaçable, interchangeable et dissoluble. La capacité de quelques bactéries du sol à convertir des formes inaccessibles de potassium en une structure accessible, est un élément essentiel des bactéries favorisant la croissance des plantes, qui contribuent à l'augmentation du rendement des cultures à forte demande en K. Les bactéries du sol peuvent obtenir du potassium

soluble, à partir de minéraux potassiques tels que le feldspath, le mica, l'illite et l'orthoclase. Cette solubilisation pourrait être attribuée à la décharge d'acides naturels, qui soit dissolvent directement le K des roches, soit chélatent les particules de silicium, amenant ainsi le K en solution. *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Bacillus mucilaginosus*, *Bacillus edaphicus*, *Bacillus circulans*, et *Paenibacillus sp.* sont toutes impliquées dans la libération de potassium sous forme accessible à partir de minéraux potassiques dans les sols (Sattar et al. 2019 ; Amaresan et al. 2022).

I. 3. 6. 4. Oxydation du soufre

Selon les normes agricoles, le soufre est le quatrième élément nutritif le plus important pour les plantes, après l'azote, le phosphore et le potassium. C'est un élément essentiel à l'augmentation de la production de légumineuses et il est nécessaire à la création de protéines, de vitamines et d'enzymes. Le soufre est généralement absorbé par les plantes sous forme de sulfate, et les bactéries oxydant le soufre accélère l'oxydation naturelle du soufre, entraînant la création de sulfates, qui sont essentiels pour améliorer le rendement des plantes (Amaresan et al., 2022). Les bactéries *Thiobacillus* sont considérées comme les plus importants bactéries oxydant le soufre en raison de leur taux élevé d'oxydation des sulfures, de leur affinité extrêmement élevée pour l'oxygène et les sulfures et de leurs faibles besoins nutritionnels (Pourbabae et al., 2020).

I. 3. 6. 5. Production des sidérophores

Le fer est un cofacteur nécessaire à la croissance des organismes vivants. Le fer existe sous deux états en solution aqueuse, Fe^{2+} et Fe^{3+} , cependant les formes Fe^{3+} ne peuvent pas être utilisées par les plantes ou les microorganismes, car elles créent des oxydes et des hydroxydes insolubles, limitant ainsi la biodisponibilité. Les sidérophores sont de minuscules molécules peptidiques, dotées de chaînes latérales et de groupes fonctionnels capables de fixer les ions ferriques. Ce sont des chélateurs du fer qui agissent comme des transporteurs de fer et présentent une forte affinité pour certains ligands (Olanrewaju et al., 2017). De nombreux d'entre eux ont été criblés et produits par les microorganismes, et certains sont également spécifiques à une espèce. *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* et plusieurs entérobactéries produisent des sidérophores peptidiques, tandis qu'*Agrobacterium*, divers *Actinobacteria*, *Burkholderia*, *Paracoccus* et *Rhizobia* synthétisent des sidérophores à squelette di- et tri- aminoalcane. Les sidérophores à base d'acide citrique sont produits par

Acinetobacter, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Marinobacter*, *Ochrobactrum*, *Ralstonia*, *Rhizobium*, *Staphylococcus*, *Synechococcus* et *Vibrio* (Yu et al., 2011 ; Kour et al., 2019 ; Kramer et al., 2020).

I. 3. 6. 6. Production de l'Acide Indole Acétique (AIA)

Les phytohormones, à savoir les auxines, régulent et simulent de nombreux aspects de la croissance des plantes. Parmi les auxines, l'acide indole-3-acétique (AIA) est la plus abondante, car elle est produite non seulement par les plantes, mais aussi par les champignons et les bactéries. Il a un effet bénéfique sur la croissance des racines. L'AIA régule la division, l'extension et la différenciation des cellules, la germination des graines et des tubercules, de nombreux processus de croissance végétative, et améliore le rythme de développement du xylème et des racines, la synthèse des pigments et la résistance à divers stress. Le tryptophane est un précurseur de la synthèse de l'AIA et se trouve dans les exsudats racinaires (Zhao and Zhong 2013 ; Marathe et al. 2017 ; da Silva et al. 2020 ; Zhao et al. 2020). Certains genres de bactéries, comme *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Pantoea*, *Rhizobium*, *Serratia* et *Streptomyces*, ont été reportés capables de produire la phytohormone acide indole acétique (Ferreira et al., 2019), l'AIA ainsi générée est une molécule de signalisation et de communication, utilisée par les plantes et les bactéries vivant dans la rhizosphère (Lambrecht et al., 2000). Les plantes se développent de manière optimale, lorsque leurs niveaux endogènes d'AIA sont optimaux, à des quantités excessives, l'AIA peut entraîner des conséquences néfastes sur les plantes, comme l'inhibition de la croissance des racines (Duca et al. 2014 ; Lam et al. 2020).

I. 3. 6. 7. Activité de l'ACC déaminase

Un autre régulateur majeur de la croissance des plantes est l'éthylène, qui régule la croissance des racines, des feuilles, des fleurs et des fruits, ainsi que l'interaction des microorganismes sur les racines. L'éthylène est un dérivé de la 1 - aminocyclopropane -1 - carboxylate (ACC) qui est produit par les plantes, en réponse à divers facteurs de stress. Ainsi, certains facteurs de stress, tels que les métaux et les produits chimiques, les blessures mécaniques et l'exposition à l'eau et aux températures extrêmes, favorisent la production d'éthylène via la stimulation de l'ACC déaminase (Dubois et al., 2018). Lorsqu'il est présent en quantités excessives, l'éthylène peut être toxique pour les plantes, entraînant une défoliation et d'autres effets cellulaires indésirables (Dubois et al., 2018). L'ACC déaminase est une enzyme produite par

plusieurs bactéries, notamment *Azotobacter*, *Bacillus*, et *Pseudomonas*. L'ACC Déaminase profite aux plantes en convertissant l'ACC en ammoniac et en α -cétobutyrate. Cela contribue à la régulation des effets néfastes de l'éthylène, en diminuant sa concentration. Par conséquent, la PGPB capable de produire de l'ACC Déaminase, profite aux plantes qui poussent dans des conditions de stress, telles que la sécheresse, la salinité et les métaux lourds, en ajustant les niveaux d'ACC de la plante et donc d'éthylène à des niveaux non toxiques (Kour et al., 2019).

I. 3. 6. 8. Antagonisme envers les agents pathogènes

Les caractéristiques antipathogènes envers les phytopathogènes sont un grand atout, en tant que technique indirecte de promotion de la croissance des plantes, car elles peuvent réduire considérablement ou éliminer l'incidence des phytopathologies, causées par des champignons et des bactéries. Les PGPB exercent ces effets de diverses manières : par le développement d'enzymes hydrolytiques, par la compétition pour les ressources, par la modulation des niveaux d'éthylène, produits par l'infection pathogène et par la production de sidérophores et d'antibiotiques. De nombreux taxons, dont *Bacillus*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Coniothyrium*, *Pythium*, *Serratia*, *Burkholderia* et *Staphylococcus*, ont été reportés comme ayant un comportement antagoniste envers un ou plusieurs agents pathogènes des plantes. Lorsque la colonisation de la rhizosphère est réussie, il a été démontré que ces bactéries améliorent le développement des plantes au fil du temps (Olanrewaju et al., 2017 ; Ferreira et al., 2019).

I. 3. 6. 9. Production des antibiotiques et des enzymes lytiques

La synthèse d'antibiotiques par les PGPB est l'un des mécanismes les plus puissants et les mieux étudiés contre les phytopathogènes. Six classes d'antibiotiques ont été principalement utilisées, pour le biocontrôle des maladies des racines ; il s'agit des phénazines, des phloroglucinols, de la pyolutéorine, de la pyrrolnitrine et des lipopeptides cycliques ; tous ces composés sont diffusibles, à l'exception du cyanure d'hydrogène (HCN), qui est un composé très volatil dans la nature. Les biosurfactants lipopeptidiques ont récemment été impliqués dans la production d'agents de biocontrôle, produits par les espèces *Pseudomonas* et *Bacillus*. Ces biosurfactants peuvent être bénéfiques dans les interactions compétitives avec les bactéries, les champignons, les oomycètes, les protozoaires, les nématodes et les plantes. De nombreux autres produits chimiques antimicrobiens, comme l'oligomycine A, la kanosamine, et la xanthobaccine, sont générés par *Bacillus*, *Streptomyces* et *Stenotrophomonas spp.* et inhibent

la prolifération des agents pathogènes des plantes, dont la majorité sont des champignons. Le 2,4-diacétylphloroglucinol (DAPG), qui est produit par les *Pseudomonas*, est un antibiotique efficace et bien étudié qui endommage les membranes de *Pythium sp.* et est particulièrement suppressif des zoospores de cet oomycète (de Souza et al. 2003). Une autre molécule produite par les *Pseudomonas*, la phénazine, a une action redox et est capable de supprimer les maladies des plantes, causées par *Fusarium oxysporum* et *Gaeumannomyces graminis* (Olanrewaju et al., 2017 ; Ferreira et al., 2019). De nombreuses enzymes lytiques sont produites par les PGPB, notamment les chitinases, les déshydrogénases, la glucanase, les lipases, les phosphatases et les protéases. Les PGPB contribuent de manière significative à la promotion de la croissance par l'activité de ces enzymes, principalement en protégeant les plantes contre les champignons pathogènes tels que : *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora sp.*, *Rhizoctonia solani*, et *Pythium ultimum* (Kumar et al. 2012 ; Bodhankar et al. 2017 ; Mishra et al. 2020).

I. 4. Bactéries associées aux vers de terre

Les vers de terre consomment les microorganismes contenus dans le sol et la litière, réduisant ainsi la biomasse microbienne, en particulier la biomasse fongique. Ils peuvent également sélectionner ou favoriser les bactéries du sol, qui aident à la digestion des matières organiques du sol, car le tube digestif des vers de terre manque souvent des enzymes nécessaires. Ce processus peut enrichir le sol avec certains taxons bactériens, par exemple, des bactéries capables de décomposer la matière organique consommée par les vers de terre ou des bactéries dénitrifiantes capables de survivre dans les conditions d'oxygène réduit de l'intestin des vers de terre (Wani et al., 2017 ; Medina-Sauza et al., 2019). De plus, le régime alimentation et le groupe écologique ont un impact direct et significatif sur le microbiote du sol (Figure 11). *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes*, *Bacteroidetes*, *Nitrospirae*, et *Chloroflexi* ont toute la plus grande abondance relative dans les sols avec des vers de terre, indépendamment de leur classification écologique (Medina-Sauza et al., 2019). Bien que les vers de terre épigés semblent induire une plus grande diversité de microorganismes, que les vers de terre endogés et anéciques, ces derniers peuvent avoir un impact plus constant sur la communauté bactérienne du sol, comme en témoigne une proportion plus faible de phylum rare.

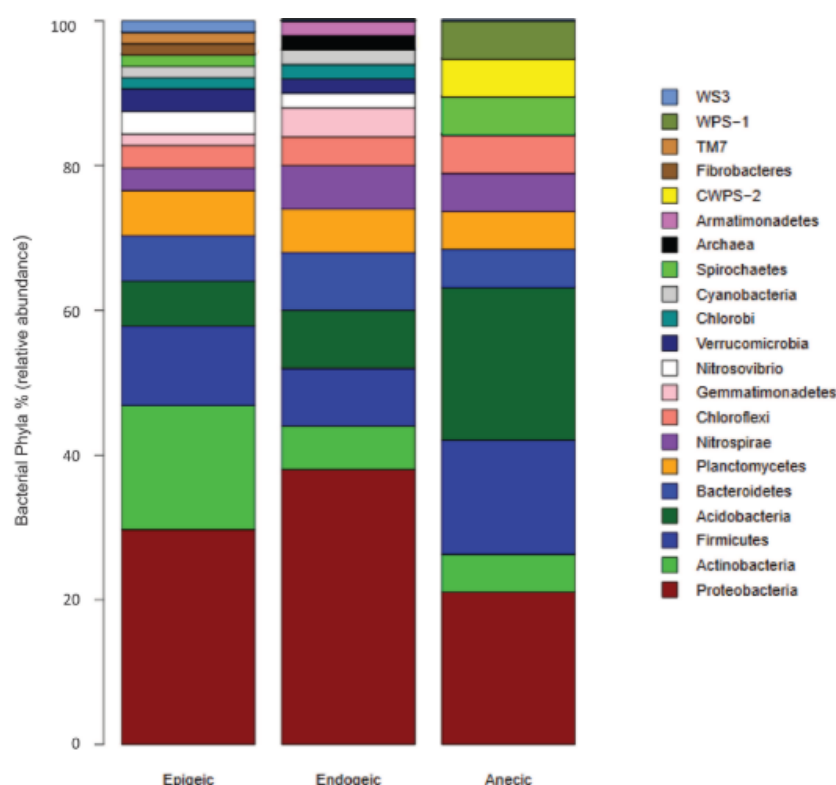


Figure 11 : Abondances relatives des phylums microbiens signalés dans les sols ou les substrats transformés par des vers de terre de différents groupes fonctionnels (Medina-Sauza et al., 2019).

I. 4. 1. Bactéries du tube digestif

L'intestin est l'un des organes les plus vitaux du ver de terre, c'est un micro-habitant avec beaucoup moins d'oxygène, mais une teneur en carbone et en azote plus élevée que l'environnement du sol adjacent, ce qui le rend plus favorable à la colonisation par les bactéries (Pass, 2015). En raison du manque d'oxygène dans l'intestin, les bactéries anaérobies et anaérobies facultatives telles que les *Proteobacteria*, *Firmicutes*, les *Bacteroidetes* et les *Actinobacteria* prédominent (Drake et al., 2006). Par ailleurs, la composition bactérienne de l'intestin du ver de terre varie selon, l'espèce de ver, son comportement et les caractéristiques de l'environnement adjacent (Sun et al., 2020). Des recherches publiées précédemment indiquaient que, l'intestin du ver est un environnement idéal pour la colonisation de bactéries anoxiques, telles que les espèces *Staphylococcus* et *Aeromonas* (Thakuria et al., 2010). Malgré le fait que l'intestin de *Lumbricus terrestris* et le sol herbeux adjacent avaient une composition bactérienne similaire, le pourcentage du phylum dominant *Actinobacteria* dans l'intestin (30 %) était significativement plus élevé que dans le sol (8 %) (Pass, 2015). En comparaison, certaines espèces, telles que celles appartenant au phylum *Acidobacteria*, préféraient le sol à l'intestin du ver, leur abondance étant significativement plus importante dans le sol que, dans

l'intestin du ver où les conditions en nutriments sont limitées et les teneurs en carbone/azote qui sont plus élevées (Sun et al., 2020). Par conséquent, les niveaux d'oxygène et de nutriments sont presque certainement des facteurs critiques pour déterminer la composition bactérienne de l'intestin du ver et des sols adjacents (Drake et al., 2006).

I. 4. 2. Bactéries des néphridies

Les espèces de vers de terre hébergent presque universellement une seule espèce symbiotique extracellulaire ressemblant à *Acidovorax* dans l'ampoule des néphridies osmorégulatrices, qui a été désignée *Verminephrobacter* (β -*Proteobacteria*) (Schramm et al. 2003 ; Davidson et al. 2013). Le symbiote néphridien est considéré comme un composant standard de l'anatomie des vers de terre en raison de sa présence chez presque toutes les espèces de vers de terre. Il s'agit de symbiotes transmis verticalement par le cocon, où ils sont déposés avec les œufs et le sperme. Les symbiotes migrent dans les néphridies en développement pendant l'embryogenèse, et après l'éclosion du ver, les symbiotes sont incapables d'infecter le ver. Des estimations indiquent que *Verminephrobacter* est associé aux *Lumbricidae* depuis la séparation de la famille des vers de terre il y a 62 à 132 millions d'années) et qui présente le taux de mutation accélérée caractéristique associé aux autres symbiotes (Davidson et al., 2006 ; Viana et al., 2018). En dehors des symbiotes *Verminephrobacter*, la plupart des vers de terre hébergent une population mixte de bactéries néphridiales appartenant à quelques groupes distincts ; environ la moitié des espèces hébergent des bactéries associées à *Flexibacter*, tandis que d'autres bactéries moins fréquentes comprennent *Ochrobactrum* et les bactéries communes du sol *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Microbacteriaceae*, *Ca Nephrothrix*, et *Variovorax*. Des membres d'un nouveau genre *Flexibacter* et d'un nouveau genre *Microbacteriaceae* sont aussi régulièrement trouvés dans les néphridies d'*Eisenia fetida* (Davidson et al. 2013 ; Møller et al. 2015 ; Viana et al. 2018).

I. 4. 3. Bactéries du cocon

Des recherches antérieures ont démontré que les cocons du ver de terre *Eisenia fetida* conservent des populations bactériennes cultivables contenant initialement environ 10^8 - 10^9 UFC mL⁻¹. Cette première population bactérienne semble être dominée par des bactéries obtenues à partir du ver de terre, avec une petite proportion de bactéries provenant de l'environnement (Zachmann et al., 1993). Le développement des techniques moléculaire a permis d'explorer la population bactérienne du cocon du ver de terre épigée *Eisenia fetida*, et

a confirmé la présence d'un assemblage microbien composé de quatre taxons bactériens majeurs : *Verminephrobacter* (Betaproteobacteria), *Microbacteriaceae* (Actinobacteria), *Flexibacteriaceae* (Bacteroidetes), et *Herbaspirillum spp* (Betaproteobacteria), qui sont considéré comme étant des résidents persistants et prolifiques des cocons et des néphridies. Étant donné que les cocons deviennent hermétiques à l'entrée des bactéries peu de temps après avoir été déposés dans le sol, le moyen le plus direct d'atteindre la haute densité observée (10^9 mL^{-1}) dans une période aussi courte (quelques heures) est la transmission à partir d'un adulte. La population d'*Herbaspirillum* qui a été découverte à des niveaux relativement faibles à la fois dans la litière et dans les cocons nouvellement formés, provenait du sol et semble résistante à ces composés inhibiteurs présents au niveau du cocon (Davidson et al., 2010). Une étude métagénomique réalisée par Aira et al. (2018), a démontré que les phylums bactériens *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, et *Actinobacteria* formaient la majorité des communautés. Les cocons et l'environnement avoisinant contenaient les mêmes phylums bactériens, alors que les cocons comprenaient plus de *Proteobacteria* et moins d'*Actinobacteria* et de *Bacteroidetes*. La prolifération ou le recrutement sélectif des *Actinobacteria* peut être lié à l'activité inhibitrice rapportée dans les cocons de vers de terre.

I. 4. 4. Bactéries des turricules

Les changements dans la composition des communautés microbiennes pendant le transit intestinal sont considérés essentiels pour la décomposition de la matière organique, certains groupes bactériens peuvent être digérés lors du passage dans l'intestin des vers de terre, tandis que d'autres peuvent survivre et même prospérer (Drake et al., 2007). En effet, la formation des turricules est l'étape initiale des interactions entre les vers de terre et les bactéries et que la diversité microbienne des vers de terre est associée à la fonction de l'écosystème, et plus précisément à la décomposition de la matière organique (Aira et al., 2019). Puisque une fois que les turricules sont expulsés, les bactéries dominantes complètent le processus de décomposition grâce aux répertoires enzymatiques qui sont particulièrement diversifiés vis-à-vis d'une variété de substrats polymères, oligomères et monomères à base de sucre (Beloqui et al., 2010). Selon van Groenigen et al. (2019), les turricules de vers de terre sont significativement plus fertiles que le sol avoisinant, avec une augmentation des concentrations élémentaires totales, de l'azote minéral et du phosphore accessible.

II. Présence des métaux lourds dans les sols

Le sol est un composant unique de la biosphère dans la mesure où il sert de réservoir géochimique pour les contaminants tout en agissant comme un tampon naturel, régulant le passage des éléments et composés chimiques vers l'atmosphère, l'hydrosphère et le biote. La fonction la plus critique du sol est sa productivité, qui est nécessaire à la subsistance de l'homme, l'humanité a donc l'obligation de maintenir les fonctions écologiques et agricoles du sol (Bruemmer et al. 1986 ; Kabata-Pendias 2010). La contamination et la pollution du sol ont été largement définies dans les publications, ainsi, on parle d'un sol contaminé comme lorsqu'il s'écarte chimiquement de sa composition typique, mais qui n'a pas d'effet nocif sur les organismes. Cependant, on considère un sol pollué lorsqu'un élément ou un produit chimique est présent à des concentrations supérieures à celles que l'on trouve dans l'environnement naturel du fait de l'activité humaine et qu'il a un effet néfaste net sur l'environnement et ses constituants, même à de faibles concentrations (Kabata-Pendias, 2010).

Les métaux lourds sont définis chimiquement comme des métaux et des métalloïdes ayant une masse atomique supérieure à 20 et une gravité spécifique supérieure à 5, tels que le cadmium (Cd), le mercure (Hg), le cuivre (Cu), l'arsenic (As), le plomb (Pb), le chrome (Cr), le nickel (Ni) et le zinc (Zn). La contamination par les métaux lourds est devenue une menace grave pour l'environnement et la sécurité alimentaire en raison de l'expansion agricole et industrielle rapide, ainsi que de la perturbation de l'écosystème naturel due à l'énorme expansion démographique mondiale. Contrairement aux polluants organiques, la pollution par les métaux lourds est dissimulée, persistante et irréversible, et elle constitue une menace importante pour la santé et le bien-être des organismes et des humains par leur accumulation dans la chaîne alimentaire (Vodyanitskii 2013 ; Li et al. 2019a).

II. 1. Sources de pollution des sols

Les métaux lourds s'infiltrant dans l'agroécosystème par des sources naturelles et anthropiques (Figure 12). De nombreuses études ont montré que, par rapport à l'activité anthropique, les sources naturelles de métaux lourds dans l'environnement sont généralement insignifiantes. La croûte terrestre est constituée de 95 % de roches ignées et d'environ 5 % de roches sédimentaires. En général, les roches volcaniques basaltiques sont abondantes en métaux lourds tels que le cuivre, le plomb, le nickel et le cobalt, tandis que le schiste est abondant en plomb, cuivre, zinc, manganèse et cobalt. Les métaux lourds stockés dans les roches peuvent s'infiltrer

dans l'environnement du sol par des processus naturels tels que l'érosion, la lixiviation et les vents de surface (Li et al., 2019). En raison de la perturbation et de l'accélération par l'homme du cycle géochimique lent des métaux dans la nature, la majorité des sols des zones rurales et urbaines peuvent accumuler un ou plusieurs métaux lourds au-delà des niveaux acceptables, ce qui constitue un danger pour la santé humaine, les plantes, les animaux, les écosystèmes et d'autres milieux. Les métaux lourds deviennent essentiellement des contaminants dans les environnements pédologiques pour les raisons suivantes : leur taux de génération via les cycles artificiels est plus rapide que les cycles naturels, ils sont transférés des mines vers des lieux environnementaux aléatoires présentant un plus grand risque d'exposition directe, les concentrations de métaux dans les produits mis au rebut sont relativement élevées par rapport à celles de l'environnement récepteur, et la forme chimique (espèce) sous laquelle existe un contaminant (Wuana et al., 2011 ; Zwolak et al., 2019). Les processus anthropiques perturbent le cycle géochimique des métaux lourds qui se déroule lentement dans la nature, ce qui entraîne l'accumulation d'un ou plusieurs métaux lourds dans le sol. Les progrès récents de l'agriculture, de l'industrialisation et de l'urbanisation ont tous contribué de manière significative à une contamination élevée des sols par les métaux lourds. Les activités anthropiques telles que l'exploitation minière, la combustion de raffinage de combustibles fossiles, l'élimination des déchets municipaux, l'application de pesticides, l'irrigation par des eaux usées, et l'application d'engrais contribuent toutes à l'augmentation des concentrations de métaux lourds. Au cours des dernières décennies, le rejet annuel mondial de métaux lourds a atteint 22 000 t (tonne métrique) pour le Cd, 939 000 t pour le Cu, 783 000 t pour le Pb et 135 000 t pour le Zn (Wuana et al., 2011 ; Li et al., 2019 ; Zhang et al., 2020 a).



Figure 12 Source des polluants métalliques dans l'environnement (Mitra et al., 2022).

II. 2. Législations

Notre compréhension actuelle de l'effet des métaux lourds à l'état de traces sur les variables écologiques du sol est assez complète. Cependant, les données sont insuffisantes pour établir des valeurs précises pour les normes nécessaires à la protection des sols contre les conséquences à long terme de la pollution par les métaux lourds. Néanmoins, certaines valeurs précoces ont été données comme guides pour effectuer des évaluations des dangers primaires (Kabata-Pendias, 2010). Ces suggestions de seuils (Tableau 3) pour les métaux traces doivent varier selon les régions ou les pays pour tenir compte des différentes conditions écologiques (Xu et al., 2012).

Tableau 3 : Plages de concentrations maximales autorisées pour les métaux lourds dans les sols agricoles (mg Kg⁻¹)

Métal	Concentrations			
	maximales autorisées ¹ (Kabata-Pendias, 2010)	CCME ²	OMS	FAO
Antimoine (Sb)	10	20	-	-
Arsenic (As)	15–20	12	20	20
Béryllium (Be)	10	4	-	-
Cadmium (Cd)	1–5	1,4	0,3	0,1
Cobalt (Co)	20–50	40	-	-
Chromium (Cr)	50–200	65	100	100
Cuivre (Cu)	60–150	63	4	0,2
Mercure (Hg)	0.5–5	6,6	-	-
Molybdène (Mo)	4–10	5	-	-
Nickel (Ni)	20–60	100	-	-
Plomb (Pb)	20–300	70	20	50
Vanadium (V)	150	-	-	-
Zinc (Zn)	100–300	200	50	20

¹ Valeurs les plus couramment rapportées dans la littérature. Les éléments et leurs composés dans l'environnement, sélection d'indicateurs pour évaluer la qualité des sols (Kabata-Pendias, 2010).

² CCME : Recommandations canadiennes pour la qualité des sols en vue de la protection de l'environnement et de la santé humaine (Cepa, 2007).

OMS : Organisation Mondiale de la Santé. FAO : Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (Ennaji et al. 2020 ; Hilali et al. 2020).

II. 3. Pollution des sols au Maroc

L'agriculture est un secteur stratégique au Maroc, important pour la création d'emplois, l'intégration aux marchés internationaux et nationaux, et la stabilisation de la population dans les zones rurales. En raison de ces caractéristiques, le pays est sensible et vulnérable à diverses formes de pollution (industrielle, urbaine et agricole) (Oumenskou et al., 2018). La rareté de l'eau a fait de l'utilisation des eaux usées une option viable pour diverses raisons, notamment pour compenser les pénuries d'eau dans l'agriculture. En outre, l'agriculture intensive, qui repose sur l'utilisation d'engrais organique et de fumier, ainsi que sur l'irrigation, est florissante et constitue la principale source de pollution des sols au Maroc, ce qui suscite des inquiétudes quant aux changements continus des propriétés des sols et à l'accumulation de polluants dans le sol et une diminution de leur fertilité (Kouchou et al. 2017 ; Hilali et al. 2020). Le Maroc dispose d'une industrie minière florissante et est connu pour ses nombreux sites miniers, concentrés dans les régions de Marrakech, Ouarzazate et les montagnes de l'Anti-Atlas, dont certains sont en cours d'exploration et d'autres ont été abandonnés. Depuis des décennies, leur surexploitation a entraîné l'accumulation de centaines de tonnes de résidus miniers, dont la majorité n'a pas été traitée et qui sont susceptibles de générer un drainage minier acide. Les mines du Maroc, qu'elles soient actives ou abandonnées, ont été étudiées précédemment, et toutes contribuent à la présence de métaux toxiques (Cd, Cu, Zn, Pb, Mn) dans les sols adjacents, les eaux de surface et/ou les eaux souterraines, ce qui constitue un risque pour la santé animale et humaine. Cependant, aucune mesure préventive n'a été prise pendant la période d'exploitation, car le code minier marocain ne comportait aucune réglementation spécifique en matière de protection de l'environnement (Boularbah et al. 2006 ; El Hamiani et al. 2010 ; Midhat et al. 2017 ; Nassiri et al. 2021). L'évaluation des risques pour la santé humaine permet de déterminer si l'exposition à un produit chimique peut entraîner une augmentation de l'incidence des effets néfastes sur la santé humaine, quelle que soit la dose (El Fadeli et al. 2015). De nombreuses études ont été menées à cet égard pour déterminer les concentrations de métaux lourds dans les sols agricoles irrigués par des eaux usées ou autour des zones minières (Tableau 4), ainsi que leur impact sur le sol environnant. Les concentrations de Cd, Cr, Cu, Pb et Zn dépassaient les directives nationales canadiennes ainsi que les normes de l'OMS et de la FAO, indiquant que les sites étudiés étaient modérément à sévèrement pollués.

Tableau 4 : Concentrations de métaux lourds (mg Kg⁻¹) dans les sols de différentes régions du Maroc.

Site d'étude	Cd	Cr	Cu	Zn	Pb	Ni	As	Mn	Références
Zone minière de fer d'Ait Ammar	1,5	130,39	44,90	104,25	7,24	-	-	-	Nouri and Haddioui (2016)
Ville de Beni-Mellal	2,2	140,41	37,24	154,63	31,45	-	-	-	Barakat et al. (2020)
Sols agricoles irrigués avec des eaux usées, Beni Mellal	4,9	77,77	87,40	75,98	109,66	42,33	8,24	-	Hilali et al. (2020)
Sols de surface, district minier de Zeïda, au nord-est du Maroc	0,4	-	26,2	47,0	1935,7	-	21,8	-	El Azhari et al. (2017)
Zone nord-est de la plaine de Tadla	0,9	32,72	138,10	162,11	31,72	-	-	-	Ennaji et al. (2020)
Sites miniers du sud du Maroc	31,5	-	554	8361	5756	-	-	-	Boularbah et al. (2006)
Mine de Kettara-Marrakech, Sud du Maroc	74,3 31,8	-	1363 1346,67	580,67 497,66	311,99 309,99	-	-	-	Midhat et al. (2017)
Sols agricoles du périmètre irrigué de Beni Amir, plaine du Tadla, Maroc	40,1	294,00	191,20	1272,00	134,70	-	-	-	Oumenskou et al. (2018)

Site d'étude (suite)	Cd	Cr	Cu	Zn	Pb	Ni	As	Mn	Références
Terres agricoles irriguées par les eaux de la rivière Fès	-	63,4	201,2	291,2	-	33,2	-	-	Kouchou et al. (2017)
Sud du Maroc	2,2 0,9	26,8 67,3	59,0 67,1	173,3 182,1	-	18,5 53,1	-	3637 559,9	EL Hamiani et al., (2010)
Sols agricoles de Beni-Moussa, plaine du Tadla (Maroc)	1,2	38,56	52,65	82,8	38,81	48,05	-	-	EL Hamzaoui et al., (2020)
Sol autour d'un site minier de Pb abandonné dans le nord-est du Maroc	0,17	69,3	25,2	69,3	255,9	24,03	-	-	Nassiri et al. (2021)
Sols agricoles dans la zone semi-aride méditerranéenne (plaine du Saiss, Maroc)	-	253	322	434	-	135	-	-	Kouchou et al. (2017)
Sol dans la région de Marrakech au Maroc	11,22	-	17,70	112,71	57,36	-	-	-	Chaoua et al. (2019)
Sol contaminé par les résidus de ruissellement des sites miniers du sud du Maroc	60,2 83,7	-	820 489	5730 2026	-	-	-	3,462 559	El Khalil et al. (2008)

II. 4. Mobilité et biodisponibilité des polluants métalliques dans les sols

Pour évaluer la mobilité et la disponibilité environnementale des métaux, il est nécessaire de comprendre à la fois les concentrations et les formes chimiques (espèces) présentes dans la solution du sol, qui sont influencées par une variété de processus complexes en interaction tels que l'adsorption/désorption, la complexation/dissociation, la précipitation/dissolution et la diffusion très lente à l'intérieur des minéraux argileux et des oxydes. Ces processus sont influencés par des paramètres physicochimiques tels que la teneur en métal total, le pH du sol, les conditions redox, les teneurs en matière organique, en minéraux argileux et en oxydes, ainsi que le temps de contact avec la matrice du sol (Dowdy and Volk 2015 ; Kim et al. 2015 ; Pikuła and Stępień 2021). Selon Bruemmer et al. (1986), ces processus sont fortement spécifiques aux métaux en raison des affinités d'adsorption des métaux sur les sites de liaison des minéraux argileux et des oxydes, des propensions à former des complexes stables avec des ligands organiques et inorganiques, et des solubilités des complexes et des minéraux. Les processus impliquant l'adsorption ou la désorption des métaux par les minéraux et les oxydes du sol peuvent être bien expliqués en utilisant le concept d'adsorption spécifique et non spécifique. Les métaux lourds existent dans un sol modérément acide jusqu'à un pH légèrement alcalin, principalement adsorbés spécifiquement aux surfaces hydroxylées des oxydes ou des minéraux argileux. Les métaux lourds sont principalement adsorbés de manière non spécifique sur les sites de liaison de l'échange cationique des minéraux argileux et des oxydes à faible pH via des liaisons électrostatiques, qui sont associées à la fraction échangeable des métaux et considérées comme facilement biodisponibles. Par conséquent, à faible pH, les métaux lourds sont plus mobiles et biodisponibles qu'à un pH de sol modérément acide à légèrement alcalin. Les constantes de stabilité des complexes métal-organique augmentent avec le pH et sont plus élevées avec les acides humiques (formés principalement à un pH légèrement acide à neutre) qu'avec les acides fulviques (formés principalement à un pH acide du sol). En raison de la charge négative dominante de la plupart des complexes métal-organique, la mobilité des ions métalliques est généralement réduite à un pH acide et augmenté à un pH légèrement acide à alcalin. Les complexes métal-organique sont les espèces métalliques dominantes dans l'eau de porosité à un pH > 6. Ces résultats suggèrent que la matière organique dissoute peut augmenter de façon significative la solubilité du Cu, du Cr et du Pb à un pH de sol modérément acide à légèrement alcalin, ce qui est associé à une disponibilité environnementale accrue. Dans la gamme commune de pH du sol, les métaux lourds sont classés en deux groupes : ceux dont la

mobilité est relativement élevée (Cd, Ni et Zn) et ceux dont la mobilité est relativement faible (Cu, Cr et Pb) (Caporale and Violante 2016 ; Król et al. 2020). On outre, la biodisponibilité des métaux lourds est contrôlée par le processus de sorption/désorption ; les composants du sol responsables de la sorption comprennent les matériaux amorphes, les silicates, les minéraux argileux, les carbonates et la matière organique. La façon dont un métal interagit avec les différents constituants du sol influence sa biodisponibilité, ainsi que sa probabilité qu'il soit lessivé dans l'environnement à plus large concentration. Les métaux dissous dans l'eau interstitielle, par exemple, peuvent être facilement mobilisés et sont considérés comme facilement disponibles pour être absorbés par les plantes ou pour interagir avec les systèmes biologiques, tandis que ceux dissous dans les fractions labiles sont potentiellement biodisponibles si les conditions physico-chimiques changent (par exemple, diminution du pH) (Bruemmer et al. 1986 ; Kabata-Pendias 2010 ; Kim et al. 2015).

II. 5. Effets des métaux sur la santé humaine

Tout oligo-élément, essentiel ou non, présent en excès par rapport au niveau de sécurité peut provoquer des anomalies physiologiques ou morphologiques ou des mutations génétiques, telles que le ralentissement ou l'arrêt de la croissance ou encore des mutations. Les cultures vivrières sont un élément essentiel de notre alimentation, et elles peuvent contenir une variété de métaux, nécessaires ou dangereux, selon le milieu de croissance utilisé. L'exposition humaine aux métaux lourds est inévitable et se fait principalement par les légumes comestibles, qui représentent environ 90 % de l'apport total (Ahmed et al., 2021 ; Mitra et al., 2022).

En raison de leur large distribution et de leur récalcitrance, leur pénétration dans l'organisme peut constituer un risque pour la santé des populations humaines. En effet, les métaux ont la capacité de contourner les mécanismes de contrôle tels que l'homéostasie, le transport, la compartimentation et la liaison à des constituants cellulaires spécifiques, ce qui entraîne des effets toxiques, voire mortels. Les métaux lourds peuvent perturber les processus cellulaires en déplaçant les métaux essentiels de leurs emplacements appropriés (Fu et al., 2020 ; Balali-Mood et al., 2021 ; Mitra et al., 2022). Les complications des effets toxiques des métaux lourds comprennent des dysfonctionnements gastro-intestinaux et rénaux, des troubles du système nerveux, des lésions cutanées, des lésions vasculaires, des dysfonctionnements du système immunitaire, des anomalies congénitales et des cancers. L'exposition simultanée à deux ou plusieurs métaux peut avoir des effets cumulatifs. Une exposition excessive aux métaux lourds, notamment au mercure et au plomb, peut entraîner des complications graves telles que des

douleurs coliques abdominales, des diarrhées sanglantes et une insuffisance rénale. En revanche, l'exposition à de faibles doses constitue une menace subtile et cachée, à moins qu'elle ne soit répétée fréquemment, et ses conséquences, telles que des troubles neuropsychiatriques comme la fatigue et l'anxiété, et des effets néfastes sur le quotient intellectuel et la fonction intellectuelle des enfants, peuvent être diagnostiquées. Un autre aspect critique de l'exposition chronique est le fait que plusieurs métaux ont été identifiés comme cancérogènes pour l'homme (Fu et al., 2020 ; Mitra et al., 2022). Bien que le mécanisme précis soit inconnu, il est suggéré que des modifications aberrantes du génome et de l'expression des gènes sont impliquées. L'arsenic, le cadmium et le chrome sont tous des métaux cancérogènes qui peuvent perturber la synthèse et la réparation de l'ADN. La toxicité et la cancérogénicité des métaux lourds dépendent de la dose. Des doses excessives induisent des réponses sévères chez les animaux et les humains, entraînant une augmentation des dommages à l'ADN et des troubles neuropsychiatriques. Le mécanisme toxique des métaux lourds est similaire à celui des autres métaux, impliquant la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'inactivation d'enzymes et la suppression de la défense antioxydante. Cependant, certains d'entre eux provoquent une toxicité selon un schéma spécifique et se lient à des macromolécules spécifiques de manière sélective (Fu et al., 2020 ; Balali-Mood et al., 2021).

II. 6. Effets des métaux sur les composantes du sol

La pollution des sols par les métaux lourds entraîne une perturbation très complexe de l'équilibre écologique. La pollution par les métaux lourds a un effet néfaste non seulement sur le rendement et la qualité des plantes, mais aussi sur la composition, la taille et l'activité de la flore microbienne. Cette pollution est principalement causée par le Ni, le Cu, le Cd, le Cr, le Zn et le Pb, qui ont tous un effet significatif sur la matière organique, le pH et la teneur en argile, ainsi que sur la biologie et la biochimie du sol, et sont considérés comme la première cause de dégradation des sols (Sherameti et al., 2010). Étant donné que les métaux se trouvent fréquemment sous forme ionisée dans le sol, ils réagissent avec les particules du sol chargées négativement, ce qui rend leurs concentrations et leurs biodisponibilités importantes. En raison de cette situation, le biote du sol doit constamment réguler ses activités afin de rendre les métaux essentiels disponibles et de les absorber aux concentrations appropriées, ainsi que d'exclure ou de détoxifier les formes ou les concentrations nocives. Ils nuisent au biote du sol en altérant les processus microbiens clés et en réduisant l'activité et le nombre de biotes (Jaiswal et al., 2018). Les microorganismes du sol, en particulier, doivent faire preuve d'une

grande capacité d'adaptation physiologique. De nombreux chercheurs ont examiné en détail les effets néfastes des métaux lourds sur les processus médiés par les microorganismes. On peut observer une diminution générale de la minéralisation et de la fixation du carbone, de la transformation de l'azote, de l'activité des enzymes du sol et de la décomposition de la litière. De plus, la contamination par les métaux lourds peut entraîner une réduction de la biomasse et la diversité microbienne, corrélée avec une augmentation de la fréquence des bactéries résistantes aux métaux (Zhang et al., 2016 ; Chu, 2018 ; Hemmat-Jou et al., 2018).

Généralement, les activités enzymatiques du sol reflètent la dynamique des processus métaboliques microbiens associés au cycle des nutriments et sont des indicateurs sensibles des stress environnementaux causés par la dégradation de la qualité du sol. L'évaluation des activités enzymatiques du sol est l'une des méthodes les plus simples et les moins coûteuses pour évaluer la pollution des sols (Tang et al., 2019 a). L'inhibition de l'activité enzymatique du sol par les métaux lourds est un problème très complexe, car de nombreux facteurs contribuent à cette inhibition (Mikanova, 2006 ; Friedlova, 2010 ; Sethi et al., 2015 ; Tang et al., 2019 a). Ces variables peuvent être classées en quatre catégories : variables liées aux métaux, variables liées aux enzymes, variables liées au sol et variables liées aux plantes. Les variables métalliques comprennent l'élément métallique lourd en question, sa concentration, sa forme chimique, sa disponibilité et les impacts indirects du métal lourd. Les facteurs enzymatiques comprennent la sensibilité de l'enzyme, l'inhibition structurelle de l'enzyme et les caractéristiques essentielles de l'enzyme. Le pH, la matière organique et l'argile sont des variables du sol. Enfin, les facteurs végétaux comprennent l'accumulation de métaux et les effets des communautés végétales (Sherameti et al., 2010). Les enzymes du sol présentent des degrés variables de sensibilité aux métaux lourds, par exemple, le plomb est moins toxique pour les enzymes que le cadmium en raison de sa moindre mobilité et de son affinité accrue pour la liaison avec les colloïdes du sol. Il a un effet inhibiteur plus important sur l'activité du α -glucosidase que sur celle de la cellulose. Le plomb inhibe significativement la catalase, l'uréase, la phosphatase acide et l'invertase. L'arsenic inhibe la sulfatase et la phosphatase, mais pas l'uréase. Le Cr a un effet antagoniste sur l'activité de l'uréase, de la phosphatase alcaline, de la protéase et de l'arylsulfatase, mais a un effet négligeable sur l'activité de l'invertase (Jaiswal et al., 2018).

III. Techniques de dépollution des sols

De nombreuses méthodes et stratégies ont été mises en œuvre pour traiter la contamination des sols, dans l'objectif principal de minimiser le risque que ces composés toxiques affectent la

santé humaine et écologique. En général, les technologies de remédiation se répartissent en deux grandes catégories : la remédiation *in situ* et la remédiation *ex situ*. La remédiation *in situ* consiste à traiter un polluant dans son habitat naturel sans déplacer le sol contaminé. En revanche, la dépollution *ex situ* implique l'excavation et le transport du sol pollué vers un autre endroit pour le traiter. La remédiation *in situ*, par rapport à la remédiation *ex situ*, présente un certain nombre d'avantages techniques, économiques et environnementaux potentiels. Cependant, la méthode d'assainissement des sols la plus appropriée est déterminée par les caractéristiques du site, le type de polluants à éliminer, la concentration de contaminants et l'utilisation prévue du milieu contaminé. Il existe trois grandes catégories de techniques de remédiation : les techniques physiques, les techniques chimiques, et les techniques biologiques (Yao et al., 2012 ; Liu et al., 2018).

III. 1. Techniques physiques

La remédiation physique des métaux lourds dans les sols contaminés a un large éventail d'applications pour divers déchets. Les méthodes d'élimination physique permettent d'éliminer la quasi-totalité des polluants. La remédiation électrocinétique, la désorption thermique, le tri, le stripping à la vapeur, le lavage du sol, la vitrification, l'encapsulation et les barrières perméables sont quelques-unes des techniques de décontamination physique utilisées pour éliminer les contaminants et prévenir la pollution. Cependant, elles présentent certains inconvénients. En général, les polluants éliminés par des techniques physiques nécessitent un traitement supplémentaire et ont un coût d'application relativement élevé par rapport aux autres techniques. De plus, en raison de leur moindre efficacité, ces techniques nécessitent des alternatives (Liu et al., 2018 ; Kumar et al., 2021 a).

III. 2. Techniques chimiques

La remédiation chimique est un terme qui fait référence à un processus dans lequel les contaminants sont éliminés à l'aide de réactifs, de réactions et de principes chimiques. Les méthodes chimiques de remédiation des sols visent soit à éliminer les contaminants qui se sont accumulés dans les sols, soit à modifier leurs caractéristiques chimiques de manière qu'ils perdent leurs propriétés toxiques. Dans certains cas, des techniques de remédiation chimique telles que la précipitation chimique, la coagulation-floculation, l'échange d'ions, la flottation, la complexation, la distillation, la filtration sur membrane, l'électrodialyse et l'osmose inverse sont utilisées pour extraire les métaux lourds. La précipitation chimique est classée en cinq

techniques fondamentales : la précipitation par chélation, la précipitation par hydroxyde, la précipitation par sulfure, la précipitation par carbonate et la précipitation par xanthate. Si les traitements chimiques sont extrêmement efficaces à l'échelle du terrain, ils présentent l'inconvénient de générer des sous-produits qui compliquent le traitement en aval et d'altérer les propriétés du sol (Sharma et al., 2018 ; Kumar et al., 2021 a).

III. 3. Techniques biologiques : bioremédiation par des bactéries

La remédiation biologique des métaux lourds est considérée comme la méthode la plus efficace pour éliminer les métaux toxiques, car il s'agit d'une technologie naturelle, respectueuse de l'environnement, peu coûteuse et largement approuvée. L'une de ces technologies est l'utilisation de bactéries favorisant pour la biorestauration des métaux lourds, ce qui est essentiel compte tenu du changement climatique mondial et de l'utilisation excessive d'engrais dans les sols agricoles (Tiwari et al., 2018).

III. 3. 1. Toxicité

La toxicité des métaux lourds fait référence à la capacité d'un métal à provoquer des effets néfastes sur les bactéries (Figure 13). Elle est déterminée par la biodisponibilité du métal et la dose absorbée. La toxicité des métaux lourds se manifeste de diverses manières, notamment par la perturbation de fonctions enzymatiques fatales, en agissant comme catalyseurs redox dans la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), en altérant la régulation ionique et en affectant directement la formation de l'ADN et des protéines. La présence de métaux lourds peut altérer les propriétés physiologiques et biochimiques des bactéries. Le Cd est capable de provoquer un stress oxydatif et une dénaturation des microorganismes, ainsi que d'altérer leur capacité de bioremédiation. Les métaux lourds tels que le cuivre (I) et le cuivre (II) peuvent catalyser la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) via les réactions de Fenton et de Haber-Weiss, en agissant comme des porteurs d'électrons solubles dans le processus. Cela a le potentiel de causer des dommages importants aux molécules cytoplasmiques, à l'ADN, aux lipides et à d'autres protéines. Les métaux lourds peuvent inhiber les fonctions enzymatiques critiques par le biais d'interactions compétitives ou non compétitives avec les substrats, ce qui entraîne des changements dans la configuration des enzymes. De plus, ils peuvent contribuer au déséquilibre ionique en adhérant à la surface cellulaire et en pénétrant par les canaux ioniques ou les transporteurs transmembranaires. Le Cd et le Pb sont toxiques pour les microorganismes, causant des dommages aux membranes cellulaires et détruisant la

structure de l'ADN. Cette toxicité est due au fait que les métaux sont déplacés de leurs sites de liaison naturels ou de leurs interactions avec les ligands. Les modifications de la structure de l'acide nucléique ont un effet sur la morphologie, le métabolisme et la croissance des microorganismes, provoquant une perturbation fonctionnelle, une perturbation des membranes cellulaires, une inhibition de l'activité enzymatique et de la phosphorylation oxydative (Medfu Tarekegn et al., 2020).

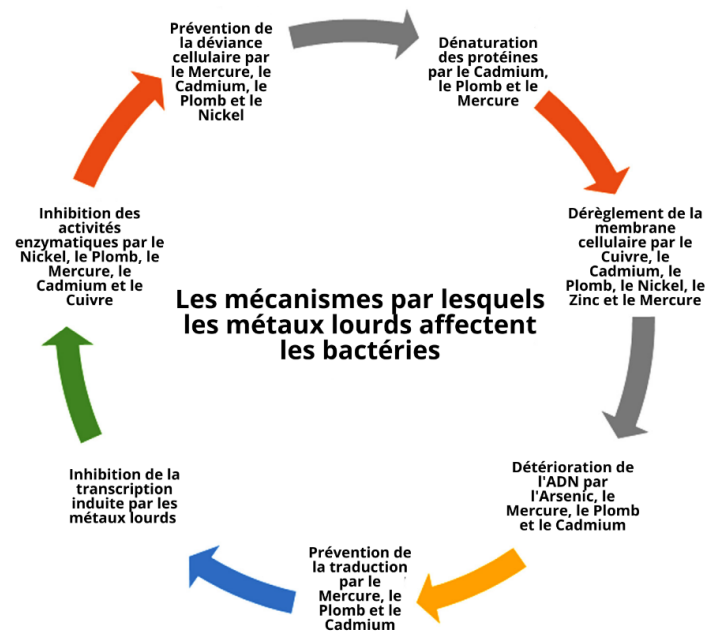


Figure 13 : Effets de la toxicité des métaux lourds sur les bactéries (Thakare et al., 2021).

III. 3. 2. Tolérance et Résistance

La tolérance et la résistance aux métaux lourds chez les microorganismes sont une condition nécessaire à leur utilisation dans les sols contaminés par les métaux lourds afin de réduire la mobilité de ces derniers. Bien que les métaux toxiques réduisent la diversité bactérienne de 99,9 % (Zhao et al., 2019), certaines bactéries ont démontré une résistance aux métaux dans l'environnement dans lequel elles vivent, comme l'eau, le sol et les eaux usées industrielles et municipales (Bruins et al., 2000). Les bactéries ont développé des mécanismes de résistance aux métaux lourds par le biais d'une variété de mécanismes à médiation chromosomique, transposon et plasmidique. La résistance aux métaux peut être basée sur les plasmides ou les chromosomes. La majorité de ces mécanismes de résistance, cependant, sont médiés par les plasmides et hautement spécifiques d'un seul cation ou anion. Il existe des systèmes de résistance tant pour les métaux nutritifs essentiels que pour les métaux non essentiels sans fonction biologique (Bruins et al., 2000 ; Etesami, 2018).

Les mécanismes impliqués dans la résistance bactérienne aux métaux sont résumés schématiquement dans la figure 14. Les sept mécanismes connus de résistance aux métaux chez les bactéries sont les suivants : l'exclusion du métal via une barrière de perméabilité ; la séquestration extracellulaire du métal via une liaison protéine/chélateur ; la séquestration intracellulaire du métal via une liaison protéine/chélateur ; la détoxification enzymatique du métal vers une forme moins toxique ; le transport actif du métal ; la tolérance passive ; et la réduction de la sensibilité du métal (Choudhary et al., 2017; Ahemad, 2019). Les bactéries peuvent posséder un ou plusieurs de ces mécanismes de résistance. Cependant, la présence de pompes ATPase sélectives des ions est le mécanisme de résistance aux métaux le plus fréquemment rencontré chez les bactéries (Etesami, 2018).

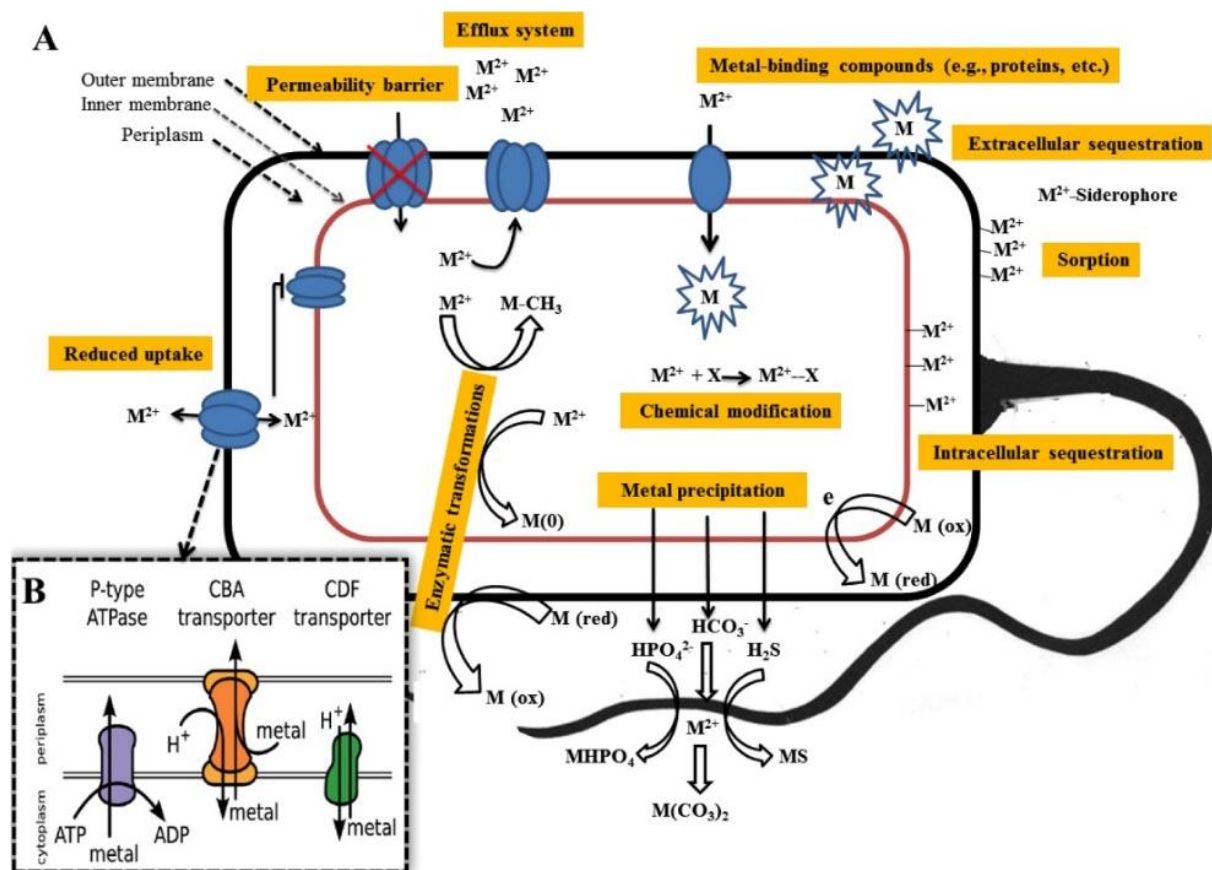


Figure 14 : Mécanismes de résistance aux métaux développés par les bactéries (A) ; Principales familles de transporteurs impliqués dans la résistance aux métaux lourds (B) ; M représente le cation métallique (Etesami, 2018).

III. 3. 3. Bioremédiation

En raison de la diversité des interactions entre les métaux et les bactéries, les bactéries potentiellement résistantes aux métaux peuvent être utilisées pour éliminer les contaminants métalliques d'une variété de sites contaminés. Les techniques de bioremédiation peuvent être classées comme *in situ* ou *ex situ* en fonction du site de traitement. En raison de la rentabilité et de la réduction des perturbations en évitant l'excavation et le transport des contaminants, la méthode *in situ* est généralement la plus souhaitable. Elle est classée en deux types : la bioremédiation intrinsèque, qui consiste à stimuler les bactéries indigènes par l'apport de nutriments et d'oxygène, et la bioremédiation extrinsèque. La deuxième méthode est la bioremédiation artificielle, qui consiste à introduire des microbes génétiquement modifiés ou stimulés (exotiques) dans un site contaminé. Elle fait appel à diverses techniques, notamment le biosparging, le bioventing, la bioaugmentation et la biostimulation (Das et al., 2018).

III. 4. Techniques biologiques : phytoremédiation

Le terme phytoremédiation a été inventé dans les années 1990 pour désigner le processus d'adsorption des métaux lourds dans le sol à l'aide d'hyperaccumulateurs. Cette technique est à la fois rentable et respectueuse de l'environnement, car elle ne modifie pas la structure ou les propriétés du sol, tout en offrant des avantages supplémentaires tels que l'amélioration de la fertilité du sol et la prévention de l'érosion (Liu et al., 2020 c).

III. 4. 1. Essentialité

Les métaux lourds tels que le Co, le Cu, le Fe, le Mn, le Mo, le Ni et le Zn induisent des réactions biochimiques et physiologiques essentielles dans les plantes à de faibles niveaux ou dans une gamme optimale (Kabata-Pendias, 2010) :

- Les études ont montré que le cobalt est essentiel pour la croissance et le développement des plantes, car il régule l'utilisation de l'eau par les plantes et réduit les taux de transpiration, a une concentration entre 7,5 –12,5 mg L⁻¹ qui a amélioré la croissance des plants de moringa, le rendement, les niveaux de nutriments et les constituants chimiques avec une meilleure qualité (Gad et al., 2019).
- Le cuivre, en tant que métal essentiel, contribue à l'amélioration de la photosynthèse dans les plantes lorsqu'il est présent en petites quantités. Le cuivre est essentiel pour la croissance et le développement des plantes, il a également été démontré qu'il s'agit d'un

micronutriment pour les plantes, et joue un rôle important dans l'assimilation du CO₂ et la synthèse de l'ATP. Le Cu est un composant essentiel de nombreuses protéines chez les plantes, notamment la plastocyanine du système photosynthétique et la cytochrome oxydase de la chaîne de transport d'électrons respiratoires (Pietrini et al., 2019 ; Liu et al., 2021 b).

- En tant que métal bénéfique pour les plantes, le Fe est nécessaire pour la respiration, la photosynthèse, la fixation de l'azote, divers processus cellulaires tels que la synthèse de l'ADN et la production d'hormones, le développement des chloroplastes et la biosynthèse de la chlorophylle. On le trouve dans les protéines de l'hème (cytochromes, catalase, peroxydase et leghemoglobine) ainsi que dans les protéines du fer-soufre (ferredoxine, aconitase et SOD) (Brumbarova et al., 2008 ; Schmidt et al., 2020).
- Le manganèse est un élément nutritif essentiel des plantes ; il est particulièrement important dans la structure des protéines et des enzymes photosynthétiques, ainsi que dans la biosynthèse des substances de croissance et l'expression des gènes. Il contrôle également le métabolisme des glucides et des lipides, ainsi que le mouvement des ions traces et autres métaux dans les sols (Alejandro et al., 2020).
- En termes d'importance, le Mo est un composant de plus de 60 métalloenzymes et protéines. Les plantes ont besoin de concentrations de Mo allant de 0,1 à 1,0 ppm, ce qui augmente la concentration totale de chlorophylle dans les plantes (Bittner, 2014 ; Banerjee et al., 2022).
- Le nickel est un autre élément bénéfique pour les plantes. Il est requis par la plante en très petites quantités pour la croissance et le fonctionnement normal des plantes (Ahmad et al., 2012 ; Barker et al., 2015).
- Le zinc est un élément essentiel qui influence une variété de processus métaboliques des plantes. Il joue également un rôle important dans la production de chlorophylle, ce qui le rend essentiel à la croissance normale des plantes (Cabot et al., 2019).

Néanmoins, les ions métallique bénéfiques tels que Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni et Zn régulent le système de piégeage des ROS de la plante via des mécanismes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (Figure 15) (Kabata-Pendias, 2010 ; Arif et al., 2016).

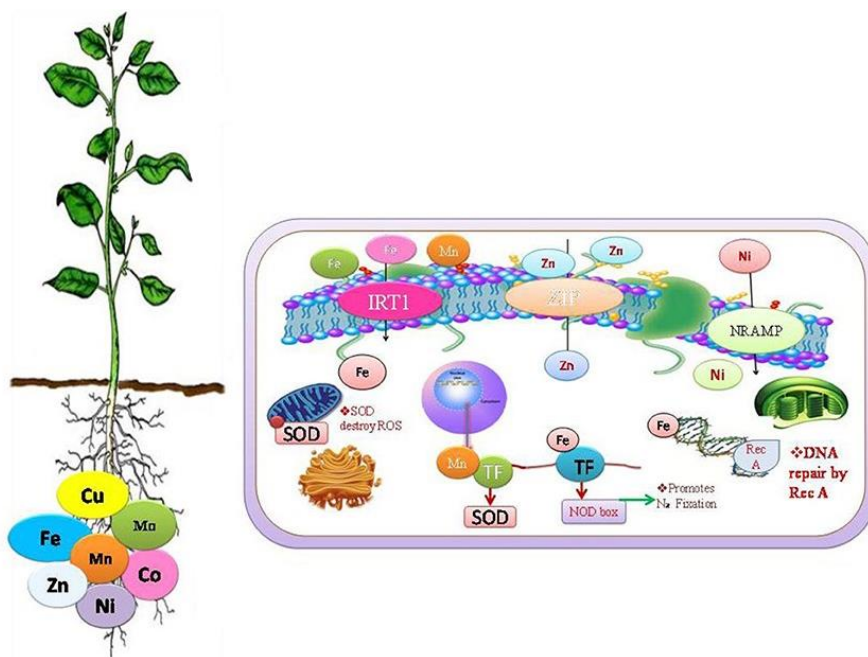


Figure 15 : Rôles des métaux lourds, à concentrations optimales, dans la synthèse des protéines, des acides nucléiques et des pigments photosynthétiques, et à l'intégrité structurelle et fonctionnelle des membranes cellulaires. (Modifié à partir de Arif et al., (2016)).

III. 4. 2. Phytotoxicité

Bien que les métaux lourds comme le Zn, le Cu, le Mo, le Mn, le Co et le Ni sont nécessaires aux processus biologiques et aux voies de développement critiques, lorsque leurs concentrations dépassent des niveaux optimaux, ces métaux, ainsi que quatre autres métaux lourds hautement toxiques, l'arsenic (As), le plomb (Pb), le cadmium (Cd), le mercure (Hg), le Cr, l'Al et le Be, peuvent réduire considérablement la productivité végétale. Ces éléments toxiques provoquent des anomalies morphologiques et des troubles métaboliques chez les plantes, ce qui entraîne une baisse de rendement. Ces anomalies entraînent également la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), telles que le radical anion superoxyde (O_2^-), H_2O_2 et le radical hydroxyle ($OH^\cdot$), qui perturbent l'homéostasie redox des cellules. Ce déséquilibre du statut redox est bien connu pour être un contributeur majeur à la toxicité des métaux lourds chez les plantes (Figure 16) (Tiwari et al., 2018).

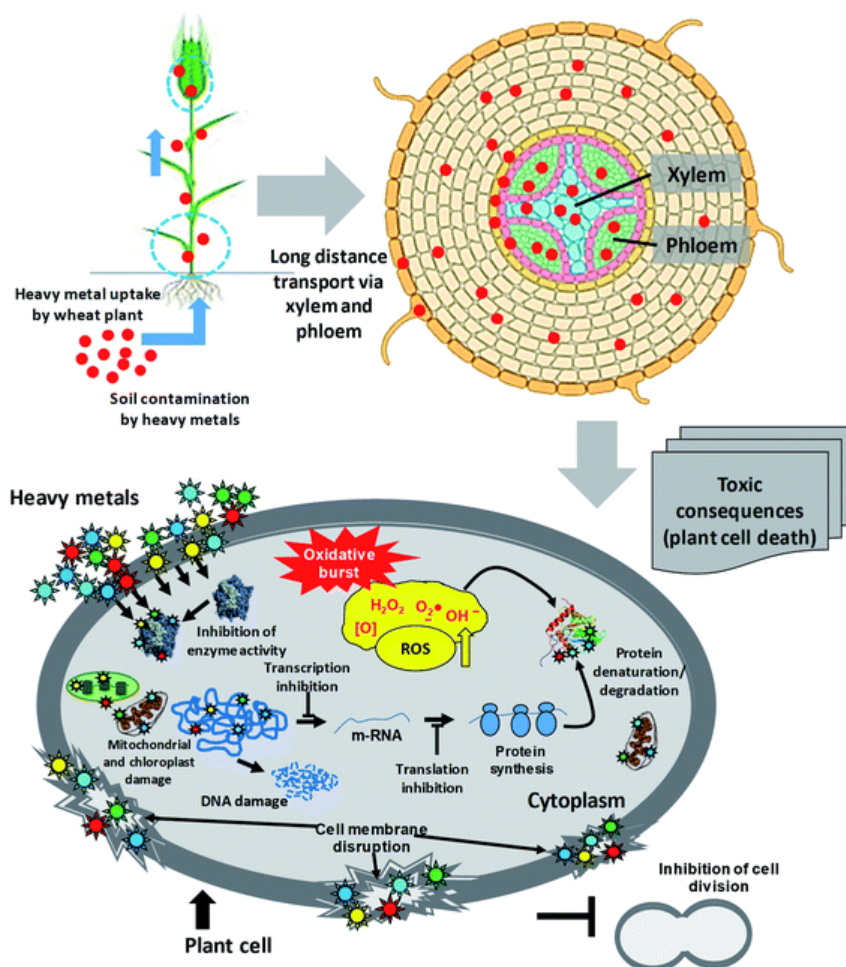


Figure 16 : Effets toxiques des métaux à forte concentration sur les cellules végétales de blé (Rizvi et al. 2020).

Les plantes cultivées dans un sol contenant des niveaux élevés de Cd présentent des symptômes visibles de dommages tels que la chlorose, l'inhibition de la croissance, le brunissement des extrémités des racines et finalement la mort. Sa toxicité peut réduire la perméabilité de la membrane plasmique, ce qui entraîne une diminution de la teneur en eau et un déséquilibre hydrique. De plus, le cadmium altère la fonctionnalité des membranes en provoquant une peroxydation des lipides et perturbe le métabolisme des chloroplastes en inhibant la biosynthèse de la chlorophylle et en diminuant l'activité des enzymes impliquées dans la fixation du CO₂ (Haider et al., 2021).

III. 4. 3. Absorption et translocation

L'accumulation de métaux lourds dans les plantes se produit par une série de processus, notamment la mobilisation, l'absorption par les racines, la charge par le xylème, le transport des racines vers les pousses, la compartimentation cellulaire et la séquestration. La majorité

des métaux lourds présents dans le sol existent sous une forme insoluble qui n'est pas biodisponible pour les plantes. Les plantes peuvent augmenter leur biodisponibilité en libérant une variété d'exsudats racinaires qui modifient le pH de la rhizosphère et augmentent la solubilité des métaux lourds (Yan et al., 2020). Le métal biodisponible est adsorbé à la surface des racines et diffuse dans les cellules racinaires via la membrane cellulaire. Les métaux lourds sont principalement absorbés dans les racines par deux voies : la voie apoplastique (diffusion passive) et la voie symplastique (transport actif contre les gradients de potentiel électrochimique et concentration à travers la membrane plasmique). La voie symplastique couramment utilisée pour l'absorption des métaux lourds est un processus dépendant de l'énergie et médié par des transporteurs d'ions métalliques ou des agents complexant (Shah et al., 2020). Les ions de métaux lourds peuvent former des complexes avec une variété de chélateurs, y compris les acides organiques, une fois qu'ils ont pénétré dans les cellules racinaires. Ces complexes précipités, qui comprennent le carbonate, le sulfate et le phosphate, sont ensuite immobilisés dans l'espace extracellulaire (parois cellulaires apoplastiques) ou intracellulaire (compartiments symplastiques, tels que les vacuoles). Les ions métalliques piégés à l'intérieur des vacuoles peuvent diffuser dans la stèle et entrer dans le flux du xylème via le symplasme de la racine, où ils sont ensuite transloqués vers les pousses via les vaisseaux du xylème. Ils sont transportés et distribués dans les feuilles via l'apoplaste ou le symplaste, où les ions sont séquestrés dans des compartiments extracellulaires (parois cellulaires) ou dans la vacuole végétale, empêchant l'accumulation d'ions métalliques libres dans le cytosol (Yan et al., 2020 ; Yang et al., 2022).

Les métaux lourds sont absorbés et transloqués dans les plantes par l'intermédiaire de diverses molécules, notamment des transporteurs d'ions métalliques et des agents complexant (Figure 24). Ces transporteurs spécialisés (protéines de canal) ou protéines de transport couplées à H^+ sont situés dans la membrane plasmique de la cellule racinaire et sont nécessaires à l'absorption des ions métalliques lourds du sol. Ils sont capables de transporter des métaux spécifiques à travers les membranes cellulaires et de médier la translocation des métaux des racines vers les pousses via l'influx-efflux (Yang et al., 2022). Les transporteurs de métaux identifiés jusqu'à présent ont été classés en plusieurs familles sur la base de l'homologie de séquence, notamment les ZIP, les HMA, les MTP et les NRAMP. En dehors des transporteurs d'ions métalliques, les agents complexant tels que les acides organiques et les acides aminés agissent comme des ligands métalliques pour médier la chélation des ions de métaux lourds. Le citrate, par exemple,

est un chélateur majeur de Fe et de Ni dans le xylème, et l'histidine peut également chélater le Ni (Yan et al., 2020).

Comme indiqué dans la figure 17, l'absorption des métaux lourds (cercles colorés) se fait par les cellules racinaires, où la présence ou la forte concentration de ces métaux active diverses voies de signalisation à l'intérieur de la cellule. Les signaux de détection des métaux dans les plantes déclenchent une réponse de défense, comme la libération des acides organiques (OAs) dérivés des mitochondries qui forment des complexes avec les ions métalliques à l'extérieur de la cellule racinaire (a), ou l'introduction de métaux et de complexes métal-OA dans les cellules via des transporteurs (de type ABC, ZIPs, CDF, ATPase H^+ métal, etc.) (b). Ces métaux forment des complexes avec des chélateurs protéiques (MTs et PCs) (c) dans le cytosol et sont ensuite transportés dans les vacuoles par des transporteurs de métaux (type ABC, NRAMP, CAX, et MTP) pour s'y accumuler ou vers un autre organite tel que le Golgi (d). Les métaux lourds peuvent également être transportés vers le xylème par des transporteurs (ZIP2 et ZNT1) et finalement vers les pousses (e), où ils peuvent être introduits dans les vacuoles cellulaires, le Golgi (MTP11) et les chloroplastes (HMA) par des transporteurs (f).

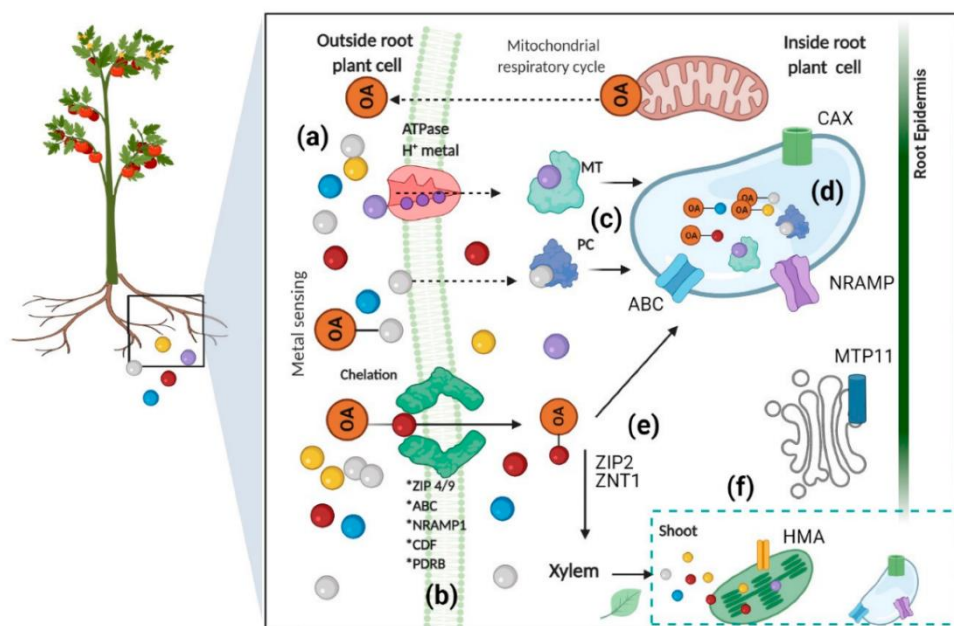


Figure 17 : Représentation schématique des processus physiologiques et moléculaires d'absorption/translocation des métaux dans les plantes (Angulo-Bejarano et al., 2021). Les acides organiques sont représentés par des cercles orange (OA) ; PC, phytochélatine ; MT, métallothionéine.

III. 4. 4. Tolérance

Les plantes utilisent généralement deux stratégies de défense pour faire face à la toxicité des métaux lourds : le contournement et la tolérance.

La capacité des plantes à limiter l'absorption des métaux lourds et leur déplacement dans les tissus végétaux via les cellules racinaires est appelée stratégie de contournement. Elle agit comme la première ligne de défense au niveau extracellulaire via divers mécanismes, notamment la sorption par les racines, la précipitation des ions métalliques et l'exclusion des métaux. Les plantes tentent d'abord d'immobiliser les métaux lourds par sorption racinaire ou en modifiant les ions métalliques lorsqu'elles y sont exposées. Une variété d'exsudats racinaires, tels que des acides organiques et des acides aminés, agissent comme des ligands de métaux lourds dans la rhizosphère, formant des complexes stables de métaux lourds. Certains exsudats racinaires peuvent modifier le pH de la rhizosphère, provoquant la précipitation des métaux lourds et limitant leur biodisponibilité et leur toxicité. Des barrières d'exclusion existent entre le système racinaire et le système des pousses via le mécanisme d'exclusion des métaux pour limiter l'accès des métaux lourds du sol uniquement aux racines ; l'absorption et le transport des racines vers les pousses sont limités pour protéger les parties aériennes des métaux lourds nocifs. Un autre mécanisme de contournement des métaux lourds est leur encapsulation dans les parois cellulaires des plantes. Les pectines des parois cellulaires sont constituées de groupes carboxyliques d'acides polygalacturoniques qui sont chargés négativement et capables de fixer les métaux lourds. En conséquence, la paroi cellulaire fonctionne comme un échangeur de cations, limitant l'entrée d'ions de métaux lourds libres dans les cellules (Yan et al., 2020).

Une fois que les ions de métaux lourds pénètrent dans le cytosol, les plantes développent une stratégie de tolérance pour faire face à la toxicité des ions métalliques accumulés. Elle sert de deuxième ligne de défense au niveau intracellulaire par le biais de divers mécanismes tels que l'inactivation des ions de métaux lourds, la chélation et la compartimentation. Lorsque des ions de métaux lourds en excès s'accumulent dans le cytosol, les plantes doivent les détoxifier pour réduire leurs effets toxiques. Cela se fait principalement par chélation, ce qui implique la complexation des ions de métaux lourds avec des ligands. La chélation réduit les concentrations d'ions métalliques libres à des niveaux relativement faibles. Dans le cytoplasme, de nombreux ligands organiques et inorganiques assurent la chélation des métaux lourds. Les acides organiques, les acides aminés, les phytochélatines (PC), les métallothionéines (MT) et les

protéines des parois cellulaires, les pectines ou les polyphénols font partie des composés organiques impliqués dans la chélation des ions de métaux lourds. Les acides organiques présents dans les cellules complexent les métaux lourds, réduisant leur biodisponibilité pour les plantes et empêchant leur persistance sous forme d'ions libres dans le cytoplasme (Viehweger, 2014 ; Ghori et al., 2019). Après chélation, les complexes ligand métal sont activement transportés du cytosol vers des compartiments inactifs tels que les vacuoles, où ils sont stockés sans toxicité. La séquestration et la compartimentation vacuolaire offrent une protection efficace contre la toxicité des métaux lourds en éliminant les ions de métaux lourds toxiques des sites sensibles de la cellule où se produisent la division et la respiration cellulaires, en réduisant les interactions entre les ions de métaux lourds et les processus métaboliques cellulaires et en évitant les dommages aux fonctions cellulaires. La figure 18 illustre l'absorption, la translocation et la détoxification des métaux lourds dans les plantes. Les ions de métaux lourds peuvent être séquestrés et compartimentés dans des endroits autres que les vacuoles, comme les pétioles des feuilles, les gaines des feuilles et les trichomes, où ils causent moins de dommages à la plante. Les métaux lourds peuvent également être transloqués vers les vieilles feuilles et être éliminés (Sharma et al., 2016 ; Bhatti et al., 2018 ; Yan et al., 2020).

Lorsque les métaux lourds s'accumulent dans l'environnement à des niveaux élevés, et que les stratégies susmentionnées sont insuffisantes pour détoxifier les effets nocifs des métaux lourds, l'accumulation accrue d'ions métalliques dans le cytoplasme entraîne la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). La production excessive de ROS provoque un stress oxydatif, qui peut perturber l'homéostasie cellulaire, inhiber les processus cellulaires, endommager l'ADN et provoquer l'oxydation des protéines. Les cellules végétales répondent aux dommages oxydatifs induits par les métaux lourds en induisant des enzymes antioxydantes comme le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la peroxydase (POD) et le glutathion réductase (GR), ainsi que des composés antioxydants non enzymatiques comme le glutathion, les flavonoïdes, les caroténoïdes, l'ascorbate et les tocophérols. Par conséquent, le système de défense antioxydant des plantes joue un rôle important dans la réponse au stress des métaux lourds (Viehweger, 2014 ; Etesami, 2018).

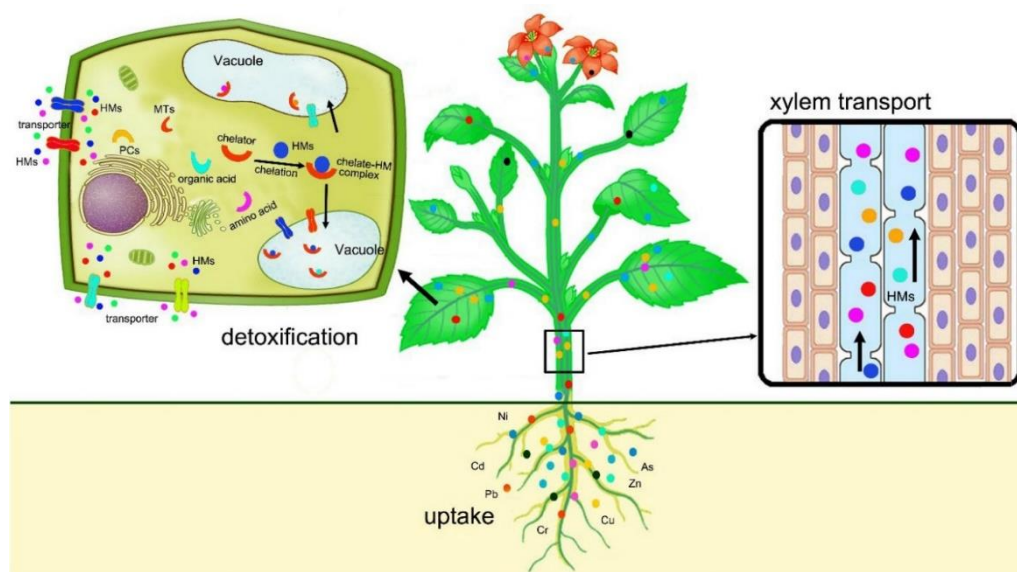


Figure 18 : Absorption, translocation et séquestration des métaux lourds dans les plantes (Yan et al. 2020). HMs : Métaux lourds (Heavy metals) ; PC, phytochélatine ; MT, métallothionéine.

III. 4. 5. Phytoremédiation

Plusieurs stratégies de phytoremédiation peuvent être utilisées pour remédier les sols contaminés par des métaux lourds, notamment la phytostabilisation, qui consiste à utiliser des plantes pour réduire la biodisponibilité des métaux lourds dans le sol, la phytoextraction, qui consiste à utiliser des plantes pour extraire et éliminer les métaux lourds du sol, la phytovolatilisation, qui consiste à utiliser des plantes pour absorber les métaux lourds du sol et les libérer dans l'atmosphère sous forme de composés volatils, et la phytofiltration, qui consiste à utiliser des plantes hydroponiques (Das et al., 2018 ; Yan et al., 2020).

III. 4. 5. 1. Phytostabilisation

La phytostabilisation consiste à utiliser des espèces végétales tolérantes aux métaux pour immobiliser les métaux lourds sous terre et réduire leur biodisponibilité, empêchant ainsi les métaux de migrer dans l'écosystème et diminuant la probabilité que les métaux entrent dans la chaîne alimentaire. La précipitation des métaux lourds ou la réduction de la valence des métaux dans la rhizosphère, l'absorption et la séquestration dans les tissus racinaires ou l'adsorption sur les parois cellulaires des racines peuvent toutes entraîner une phytostabilisation. La croissance des plantes contribue à la préservation de la santé des sols dans les zones fortement polluées. La couverture végétale établie non seulement stabilise les métaux lourds dans le sous-sol et réduit leur lessivage dans les eaux souterraines, mais elle empêche également les

particules de sol contenant des métaux lourds d'être dispersées par le vent. Les plantes doivent être tolérantes aux métaux lourds afin de répondre aux exigences d'une phytostabilisation très efficace. Les racines des plantes doivent être denses, car elles jouent un rôle important dans l'immobilisation des métaux lourds, la stabilisation de la structure du sol et la prévention de l'érosion. Les plantes doivent être capables de produire une grande quantité de biomasses et de croître rapidement afin d'établir à temps une couverture végétale à un endroit précis. En outre, la couverture végétale doit être simple à entretenir sur le terrain (Shackira et al., 2019 ; Zine et al., 2020).

III. 4. 5. 2. Phytoextraction

La phytoextraction fait référence à l'utilisation de plantes pour absorber les contaminants du sol ou de l'eau, puis transloquer et accumuler ces contaminants dans leur biomasse aérienne. La phytoextraction est récemment apparue comme la technique de phytoremédiation la plus importante pour récupérer les métaux lourds et les métalloïdes des sols pollués. Contrairement à la phytostabilisation, dans laquelle les plantes ne retiennent que temporairement les métaux lourds qui restent sous terre, la phytoextraction est une solution permanente pour éliminer les métaux lourds des sols pollués. Par conséquent, elle est mieux adaptée à une utilisation commerciale. La phytoextraction des métaux lourds se déroule en quatre étapes : la mobilisation des métaux lourds dans la rhizosphère, l'absorption des métaux lourds par les racines des plantes, la translocation des ions de métaux lourds des racines aux parties aériennes des plantes, et la séquestration et la compartimentation des ions de métaux lourds dans les tissus végétaux (Keller et al., 2003 ; Ye et al., 2017).

Parmi ces caractéristiques, les capacités d'accumulation des métaux et la biomasse aérienne sont les facteurs les plus importants pour déterminer le potentiel de phytoextraction d'une espèce végétale. Par conséquent, deux stratégies différentes de sélection des plantes sont utilisées : l'utilisation de plantes hyperaccumulatrices, qui peuvent accumuler les métaux lourds dans les parties aériennes dans une plus grande mesure, et l'utilisation de plantes à forte production de biomasse aérienne, qui peuvent avoir des capacités d'accumulation de métaux plus faibles, mais ont une accumulation globale de métaux lourds comparable à celle des hyperaccumulatrices (Yan et al., 2020 ; Sytar et al., 2021). Les hyperaccumulateurs sont des espèces végétales qui peuvent accumuler des niveaux extrêmement élevés de métaux lourds dans leurs parties aériennes sans présenter de symptômes de phytotoxicité. Dans les mêmes conditions, un hyperaccumulateur naturel de métaux lourds peut accumuler des métaux à des

niveaux 100 fois plus élevés que les espèces communes non hyperaccumulatrices. Au sens strict, la définition d'hyperaccumulateur doit répondre aux exigences suivantes : le rapport de la concentration de métaux lourds entre les pousses et les racines est supérieur à un, ce qui indique une capacité plus efficace à transporter les métaux des racines aux pousses ; le rapport de la concentration de métaux lourds entre les pousses et le sol est supérieur à un, ce qui indique une plus grande capacité à absorber les métaux lourds du sol ; et (3) la concentration du métal dans la pousse est supérieure à 10 mg/Kg pour le Hg, à 100 mg/Kg pour le Cd et le Se, à 1 000 mg/Kg pour le Co, le Cu, le Cr, le Ni, et à 10 000 mg/Kg pour le Zn et le Mn (Rascio et al., 2011 ; Sytar et al., 2021). La recherche d'hyperaccumulateurs efficaces est une stratégie critique et simple pour une phytoremédiation réussie des métaux lourds. Jusqu'à présent, plus de 500 espèces végétales d'au moins 45 familles d'angiospermes, allant des herbes annuelles aux arbustes et arbres pérennes, ont été identifiées comme des hyperaccumulateurs de métaux. Toutefois, la majorité des plantes hyperaccumulatrices ont une croissance lente et une faible biomasse végétale, ce qui réduit l'efficacité du processus d'assainissement (Chibuike et al., 2014).

III. 4. 5. 3. Phytovolatilisation

La phytovolatilisation est une stratégie de phytoremédiation dans laquelle les plantes absorbent les polluants du sol, les convertissent en formes volatiles moins toxiques, puis les libèrent dans l'atmosphère via le processus de transpiration des plantes à travers les feuilles ou le système foliaire. Cette méthode peut être utilisée pour détoxifier les polluants organiques ainsi que les métaux lourds tels que Se, Hg et As. Comparée à d'autres stratégies de phytoremédiation, la phytovolatilisation présente l'avantage d'éliminer les contaminants de métaux lourds (métalloïdes) du site et de les disperser sous forme de composés gazeux sans qu'il soit nécessaire de récolter et d'éliminer les plantes. Cependant, en tant que stratégie d'assainissement, la phytovolatilisation n'élimine pas complètement les polluants ; ceux-ci restent dans l'environnement. Elle ne fait que transporter les polluants du sol vers l'atmosphère, où les composés volatils toxiques polluent l'air. De plus, les précipitations peuvent les redéposer sur le sol (Yan et al., 2020 ; Shen et al., 2022).

III. 4. 5. 4. Phytofiltration

La phytofiltration est le processus qui consiste à éliminer les polluants des eaux de surface ou des eaux usées contaminées en utilisant les racines des plantes (rhizofiltration), les pousses

(caulofiltration) ou les plantules (blastofiltration). Les métaux lourds sont soit adsorbés à la surface des racines, soit absorbés par les racines lors de la rhizofiltration. Les exsudats racinaires peuvent modifier le pH de la rhizosphère, entraînant la précipitation des métaux lourds sur les racines des plantes et réduisant ainsi le déplacement des métaux lourds vers les eaux souterraines. Les plantes utilisées pour la rhizofiltration sont d'abord cultivées en hydroponie dans de l'eau propre pour développer un système racinaire important, puis l'eau propre est remplacée par de l'eau polluée pour acclimater les plantes. Après l'acclimatation, les plantes sont transportées sur le site contaminé pour l'élimination des métaux lourds. Les racines sont récoltées et éliminées une fois qu'elles sont saturées. Les plantes utilisées pour la rhizofiltration doivent idéalement avoir un système racinaire dense, une production de biomasse élevée et être tolérantes aux métaux lourds (Yan et al., 2020 ; Adeoye et al., 2022).

III. 4. 5. 5. Facteurs affectant les performances de la phytoremédiation

Certains facteurs peuvent influencer ou limiter l'efficacité et l'efficience des processus de phytoremédiation. L'utilisation de plantes appropriées est essentielle au succès de la technologie de phytoremédiation. L'espèce végétale doit avoir une biomasse élevée, un taux de croissance rapide et une forte capacité à absorber et à accumuler les métaux lourds, ce qui est influencé non seulement par son génotype, mais aussi par les caractéristiques du sol, la communauté microbienne rhizosphérique, les conditions climatiques et la biodisponibilité des métaux lourds. La biodisponibilité des métaux lourds peut avoir un impact direct sur l'efficacité de la phytoextraction. Le pH, l'humidité, la matière organique, l'oxygène et d'autres facteurs du sol peuvent influencer la biodisponibilité des métaux lourds. Les métaux présents dans les sols sont généralement classés en trois fractions en fonction de leur capacité à être absorbés par les plantes : disponibles, non disponibles et échangeables. Le métal lié à la matière organique, aux oxydes ou aux carbonates de Fe-Mn, qui ne peut être extrait par les plantes, constitue la fraction échangeable. Selon divers chercheurs, le pH est le principal déterminant de la dissolution des métaux lourds dans le sol. Toutefois, en raison de la lenteur de la dissolution, un pH élevé (alcalinité) peut réduire la biodisponibilité des métaux (Shen et al., 2022).

III. 5. Phytoremédiation couplée à la bioaugmentation

L'une des méthodes les plus efficaces pour améliorer les performances des plantes dans le cadre de la phytoremédiation consiste à utiliser des bactéries bénéfiques résistantes aux métaux

lourds pour assister la phytoremédiation. La communauté bactérienne de la rhizosphère peut stimuler directement la prolifération des racines, favorisant ainsi la croissance des plantes, augmentant la tolérance aux métaux lourds et améliorant la santé des plantes. Ils ont aussi la capacité à produire des métabolites qui augmentent la biodisponibilité des métaux dans le sol. Cela peut résulter d'une croissance accrue ou équilibrée des plantes en réponse au stress lié aux métaux lourds, ou d'une biodisponibilité accrue des métaux pour une absorption facile par les plantes et les cellules bactériennes (Figure 19). Dans les communautés bactériennes rhizosphériques, les caractéristiques des PGPB, telles que la libération d'enzymes extracellulaires, de sidérophores, de phytohormones, la solubilisation de minéraux insolubles (phosphate, zinc et potassium) et la fixation de l'azote, favorisent la croissance des plantes tout en atténuant les effets néfastes des métaux lourds sur la santé des plantes (Mishra et al., 2020 ; Shen et al., 2022).

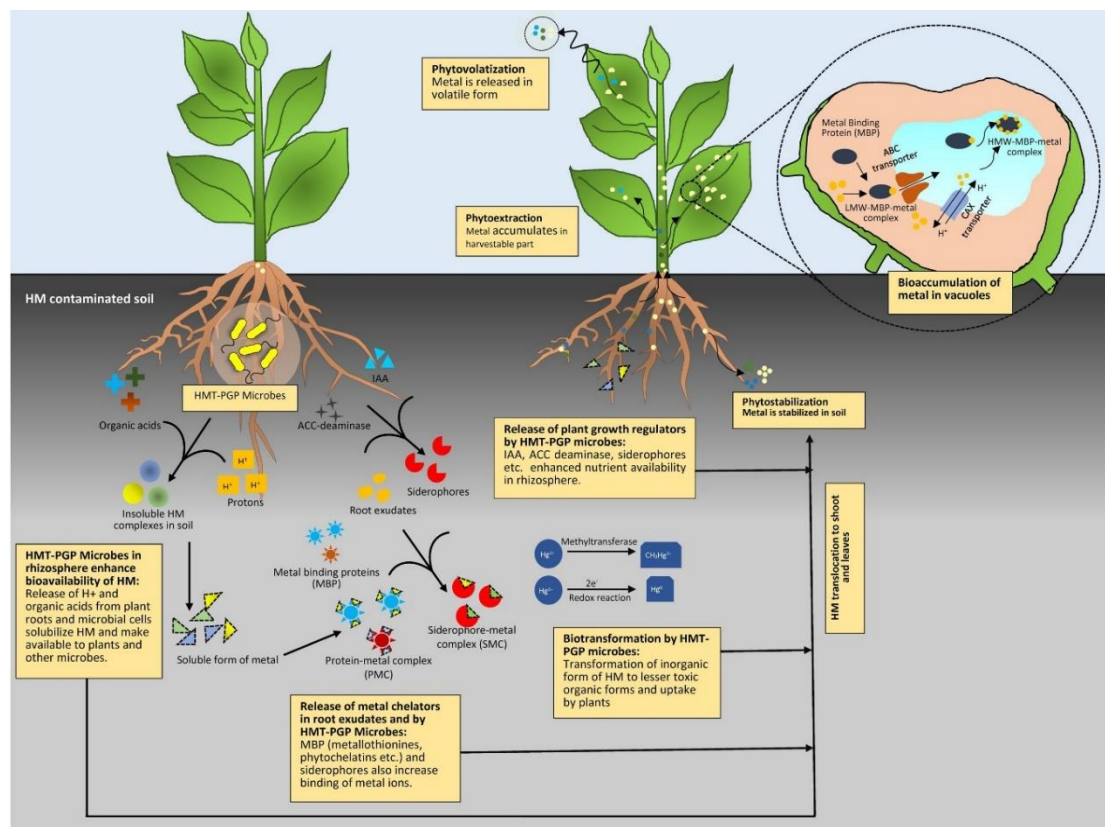


Figure 19 : Mécanismes impliqués dans la remédiation des sols contaminés par des métaux lourds HM par l'interaction entre les bactéries tolérantes aux métaux lourds et favorisant la croissance des plantes (HMT-PGP) et les plantes (Mishra et al., 2017)

Plusieurs études ont reporté la fiabilité des bactéries PGP à promouvoir la croissance des plantes exposées au stress métallique et à améliorer leur pouvoir phytoremédiateur (Tableau 5). Par exemple, *B. subtilis* SJ-101, une souche productrice d'AIA, a stimulé la croissance de *Brassica juncea* cultivé dans un sol contaminé par le Ni (Zaidi et al., 2014). De même, dans un sol contaminé au Cd, des souches productrices d'AIA tolérantes au Zn, Cu, Ni et Co ont induit une elongation rapide des racines de *B. juncea* (Belimov et al., 2005). En outre, les bactéries solubilisatrices de phosphate, productrices de sidérophores et fixatrices d'azote, contribuent à la croissance des plantes et au développement des racines en augmentant la disponibilité des nutriments et en modifiant la biodisponibilité des métaux lourds (Gupta et al., 2014 ; Wu et al., 2010). Funes Pinter et al., (2017) ont découvert qu'en présence de concentrations élevées d'As, la production de sidérophore, la solubilisation du phosphate et les activités de fixation de l'azote de *Bacillus licheniformis*, *Micrococcus luteus* et *Pseudomonas fluorescens* tolérantes à l'As augmentaient la biomasse de la vigne. Jiang et al., (2017) ont évalué l'adaptabilité environnementale des bactéries résistantes au Cd, Pb et Cu du sol rhizosphérique de *Boehmeria nivea* poussant autour des raffineries de mines, et ils ont découvert que les bactéries rhizosphériques des genres *Pseudomonas*, *Cupriavidus*, *Bacillus* et *Acinetobacter* présentaient une tolérance au Cd, Pb et Cu à des concentrations élevées. Les *Rhizobium* possèdent un large éventail de traits PGP, notamment la fixation de l'azote, la solubilisation de minéraux insolubles tels que le phosphate, la production de phytohormones, la libération de sidérophores, la production d'ACC déaminase et de composés volatils tels que l'acétoïne et le 2, 3-butanediol, ce qui en fait d'excellents candidats pour la détoxification des métaux lourds et phytoremédiation avec leurs légumineuses partenaires (Hao et al., 2014 ; Rangel et al., 2017).

Tableau 5 : Liste de quelques études dans différents sols contaminés par des métaux lourds pour améliorer la capacité de phytoremédiation en utilisant des bactéries du sol.

Plante	Bactéries	Métaux lourds	Effet	Références
<i>Medicago sativa</i> L	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> RC6b	Pb Zn Cd	RC6b increased metal uptake by 18.6–31.2 % (Pb), 23.8–37.5 % (Cd), and 26.4– 38.3 % (Zn).	(Liu et al., 2015)
<i>Trifolium arvense</i>	<i>Pseudomonas azotoformans</i> ASS1	Cu Zn Ni	ASS1 a augmenté les accumulations de Ni, Cd et Zn de 26, 51 et 63 %, respectivement.	(Ma et al., 2017)
<i>Centella asiatica</i> L.	<i>Enterobacter sp.</i> FM-1	Cd	Les teneurs en Cd dans les racines, les tiges et les feuilles des plantes inoculées avec <i>Enterobacter sp.</i> FM-1 étaient respectivement 71,5, 162,3 et 120,4 % plus élevées que celles du témoin.	(Li et al., 2018)
<i>Brassica juncea</i>	<i>Serratia</i> PRE01 <i>Arthrobacter</i> PRE05	V	Une augmentation de la biomasse (12,0-17,4 %) et de l'absorption des métaux (24,2-32,0 %) a été constatée dans les traitements inoculés.	(Wang et al., 2020 a)
<i>Brassica juncea</i>	<i>Streptomyces pactum</i>	Zn Pb Cd Cu	L'absorption de Zn (40, 14 %) et de Pb (82, 15 %) dans les pousses et les racines a augmenté. L'absorption de Cd et Cu dans les racines a augmenté de 17 et 33 % respectivement.	(Ali et al., 2017)
<i>Brassica oxyrrhina</i>	<i>Pseudomonas libanensis</i> TR1	Cu Zn	TR1 a augmenté la teneur en Cu dans <i>B. oxyrrhina</i> de 61 % par rapport au groupe témoin.	(Ma et al., 2016 b)
<i>Helianthus annuus</i>	<i>Pseudomonas libanensis</i> TR1,	Ni	L'inoculation de <i>Pseudomonas libanensis</i> TR1 a augmenté significativement l'accumulation de Ni dans <i>Helianthus annuus</i> de 38-82 %.	(Ma et al., 2019)
<i>Sedum plumbizincicola</i>	<i>Rhodococcus sp.</i> NSX2	Cd	La concentration de Cd dans les pousses a augmenté de 21,7 % avec l'inoculation NSX2.	(Hou et al., 2019)

Plante	Bactéries	Métaux lourds	Effet	Références
<i>Scirpus triqueter</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> CX-1	Ni	<i>S. triqueter</i> inoculé par <i>Klebsiella pneumoniae</i> a augmenté les taux d'élimination du Ni de 0,9 à 8,8 % (près de 9 fois).	(Zhang et al., 2020 b)
<i>Napier grass</i>	<i>Micrococcus</i> sp.	Cd	L'accumulation de Cd dans les racines et les pousses a augmenté de 1,5 et 1,6 fois avec l'inoculation de <i>Micrococcus</i> sp.	(Wiangkham et al., 2018)
<i>Glycine max</i> (Linn.)	<i>Arthrobacter</i> sp.	Cd	Les plantes inoculées par <i>Arthrobacter</i> sp. avaient une teneur en cadmium plus élevée que les plantes non inoculées, de 3,36.	(Rojjanateeranaj et al., 2017)
<i>Miscanthus sinensis</i>	<i>Pseudomonas koreensis</i> AGB-1	Pb Zn Cd Cu	Les concentrations moyennes de métaux lourds dans les racines étaient 23 % (As), 31 % (Cd), 7 % (Cu), 18 % (Pb) et 15 % (Zn), et dans les pousses étaient 31 % (As), 71 % (Cd), 61 % (Cu), 22 % (Pb) et 21 % (Zn) plus élevées que dans les plantes non inoculées.	(Babu et al., 2015)
<i>Leptochloa fusca</i> (L.)	<i>Pantoea stewartii</i> ASI11 <i>Microbacterium arborescens</i> HU33 <i>Enterobacter</i> sp. HU38	U Pb	Les consortiums bactériens ont amélioré la capacité d'absorption des métaux de 53 à 88 % pour l'U et de 58 à 97 % pour le Pb.	(Ahsan et al., 2017)
<i>Glycine max</i> (Linn.)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109 <i>Azospirillum brasilense</i> Az39	As	La stratégie de double inoculation a augmenté l'accumulation d'As (III) dans les racines de 42 % tout en diminuant la translocation d'As vers les parties aériennes, améliorant ainsi le potentiel de phytostabilisation d'As des plantes de soja.	(Armendariz et al., 2019)
<i>Phytolacca acinosa</i>	<i>Bacillus cereus</i>	Cd	Les concentrations de Cd dans les tissus végétaux ont augmenté de manière significative, de 9,7 mg Kg ⁻¹ dans les racines et de 7,4 mg Kg ⁻¹ dans les feuilles.	(Liu et al., 2022)
<i>Lolium multiflorum</i> Lam	<i>Pantoea</i> sp. PP4	Pb Cd	L'inoculation avec PP4 a augmenté l'accumulation de Pb et Cd dans <i>Lolium multiflorum</i> Lam. de 28,9 et 95,5 %, respectivement.	(WeiXie et al., 2022)

IV. Techniques d'analyse

IV. 1. Techniques d'identification des vers de terre

IV. 1. 1. Identification morphologique

L'identification morphologique des espèces de vers de terre est basée sur l'application de plusieurs étapes d'une clé taxonomique dédiée pour les vers de terre adultes. La clé taxonomique des vers de terre est présentée sous la forme d'un organigramme (Figure 20). Elle commence par les caractéristiques les plus fondamentales et devient progressivement plus spécifique à chaque niveau. Au fur et à mesure que vous progressez dans une branche de l'organigramme, vous éliminez des vers de terre jusqu'à ce qu'il n'en reste que quelques-uns à prélever (Bouché, 1972).

- Détermination de la taille : la taille de l'échantillon de ver de terre permet de déterminer si l'adulte est petit, moyen ou grand. Pour déterminer la longueur du ver de terre, le ver doit s'étendre librement comme s'il rampait, puis la distance maximale parcourue par le ver de terre lorsqu'il est complètement étiré doit être enregistrée.
- Une fois la taille du ver de terre déterminée, on détermine également la couleur de sa pigmentation. La face dorsale du ver de terre est utilisée pour déterminer sa couleur. Si la majorité des vers de terre sont de couleur unie, certains sont rayés. *Eisenia foetida*, par exemple, est une espèce rayée avec des segments rouge vif et des sillons intersegmentaires jaunes.
- Sur la face ventrale, on examine la distance entre le clitellum avec la tête (certaines espèces ont le clitellum très proche de la tête). De plus, la tumescence génitale (GT) et le motif général du tubercule pubertaire (TP) sont examinés et leur emplacement est déterminé. Les questions suivantes peuvent être posées afin de déceler plus de caractères distinctifs :
 - Toutes les GT sont-elles contenues à l'intérieur du clitellum, ou certaines se trouvent-elles à l'extérieur ?
 - Les TP sont-elles de forme triangulaire ou en barre ?
 - Les TP s'étendent-ils sur toute la longueur du clitellum ou sont-ils plus courts ?

La forme du prostomium et de la queue ainsi que la disposition des soies sont aussi des caractères qui aident à distinguer entre certaines espèces du vers de terre.

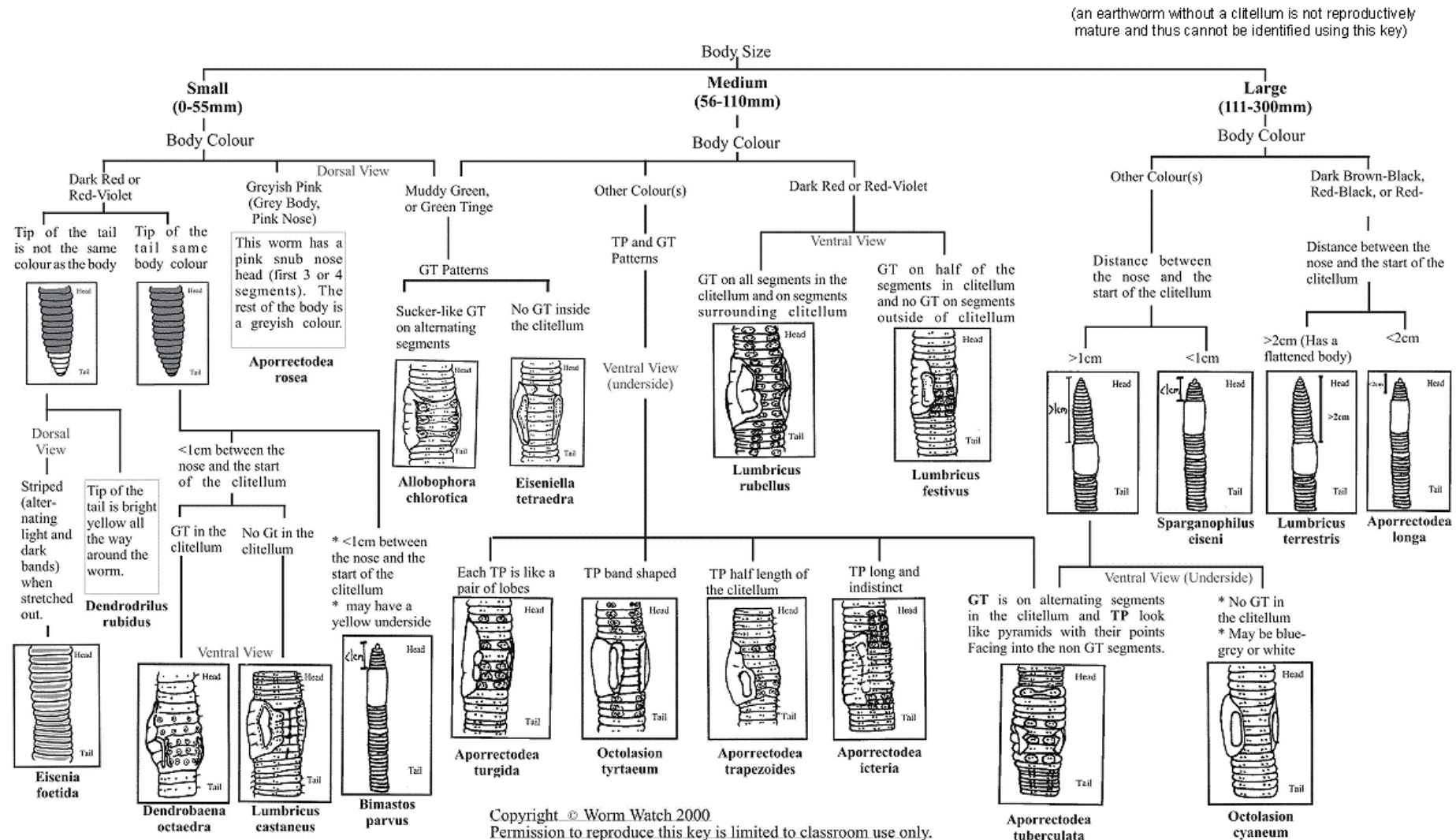


Figure 20 : Clé taxonomique d'identification du ver de terre
(https://www.naturewatch.ca/wormwatch/wp-content/uploads/sites/5/2014/09/taxonomic_key.gif)

Cette technique, cependant, prend beaucoup de temps, demande beaucoup de travail et requiert l'expertise de spécialistes qualifiés. Par conséquent, le délai d'exécution des échantillons est long. Ces difficultés sont encore exacerbées par la diminution constante du nombre de taxonomistes spécialisés disponibles et par l'obligation d'identifier les espèces uniquement à partir de spécimens adultes, qui ne représentent souvent qu'une faible proportion de l'ensemble des vers de terre (Bartlett et al., 2010).

IV. 1. 2. Identification moléculaire

L'utilisation du codage à barres de l'ADN a été l'une des premières réalisations en phylogénétique moléculaire des vers de terre (séquençage de la sous-unité I du cytochrome C oxydase, COI). Le COI a d'abord été proposé comme candidat pour un marqueur moléculaire universel, et elle a ensuite été acceptée dans ce rôle pour la majorité des taxons animaux en raison de la robustesse de ses amorces universelles et de la large gamme de signaux phylogénétiques, qui permet de distinguer des espèces étroitement apparentées et des lignées génétiques au sein d'une même espèce. L'utilisation de cet outil a permis de découvrir la présence généralisée de lignées cryptiques au niveau de l'espèce chez les *Lumbricidae*, un modèle qui s'est avéré par la suite être la norme dans différentes familles de vers de terre. Les codes-barres COI ont un fort potentiel pour les analyses phytogéographiques, qui nécessitent une représentation diversifiée d'individus de différentes populations pour déduire la diversité génétique et les modèles de dispersion. Bien que le code-barres COI soit un outil pratique utilisé individuellement, d'autres marqueurs moléculaires mitochondriaux (tels que COII, ARN_r 16S, ARN_r 12S et ND1) et nucléaires (tels que ARN_r 28S ou ARN_r 18S) ont montré des limites similaires. Leur combinaison dans des analyses phylogénétiques multigènes ou multilocus a amélioré la capacité de l'analyse phylogénétique à retrouver des espèces étroitement liées au sein de clades monophylétiques, révélant même certaines relations au-dessus du niveau du genre (ou même de la famille) (Sun et al., 2007 ; Pérez-Losada et al., 2012 ; Marchán et al., 2022). L'analyse du génome mitochondrial est une alternative intrigante à l'analyse phylogénétique multigénique en tant que source de plusieurs marqueurs moléculaires avec l'avantage supplémentaire d'établir l'ordre des gènes. Outre les avantages d'une résolution supérieure à l'espèce en raison d'un nombre accru de marqueurs et de réarrangements rares, les génomes mitochondriaux ignorent les informations nucléaires, ce qui pourrait être problématique en cas de tri incomplet des lignées ou d'hétéroplasie (Shekhovtsov et al., 2019 ; Zhang et al., 2020 c ; Liu et al., 2021 a).

IV. 2. Techniques d'étude des bactéries du sol

Depuis des décennies, la complexité des habitats du sol s'est avérée être un obstacle important à surmonter pour les microbiologistes. En conséquence, la recherche en microbiologie s'est fortement appuyée sur la capacité de cultiver et de maintenir des microorganismes en laboratoire. Malheureusement, seul 1 % environ de toutes les bactéries du sol sont actuellement cultivables. Bien que de nombreuses nouvelles approches moléculaires aient été utilisées pour étudier la biodiversité et le rôle des bactéries dans le sol, la culture est toujours utile pour comprendre le métabolisme détaillé et les fonctions de ces microorganismes, ainsi que pour rendre possible la manipulation génétique, confirmant certaines fonctions. Malheureusement, nous ne disposons pas des connaissances nécessaires pour créer des environnements naturels pour tous les microorganismes. Les milieux de culture sont souvent incapables de simuler les conditions abiotiques et biotiques endogènes nécessaires à la croissance microbienne, et les bactéries sont incapables de s'adapter immédiatement à ces changements de conditions (Kirk et al., 2004 ; Pham et al., 2012 ; Priya et al., 2021).

IV. 2. 1. Techniques basées sur la culture des bactéries

Des bactéries spécifiques au sol peuvent être isolées d'une grande variété de sols à l'aide de techniques de culture. Les cellules bactériennes sont libérées de la surface des particules et des agrégats du sol à l'aide d'eau stérile, de la solution de Winogradsky ou d'une solution saline physiologique (0,85 % de NaCl). Les suspensions de sol sont diluées à une concentration appropriée après extraction. La culture des suspensions se fait ainsi sur un milieu de culture, qui est une préparation solide ou liquide utilisée pour cultiver, transporter et conserver des microorganismes. Bien que toutes les bactéries aient besoin de sources d'énergie ainsi que de macro - et micronutriments, la composition précise d'un milieu approprié dépend de l'espèce cultivée en raison de la grande diversité des besoins nutritionnels. Comme ses besoins en nutriments reflètent son environnement naturel, la connaissance de l'habitat normal est souvent utile pour sélectionner un milieu de culture approprié (Paul, 2007).

Bien qu'il existe des milliers de compositions de milieux de culture microbiens, la microbiologie repose essentiellement sur deux grandes catégories de milieux de culture : les milieux définis et les milieux complexes. Des produits chimiques inorganiques ou organiques purs sont ajoutés en quantités précises à de l'eau distillée pour créer des milieux définis. Par conséquent, la composition précise d'un milieu défini est connue (tant sur le plan qualitatif que

quantitatif). La source de carbone est essentielle dans tout milieu de culture, car toutes les cellules ont besoin de grandes quantités de carbone pour régénérer du nouveau matériel cellulaire. Le type de source de carbone utilisé et sa concentration sont déterminés par l'organisme à cultiver. Certains milieux définis sont dits "simples" en raison de la présence d'une seule source de carbone. Il n'est pas nécessaire de connaître la composition exacte d'un milieu lorsqu'on cultive un grand nombre de microorganismes. Les milieux complexes peuvent suffire dans ces cas et peuvent même être avantageux. Les milieux complexes sont composés de digests de microorganismes, d'animaux ou de plantes, comme les protéines du lait (caséine), le bœuf (extrait de bœuf), le soja (bouillon de soja tryptique), les cellules de levure (extrait de levure) ou toute autre substance hautement nutritive. Disponibles commercialement sous forme déshydratée, ces digests ne nécessitent qu'une hydratation avec de l'eau distillée pour former un milieu de culture. L'inconvénient d'un milieu complexe, en revanche, est que sa composition nutritionnelle précise est inconnue. On crée parfois des milieux de culture sélectifs ou différentiels (ou les deux). Un milieu sélectif contient des composés qui inhibent la croissance de certains microorganismes tout en permettant à d'autres de se développer. Des milieux sélectifs sont disponibles dans le commerce pour l'isolement de certaines bactéries communes. Un milieu différentiel est un milieu qui contient un indicateur (généralement un colorant) qui change de couleur lorsqu'une réaction métabolique spécifique se produit pendant la croissance (Madigan et al., 2021).

L'impossibilité de maintenir un environnement de croissance naturel est l'obstacle le plus important à la croissance bactérienne dans les milieux de laboratoire, et le manque de connaissances sur des facteurs tels que le taux de croissance, la température appropriée et les conditions nutritives pour la croissance rendent certaines bactéries non cultivables. Les méthodes traditionnelles de culture bactérienne mettent l'accent sur l'utilisation de milieux riches en nutriments et sur la création d'un environnement qui favorise la croissance rapide des bactéries. En revanche, les milieux riches en nutriments peuvent être toxiques pour les microorganismes qui se développent dans des environnements pauvres en nutriments, comme le sol. Il a été démontré que les méthodes traditionnelles favorisent les bactéries à croissance rapide tout en sous-estimant les bactéries à croissance plus lente. En outre, certains organismes peuvent avoir besoin d'agents indicateurs spécifiques (comme un signal) pour révéler la présence d'un environnement approprié dans lequel ils peuvent commencer à se développer. Certaines bactéries ne peuvent survivre que si elles sont entourées d'organismes et d'agents auxiliaires. Le fer est solubilisé par des agents auxiliaires comme les sidérophores, ce qui le

rend disponible pour les microorganismes qui ne peuvent pas survivre sans lui. De même, en éliminant le stress oxydatif, certains organismes auxiliaires peuvent protéger d'autres organismes des effets toxiques de l'environnement. Sans l'aide d'agents et d'organismes auxiliaires dans l'environnement de croissance, ces bactéries dépendantes des agents auxiliaires sont incapables d'effectuer des activités métaboliques essentielles. L'interaction entre les communautés microbiennes et leur métabolisme est essentielle pour leur prolifération dans la nature, et elle est influencée par une variété de facteurs physiologiques tels que les nutriments, le pH, les conditions osmotiques, la température et une variété d'autres facteurs (Chaudhary et al., 2019).

IV. 2. 2. Techniques d'étude moléculaire

Les approches culturelles traditionnelles ont révélé le rôle indéniable du microbiome rhizosphérique dans la productivité des plantes, mais les techniques de compréhension des organismes non cultivables et de leur écologie nécessitent une approche multicouche. Les écologistes ont pu corrélérer les rôles fonctionnels du microbiote dans leurs écosystèmes grâce aux progrès des techniques moléculaires et des études "omics". La grande diversité des données générées par des analyses communautaires à grande échelle telles que BIOLOG, l'analyse des acides gras phospholipidiques (PLFA), l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE) et les tests d'hybridation de l'ADN a toujours attiré l'attention. Afin de comprendre cette écosphère complexe, les chercheurs ont utilisé une combinaison de diverses méthodes moléculaires pour étudier des cellules uniques et la communauté entière ont été développées (Priya et al., 2021). La métagénomique a le potentiel de débloquent la vaste diversité bactérienne non cultivée présente dans le sol afin de découvrir de nouvelles molécules pour des applications biotechnologiques et agricoles durables. Bien que cette technique n'ait révélé que la " pointe de l'iceberg " de la dynamique des communautés bactériennes de divers environnements, y compris la rhizosphère, elle a permis d'accéder à des informations qui aident à comprendre la biologie et l'évolution des bactéries, quel que soit leur statut de culture (Gupta et al., 2018 ; Bakshi et al., 2020 ; Priya et al., 2021).

IV. 3. Techniques d'identification des bactéries

L'identification correcte des souches bactériennes isolées est une partie importante des pratiques microbiologiques. En raison de leurs différentes constitutions génomiques, toutes les souches bactériennes présentent des caractéristiques distinctes. Ce trait distinctif des cellules

microbiennes se reflète également lors de la culture *in vitro* sur des boîtes de Pétri, où elles se développent sous forme de colonies. Comme chaque colonie isolée représente une culture pure ou axénique d'une souche bactérienne spécifique, elle se distingue également par sa couleur, sa taille, son élévation, la douceur ou la rugosité de ses surfaces, son étalement, etc. En outre, la culture sur des milieux sélectifs ou différentiels produit des caractéristiques distinctes. Cependant, l'identification précise d'un genre spécifique reste nécessaire, ce qui peut être accompli par l'utilisation de tests biochimiques spécifiques. Ces tests biochimiques sont basés sur le fait que chaque type de bactérie réagit différemment et donne différents types de résultats positifs ou négatifs en raison de ses propriétés métaboliques spécifiques.

L'identification des bactéries a été révolutionnée par les méthodes de microbiologie moléculaire. Elle est non seulement plus rapide et plus exacte, mais aussi plus précise et largement utilisée. Elle permet également d'identifier des souches difficiles à cultiver en laboratoire. La sous-unité 30S du ribosome bactérien est composée de l'ARNr 16S et de nombreuses autres protéines. Le gène qui code pour l'ARNr 16S est hautement conservé parmi les bactéries, car il est nécessaire à l'assemblage du ribosome. Il possède également certaines régions variables qui servent de signature pour les espèces bactériennes. En raison de ces caractéristiques, le gène de l'ARNr 16S est devenu un fragment d'ADN/gène idéal et nécessaire pour l'identification des bactéries, les études comparatives et phylogénétiques et la classification (Chauhan et al., 2020 b).

IV. 4. Techniques de mise en évidence des performances de PGPB

Malgré le fait que les capacités des bactéries à agir comme promoteurs de croissance des plantes peuvent être déterminées à l'aide de méthodes moléculaires par la présence de gènes fonctionnels dans le génome bactérien, les méthodes basées sur la culture pour cribler et évaluer qualitativement et quantitativement leurs performances sont largement adoptées. Plusieurs méthodes ont été publiées au cours de la dernière décennie pour évaluer le potentiel des bactéries à solubiliser des minéraux, leur capacité à produire plusieurs phytohormones et molécules bioactives, ainsi que leur capacité à fixer l'azote, produire et oxyder l'ammonium.

Pour évaluer le potentiel de solubilisation des minéraux des bactéries, on utilise la méthode traditionnelle consistant à cultiver les bactéries sur un milieu minimal contenant des minéraux insolubles des nutriments présents en milieux de culture comme source unique de cet élément

et à évaluer leur capacité à produire une zone de clairance autour de la colonie. Le diamètre de la zone de clairance est proportionnel à sa capacité de solubilisation des minéraux. Les éléments solubilisés peuvent être estimés dans des milieux minimaux liquides contenant des formes insolubles des éléments testés en utilisant la spectroscopie d'absorption atomique (par exemple, le zinc et le potassium) ou la spectrophotométrie (par exemple, la quantité de phosphate libéré dans la solution est déterminée en mesurant la réduction du complexe phosphomolybdate, de couleur bleue, qui est directement proportionnelle à la quantité de phosphate soluble) (Amaresan et al., 2022).

La synthèse bactérienne de la phytohormone auxine est connue depuis longtemps et l'acide indole-3-acétique (AIA) représente l'auxine la plus abondante dans la nature. L'AIA est synthétisé par deux voies différentes : le tryptophane est converti en AIA par désamination en acide indole-3-pyruvique, suivie d'une décarboxylation en indole-3-acétaldéhyde, qui est ensuite oxydé en AIA ; le tryptophane est décarboxylé en indole-3-acétamide, qui est ensuite hydrolysé en AIA. Des méthodes colorimétriques et chromatographiques sont utilisées pour détecter l'AIA produit par les plantes et les micro-organismes, mais les méthodes colorimétriques sont plus couramment utilisées. La détection et la quantification de production de l'AIA par les bactéries se font par l'ajout du tryptophane, précurseur clé pour la synthèse de l'AIA, au milieu de culture liquide (Luria Bertani LB, bouillon nutritif NB, extrait de levure mannitol YEM). Un test colorimétrique utilisant le réactif de Salkowski est couramment utilisé pour la détection et la quantification de l'AIA. Le réactif de Salkowski est un mélange de chlorure ferrique 0,5 M (FeCl_3) et d'acide perchlorique 35 % (HClO_4) qui, lorsqu'il est combiné à l'AIA, produit une couleur rose due à la formation de complexes d'AIA et à la réduction du Fe^{3+} . La présence de divers composés indoliques comme sous-produit du métabolisme du tryptophane est indiquée par la couleur produite par la réaction positive qui peut être quantifiée par spectrophotométrie (Brunoni et al., 2019 ; Gang et al., 2019).

Les bactéries productrices de sidérophores ont suscité l'intérêt des chercheurs en raison de leur utilisation répandue comme agents de biocontrôle et de bioremédiation. Le test du chrome azurol S (CAS), une méthode colorimétrique universelle qui détecte les sidérophores quelle que soit leur structure, est utilisé pour produire des sidérophores. Dans les milieux de culture, le chromazurol S (CAS) et le bromure d'hexadécyltriméthylammonium (HDTMA) sont utilisés comme indicateurs. Le complexe CAS/HDTMA forme une liaison étroite avec le fer ferrique, ce qui donne une couleur bleue. Lorsqu'un chélateur de fer puissant, tel qu'un sidérophore, est

produit dans le milieu de culture, il élimine le fer du complexe colorant et fait passer la couleur du bleu à l'orange, indiquant ainsi un résultat positif de la production des sidérophores (Louden et al., 2011 ; Amaresan et al., 2022).

IV. 5. Techniques de la mise en évidence de la résistance aux métaux lourds

La résistance des bactéries aux métaux lourds est généralement établie par la détermination des CMI (concentrations minimales inhibitrices) des métaux lourds pour les souches bactériennes, qui peut être étudiée à l'aide de milieux solides ou liquides. La majorité des études utilisent un milieu de culture qui favorise le mieux la croissance des bactéries. Souvent, des concentrations croissantes de sels de métaux lourds sont ajoutées au milieu, et la CMI correspond à la plus faible concentration qui inhibe la croissance bactérienne. Cette approche présente un certain nombre d'inconvénients. La capacité des bactéries à fixer les métaux, la chélation à divers composants du milieu et la formation de complexes peuvent toutes entraîner une diminution de l'activité des métaux libres. Par conséquent, l'activité d'un ion métallique libre, qui est généralement considéré comme l'espèce métallique toxique responsable de la réaction microbienne du métal, se rapproche rarement de la concentration totale de métal ajoutée au milieu. La sorption ou la chélation des métaux sur des composés organiques non spécifiés présents dans la majorité des milieux biologiques est particulièrement importante. Malgré ces limites, la technique CMI reste une méthode viable pour évaluer l'effet des métaux lourds sur l'activité bactérienne, à condition d'utiliser un milieu à teneur minimale en sel et à faible concentration en phosphate pour éviter la formation des complexes et la précipitation des ions métalliques (Hassen et al., 1998 ; Nath et al., 2019). Récemment, des approches moléculaires ont été utilisées par analyse PCR du génome bactérien afin de déterminer les gènes de résistance aux métaux, tels que *cadB*, *chrA*, *copAB*, *pbrA*, *merA* et *NiCoT* liés à la résistance et à la détoxification du cadmium, du chrome, du cuivre, du plomb, du mercure et du nickel, respectivement (Das et al., 2016 ; Dweba et al., 2019).

IV. 6. Techniques d'inoculation des plantes par des bactéries multibénéfiques

Les méthodes d'inoculation introduisent des bactéries polyvalentes dans les plantes hôtes et influencent l'établissement et la persistance des populations bactériennes dans la rhizosphère, ainsi que leurs effets promoteurs de croissance. L'inoculation doit être effectuée aussi près que

possible de la rhizosphère en raison de l'incapacité des bactéries à se déplacer du site d'inoculation vers la rhizosphère, car les bactéries ne sont généralement pas mobiles dans le sol. La réponse de la plante à l'inoculation bactérienne dépend de la colonisation des racines, qui varie en fonction de la multiplication et de la distribution des bactéries dans la rhizosphère, de l'antagonisme microbien, de l'humidité du sol, du pH, de la température, de l'hôte, des exsudats racinaires et de l'état physiologique de la plante. La diminution de la population bactérienne après inoculation pourrait être attribuée à des difficultés d'adaptation à leur nouvel environnement. Les exsudats racinaires, quant à eux, jouent un rôle important dans la croissance bactérienne. La diversité structurelle et fonctionnelle des communautés de microorganismes est influencée par une variété de facteurs biotiques et abiotiques. Ainsi, les microorganismes provenant d'associations végétales spécifiques à un site doivent être évalués et sélectionnés. L'objectif est d'optimiser l'inoculant pour une utilisation dans la production végétale. Les caractéristiques physiologiques de l'organisme inoculant déterminent en grande partie son devenir et son activité dans le sol. L'inoculation peut se faire avec un seul isolat ou avec plusieurs isolats, ce qui est connu sous le nom de co-inoculation. Les microorganismes interagissent de manière synergique dans la co-inoculation, ce qui augmente l'efficacité de l'inoculation et permet d'améliorer le développement des plantes (Lopes et al., 2021 ; Rakshit et al., 2021). Les plantes sont inoculées avec des bactéries bénéfiques à l'aide de diverses techniques, notamment l'inoculation des graines, des racines et du sol (Figure 21).

IV. 6. 1. Inoculation des semences

La méthode d'inoculation des semences avec des bactéries bénéfiques est une alternative aux traitements chimiques des semences. Elle consiste à immerger la graine dans une concentration connue de solution bactérienne. La germination des graines produit une grande quantité de glucides et d'acides aminés sous forme d'exsudats de graines. Ainsi, les organismes introduits dans le sol avec les graines inoculées utilisent les exsudats comme source de nutrition et colonisent les racines dès leur émergence. L'interaction bactérienne avec les racines des plantes influence le niveau des phytohormones produites par les plantes. Les phytohormones sont des composés organiques qui régulent la croissance des plantes et peuvent induire la tolérance des plantes à une variété de stress biotiques et abiotiques. Les bactéries colonisent les tissus végétaux et produisent des phytohormones telles que la gibbérelline, qui favorise la germination (O'Callaghan, 2016).

IV. 6. 2. Inoculation des racines

La technique d'inoculation des racines est réalisée en immergeant les racines dans une solution de microorganismes. Après l'inoculation, la plantule est plantée sur le substrat approprié pour son développement. Comme l'inoculation peut être effectuée sur des plantules de taille similaire, cette méthode permet de standardiser la taille des plantes. Un autre avantage de cette méthode d'inoculation est que l'inoculum entre en contact direct avec les racines de l'hôte, ce qui améliore la colonisation des racines. Cette méthode s'applique de préférence aux espèces végétales à propagation asexuée, car le PGPB a la capacité de synthétiser des phytohormones de croissance telles que l'auxine, qui, en plus de favoriser la croissance des plantes, peuvent également atténuer les phytopathogènes qui menacent la survie des plantes après leur plantation (Lopes et al., 2021).

IV. 6. 3. Inoculation du sol

La méthode d'inoculation du sol consiste à introduire directement le PGPB dans le sol par trempage et incorporation. Une solution de bactéries est ajoutée au sol aussi près que possible des racines de l'hôte. Ceci est nécessaire, car le PGPB sera capable d'effectuer plusieurs fonctions critiques pour promouvoir le développement des plantes dans la rhizosphère, comme la solubilisation du phosphate, la synthèse des sidérophores et la synthèse des phytohormones. L'inoculation du sol est utile pour introduire un grand nombre de bactéries viables. La charge microbienne élevée de l'inoculation du sol élimine bon nombre des contraintes associées à d'autres techniques connexes. L'inoculation du sol réduit le risque que les inoculant souhaités soient emportés par les machines de semis (Rakshit et al., 2021).

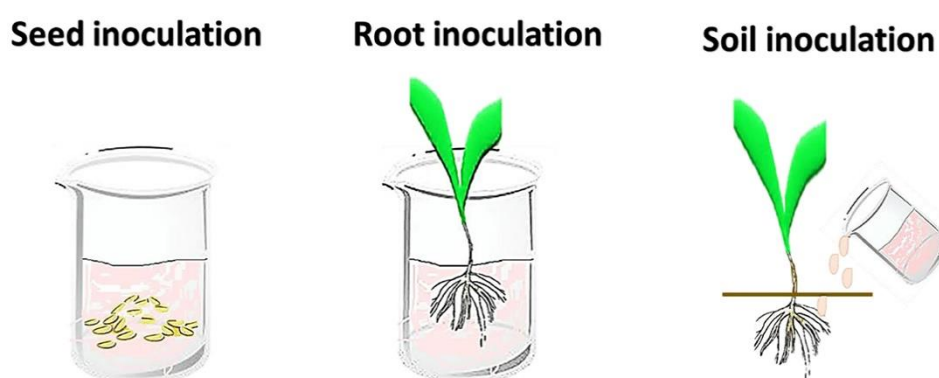


Figure 21 : Méthodes d'inoculation de bactéries favorisant la croissance des plantes dans la plante hôte (Lopes et al., 2021).

Deuxième partie :

partie pratique

Chapitre 1 : Matériel et Méthodes

I. Caractérisation des vers de terre

I. 1. Récolte des échantillons

Des vers de terre adultes ont été collectés près d'un barrage d'eau dans la région d'Akrach (Figure 22) — Rabat, Maroc (latitude : 33° 97' 94N, longitude : 6° 46 — 43 W). Ils ont été prélevés à une profondeur de 20-30 cm, puis mis dans des pots pour être transportés pour analyses au laboratoire de notre équipe « LAPSE » à l'ENS — Rabat, Maroc.

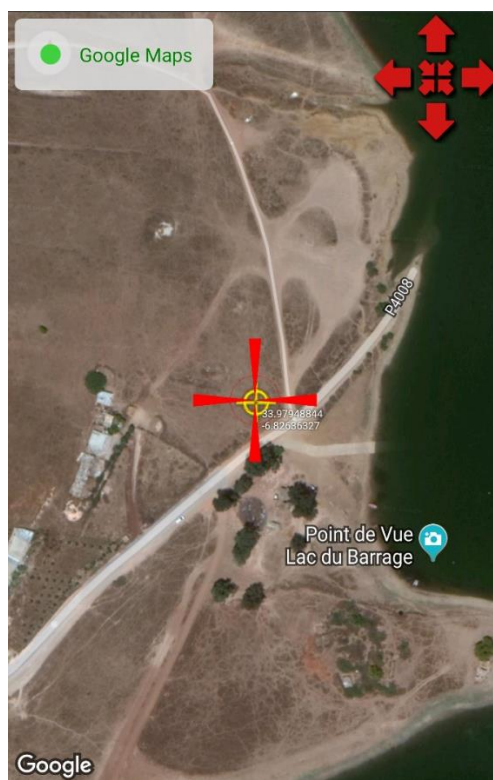


Figure 22 : Carte du lieu d'échantillonnage des vers de terre avec les coordonnées géodésiques. Image prise par l'application Mobile Topographer

Tous les vers de terre échantillonnés étaient placés dans des pots en terre cuite, contenant du sol à une température de 20 °C dans l'obscurité, un niveau d'humidité était assuré par un torchant imbibé d'eau recouvrant les pots. Pour un stockage pendant une longue durée, les vers de terre ont été nourris avec des flocons d'avoine ou de la salade une fois par semaine.

I. 2. Identification morphologique de l'espèce de ver de terre

Avant l'identification moléculaire, une identification préliminaire des vers de terre était effectuée sur la base de caractéristiques externes décrites par Bouché (1977). Différents critères sont utilisés au cours de l'identification : la forme du prostomium, la disposition des soies, la forme, la longueur et l'emplacement du clitellum et du puberculum (*Tuberculata puberculum*), et la forme de la queue.

I. 3. Identification moléculaire de l'espèce du vers de terre

Après avoir lavé les vers de terre avec de l'eau désionisée, chaque spécimen a été stocké dans de l'éthanol absolu et l'ensemble des échantillons ont été envoyé en Espagne, pour une identification moléculaire réalisée par « Grupo de Ecoloxía Animal (GEA) », Université de Vigo — Espagne. Le codage à barres de l'ADN contribue à la discrimination des espèces, à l'identification de nouveaux taxons, à la reconstruction de phylogénies et à l'évaluation de la biodiversité chez les vers de terre.

En résumé, l'extraction de l'ADN génomique total a été faite à partir des échantillons de tissus de vers en utilisant le kit DNAeasy Tissue (Qiagen). Les amorces répertoriées dans le tableau 6 ont été utilisées pour amplifier les gènes des marqueurs moléculaires mitochondriaux : l'ARNr 16S, de la NADH déshydrogénase (ND1), de la sous-unité I de la cytochrome oxydase (COI) et le marqueur nucléaire l'ARNr 28S.

Tableau 6 : Séquences d'amorces et longueur (pb) des régions géniques amplifiées, utilisées dans l'identification moléculaire des vers de terre (Pérez-Losada et al., 2009)

Séquences d'amorce	Longueur (pb)
28s-RD3.3f : 5'-GAA GAG AGA GTT CAA GAG TAC G-3'	952
28s-rD5b : 3'-CCA CAG CGC CAG TTC TGC TTA C-5'	
16S-tRNA F2 : 5'-CGA CTG TTT AAC AAA AAC ATT GC-3'	869
16S-tRNA R2 : 3'-GTT TAA ACC TGT GGC ACT ATT C-5'	
tRNA-ND1 F2 : 5'-GAA TAG TGC CAC AGG TTT AAA C-3'	947
tRNA-ND1 R1b : 5'-TTA ACG TCA TCA GAG TTA TC-3'	
COI F LCO1490 : 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'	710
COI R HC012198 : 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'	

La réaction PCR (40 μ L) consistait en un Master Mix (38 μ L) contenant : H₂O PCR = 28,2 μ L, Primer F (10 μ M) = 2 μ L, Primer R (10 μ M) = 2 μ L, Buffer Biotools (10x) : Mg = 4 μ L, dNTPs = 0,8 μ L, Biotools Polymérase (1 U/ μ L) = 1 μ L, et 2 μ L de matrice d'ADN. Le protocole de thermo cyclage comprenant une dénaturation initiale à 95°C (3 min), 40 cycles de dénaturation à 94°C (30 sec), une hybridation à 45°C (45 sec) et une extension à 72°C (1 min), suivi d'une extension finale à 72°C (5 minutes).

Une fois la PCR effectuée, on vérifie que les gènes se sont amplifiés au moyen d'électrophorèse (100 V, 45 minutes) sur gel d'agarose à 1,5 %. Des contrôles négatifs ont été inclus pour détecter une contamination potentielle, les bandes d'ADN ont été purifiées à l'aide d'un kit Millipore MultiScreen PCR196.

En suivant le protocole de séquençage de cycle standard, des séquences automatisées ont été générées dans les deux sens à partir de différents passages sur un séquenceur automatisée Applied Biosystems (ABI) 377XL en utilisant le kit ABI Big-dye Ready-Reaction. Tous les produits PCR ont produit des chromatogrammes de nucléotides non ambigus (Pérez-Losada et al., 2009).

I. 4. Préparation des extraits de vers de terre

I. 4. 1. Extraits bruts

Afin d'examiner l'effet des extraits de vers de terre sur la croissance des microorganismes du sol, deux types d'extraits bruts ont été préparés, un avec des vers fraîchement récoltés et l'autre avec des vers mis à jeûne et dépourvus de leur contenu digestif. De ce fait, les vers de terre échantillonnés ont été répartis en deux lots :

- Le premier lot de vers de terre fraîchement récoltés (VF) d'un poids frais de 100g est immergé dans du méthanol pur puis placé directement dans une étuve à 70°C pendant trois jours. Après séchage complet, les vers ont été broyés dans un mortier jusqu'à l'obtention d'une poudre. La préparation de l'extrait VF a été réalisée à l'étuve (70 °C) par macération dans des bains successifs d'eau distillée chaude. Après avoir récupéré délicatement le macérat brun (surnageant) de chaque macération, les bains de macération ont été répétés jusqu'à ce que le macérat final devienne transparent. Les macérats successifs ont été recueillis puis filtrés deux fois, d'abord sur du coton de verre puis sur du papier Whatman.

Le filtrat a été évaporé dans une étuve à une température de 70°C puis pesé pour déterminer son poids sec. Ce résidu sec, entièrement soluble dans l'eau, représentait l'extrait brut du lot VF.

- Les vers de terre du deuxième lot, désignés VJ, ont été rincés minutieusement à l'eau distillée puis mise à jeûne pendant 8 à 10 jours dans des pots en terre cuite vides sans nourriture ni terre. À la fin du jeûne, les vers de terre ont été rapidement rincés et séchés. Selon le même protocole réalisé pour le lot VF, 100 g de ce lot VJ ont été immergés dans du méthanol pur. Puis, la poudre de la matière soluble extraite des vers à jeûne « VJ » a été récupérée.

Les extraits bruts VF et VJ ont été stockés à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

I. 4. 2. Excrétions cutanées (EXC)

L'obtention des excrétions cutanées des vers de terre a été faite en suivant la technique d'électrostimulation mise au point par notre laboratoire (Raouane and El Harti 2020) qui comporte trois étapes : une préstimulation, une stimulation sensu stricto et une étape finale post-stimulation.

- Préstimulation : c'est le stade où les vers de terre jeûnent pendant 8 à 10 jours. Cette étape est essentielle, car elle empêche les excrétions cutanées d'interférer avec le contenu du tube digestif des vers de terre, qui sont rejetés via les orifices anaux et oraux lors de la stimulation électrique. Un nouveau lot de vers de terre était dépourvu de sol et de nourriture et afin d'éviter la déshydratation, les pots contenant les vers à jeûne ont été enveloppés dans un tissu de coton humifié. Tous les deux jours, les vers sont transférés dans un autre pot et recouverts avec un nouveau tissu humifié. La procédure a été répétée quatre à cinq fois jusqu'à ce que les excrétions solides soient épuisées. A la fin de ce stade les vers de terre ont été rapidement rincés à l'eau distillée.
- Stimulation sensu stricto : le lot de vers de terre de la période de jeûne a été divisé en 5 à 10 petits lots en fonction du volume du récipient d'excitation du dispositif de stimulation électrique (100 à 200 mL). La contraction des vers de terre entraîne une production massive d'excrétions cutanées. Chaque petit lot de vers a été immergé dans 20 à 40 mL d'eau distillée, en fonction de la taille du récipient d'excitation. Les électrodes ont été immergées dans de l'eau contenant les vers de terre et connectées à un générateur de courant de type

stimulateur à double impulsion. Enfin, chaque petit lot a été soumis à 5 minutes de stimulation électrique à une tension de 20 V et une fréquence de 100 stimulations par seconde.

- Post-stimulation : Après chaque stimulation sensu stricto, chacun des petits lots a été transféré dans un autre récipient et rincé à l'eau distillée pour éliminer tout les résidus des excréctions cutanées collantes aux vers. Toutes les excréctions cutanées des conteneurs d'excitation et de l'eau de rinçage ont été collectées puis évaporées dans une étuve à 70 °C jusqu'à ce que le poids sec se stabilise. Ces excréctions (EXC) ont été stockées à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

I. 5. Effet des extraits de vers de terre sur la croissance des levures

I. 5. 1. Préparation de milieux de culture exclusivement à partir d'extraits de vers de terre

- Milieux à base d'extraits de vers frais et vers à jeûne : 3 g d'extrait de vers (VF ou VJ) sont mis en suspension dans 100 mL d'eau distillée. Les deux solutions obtenues constitueront les solutions mères VF et VJ, à partir desquelles seront préparés par dilutions successives à ½ les milieux de culture finaux VF et VJ à différentes concentrations comme indiquées dans le tableau 7.
- Milieux à base d'excréments cutanés (EXC) : Une solution mère de 100 mL a été préparée à partir de 1 g de résidu sec d'EXC. Par dilutions successives de moitié de cette solution, des milieux de culture ont été préparés à des concentrations précisées au niveau du Tableau 7.

Le pH des différents milieux a été ajusté à $5,6 \pm 0,2$, l'Agar bactériologique (Biokar) est ajouté à $1,5 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$ puis les milieux sont autoclavés à 121 °C pendant 15 min.

Tableau 7 : Concentration en matière sèche par milieu de culture à base d'extraits de vers de terre

Milieux	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇
Concentration en extraits bruts (g 100 mL ⁻¹)	3	1,5	0,75	0,375	0,187	0,0937	0,0468
Concentration en excréments (g 100 mL ⁻¹)	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	0,015

I. 5. 2. Milieu de culture conventionnel

Sabouraud Dextrose Agar (SDA, HIMEDIA) a été utilisé comme milieu de contrôle. Il contient 4 g de dextrose, 1 g de peptone et 1,5 g d'Agar pour 100 mL. Le pH a été ajusté à $5,6 \pm 0,2$ et le milieu a été autoclavé pendant 15 minutes à 121° C.

I. 5. 3. Culture de levures et évaluation de la croissance

Deux espèces de levures ont été utilisées pour évaluer la performance de nos extraits :

- *Candida tropicalis* : provient de la collection de souches cliniques de l'Institut Supérieur des Professions infirmières et des Techniques de Santé (ISPITS) à Rabat-Maroc.
- *Filobasidium uniguttulatum* : a été isolé, du sol où les vers de terre ont été récoltés, dans le laboratoire de notre équipe : (LAPSE) à l'ENS-Rabat (Maroc). Ensuite, l'identification a été faite par l'analyse de séquence de l'ADNr 18S ribosomal, au Centre National de la Recherche Scientifique et Technique (CNRST) à Rabat-Maroc.

Des inocula des deux levures ont été préparés afin d'obtenir une suspension donnant un nombre de colonies dénombrables compris entre 30 et 300. Puis sur chaque milieu de culture solide SDA et VF ou VJ ou EXC à différentes concentrations, 0,1 mL de l'inoculum a étéensemencé à l'aide d'étaioirs stériles en trois répétitions. Les boîtes de Pétri ont été incubé pendant 72 heures à 30 °C et 26 °C pour *Candida tropicalis* et *Filobasidium uniguttulatum*, respectivement, ensuite, la croissance a été évaluée pour chaque milieu, en comptant le nombre de colonies formées par boîte de Pétri.

II. Isolement, identification moléculaire et caractérisation biochimiques des microorganismes isolés du tissu chloragogène TC

II. 1. Dissection de vers de terre et prélèvement du tissu chloragogène

Les vers de terre collectés ont été lavés avec de l'eau distillée stérile et la surface de chaque spécimen a été désinfectée avec de l'alcool à 70 %, puis lavée trois fois avec de l'eau distillée stérile. Ensuite, ils ont été placés sur du papier-filtre humide, dans des boîtes de Pétri en verre stériles pendant 5 à 7 jours. La vacuité de leur tube digestif a été déterminée visuellement en observant la présence ou l'absence de particules sombres.

A la fin de cette période, les vers de terre ont été anesthésiés à l'aide de coton imbibé avec du chloroforme, sans aucun contact avec les vers. Avant dissection, les vers de terre ont été stérilisés en surface avec de l'alcool à 70 % puis lavés trois fois dans des bécards d'eau distillée stérile. Sur une planche de dissection stérile, le spécimen a été fixé, la face ventrale, qui est généralement d'une couleur plus claire que la surface dorsale, vers le haut. Une petite fente a été faite dans la paroi du corps à la ligne médiane près du clitellum, et l'incision a été faite longitudinalement (Figure 23).



Figure 23 : Face ventrale avec incision longitudinale avant l'épingleage (Lów et al., 2016)

Des épingles ont été utilisées par paires pour exposer les structures internes (Figure 24).

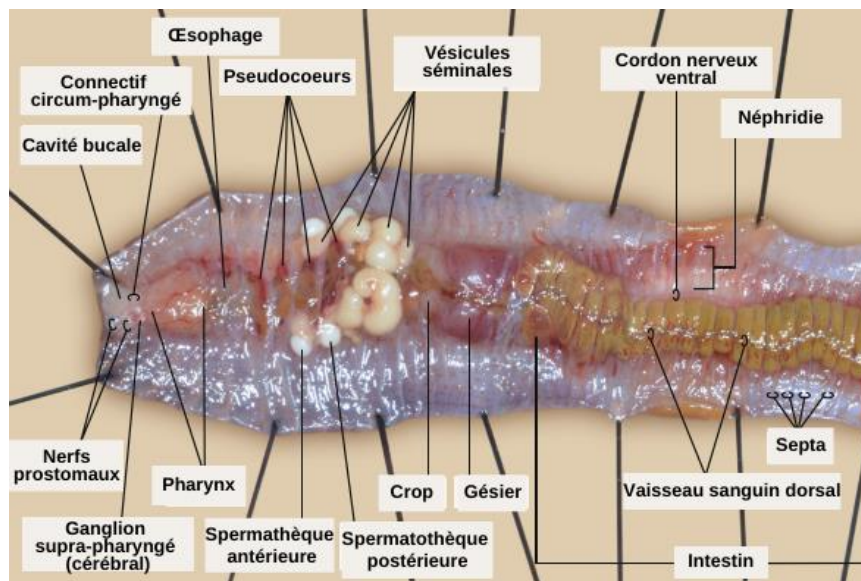


Figure 24 : Ver de terre disséqué et épinglé ouvert montrant les organes internes (Lów et al., 2016)

Le tissu chloragène apparaît sur la surface externe de l'intestin moyen ayant une couleur jaunâtre à verdâtre (Figure 25).

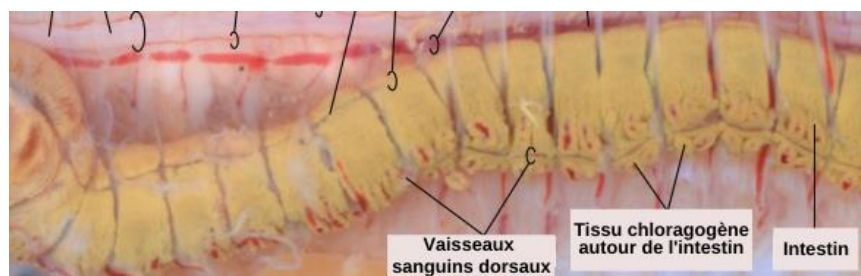


Figure 25 : Tissu chloragène (cellules jaunâtres) entourant la face interne du tube digestif (Lów et al., 2016)

Des échantillons ont été prélevés à l'aide d'écouvillons stériles et trempés dans 2 mL du bouillon Brain Heart Infusion (BHI). Les écouvillons ont été fermés soigneusement pour éviter toute sorte de contamination puis incubés à 30°C et 25°C avec rotation à 200 rpm pendant 2 h afin de revivifier les microorganismes.

II. 2. Isolement des bactéries et purification

Les suspensions résultantes de chaque écouvillon ont été homogénéisées et ont été utilisées comme inoculum. Un volume de 0,1 mL a étéensemencé à l'aide d'étaioir stériles dans trois types de milieux, à savoir :

- Gélose (BHI) contenant par 1L : 10g de peptone, 10g d'infusion de cœur de bœuf ; 7,5g d'infusion de cerveau de veau, 2g de dextrose ; 2,5g de Na_2HPO_4 , 5g de NaCl, 15g de gélose bactériologique ;
- Milieu à base d'urée sans source d'azote contenant par 1 L : 10g de glucose, 5g de K_2HPO_4 , 5g de MgCl_2 ; 0,25g de MgSO_4 ; 0,2 g de KCl ; 0,5 g d'Urée et 15g d'Agar ;
- Milieu contenant uniquement des extraits bruts de vers de terre à jeûne à une concentration de 0.5 g L^{-1} (la composition et la préparation du milieu sont détaillées au paragraphe I. 4). Les boîtes de Pétri ont été incubées à 25°C et 30°C pendant 1 à 7 jours.

En se basant sur les caractères macroscopiques des colonies cultivées dans chaque milieu de culture, un premier criblage a été réalisé pour choisir des isolats différents. Après purification, un deuxième criblage a été fait par une caractérisation phénotypique comprenant une caractérisation macroscopique de la taille, de la couleur, de la forme, de la transparence et de l'élévation de la colonie, tandis que la différenciation des bactéries Gram-positives de celles Gram-négatives a été faite par la coloration de Gram, et les tests catalase et oxydase ont été aussi réalisés pour un meilleur criblage. Les isolats sélectionnés ont été conservés pour la caractérisation biochimique et l'identification moléculaire.

II. 3. Caractérisation biochimique

Une galerie biochimique classique a été réalisée selon le manuel de (Brown et Smith, 2010) pour caractériser les isolats bactériens.

II. 3. 1. Test d'oxydase

Le test d'oxydase détecte la présence de cytochrome oxydase, une enzyme de la chaîne de transport d'électrons. La cytochrome oxydase se trouve dans les bactéries qui utilisent l'oxygène comme accepteur d'électrons terminal pendant la respiration. A l'aide de pince, une bande d'oxydase est placée sur une lame porte objet. Une colonie d'une culture fraîche est prélevée à l'aide d'un bâtonnet ou d'une anse en plastique stérile, puis frottée doucement sur la bande. L'apparition d'une coloration violette dans un délai de 30 secondes est synonyme d'un résultat positif (Figure 26). En effet, l'enzyme est détectée en transférant des électrons du cytochrome c réduit à un accepteur d'électrons artificiel, la N — tétraméthyl-p-phénylènediamine, qui change de couleur du jaune au violet lorsque les électrons sont transférés du cytochrome c réduit à l'accepteur artificiel.

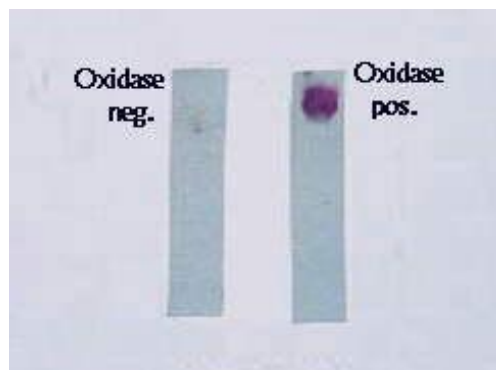


Figure 26 : Test d'oxydase : la bande de droite montre une réaction violette due à la production d'oxydase et la bande de gauche montre une culture négative à l'oxydase (Brown et Smith, 2010).

II. 3. 2. Test de catalase

Lorsque les bactéries aérobies se reproduisent par la respiration, elles utilisent l'oxygène comme accepteur d'électrons terminal et le convertissent en eau. Cependant, en tant que sous-produit de cette réaction, ils produisent du peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène est un agent oxydant hautement réactif qui peut endommager les enzymes, les acides nucléiques et d'autres molécules cellulaires bactériennes critiques. Les aérobies produisent l'enzyme catalase pour convertir le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau non toxiques. Une colonie est transférée d'une boîte de Pétri sur une lame propre pour déterminer si la catalase est produite. Quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène à une concentration de 3 % sont ajoutées aux cellules sur la lame. Si la catalase est produite, il y aura un bouillonnement vigoureux lorsque le peroxyde d'hydrogène est décomposé et que de l'oxygène gazeux est produit (Figure 27).

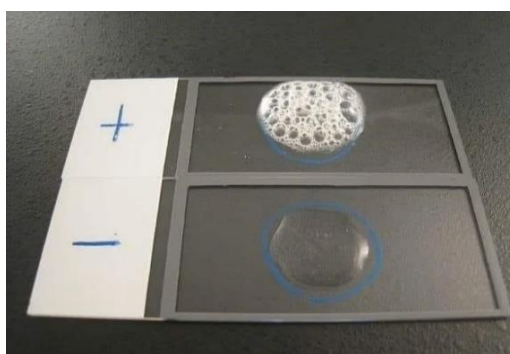


Figure 27 : Test de catalase : (-) catalase-négatif ; (+) des bulles vigoureuses se produisent lorsque la catalase est présente (Brown et Smith, 2010).

II. 3. 3. Test de citrate

Certaines bactéries sont capables de se développer sur milieu minimum avec le citrate uniquement comme source de carbone. Normalement, le citrate est métabolisé par oxydation via le cycle de Krebs. Certaines bactéries, en revanche, peuvent cliver le citrate pour produire de l'oxaloacétate et du pyruvate. Ensuite, ces intermédiaires sont fermentés pour produire une variété de produits finaux, notamment le formiate, l'acétate, le lactate, l'acétoïne et le CO₂. De plus, le milieu contient des sels d'ammonium, qui agissent comme la seule source d'azote pour la croissance. Les bactéries qui dégradent le citrate doivent également utiliser des sels d'ammonium, ce qui entraîne la formation d'ammoniac, ce qui rend le milieu alcalin. Une culture bactérienne fraîche et pure est inoculée en stries sur la pente du milieu, ainsi l'indicateur de pH dans le milieu passe du vert foncé au bleu de Prusse foncé dans des conditions alcalines, indiquant l'utilisation du citrate (Figure 28).

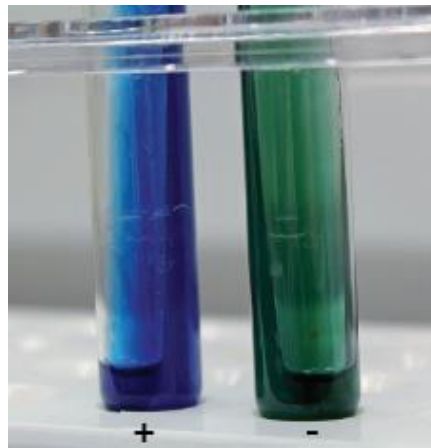


Figure 28 : Utilisation du citrate (+) test positif, bleu de Prusse ; (-) contrôle non-inoculé (Brown et Smith, 2010).

II. 3. 4. Test Mannitol-Mobilité

Ce milieu de culture est destiné à classer les bactéries selon leur motilité et leur capacité à fermenter le mannitol. Le digestat peptique hautement nutritif des tissus animaux favorise la croissance luxuriante de bactéries exigeantes. Une culture bactérienne fraîche et pure est ensemencée par pique longitudinale centrale, et la nature semi-solide du milieu (gélose à 0,3 %) facilite la détection de la motilité. Alors que les bactéries mobiles se développent uniformément dans tout le milieu, les bactéries non mobiles se développent uniquement le long de la ligne d'inoculation. La fermentation du mannitol entraîne l'acidification du milieu. Le rouge de phénol est un indicateur de pH qui détecte l'acidité en changeant de couleur du rouge au jaune lorsqu'il est exposé à l'acide (Figure 29).

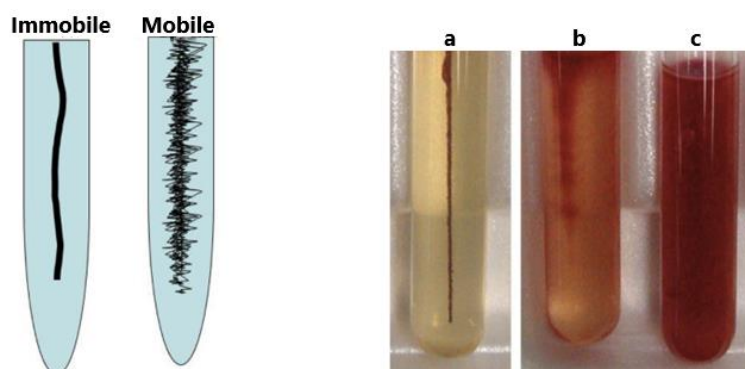


Figure 29 : Test de motilité au mannitol : Couleur rouge = Mannitol - ; Couleur rouge = Mannitol +. (a) Immobile ; (b) et (c) Mobile (Brown et Smith, 2010).

II. 3. 5. Test au milieu Hajna-Kligler

Hajna-Kligler est un milieu multi-test qui peut être utilisé pour détecter la fermentation du glucose et du lactose, ainsi que la production de sulfure d'hydrogène à partir de la dégradation de l'acide aminé cystéine. Il contient 0,1 % de glucose, 1 % de lactose, du peptone, des sels ferreux et un indicateur de pH appelé rouge de phénol. Il est préparé selon le modèle d'une inclinaison et un culot. Une culture bactérienne est inoculée par pique centrale du culot du tube, et des stries sur la pente.

- Les résultats des réactions de fermentation sont interprétés comme suit :
- 1. Pente alcaline (rouge)/culot acide (jaune) : cela indique que le glucose était le seul métabolite utilisé. La bactérie a initialement utilisé la faible concentration de glucose et a ensuite dégradé la peptone dans le milieu. La pente est alcaline (rouge) en raison de la

dégradation aérobie du glucose, et l'ammoniac libéré lors de l'utilisation de la peptone a rendu la pente aérobie alcaline. Cependant, le culot est jaune (acide) en raison de la fermentation anaérobie du glucose pour produire suffisamment d'acides pour initier la réaction acide dans le culot. Si du gaz est produit, le milieu se divisera et des bulles de gaz se formeront dans la pente d'Agar (Figure 30. a).

2. Pente acide jaune/culot acide jaune : la bactérie a fermenté le glucose et le lactose, générant des acides qui font jaunir l'indicateur de pH. Le lactose est présent à dix fois (1 %) par rapport à la concentration de glucose (0,1 %), et suffisamment d'acide est produit pour acidifier à la fois la pente et le culot. Cependant, les tubes doivent être lus à 24 heures, car ils peuvent devenir alcalins en 48 heures si le lactose et les peptones sont épuisés, entraînant la production d'ammoniac (Figure 30. b).
3. Alcaline (rouge) inclinée/alcaline (rouge) : aucun changement indique qu'aucun sucre n'a été fermenté. Certaines bactéries peuvent utiliser les peptones à la fois de manière aérobie et anaérobie, ce qui entraîne une pente et un culot alcalins. D'autres peuvent utiliser les peptones exclusivement de manière aérobie, ce qui entraîne une inclinaison alcaline, mais aucun changement dans le culot (Figure 30. c).
- Sulfure d'hydrogène : Certaines bactéries peuvent dégrader l'acide aminé cystéine pour produire de l'acide pyruvique, de l'ammoniac et du sulfure d'hydrogène. Le milieu Hajna-Kligler contient des sels ferreux qui réagiront avec le sulfure d'hydrogène libéré par la cystéine désulfurase pour produire un précipité noir insoluble (Figure 30. e), le sulfure ferreux (H_2S).

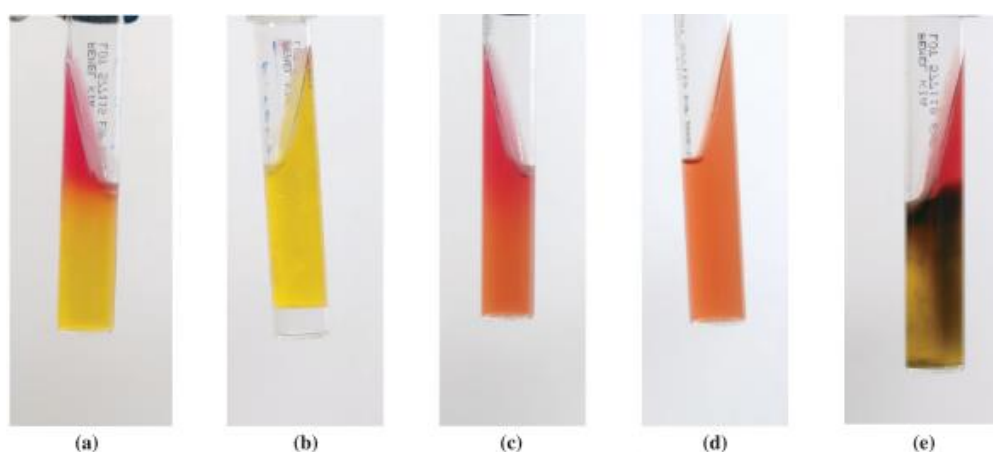


Figure 30 : Réactions de fermentation et production de sulfure d'hydrogène sur milieu Hajna-Kligler. (a) Alcalin/ acide ; (b) acide/acide avec gaz ; (c) alcalin/pas de changement ; (d) non inoculé ; (e) production de sulfure d'hydrogène (H_2S) (Brown et Smith, 2010).

II. 3. 6. Panels miniaturisés de tests biochimiques

Pour une caractérisation plus poussée, les isolats bactériens ont été testés pour leur capacité à utiliser divers substrats et pour leur activité hydrolytique à l'aide des galeries biochimiques du système Thermo Scientific™ RapID™ (Figure 31). La détection se fait par divers systèmes d'indicateur et les réactions utilisées sont une combinaison de tests chromogéniques conventionnels et mono-substrat.



Figure 31 : Galeries biochimiques du système Thermo Scientific™ RapID™
(<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R8311006>)

Chaque panel RapID possède plusieurs cavités de réaction à la périphérie de la galerie jetable en plastique. Les cavités de réaction contiennent des réactifs déshydratés (Tableau 8) et le panel permet l'ensemencement simultané de chaque cavité avec une quantité prédéterminée d'inoculum. Une suspension bactérienne préparée dans de l'eau physiologique est utilisée comme inoculum qui se réhydrate et initie les réactions de test. Après incubation de la galerie pendant 4 h à 30°C, chaque cavité de test est examinée pour la réactivité en notant le développement d'une couleur. Dans certains tests, un réactif (fourni) est ajouté aux cavités de test, après incubation, pour aboutir à un changement de couleur.

Tableau 8 : Composants, principes et interprétation des tests du système Thermo Scientific™ RapID™ (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R8311006>)

Test	Réactif	Principe	Réactions
GLU	Glucose	L'utilisation du substrat de sucre produit des produits acides qui abaissent le pH et modifient l'indicateur coloré	(+) Jaune
SUC	Sucrose		(—) Clair ou brun
TRD	Thiol aliphatique	L'utilisation du substrat abaisse le pH et modifie l'indicateur	(+) Jaune (—) Rouge ou orange
EST	Triglycéride	L'hydrolyse du lipide libère des acides gras qui abaissent le pH et modifient l'indicateur	(+) Jaune ou doré (—) Rouge ou orange
PO₄	Phosphate de nitrophényle	L'hydrolyse du phosphoester incolore libère du nitrophénol jaune	(+) Jaune (—) Clair
ONPG	ρ -Nitrophényl, β , D-galactoside	L'hydrolyse enzymatique du glycoside aryl-substitué incolore libère du nitrophénol jaune.	(+) Jaune
NAG	ρ -nitrophényl-N-acétyl- β ,D-glucosaminide		(—) Clair
ORN	Ornithine	L'hydrolyse de l'ornithine ou de l'arginine produit des produits basiques qui élèvent le pH et modifient l'indicateur	(+) Rouge
ADH	Arginine		(—) Jaune ou orange clair
PRO	Proline- β -naphtylamide	L'hydrolyse enzymatique du substrat arylamide libère de la naphtylamide libre qui est détectée avec le réactif fournis	(+) Violet, violet ou rouge
PYR	Pyrrolidine- β -naphtylamide		(—) Transparent, beige ou orange clair
GGT	γ -Glutamyl naphtylamide		

II. 4. Identification moléculaire

L'identification moléculaire a été réalisée au Centre National de la Recherche Scientifique et Technique, Division UATRS, Plateforme de Biologie Moléculaire et de Génomique Fonctionnelle – Rabat, Maroc, où le séquençage du gène ARNr 16S a été réalisé pour identifier les souches isolées.

Les isolats ont été cultivés en BHI jusqu'à ce qu'ils atteignent une densité optique (600 nm) supérieure à 1, puis les cellules bactériennes ont été culotées à partir de 1 mL de culture par centrifugation pendant 5 min à 8 000 x g. L'extraction de l'ADN chromosomique a été réalisée selon le protocole BIOLINE « ISOLATE II GENOMIC DNA KIT » basé sur la technologie de la colonne de centrifugation à membrane de silice. Les échantillons sont d'abord lysés dans des ions de sel chaotropiques en présence de protéinase K. L'éthanol est ajouté à l'échantillon, puis versé à travers une mini colonne de centrifugation d'ADN génomique contenant une membrane de silice à laquelle l'ADN génomique se lie. Les contaminants et les impuretés tels que les sels, les métabolites et les composants cellulaires sont efficacement éliminés par de simples étapes de lavage avec deux tampons différents. L'ADN génomique purifié de haute qualité est ensuite élué dans un tampon d'éluion (Figure 32).

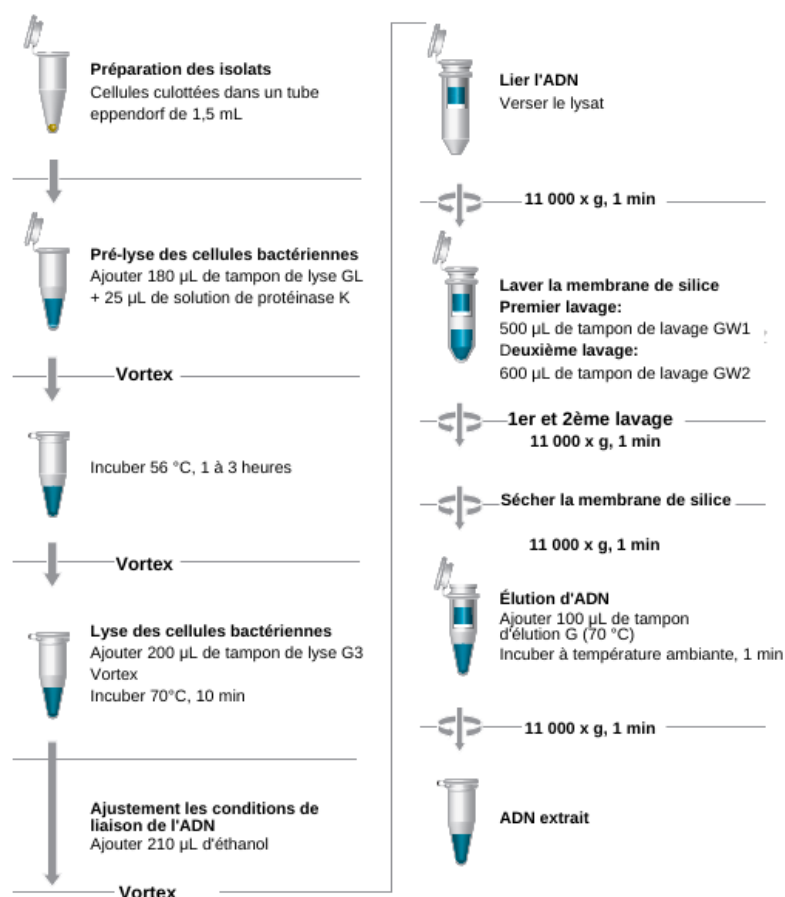


Figure 32 : Schéma d'extraction de l'ADN génomique bactérien suivant le kit Bioline « ISOLATE II GENOMIC DNA KIT »
(https://www.bioline.com/downloads/dl/file/id/1197/nucleic_acid_isolation_guide.pdf)

La qualité et la concentration de l'ADN extrait ont été vérifiées par dosage en utilisant le Nanodrop 8000 (Figure 33). Le rapport de densité optique DO 260/280 nm a été utilisé pour déterminer la pureté de l'ADN. Un extrait de bonne qualité doit avoir un rapport de 1,8 à 2 et une concentration d'ADN d'au moins 300 ng L⁻¹.



Figure 33 : Dosage par Nanodrop des ADN extraits

La réalisation d'une PCR a été faite pour les échantillons d'ADN extraits afin d'obtenir un amplicon de 1500bp. En effet, l'ADNr 16S a été amplifié à l'aide de deux amorces universelles Fd1 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) et RP2 (ACGGCTACCTTGTACGACTT) avec un mélange réactionnel pour un tube (2x Mix MyTaq de Bioline) qui contient les éléments suivants : 2x tampon, 10µL ; les amorces FD1 et RP2 (10 µM), 2 µL chacune ; 130 ng de matrice d'ADN ; de l'eau déminéralisée pour constituer un volume final de 25µL. Le programme PCR utilisé pour l'amplification était le suivant : dénaturation initiale à 95° C pendant 1 minute, suivie de 35 cycles comprenant dans chacun, une dénaturation à 95°C pendant 15 sec, une hybridation à 52°C pendant 20 sec et une extension à 72°C pendant 15 sec et une extension finale à 72°C pendant 3 min (thermocycleur ABI « Verity »). L'électrophorèse des produits de PCR a été réalisée en présence d'un marqueur de poids moléculaire 1kb par migration sur un gel d'agarose 1 %, visualisé par un système de documentation photo (G box).

Après purification des fragments d'ADNr 16S amplifiés, le séquençage a été réalisé en utilisant les amorces suivantes : PDR (GTATTACCGCGGCTGCTG), PCF (CTACGGGAGGCAGCAGTGGG) et PEF (CATGGCTGTCGTCAGCTCGT), en utilisant le kit de séquençage de cycle Big Dye terminator version 3.1 (Applied Biosystems). L'analyse des électrophérogrammes produits a été réalisée par le logiciel DNA Dragon, ainsi l'assemblage des trois séquences a été réalisé par le logiciel DNA Dragon (Hepperle, 2011),

puis la séquence résultante a été corrigée manuellement. La séquence du gène ribosomique obtenue a été comparée à la base de données GenBank BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Les séquences obtenues ont ensuite été alignées par ClustalW à l'aide du logiciel MEGA X (Kumar et al., 2018). L'arbre phylogénétique a été généré par la méthode de Neighbor-Joining, Kimura two-parameter (Kimura, 1980). Une analyse bootstrap a été effectuée sur 1500 répliques aléatoires prélevées sur plusieurs alignements à l'aide du même logiciel (Kumar et al., 2018).

L'identification du genre et de l'espèce a été réalisée comme décrit par (Drancourt et al., 2000), où les isolats sont considérés comme appartenant à une espèce lorsque la similarité de la séquence inconnue à celle de l'espèce de référence est d'au moins 99 % et à un genre lorsque la similarité de séquence avec une souche connue est d'au moins 97 %. Ainsi, une souche peut être considérée comme une nouvelle espèce lorsque la similarité de séquence est inférieure à 97 %.

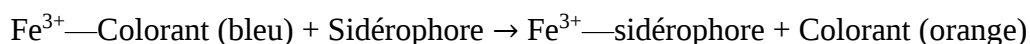
III. Caractérisation du potentiel PGP des bactéries isolées et résistance aux métaux lourds

III. 1. Préparation des inocula bactériens

Les souches bactériennes pures ont été cultivées en culture pure dans le bouillon Luria Bertani (LB) pendant 24 heures à 200 rpm et à une température de 30°C. Après centrifugation des bactéries à 10 000 rpm pendant 10 minutes, les culots ont été récupérés et lavés avec de l'eau distillée stérile et mis en suspension dans de l'eau physiologique stérile, pour obtenir une concentration de 10^8 UFC mL⁻¹.

III. 2. Production des sidérophores

La capacité des isolats à produire des sidérophores a été quantifiée qualitativement en utilisant le test Chrome Azurol sulfonate (CAS) tel que décrit par (Louden et al., 2011). Le test CAS est la méthode chimique universelle de détection des sidérophores. Il est basé sur la forte affinité des sidérophores pour le fer ferrique. La couleur bleue des milieux CAS est due à un complexe de chrome Azurol S et de fer ferrique. En présence d'un sidérophore, la réaction ci-dessous se produit, libérant l'azurol de chrome (couleur orange).



Le milieu solide CAS a été préparé aseptiquement après autoclavage, en combinant deux préparations. Le colorant bleu est obtenu dans la première préparation en combinant trois solutions : solution 1 (0,06 g de chromazurol-S dans 50 mL d'eau distillée), solution 2 (0,0027 g de FeCl₃ dans 10 mL de 10 mM HCl), solution 3 (0,073 g de HDTMA dans 40 mL d'eau distillée). La deuxième préparation est le milieu LB (10g de tryptophane, 5g d'extrait de levure, 5g de chlorure de sodium, et 15g d'Agar, par litre). Le mélange des deux préparations devient vert lors de la solidification (Figure 34).

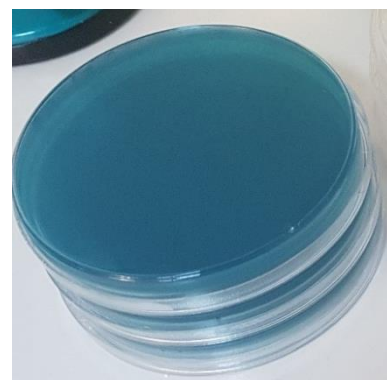


Figure 34 : Milieu solide CAS pour la détection des sidérophores

L'inoculation du milieu solide CAS a été réalisée par ponction d'une goutte de la suspension bactérienne, ensuite les boîtes de Pétri inoculées ont été incubées à 30 °C pendant 72 heures. La

présence d'une zone de halo jaune à orange, entourant les colonies, est considérée comme un résultat positif de la production des sidérophores (Figure 35).

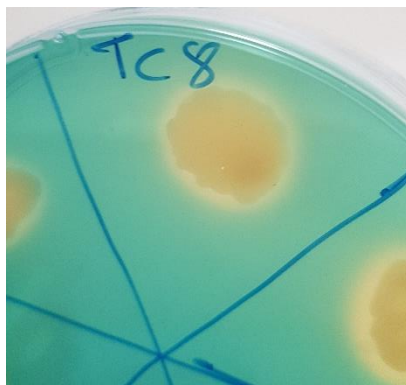


Figure 35 : Présence du halo jaune autour de la colonie signifiant la production des sidérophores

III. 3. Fixation d'azote

Le milieu solide sans source d'azote (Nitrogen-free media) a été utilisé pour déterminer la capacité des souches isolées à fixer l'azote. Il contient par litre : 20g de saccharose ; 0,1g de K_2HPO_4 ; 0,4g de $MgSO_4$; 0,1g de NaCl ; 0,01g de $FeCl_3$; 0,002g de Na_2MoO_4 , et 15g d'Agar.

Sur milieu solide, 10 μ L d'une suspension bactérienne ont été inoculés en triplicatas et les boîtes de Pétri ont été incubées à 30°C pendant 7 jours. La formation d'une colonie bactérienne est considérée comme résultat positif de la fixation d'azote.

III. 4. Production d'ammonium et de nitrate

Pour détecter le potentiel des souches à produire de l'ammonium et du nitrate (oxyder l'ammonium) dans des milieux sans supplément d'azote, une suspension bactérienne — préalablement préparée dans de l'eau physiologique — a été inoculée (1%) dans 30 mL de milieu Mannitol Ashby sans source d'azote. Les flacons ont été inoculés en triplicata et incubés à 30°C pendant 5 jours sur un agitateur rotatif à 180 rpm. Les cultures bactériennes ont été centrifugées à 4°C pendant 2 minutes à 10 000 rpm.

La détermination de l'ammonium et du nitrate dans les solutions bactériennes a été faite en utilisant la méthode de distillation à la vapeur telle que décrite par (Bremner et al., 1965). L'ammonium a d'abord été récupéré en ajoutant 0,2 g d'oxyde de magnésium au surnageant

dans le ballon de distillation. Lorsque le distillat atteint la marque de 30 mL sur le flacon récepteur (contenant préalablement 5 mL d'acide borique), la distillation est arrêtée et 0,2 g d'alliage de Devarda est ajouté au flacon de distillation pour récupérer les nitrates restants. Le distillat de nitrate est récupéré dans un flacon contenant 5 mL d'acide borique puis la distillation est arrêtée lorsqu'elle dépasse 30 mL. La détermination des teneurs en ammonium et en nitrates dans les distillats correspondants se fait par titrage avec de l'acide sulfurique 0,01 N, le changement de couleur au point final est du vert à un rose/violet pâle permanent (Figure 36).



Figure 36 : Détermination $\text{NH}_4\text{-N}$ et $\text{NO}_3\text{-N}$ — Virage du vert à un violet pâle lors de la titration par H_2SO_4

La quantité d'Ammonium-N et de Nitrate-N libérée dans la solution bactérienne après 5 jours d'incubation est calculée avec les formules suivantes (Bremner et al., 1965) :

$$\text{Ammonium} - \text{N (ppm)} = \frac{(V - B) \times N \times 18.039 \times 1000}{30}$$

$$\text{Nitrate} - \text{N (ppm)} = \frac{(V - B) \times N \times 62.0049 \times 1000}{30}$$

Avec :

- V : Volume de l'acide sulfurique titré pour l'échantillon (mL)
- B : Volume de titrage du blanc (mL)
- N : Normalité de la solution H_2SO_4

III. 5. Production de l'Acide Indole Acétique

La capacité des souches isolées à produire la phytohormone Acide Indole Acétique AIA a été estimée par méthode colorimétrique décrite par Gordon et al., (1951). Les souches bactériennes

ont été cultivées dans un bouillon à l'extrait de levure et au mannitol contenant par litre : extrait de levure : 1g ; mannitol : 10g ; K_2HPO_4 : 0,5g ; $MgSO_4$: 0,2g ; NaCl : 0,1g ; $CaCO_3$: 1,0g. Le milieu a été complété avec 3 g L^{-1} de L-tryptophane qui est considéré comme le précurseur de la production d'AIA. Après une incubation de 5 jours à 30°C, les cultures ont été centrifugées à 5000 rpm pendant 30 min, puis 1 mL du surnageant a été mélangé avec 2 mL de réactif de Salkowski (1 mL de $FeCl_3$ 0,5 M dans 50 mL de $HClO_4$ 35 %), puis mis dans l'obscurité pendant une heure. Le développement de la couleur rose (Figure 37) indique la production d'AIA.



Figure 37 : Production de l'AIA — la couleur rose indique la production de l'AIA ; la couleur jaune est synonyme d'un résultat négatif

Les mesures ont été effectuées par spectrophotométrie à 540 nm. La concentration d'AIA dans chaque échantillon a été calculée en utilisant la courbe standard qui a été préparée séparément avec de l'acide indole acétique pur (Figure 38).

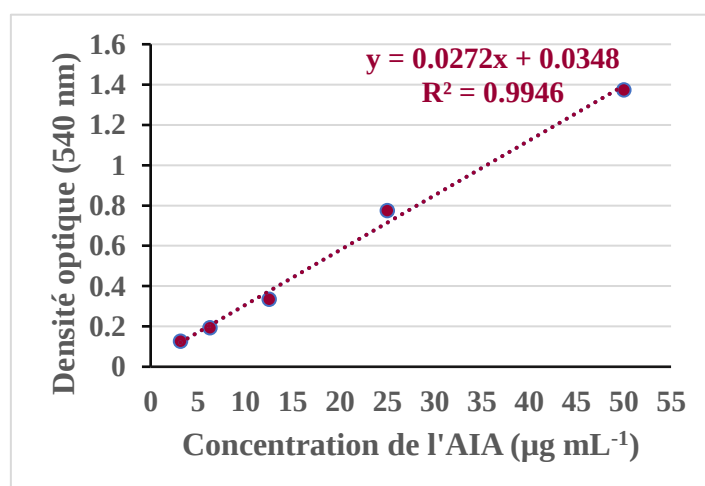


Figure 38 : Courbe étalon de la production de l'acide indole acétique AIA

III. 6. Solubilisation du phosphate tricalcique

La capacité des isolats à solubiliser le phosphate tricalcique a été testée d'abord qualitativement en utilisant le milieu solide Pikovskaya's, sans source de phosphate soluble, contenant par litre : glucose, 10 g ; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: 5 g ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 0,5 g ; NaCl : 0,2 g ; MgSO_4 : 0,1 g ; KCl : 0,2 g ; extrait de levure : 0,5 g ; MnSO_4 : 0,002 g et FeSO_4 : 0,002 g. Le pH a été ajusté à $7,0 \pm 0,2$ et 15 g/L ont été ajoutés.

10 μL d'inoculum bactérien ont été inoculés par ponction du milieu solide en triplicata, les boîtes ont été incubées une semaine à 30°C . Les bactéries présentant une zone de halo autour de la colonie ont été jugées positives pour la solubilisation du phosphate tricalcique (Figure 39).



Figure 39 : Résultat positif de la solubilisation du phosphate tricalcique par les isolats sur milieu solide

La quantification de la solubilisation du phosphate a été testée ensuite en utilisant le même milieu de culture Pikovskaya's, liquide. Les souches ont été inoculées (1%) dans le milieu en trois exemplaires, le milieu non inoculé servant de témoin. Les flacons ont été incubés pendant 5 jours à 30°C sous agitation à 180 rpm. 10 mL de bouillon de culture de chaque flacon ont été centrifugés à $10\,000 \times g$ pendant 10 min, et la quantité de P soluble libérée dans le surnageant a été estimée par la méthode du bleu phosphomolybdate (Watanabe et al., 1965). La couleur bleue développée a été mesurée par spectrophotométrie à 600 nm et la quantité de P solubilisé a été calculée en utilisant la courbe d'étalonnage (Figure 40) préparée par KH_2PO_4 (Chen et al., 2006).

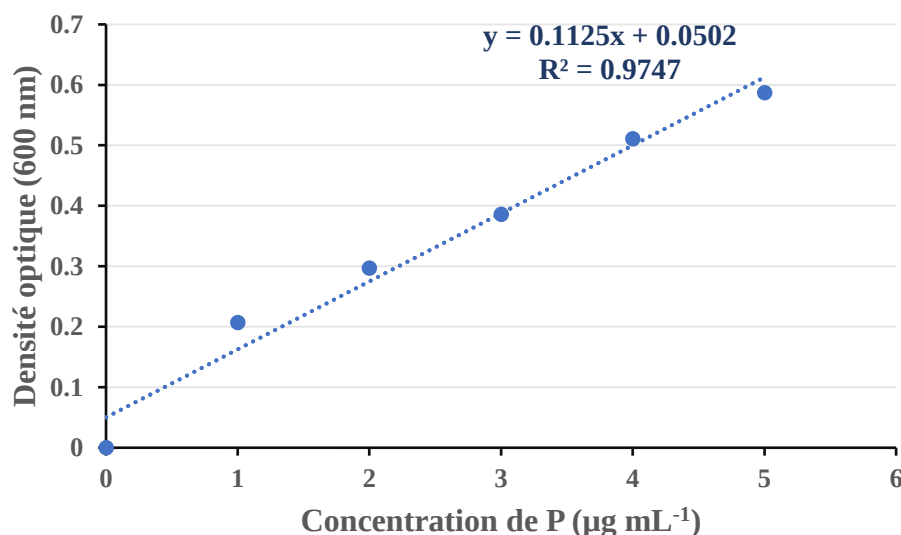


Figure 40 : Courbe étalon de la solubilisation du phosphate tricalcique

III. 7. Solubilisation du potassium

Pour détecter le potentiel de nos souches à solubiliser les formes insolubles de potassium, la roche de muscovite a été ajoutée dans le milieu Aleksandrov contenant par litre : glucose : 5 g ; MgSO_4 : 0,5 g ; CaCO_3 : 0,1 g ; FeCl_3 : 0,006 g ; Na_2HPO_4 : 0,2g ; poudre de muscovite : 3g. Le pH de ce milieu a été ajusté à $7,2 \pm 0,2$ et 15 g L^{-1} d'Agar ont été ajoutés. En trois exemplaires, 10 µL des suspensions bactériennes ont été inoculés en spot sur le milieu Aleksandrov et les boîtes ont été incubées pendant une semaine à 30°C . Les colonies bactériennes entourées d'une zone de halo ont été considérées solubilisatrices du potassium minéral trouvé dans la muscovite (Figure 41).



Figure 41 : Résultat positif de la solubilisation du potassium — halo transparent apparent autour des colonies

Pour quantifier la solubilisation du potassium, 3 g L^{-1} de roche muscovite (en poudre) ont été ajoutés au milieu liquide d'Aleksandrov. En trois exemplaires, des flacons contenant 20 mL de bouillon ont été inoculés avec 0,5 mL de l'inoculum bactérien. Les flacons ont été incubés

pendant 5 jours à 30 °C sous agitation à 180 rpm. Pour le blanc, une solution d'Aleksandrov non inoculée a été utilisée. Les cultures ont ensuite été centrifugées pendant 10 minutes à 3000 × g. Un photomètre à flamme a été utilisé pour déterminer directement la teneur en K disponible dans le surnageant (Hu et al., 2006).

III. 8. Résistance aux métaux lourds

La tolérance bactérienne au Mn (MnSO_4), Zn ($\text{Zn(NO}_3)_2$), Cd (CdCl_2), Cu (CuSO_4) et Ni (NiCl_2) a été déterminée dans des boîtes de Pétri contenant un milieu Agar Sucrose Low Phosphate (SLP) contenant par litre : saccharose : 10 g ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 1 g ; K_2HPO_4 : 0,5 g ; MgSO_4 : 0,5 g ; NaCl : 0,1 g ; extrait de levure : 0,5 g ; CaCO_3 : 0,5 g ; pH = 7,2. Une solution mère de chaque métal (500 mM) stérilisée par filtration a été supplémenté au milieu SLP pour obtenir les concentrations voulues d'une manière croissante. L'inoculation des boîtes a été faite par ponction avec 10 μL d'une suspension bactérienne, et les boîtes ont été incubées pendant trois jours à 30 ± 2 °C. Chaque concentration de métal a été augmentée de manière différentielle en fonction de la tolérance bactérienne, jusqu'à ce que les souches soient incapables de se développer sur le milieu. La concentration minimale inhibitrice (CMI) de chaque métal a été définie comme la concentration minimale qui inhibe la croissance des souches bactériennes après trois jours d'incubation.

III. 9. Analyses statistiques

Le logiciel de statistiques SPSS 20.0 a été utilisé pour analyser toutes les données. Les données ont été analysées à l'aide d'une analyse de variance à sens unique (ANOVA) et du test de Tukey pour les comparaisons multiples entre les moyennes des traitements. Les différences significatives ($P < 0,05$) entre les traitements sont indiquées par des lettres différentes. Le biplot de l'analyse en composantes principales catégorielles (Cat-PCA) a été créé à l'aide du même logiciel.

IV. Effet de l'enrobage (bio-priming) des graines de *Spinacia oleracea* L avec des isolats bactériens sur la promotion de la croissance des plantules et leur résistance aux métaux lourds

IV. 1. Préparation de l'inoculum bactérien

Pour les expériences à venir, cinq isolats bactériens ont été choisis en fonction des résultats des tests PGP et de leur résistance aux métaux lourds. Les isolats ont été cultivés en culture pure dans le bouillon LB et agitées à 200 rpm à 30°C pendant 24 heures.

Après avoir pelleté les bactéries par centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 min, les culots ont été lavés avec de l'eau distillée stérile et mise en suspension dans de l'eau physiologique stérile (1 mL) et soumis à une vibration induite par un vortex pendant 20 s. La suspension de bactéries a ensuite été diluée pour atteindre une concentration de 10^8 UFC mL⁻¹.

IV. 2. Résistance des isolats bactériens aux mélanges de métaux lourds

Le potentiel des souches à se développer dans des mélanges de métaux lourds à différentes concentrations a été déterminé en utilisant des cultures en milieu liquide. Des flacons de 100 mL ont été remplis de 50 mL de milieu liquide SLP avec un pH ajusté à 7,0, supplémenté dans chaque mélange de métaux lourds aux concentrations suivantes :

- Mix1 : Mn 100 ; Zn 20 ; Cu, Cd et Ni 5 ppm
- Mix2 : Mn 150 ; Zn 30 ; Cu, Cd et Ni 10 ppm
- Mix3 : Mn 200 ; Zn 40 ; Cu, Cd et Ni 15 ppm

Les concentrations de métaux lourds ont été choisies en fonction de la tolérance des souches et des ratios de disponibilité des métaux lourds dans les sites contaminés (Bilen et al., 2017). Les flacons Erlenmeyer ont été inoculés avec 1 % de l'inoculum bactérien préalablement préparé. Dans cette expérience, deux types de contrôles distincts ont été utilisés : Les flacons contenant des isolats cultivés sans métaux lourds servent de contrôle de la croissance bactérienne et ceux non inoculés sont utilisés comme contrôle abiotique. Pendant trois jours, les flacons ont été incubés à 30°C dans un agitateur rotatif réglé à 150 rpm. Une aliquote (5 mL) a été prélevée

toutes les 24 h pour déterminer la croissance par densité optique à 600 nm. La variation du pH a été mesurée à la fin de l'expérience, qui a été réalisée en triplicata.

IV. 3. Contamination artificielle du sol par des métaux lourds

Le sol alcalin (pH= 7,8) a été collecté à l'Université Atatürk, serre de recherche, Erzurum, Turquie (39°54' 80 "N ; 41°15'06 " E). Le sol a été séché à l'air, tamisé ($\varnothing < 2$ mm), et stérilisé par autoclave, trois fois consécutives à 121 °C pendant 30 minutes. Ensuite, le sol a été artificiellement contaminé avec Ni (100 mg Kg⁻¹), Cu (80 mg Kg⁻¹), Cd (70 mg Kg⁻¹), Zn (150 mg Kg⁻¹), et Mn (600 mg Kg⁻¹) et conservé dans la serre pour une période d'un mois (pour la stabilisation des métaux). Le sol a été contaminé à un niveau qui imite un sol fortement contaminé par le cadmium dans un site pollué, en tenant compte de la faible mobilité des métaux dans un sol alcalin.

IV. 4. Enrobage des semences des épinards avec les isolats bactériens

L'effet de l'enrobage des graines avec les isolats bactériens sélectionnées a été évalué dans le même type de sol où la croissance des graines a été évaluée en l'absence et en présence d'un stress métallique. Les plaques de godets (7×7×8 cm) sécables ont été remplies avec le sol agricole stérile correspondant (les uns avec du sol non contaminé et les autres avec du sol contaminé par des métaux).

Les graines ont été stérilisées par immersion dans de l'H₂O₂ à 5 % pendant 20 minutes, puis lavées quatre fois avec de l'eau ultrapure stérile. Chaque inoculum bactérien a servi de traitement ; l'eau physiologique stérile a servi de témoin. Les graines stériles ont été trempées dans les différents traitements pendant 1 h, puis séchées à l'air libre. Six des graines enrobées ont été placées dans chaque godet de plaque, avec six répétitions pour chaque traitement.

IV. 5. Germination des graines et croissance des plantules

Les plantules ont été cultivées en serre sous un cycle jour - nuit de 15-9 heures, une lumière naturelle allant de 900 à 1 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, une température de 25 durant la journée et 16°C en nuit et une humidité relative de 55 % (Canbolat et al., 2006).

Après trois semaines, le nombre de graines germées a été noté, et les plantules ont été lavées à l'eau du robinet puis mises sur du papier absorbant. La longueur des plantules ainsi que leur poids frais ont été mesurés. Ensuite, ils ont été mis dans l'étuve pendant 2 jours à 70°C pour mesurer leur poids sec.

IV. 6. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS 20.0. La signification statistique a été déterminée par une analyse de variance (One-way ANOVA) suivie du test post-hoc de Tukey ($P < 0,05$). Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ erreur standard (S.E.).

V. Étude du pouvoir des isolats à bioremédier le sol et à assister la phytoremédiation des métaux lourds par *Spinacia oleracea* L.

V. 1. Préparation du sol

Le même sol alcalin (pH= 7,8), préparé dans la section précédente (IV. 3), contaminé par un mélange de métaux lourds, a été utilisé dans cette étude. Les propriétés physiques et chimiques du sol sont présentées au niveau du Tableau 9.

Tableau 9 : Propriétés physicochimiques du sol utilisé durant cette étude

Caractéristiques	Moyenne
pH (1:2, 5)	7,8
EC (dS m ⁻¹)	1,7
Texture	loam sablo-argileux
Sable – silt – argile (%)	54,92 – 22,54 – 22,54
N minéral total (mg Kg ⁻¹)	30,2
P disponible (mg Kg ⁻¹)	15,3
K disponible (mg Kg ⁻¹)	60,4
Teneur totale en métaux (mg Kg ⁻¹)	
Manganèse (Mn)	869,2
Zinc (Zn)	158,4
Cuivre (Cu)	87,2
Cadmium (Cd)	70,3
Nickel (Ni)	105,8
Calcium (Ca)	27 488,5
Fer (Fe)	16 870,1

V. 2. Effet des isolats bactériens sur la mobilité des métaux du sol

L'effet de l'inoculation du sol avec des isolats bactériens sur la mobilité des métaux du sol a été testé *in vitro*. En suivant la méthode décrite par Rajkumar et Freitas (2008), des tests sur l'influence des bactéries sur la mobilité des métaux du sol ont été effectués en utilisant des

tubes de centrifugation en polypropylène de 50 mL. Les tubes contenant 2 g de sol stérile artificiellement contaminé ont été inoculés avec 2 mL de culture bactérienne pure ($\sim 1 \times 10^8$ cellules mL^{-1}), le contrôle axénique a été inoculé avec 2 mL d'eau physiologique stérile. Tous les tubes ont été pesés, enveloppés dans du papier brun pour assurer l'opacité, puis agités à 200 rpm à 30 °C sur un agitateur orbital. Après une semaine, les tubes ont été pesés à nouveau pour compenser l'eau évaporée, et 10 mL d'eau ultrapure stérile ont été ajoutés à chaque tube pour extraire les métaux lourds hydrosolubles du sol. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 4000 rpm pendant 10 min et le contenu a été filtrés. Les filtrats ont ensuite été acidifiés avec du HNO_3 pour la mesure de la concentration des métaux lourds (Mn, Zn, Cu, Cd et Ni) par ICP-AES (spectroscopie d'émission atomique à plasma à couplage inductif).

V. 3. Influence des souches bactériennes sur la croissance de *Spinacia oleracea* sous stress métallique

Une expérience en serre a été menée pour étudier l'effet des isolats bactériens sélectionnés, sur la croissance de *Spinacia oleracea* Ayaz F1, dans un sol contaminé par des métaux lourds. Les graines d'épinard ont d'abord été stérilisées par 5 % de H_2O_2 pendant 20 minutes, lavées trois fois avec de l'eau stérile ultrapure, puis laissées pousser dans un sol stérile non contaminé pendant trois semaines dans la serre.

Les pots en plastique (de même taille) ont été soigneusement nettoyés avec de l'alcool éthylique et remplis avec 1,5 Kg de sol stérile (stérilisé trois fois par autoclavage à 121°C pendant 30 min). De l'azote, du phosphore et du potassium (NPK) ont été utilisés pour fertiliser le sol aux taux de 300 Kg N ha^{-1} sous forme de nitrate d'ammonium (33 % N), 95 Kg P ha^{-1} sous forme de phosphate diammonique (18 % N, 46 % P_2O_5), 150 Kg K ha^{-1} sous forme de sulfate de potassium (50 % K_2O), respectivement (Canbolat et al., 2006). Ensuite, des plantules saines et homogènes ont été transférées (6 plantules par pot) dans chaque traitement.

Tous les traitements ont été effectués en triplicata et consistaient en :

- Contrôle négatif : sol normal (non contaminé) inoculé avec 20 mL d'eau physiologique stérile.
- Contrôle positif : sol contaminé inoculé avec 20 mL d'eau physiologique stérile.
- Traitements bactériens : sol contaminé inoculé avec 20 mL de suspension bactérienne de 24 h ($\sim 1 \times 10^8$ cellules mL^{-1}) de l'un des isolats bactériens sélectionnés.

Les plantes ont été cultivées dans une serre sous les conditions suivantes : un cycle jour-nuit de 15-9 h, une lumière naturelle (allant de 900 à 1 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), une température de 25-16 °C et une humidité relative de 55 % (Canbolat et al., 2006). Les plantes ont été irriguées avec de l'eau du robinet à 60 % de la capacité de rétention d'eau du sol, et toutes les deux semaines, elles ont reçu la solution de Hoagland (Hoagland et al., 1950) et 10 mL du traitement correspondant.

Six semaines après leur transfert, les plantes ont été récoltées, soigneusement lavées à l'eau du robinet, puis trois fois à l'eau ultrapure. Après chaque traitement, cinq plantes ont été choisies au hasard pour des mesures de longueur et de poids frais. Ensuite, les plantes (les pousses et les racines ont été séparées) ont été mises à l'étuve (70°C) jusqu'à un poids constant (~72h), la biomasse sèche a été mesurée.

En parallèle, la teneur en chlorophylle a + b des feuilles de 3 plantes a été mesurée selon la méthode décrite par Palta (1990). À l'aide d'un pilon et d'un mortier, une quantité connue de tissu foliaire (de préférence coupée en petites tranches) a été homogénéisée avec de l'éthanol à 96 %, puis incubée pendant une nuit à 4 °C dans de l'éthanol à 96 %, pour une extraction totale de chlorophylle. Les homogénats ont ensuite été centrifugés à 2000 rpm pendant 10 minutes pour éliminer les débris. Les surnageants résultants ont ensuite été dilués avec de l'éthanol à 96 % jusqu'à un volume connu. Après un mélange minutieux, l'absorbance a été mesurée à 654 nm avec un spectrophotomètre, en utilisant de l'éthanol à 96 % comme blanc. L'équation suivante a été utilisée pour déterminer la teneur en chlorophylle totale :

$$C = 1000 \times \frac{A_{654}}{39,8}$$

Où C représente la concentration en chlorophylle en $\mu\text{g mL}^{-1}$. La teneur en chlorophylle en $\mu\text{g g}^{-1}$ de tissu foliaire a été déterminée en utilisant le volume total d'éthanol utilisé et le poids du tissu.

Pour l'analyse des métaux, les échantillons de pousses et de racines ont été broyés et tamisés ($\varnothing = 0,15 \text{ mm}$), puis digérés avec du Triacide ($\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4\text{-HClO}_4$) suivant la méthode du Block Digester décrite par (Estefan et al., 2013). Une quantité connue de matériel végétal sec et broyé (0,15 mm) a été placée dans un tube de digestion calibré de 300 mL avec 5 mL de H_2SO_4 concentré et a été doucement brassée dans la hotte avant d'être placée dans le bloc-

digesteur. Pendant une heure, la digestion a été réalisée à une température de 145 °C. À ce moment, 5 mL du mélange triacide (HNO_3 , H_2SO_4 et HClO_4 préparés dans un rapport 10:1:4) ont été ajoutés, et la température a été augmentée à 240 °C pendant une heure supplémentaire. Après refroidissement à température ambiante, les mélanges ont été filtrés à travers un papier-filtre Whatman No. 42, et le volume final du filtrat a été porté à 50 mL par l'ajout de l'eau ultra pure stérile. La teneur en calcium, fer, manganèse, zinc, cuivre, cadmium et nickel au niveau du filtrat a été déterminée par (ICP- AES).

V. 4. Analyses bio-physico-chimiques du sol

V. 4. 1. Activité enzymatique

Trois activités enzymatiques ont été mesurées, dans les échantillons du sol, à la fin de l'expérience :

Les activités phosphatase acide (AcdP) et alcaline (AlkP) ont été évaluées, en mesurant la quantité de p-nitrophénol (p-NP) libérée, après que 1 g de sol humide ait été incubé à 37 °C pendant 1 heure avec 0,2 mL de toluène, 4 mL de tampon universel modifié MUB (0,17 M, pH 6,5 pour AcdP, pH 11,0 pour AlkP), et 1 mL de substrat 0,025 M (p-nitrophényl phosphate). Les concentrations correspondantes ont été déterminées à l'aide d'une courbe étalon construite avec des concentrations précises de p-NP et exprimées en $\mu\text{g pNP g}^{-1} \text{ sol h}^{-1}$ selon la méthode décrite par Tabatabai (1994), et Bilen et Turan (2022).

L'activité de l'uréase du sol a été évaluée par distillation à la vapeur comme décrite précédemment (Tabatabai et al., 1972), en utilisant l'urée comme substrat et exprimée en $\text{mg NH}_4\text{-N g}^{-1} \text{ sol 2 h}^{-1}$. Cette méthode détermine la quantité d'ammonium libérée par l'activité uréasique, après que le sol a été incubé pendant 2 heures à 37 °C avec une solution d'urée tamponnée (tris-hydroxyméthyl aminométhane, THAM) et du toluène. La procédure rapide pour déterminer la libération d'ammonium consiste à traiter l'échantillon de sol incubé avec du KCl 2,5 M contenant un inhibiteur d'uréase (Ag_2SO_4) et à distiller à la vapeur une aliquote de la suspension résultante avec du MgO pendant 4 minutes.

V. 4. 2. Analyses physicochimiques

Une fois la période de cultivation terminée, les échantillons de sol ont été transportés au laboratoire pour être séchés à l'air et tamisés à travers un tamis de 2 mm.

Les valeurs de **pH** ont été déterminées en utilisant des électrodes standard en verre/calomel dans une suspension sol-eau à 1 : 2,5 p/v (10 g de sol avec 25 mL d'eau ultrapure) qui avait été laissée au repos pendant 24 heures. La conductivité électrique, **EC**, de la même solution a été déterminée à l'aide d'un conductimètre (Estefan et al., 2013).

L'azote total (N) a été déterminé par la méthode Kjeldahl (Bremner, 1996), qui comporte trois étapes majeures :

- La digestion : le but de la digestion est de briser toutes les liaisons d'azote dans l'échantillon et de convertir tout l'azote lié organiquement en ions ammonium (NH_4^+). Le carbone organique et l'hydrogène forment du dioxyde de carbone et de l'eau. Dans ce processus, la matière organique se carbonise, ce qui peut être visualisé par la transformation de l'échantillon en mousse noire. Pendant la digestion, la mousse se décompose, et finalement, un liquide clair indique l'achèvement de la réaction chimique. Pour ce faire, l'échantillon de sol (1 g de poids sec) est mélangé avec de l'acide sulfurique et un mélange de catalyseurs (K_2SO_4 — CuSO_4 — Se), à une température de 370 °C pendant environ 3 heures. Le sulfate de potassium est ajouté afin d'augmenter le point d'ébullition de l'acide sulfurique, et les catalyseurs sont ajoutés afin d'augmenter la vitesse et l'efficacité de la procédure de digestion.
- Distillation : Au cours de l'étape de distillation, les ions ammonium (NH_4^+) sont transformés en ammoniac (NH_3), par l'ajout d'une solution de NaOH (10N). L'ammoniac (NH_3) est transféré dans le récipient de réception par distillation à la vapeur. Le récipient de réception du distillat est rempli d'une solution absorbante, une solution d'acide borique saturé H_3BO_3 , afin de capturer le gaz ammoniac dissous.
- Titrage : La concentration des ions ammonium capturés a été déterminée par titrage direct à l'aide d'acide sulfurique 0,01 N jusqu'à ce que la couleur de la solution change d'un vert clair en une couleur légèrement violette.

Le **phosphore inorganique (P)** a été extrait du sol avec du bicarbonate de sodium 0,5M NaHCO_3 à un pH presque constant de 8,5 et mesuré selon la méthode décrite par (Olsen

et al., 1982). Cette méthode permet de quantifier la biodisponibilité relative de l'orthophosphate inorganique ($\text{PO}_4\text{-P}$) dans les sols à pH neutre à alcalin. La méthode est basée sur l'extraction du phosphate du sol à l'aide d'une solution de bicarbonate de sodium NaHCO_3 0,5 N ajustée à un pH de 8,5. L'hydroxyde et le bicarbonate désorbent le phosphate des particules du sol de manière compétitive pendant le processus d'extraction, et l'absorption secondaire est minimisée en raison du pH élevé. L'ion orthophosphate forme un complexe avec le molybdate d'ammonium et le tartrate d'antimoine et de potassium dans des conditions acides. Réduit par l'acide ascorbique, ce complexe se transforme en un complexe bleu qui absorbe la lumière à 880 nm. L'absorbance est proportionnelle à la concentration d'orthophosphate dans l'échantillon.

Le **potassium hydrosoluble et échangeable**, potassium (K) disponible pour les plantes dans le sol, a été extrait à l'aide d'acétate d'ammonium 1N (NH_4OAc) selon la procédure décrite par (Knudsen et al., 1982). La concentration de $\text{NH}_4\text{OAc-K}$ a été déterminée en extrayant 10 g de sol séché pendant 30 minutes avec 50 mL de solution neutre de NH_4OAc 1N sur un agitateur alternatif réglé à 200-300 rpm. Pour éliminer toute particule de sol, la suspension a été filtrée à travers un papier-filtre Whatman No.1, et le volume de l'extrait a été complété à 50 mL en utilisant la solution de NH_4OAc à 1N. La concentration du potassium (K) a été mesurée à l'aide d'un photomètre à flamme à une longueur d'onde de 767 nm.

La **teneur des échantillons du sol en métaux lourds** a été déterminée par méthode de bloc de digestion à l'aide d'un mélange diacide ($\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$) décrite par (Estefan et al., 2013). Une quantité connue (1 g) de sol séché ($\varnothing = 0,15$ mm) a été pesée et transférée dans un tube de digestion calibré de 300 mL avec 3 mL d'acide nitrique concentré (HNO_3) et 4 mL d'acide perchlorique concentré (HClO_4). Le mélange a été chauffé à 145 °C pendant une heure dans le digesteur en bloc, puis augmenté à 240 °C. Après refroidissement, la solution a été mélangée et filtrée dans une fiole volumétrique de 50 mL à l'aide d'un papier-filtre Whatman n° 42. Après avoir dilué les filtrats digérés à un volume final de 50 mL, ils ont été analysés pour le calcium, le fer, le manganèse, le zinc, le cuivre, le cadmium et le nickel en utilisant la (ICP-AES).

V. 5. Efficacité de la phytoremédiation

La capacité de chaque traitement à améliorer l'efficacité de la phytoremédiation des épinards a été déterminée, en calculant les caractéristiques d'accumulation des métaux par les plantes (Chaturvedi et al., 2019):

Le facteur de bioaccumulation (BAF) au niveau des racines et des pousses indique l'efficacité d'une plante à extraire et accumuler les métaux lourds dans ses tissus, il a été calculé par la formule suivante :

$$BAF = \frac{\text{concentration du métal en tissus des plantes}}{\text{concentration du métal en soil}}$$

Le facteur de translocation (TF) représente la capacité d'une plante à transloquer le métal lourd accumulé des racines aux tissus aériens, il est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$TF = \frac{\text{Metal concentration in plant shoots}}{\text{Metal concentration in plant roots}}$$

Un BAF supérieur à 1 indique que la plante a la capacité de phytostabilisation, et un TF supérieur à 1 signifie que la plante peut absorber et éliminer les métaux lourds dans les organes aériens pour la phytoextraction (Xiao et al., 2021).

V. 6. Analyse des données

Une analyse de variance one-way (ANOVA) a été réalisée pour analyser les données, et le test de Tukey a été utilisé pour les comparaisons multiples entre les moyennes des traitements. Des lettres différentes indiquent des différences significatives ($P < 0,05$) entre les traitements. SPSS 20.0 a été utilisé pour toutes les études statistiques, y compris la construction de biplots par analyse catégorielle en composantes principales (Cat-PCA). Les coefficients de corrélation de Pearson et la carte thermique entre les paramètres de croissance des plantes et l'accumulation des métaux dans les tissus des épinards ont été réalisés à l'aide du logiciel Origin.

Chapitre 2 : Résultats et Discussion

I. Caractérisation des vers de terre

I. 1. Identification de l'espèce de vers de terre

- Les vers de terre échantillonnés dans la région d'Akrach – Rabat, Maroc, ont révélé la présence de trois genres de vers de terre morphologiquement distincts. Le spécimen le plus abondant (Figure 42) a été choisi pour être identifié et utilisé dans les expériences subséquentes.



Figure 42 : Espèce de vers de terre la plus abondante dans la région, choisie pour les études ultérieures

L'identification classique, selon la clé d'identification étant trop complexe, n'a pas abouti à la détermination du genre de ce ver de terre. Cependant, les caractères morphologiques simples (Tableau 10), nous ont mené à déterminer qu'il s'agit d'une espèce faisant partie du groupe écologique des endogés.

Tableau 10 : Caractères morphologiques du ver de terre isolé

Couleur d'épiderme	Marron sombre
Pigmentation	Verdâtre foncée
Tube digestive	Visible sous lumière
Prostomium	Zymologique
Clitellum	Présent — Rose clair Annulaire non évasé
Queue	Circulaire
Taille moyenne	70 — 90 mm longueur 15 — 25 mm largeur

En effet, souvent la recherche sur la taxonomie des vers de terre a été entravée par le manque de caractères morphologiques standardisés, la variabilité phénotypique et les difficultés à définir les caractères morphologiques aux stades juvéniles ou de cocon (Nouri-Aiin et al., 2021), par conséquent, le manque d'expertise taxonomique reste une contrainte majeure. Le codage à barres de l'ADN contribue à la discrimination efficace des espèces, à l'identification de nouveaux taxons et à la résolution des confusions taxonomiques (Domínguez et al. 2015 ; Tiwari et al. 2021 ; Marchán et al. 2022).

Les spécimens ont donc été analysés par codage à barres de l'ADN en utilisant les gènes COI, ARNr 28S, ARNr 16S et ND1 afin d'identifier l'espèce du ver de terre (Pérez-Losada et al., 2009). Lorsque les analyses d'ADN ont été utilisées, le ver a pu être identifiés avec des pourcentages d'identités différents selon la séquence de gène utilisée (Tableau 11). Malgré des différences mineures dans les ensembles de données et les arbres phylogénétiques (Figure 43), l'analyse des séquences COI, 28S, 16S et ND1 n'ont montré aucun désaccord majeur.

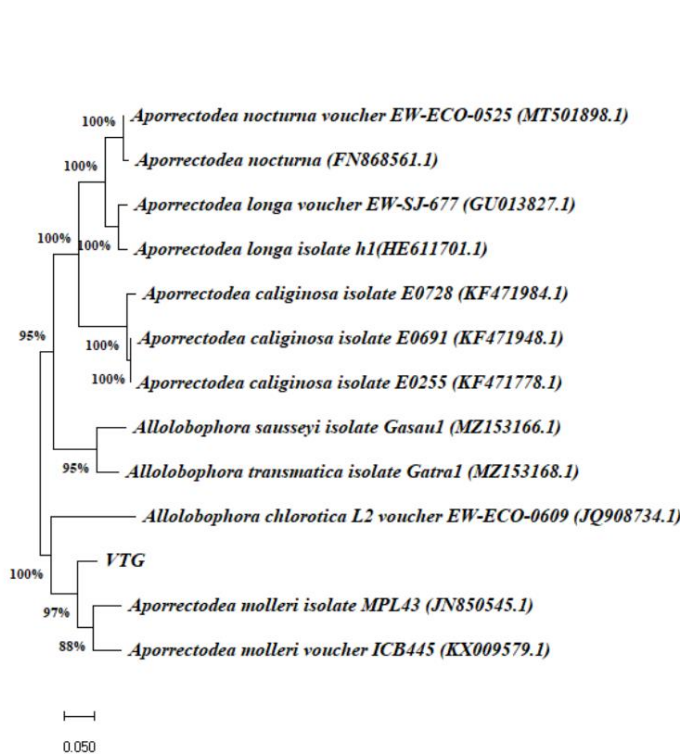
Tableau 11 : Affiliation de l'espèce après identification par l'ARN en utilisant les séquences des gènes COI, ARNr 16S, ND1 et ARNr 28S.

Identification basée sur	Espèce la plus proche	N° d'accension	Pourcentage d'identité
cytochrome oxydase sous-unité I (COI)	<i>Aporrectodea molleri</i> MPL43	JN850545.1	90,8 %
ARNr 16S mitochondrial	<i>Aporrectodea molleri</i> MPL43	FJ967637.1	96,2 %
NADH déshydrogénase (ND1)	<i>Aporrectodea molleri</i> MPL43	FJ967319.1	92,2 %
ARNr 28S nucléaire	<i>Aporrectodea moebii</i> MPL349	KJ912154.1	100 %
	<i>Aporrectodea molleri</i> MPL43	FJ967506.1	99,9 %

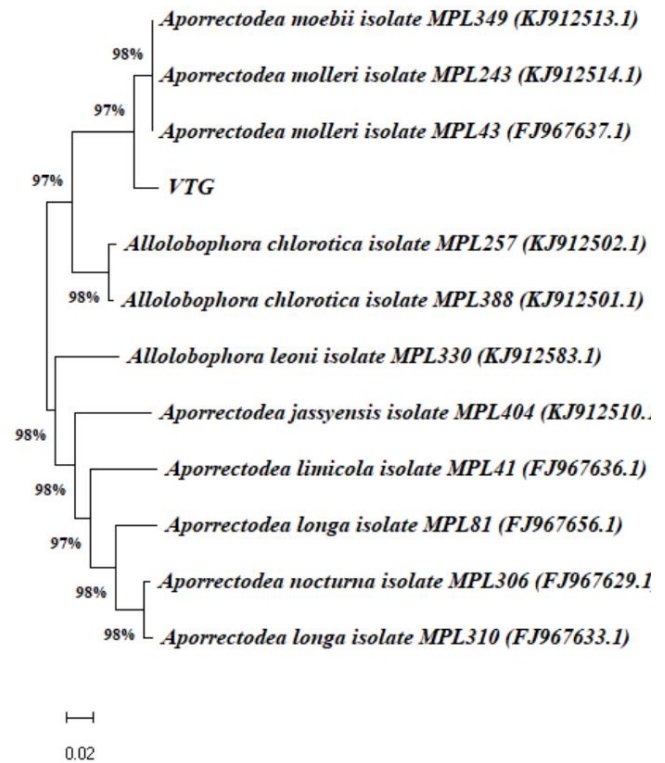
L'ensemble des arbres phylogénétiques basés sur la méthode du maximum Likelihood, présentés dans la Figure 43, indiquent le positionnement de notre spécimen dans le genre *Aporrectodea*, qui lui-même faisant parti de la famille des *Lumbricidae*. En prenant compte des quatre séquences de gènes, l'espèce a été déterminée en tant que *Aporrectodea molleri*, ayant le pourcentage de similarité le plus élevé.

Aporrectodea molleri (Rosa 1889) (synonyme homotypique : *Allolobophora molleri*) est un polymorphe de *A. moebii* (Michaelsen 1895), *A. fernandae* (Graff 1957), et de quelques autres espèces moins connues (Baha, 1997), ce qui pourrait expliquer l'apparition de *A. molleri* et *A. moebii* dans le même embranchement. *A. molleri* est un ver de terre endogène, qui préfère les sols riches en matière organique, ayant une quantité importante de litière végétale et recevant une humidité suffisante (Tejada et al., 2017). C'est une espèce de ver de terre très répandue dans les climats méditerranéens et sa présence a été précédemment reportée au Maroc, en Algérie, au Portugal, en Espagne, en France et au Mexique (Trigo et al. 1988 ; Baha 1997 ; Monroy et al. 2003 ; Pérez-Losada et al. 2012 ; Bazri 2013 ; Reynolds and Reeves 2019). Cependant, *Aporrectodea molleri* est une espèce peu étudiée en ce qui concerne son rôle écologique et ses interactions microbiennes.

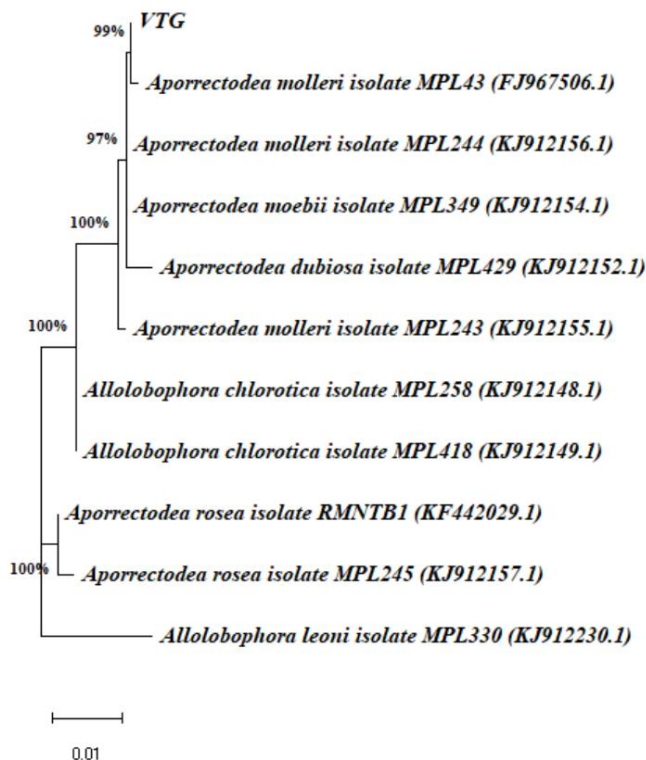
A: Gène de la sous-unité I de la cytochrome C oxydase (COI)



B: Gène de l'ARNr 16S mitochondrial



C: Gène du NADH déshydrogénase (ND1)



D: Gène de l'ARNr 28S nucléaire

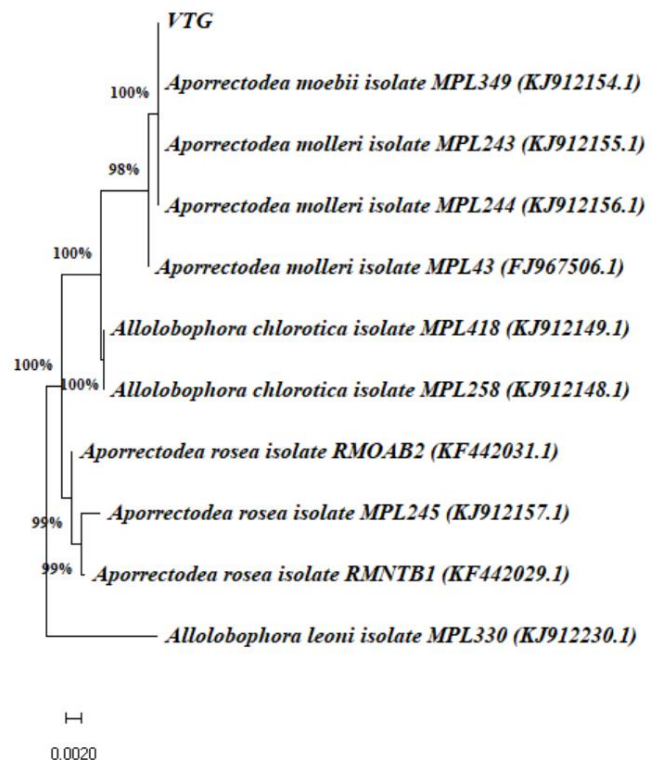


Figure 43 : Arbres phylogénétiques construits par méthode « Maximum Likelihood » suite à 1000 répétitions, montrant la proximité de notre spécimen de ver de terre VTG par rapport à des espèces connues en utilisant quatre gènes différents : COI, ARNr 16S, ND1 et ARNr 28S.

I. 1. Effet des extraits bruts de vers de terre sur la croissance des levures

Les résultats de la culture des deux espèces de levures, *Candida tropicalis* et *Filobasidium uniguttulatum*, sur des milieux préparés uniquement avec des extraits de vers de terre (VF et VJ) ont démontré leur capacité à croître et à assimiler ces extraits comme une source unique de nutriments. L'effet des extraits à différentes concentrations (C_n) sur la croissance de *Candida tropicalis* et *Filobasidium uniguttulatum* est présenté au niveau du tableau 12.

I. 1. 1. Milieux à base d'extraits de vers frais (VF)

Pour la levure *Candida tropicalis*, toutes les concentrations d'extraits bruts de VF ont permis sa croissance, avec un nombre moyen de colonies formées par boîte de Pétri significativement similaire aux concentrations de C_1 , C_2 , C_6 et C_7 . La croissance était significativement plus élevée aux concentrations C_3 , C_4 et C_5 qui ont permis le développement d'un nombre de colonies plus élevé par 5,9 %, 23,9 % et 7 %, respectivement, comparé au nombre obtenu dans le milieu SDA témoin.

D'autre part, *Filobasidium uniguttulatum* n'a pas pu se développer à la première concentration de C_1 de l'extrait de VF et la croissance aux concentrations les plus basses de C_6 et C_7 était significativement minimale. La croissance optimale a été obtenue, ainsi que celle de *Candida tropicalis*, à C_4 (0,375 g 100 mL⁻¹ d'extraits bruts), qui est la seule concentration qui a donné un nombre de colonies significativement plus élevé que celui du contrôle de 14,4 %.

I. 1. 2. Milieux à base d'extraits de vers à jeûne (VJ)

La capacité de la levure *Candida tropicalis* à se développer, sur des milieux à base d'extraits de vers de terre à jeun, était légèrement différente, puisque la croissance était significativement plus faible aux concentrations les plus élevées et les plus faibles : C_1 , C_2 et C_7 (Tableau 12). Toutes les autres concentrations : C_3 , C_4 , C_5 et C_6 ont donné un nombre moyen de colonies formées par boîte de Petri, significativement plus élevé que le nombre obtenu dans le milieu témoin (SDA) de 5,9 %, 20,1 %, 18,4 %, 18,7 %, respectivement, la croissance optimale ayant été obtenue à la concentration C_4 . Cependant, pour la levure isolée du sol *Filobasidium uniguttulatum*, seuls les extraits de VJ aux concentrations C_3 et C_4 ont permis une croissance significativement supérieure à celle obtenue sur le milieu témoin SDA ($p < 0,05$), supérieure de

12,6 % pour C₃ et de 12,8 % pour C₄. Les concentrations C₂, C₅ et C₆ des extraits bruts ont donné des résultats comparables à ceux de la SDA, tandis que pour C₁ et C₇, correspondant aux concentrations extrêmes (3 g 100 mL⁻¹ et 0,05 g 100 mL⁻¹), la croissance était significativement plus faible.

Tableau 12 : Nombre de colonies formées (NCF) de *Candida tropicalis* et *Filobasidium uniguttulatum* dans des milieux préparés avec des dilutions d'extraits bruts de vers de terre par rapport au milieu témoin SDA. Les lettres différentes (a, b, c, et d) indiquent les traitements qui diffèrent significativement au niveau P<0,05.

Yeast strain	Medium	SDA	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇
	Nutriments (g 100 mL ⁻¹)	5	3	1,5	0,75	0,375	0,19	0,09	0,05
<i>Candida tropicalis</i>	NCF (VF)	228.33 ± 1.45 ^a	231.00 ± 1.73 ^a	233.00 ± 1.73 ^a	241.67 ± 1.45 ^b	283.00 ± 2.08 ^c	244.33 ± 2.03 ^b	233.33 ± 0.88 ^a	227.00 ± 1.73 ^a
	NCF (VJ)	228.33 ± 1.45 ^b	220.67 ± 2.03 ^b	228.00 ± 2.08 ^b	241.67 ± 3.18 ^c	274.33 ± 2.96 ^d	270.33 ± 2,96 ^d	271.00 ± 1,53 ^d	203.00 ± 3,61 ^a
<i>Filobasidium uniguttulatum</i>	NFU (VF)	201.33 ± 1,76 ^c	0 ± 0 ^a	202.00 ± 2,31 ^c	201.00 ± 2,08 ^c	230.33 ± 1,86 ^d	211.67 ± 3,28 ^c	182.33 ± 2,40 ^b	188.00 ± 3,06 ^b
	NFU (VJ)	201.33 ± 1,76 ^b	182.33 ± 1,76 ^a	204.33 ± 2,40 ^b	226.67 ± 2,08 ^c	227.00 ± 1,76 ^c	206.00 ± 2,31 ^b	204.67 ± 2,40 ^b	187.33 ± 2,60 ^a

Nos résultats ont montré qu'à de faibles concentrations des milieux VJ et VF, la croissance des levures a été significativement plus faible par rapport au milieu de culture de référence. Ces diminutions seraient dues à des dilutions qui appauvrissent le milieu. En revanche, pour *Filobasidium uniguttulatum*, les fortes concentrations ont également affecté la croissance, soit en l'inhibant, soit en donnant une croissance significativement plus faible que dans le SDA. Cela serait probablement dû à l'excès de vitamines et de facteurs de croissance, qui sont connus pour leurs effets toxiques à des concentrations élevées. La concentration optimale pour la croissance des levures correspondait à 0,375 g d'extraits brut par 100 mL, quelle que soit la nature du milieu (VF ou VJ), les résultats étaient similaires pour les deux levures, mais les valeurs pour *Candida tropicalis* étaient toujours supérieures à celles de *Filobasidium*

uniguttulatum. Les résultats obtenus montrent que les exigences de *Candida tropicalis* en concentration de nutriments est légèrement inférieure à celle de *Filobasidium uniguttulatum*. De plus, les résultats confirment que la richesse des extraits en matières nutritives et en substances de croissance provient, principalement, de la composition intrinsèque de la masse corporelle des vers et non de celle de leur contenu intestinal.

De multiples études sur la composition nutritionnelle de la poudre sèche de vers de terre ont révélé qu'elle contient 60-70 % de protéines, 8-20 % de glucides, 7-10 % de lipides, 2-3 % de minéraux, diverses vitamines et des composés indoliques rhizogènes (Edwards, 1985 ; Sogbesan et al., 2008 ; El Harti et al., 2009 ; Anitha et al., 2012 ; Köse et al., 2017). Cette composition diversifiée des vers de terre, peut expliquer pourquoi les deux levures testées se sont développées de façon optimale à des concentrations d'extraits bruts de VF et VJ de seulement 0,375 g d'extrait brut par 100 mL, contrairement au milieu SDA, qui contient 5 g de nutriments par 100 mL de matières nutritives (peptone et dextrose).

La projection de nos résultats dans le milieu naturel pourrait aider à comprendre l'effet post-mortem des vers de terre dans la rhizosphère. En effet, ces animaux invertébrés, qui représentent environ 80 % de la biomasse animale au sol, ont un cycle de vie potentiellement très long, pouvant aller jusqu'à dix à douze ans, bien que de nombreuses espèces ne vivent qu'une ou deux saisons au sol, en raison de leur sensibilité à une grande variété de prédateurs (Edwards et al., 1996). Après leur disparition, leurs tissus décomposés enrichissent le sol en nutriments et éventuellement en facteurs de croissance de grande valeur, notamment en azote (Edwards, 1985 ; Christensen, 1988 ; Whalen et al., 1999). Cet enrichissement stimulerait la fertilité du sol, en augmentant l'activité et la croissance des microorganismes, notamment des levures. En effet, une gamme variée de levures PGP présentent des caractéristiques, qui favorisent la croissance des plantes et contribuent à cet effet de diverses manières, notamment par leurs capacités de biocontrôle (Falih et al., 1995 ; Nassar et al., 2005 ; El-Tarabily et al., 2006 ; Cloete et al., 2009 ; Prabina et al., 2019 ; Silambarasan et al., 2020). Dans nos recherches, nous avons examiné deux espèces de levures présentes dans le sol. *Candida tropicalis* est fréquemment découverte dans la matière végétale en décomposition et a été identifiée comme une levure PGP (Amprayn et al., 2012). *Filobasidium uniguttulatum*, découvert par Kwon-Chung en 1977 (Kwon-Chung, 1977) et précédemment connu sous le nom de *Cryptococcus uniguttulatum*, n'a pas été signalé dans des études ultérieures. Cependant, le genre *Cryptococcus* est un membre des levures PGP, et ses implications dans l'augmentation

de la productivité des plantes ont été rapportées (Medina et al., 2004 ; El-Tarabily et al., 2006 ; Cloete et al., 2009).

I. 2. Effet des excréctions cutanées des vers de terre sur la croissance des levures

Étonnamment, et contrairement aux extraits bruts de vers de terre, les deux espèces de levures ont été incapables de se développer sur des milieux contenant de fortes concentrations d'excréments cutanés (Tableau 13). À de très faibles concentrations (> 0,03 %) la croissance commence à être positive.

Tableau 13 : Nombre de colonies formées (NCF) de *Candida tropicalis* et *Filobasidium uniguttulatum* dans des milieux préparés avec des dilutions d'excréments cutanés de vers de terre par rapport au milieu témoin SDA. Les lettres différentes (a, b, c, et d) indiquent les traitements qui diffèrent significativement au niveau $P < 0,05$.

	Medium	SDA	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇
Yeast strain	Nutriments (g 100 mL ⁻¹)	5	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	0,015
<i>Candida tropicalis</i>	228.33 ± 1,45 ^a	0	0	0	0	0	0	3 ± 1,8 ^c	20 ± 1,2 ^b
<i>Filobasidium uniguttulatum</i>	201.33 ± 1,76 ^a	0	0	0	0	0	0	0	7 ± 1 ^b

En effet, les excréments cutanés englobent tous les fluides produits par la surface du corps du ver de terre, y compris le mucus produit dans les micropores des cellules glandulaires qui tapissent toute la surface du ver de terre, le fluide coelomique libéré par les pores coelomiques et l'urine excrétée par les pores urinaires ventraux. De plus, les fluides susmentionnés sont connus pour être denses en nutriments, contenant des composés azotés et des protéines (Salmon, 2001 ; Santocki et al., 2016 ; Chelkha et al., 2021). La sécrétion mucilagineuse est un élément essentiel de la barrière antibiotique du système immunitaire du ver de terre. Les vers de terre extrudent le mucus dans des vésicules intactes contenant de petits granules. Ce mucus contient des mucopolysaccharides et des protéines qui peuvent agir comme bactéricides, qui

diluent le nombre de microorganismes à la surface du ver de terre, les deux assurant une protection contre l'invasion des microorganismes (Cooper et al., 2003 ; Wang et al., 2011).

Les cavités corporelles des vers de terre sont remplies de liquide cœlomique et de leucocytes, qui sont aussi diversifiés morphologiquement que ceux d'autres invertébrés de complexité similaire. En effet, ils ressemblent aux leucocytes des vertébrés en termes d'opsonisation, de phagocytose, d'encapsulation, d'inflammation, d'agglutination, de mitogènes, de lyse et de destruction de cibles allogéniques et xénogéniques. Le mécanisme d'immunité interne des vers de terre comprend également une réponse humorale représentée par le lysozyme, la synthèse et la sécrétion d'agglutinines, un système de phénoloxydase/peroxydase, et la synthèse et l'expression de composants lytiques appelés fétidines (Cooper et al., 2003 ; Bilej et al., 2010). Des recherches antérieures ont indiqué que les excréments de vers de terre, en particulier le mucus, ont un effet inhibiteur sur les champignons (Plavšín et al., 2017) et les levures étant les microorganismes les plus sensibles (Yurkov et al. 2008 ; Bilej et al. 2010 ; Roubalová et al. 2015 ; Fiołka et al. 2021). Cependant, le fait que ces excréments cutanés aient été stérilisés par autoclavage à 121 °C, indique que la ou les molécules responsables de cet effet inhibiteur sont très probablement issues d'une activité humorale et ayant une propriété thermostable.

II. Isolement, identification moléculaire et caractérisation biochimiques des bactéries isolées du tissu chloragène

II. 1. Isolement et criblage des bactéries

Dans la présente étude, la culture de la suspension, résultante de l'écouvillonnage du tissu chloragène, a indiqué la présence de bactéries aérobies au niveau du tissu chloragène du ver de terre *Aporrectodea molleri*. Des bactéries aérobies ont été cultivées avec succès dans les trois milieux différents utilisés. Le milieu (BHI) a permis la croissance du plus grand nombre de colonies, suivi du milieu contenant uniquement des extraits de vers de terre (VT) et enfin du milieu à base d'urée (Urée). En dépit de cela, le milieu à base d'urée était celui qui présentait la plus grande diversité de colonies (Figure 44).

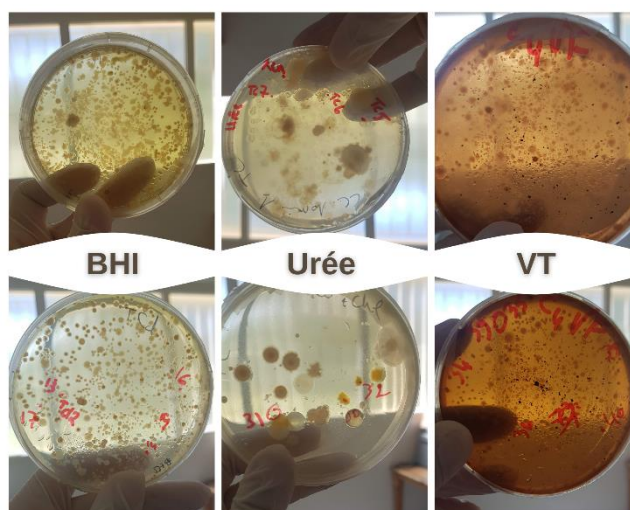


Figure 44 : Culture des bactéries aérobies du tissu chloragène sur les trois milieux de culture : BHI ; Urée (Milieu à base d'urée et sans source d'azote) ; VT (Milieu exclusivement à base d'extraits de vers de terre).

En se basant sur les caractères macroscopiques des colonies, 49 isolats ont été choisis des trois différents milieux, 44,9 % des bactéries ont été isolés à partir du milieu à base d'urée, 30,6 % du milieu BHI et 24,5 % du milieu à base d'extraits de ver de terre (Tableau 14). La forte prévalence des isolats au niveau du milieu de culture contenant l'urée, comme source unique d'azote, pourrait fortement être liée à leur habitat d'origine, tissu chloragène, qui est responsable du stockage d'urée (Fischer et al., 1992); indiquant ainsi leur aptitude à hydrolyser l'urée.

Tableau 14 : Nombre d'isolats bactériens du tissu chloragogène par milieu de culture

Milieus de culture	Nombre d'isolats
Brain Heart Infusion (BHI)	15
Milieu à base d'urée (Urée)	22
Milieu à base d'extraits de vers de terre (VT)	12
Total : 49	

II. 2. Caractérisation biochimique des isolats

Après la purification des isolats, l'étude macroscopique et microscopique a permis la distinction et la sélection de 15 morphotypes différents, qui ont été choisis pour caractériser leur profil biochimique et les identifier moléculairement. Une galerie biochimique classique et une autre miniaturisée diversifiée ont été réalisées, afin de caractériser les souches isolées et de déterminer leur capacité à utiliser différents métabolites et de produire plusieurs enzymes (Tableau 15). Dans l'ensemble, tous les isolats étaient capables de métaboliser le glucose et les thiols aliphatiques ; 73 % d'entre eux ont fermenté le saccharose et 53 % ont hydrolysé les lipides en acides gras ; 60 % avaient la capacité de métaboliser le mannitol avec production d'acide et uniquement 33 % pouvaient utiliser le citrate. En outre, parmi les 15 isolats bactériens, 73 % étaient catalases positives, 67 % étaient oxydases positives et toutes les bactéries Gram-négatives produisaient les phosphatases. Par ailleurs, la capacité à produire d'autres enzymes a été variable selon l'espèce. Les morphotypes bactériens isolés du tissu chloragogène avaient des profils enzymatiques variés et intéressants, leur permettant d'utiliser une large gamme de substrats, ces potentiels pourraient être liés à la spécificité de leur site d'isolement. Le tissu chloragogène recouvre la partie externe de l'intestin, a une fonction semblable au foie, qui permet à ses cellules la synthèse et le stockage du glycogène, des lipides et l'excrétion du catabolisme cellulaire (Roubalová et al. 2019 ; Courtois et al. 2021 b). Des études antérieures ont rapporté que plusieurs bactéries productrices d'enzymes, isolées de l'intestin des vers de terre, peuvent être impliquées dans la décomposition de matières organiques complexes et de polymères naturels au cours du processus de digestion, vivant en symbiose transitoire ou permanente avec leur hôte (Byzov et al. 2009, 2015 ; Samson et al. 2020).

Tableau 15 Caractéristiques biochimiques des isolats

	<i>Aeromonadaceae</i>			<i>Pseudomonadaceae</i>			<i>Enterobacteriaceae</i>			<i>Bacillaceae</i>					
Caractéristiques	TC 22	TC 38	TC 48	TC 11	TC 29	TC 1	TC 33	TC9	TC 44	TC 8	TC 4	TC 7	TC 10	TC 34	TC 45
Milieu d'isolement	BHI	VT	BHI	Urée	Urée	Urée	BHI	Urée	VT	VT	Urée	Urée	Urée	VT	BHI
Substrats utilisés															
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Avec production de gaz	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
Mannitol	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
Citrate	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-
Thiol aliphatique	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Triglycérides	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
Enzymes produites															
Catalase	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Oxydase	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-
Phosphatases	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
β -galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
β -glucosaminidase	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithine-decarboxylase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine-dihydrolase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Proline- β -naphthylamidase	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
Pyrrolidonyl- β -naphthylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Glutamyl- β -naphthylamidase	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-

II. 3. Identification moléculaire par séquençage du gène ARNr 16S

Les bandes des fragments d'ARNr 16S amplifiés (Figure 45) ont été purifiées et le séquençage du gène de l'ARNr 16S a été réalisé afin de déterminer leurs positions taxonomiques. Les séquences nucléotidiques correspondantes ont été comparées à celles de la plateforme BLAST de la base de données NCBI GenBank et un arbre phylogénétique a été construit ; la position des isolats et leur proximité avec d'autres bactéries de référence ont été déterminées (Figure 46).

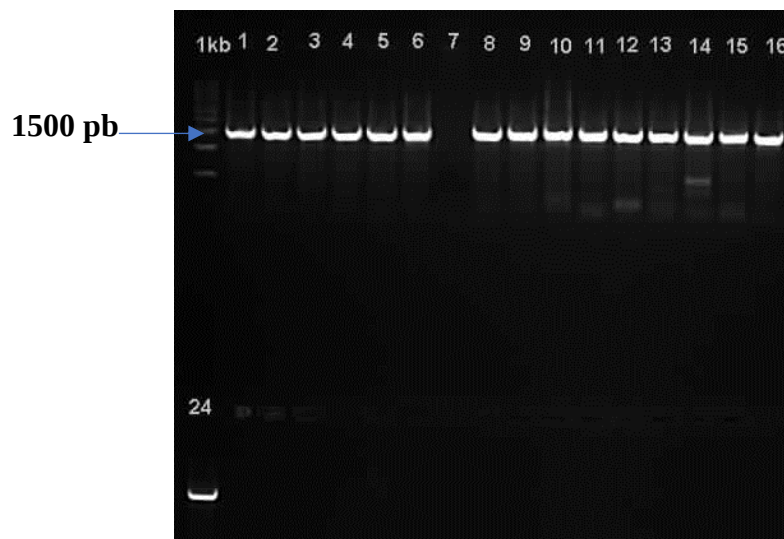


Figure 45 : Electrophorèse réalisée par la migration des produits de PCR sur un gel d'agarose à 1 % avec un marqueur de poids moléculaire de 1 kb. Photo visualisée par le système de documentation photo « G Box ».

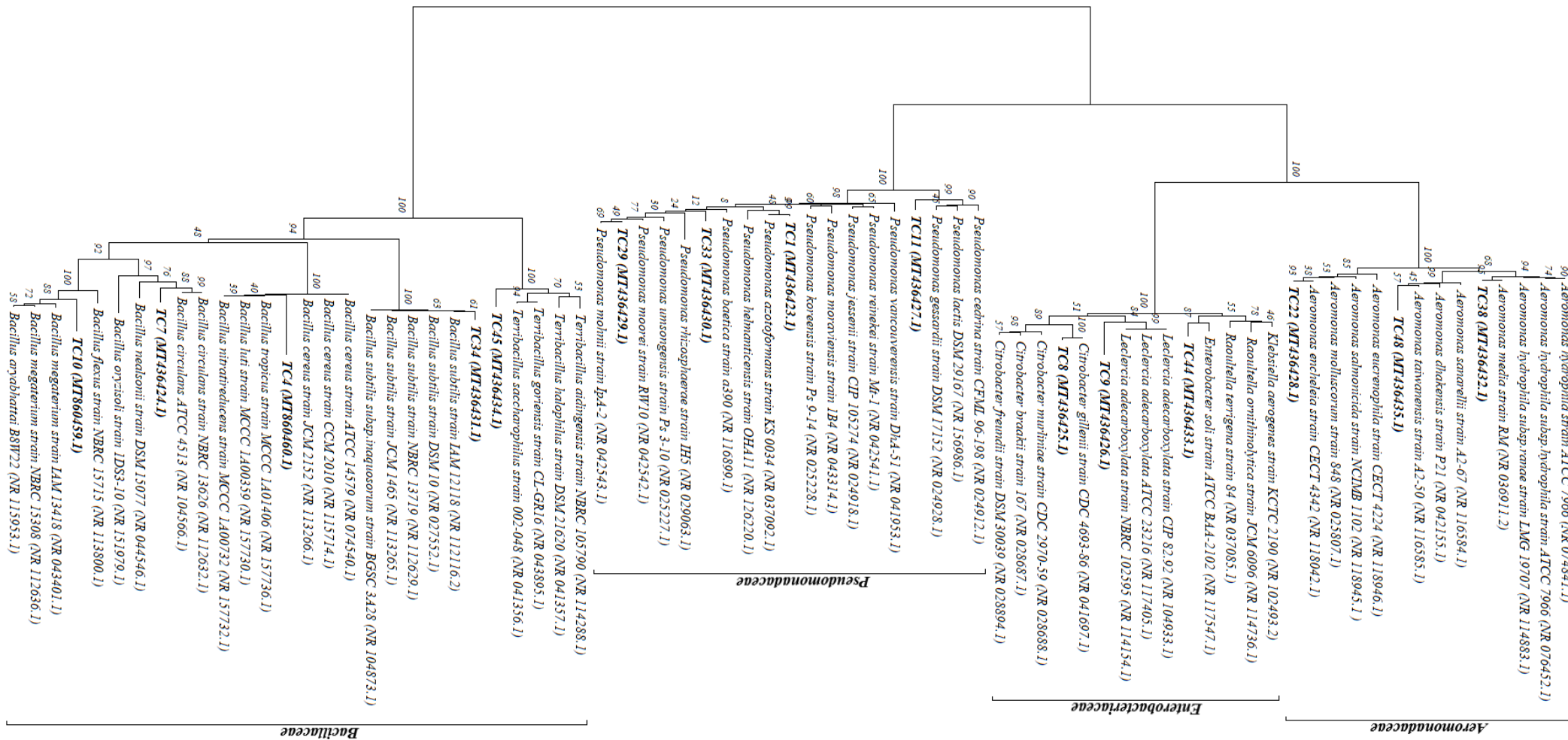


Figure 46 : Analyse phylogénétique moléculaire par la méthode Neighbor-Joining de la séquence complète d'ARNr 16 S. L'arbre phylogénétique montre la position de nos souches isolées et les souches types d'espèces étroitement apparentées. Les valeurs bootstrap (exprimées en pourcentages de 1500 répétitions) sont présentées aux points de branchement. Barre : 0,05 substitutions par position de nucléotide.

Les affiliations phylogénétiques avec les souches bactériennes les plus proches et les numéros d'accension correspondants sont présentées au niveau du tableau 15. Les isolats bactériens ont été affiliés à 2 phylums (66,67 % aux *Gammaproteobacteria* et 33,3 % aux *Firmicutes*), 4 familles (*Aeromonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Bacillaceae*) et divisés en 7 genres bactériens différents (pourcentage de similitude entre 98 et 100 %). Un faible pourcentage de similarité (97 %) a été présenté par la souche TC4 qui pourrait appartenir à une nouvelle espèce du genre *Bacillus*.

Tableau 16 : Affiliation taxonomique des bactéries isolées du tissu chlorogène du ver de terre *Aporrectodea molleri*

Isolat (N° d'accension)	Espèce la plus proche (N° d'accension)	Pourcentage d'identité
TC22 (MT436428.1)	<i>Aeromonas encheleia</i> CECT 4342 (NR_118042.1)	100 %
TC38 (MT436432.1)	<i>Aeromonas media</i> RM (NR_036911.2)	100%
TC48 (MT436435.1)	<i>Aeromonas taiwanensis</i> A2-50 (NR_116585.1)	98,2 %
TC9 (MT436426.1)	<i>Leclercia adecarboxylata</i> CIP 82.92 (NR_104933.1)	99,1 %
TC44 (MT436433.1)	<i>Enterobacter soli</i> ATCC BAA-2102 (NR_117547.1)	98,6%
TC8 (MT436425.1)	<i>Citrobacter gillenii</i> CDC 4693-86 NR_041697.1	99,7%
TC1 (MT436423.1)	<i>Pseudomonas azotoformans</i> KS0034 (NR_037022.1)	98,8 %
TC11 (MT436427.1)	<i>Pseudomonas gessardii</i> DSM 17152 (NR_024928.1)	98,8 %
TC29 (MT436429.1)	<i>Pseudomonas mohnii</i> IpA-2 (NR_042543.1)	99,3%
TC33 (MT436430.1)	<i>Pseudomonas baetica</i> a390 (NR_116899.1)	99,2%
TC4 (MT860460.1)	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 (NR_074540.1)	97,0 %
TC7 (MT436424.1)	<i>Bacillus circulans</i> ATCC 4513 (NR_104566.1)	99,0%
TC10 (MT860459.1)	<i>Bacillus megaterium</i> NBRC 15308 (NR_112636.1)	98,1%
TC34 (MT436431.1)	<i>Bacillus subtilis</i> IAM 12118 (NR_112116.2)	99,5 %
TC45 (MT436434.1)	<i>Terribacillus goriensis</i> CL-GR16 (NR_043895.1)	98,5 %

La classification phylogénétique des isolats était comparable à la majorité des études réalisées sur des communautés bactériennes cultivables isolées de vers de terre, car il a été rapporté qu'elles appartiennent principalement à des groupes bactériens tels que *Firmicutes*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria* et *Flavobacteria*, entre autres groupes (Byzov et al. 2009 ; Singh et al. 2015, 2016 ; Samanta and Das 2016 ; Wani et al. 2017). La présence de ces groupes spécifiques était liée à leur activation métabolique et à la croissance rapide qui se produit dans l'environnement interne du ver de terre (Medina-Sauza et al., 2019 ; Sapkota et al., 2020). Par ailleurs, l'isolement des seules bactéries affiliées aux taxons *Firmicutes* et *Gammaproteobacteria* peut être associé à un effet inhibiteur du fluide coelomique du ver de terre, qui est en contact permanent avec le tissu chloragogène (Byzov et al. 2009 ; Singh et al. 2016 ; Wani et al. 2017). Toutefois, une analyse métagénomique du tissu chloragogène permettrait d'en savoir plus sur cette communauté bactérienne.

III. Caractérisation du potentiel PGP des microorganismes isolés et résistance aux métaux lourds

III. 1. Caractérisation qualitative des souches isolées à produire des éléments bénéfiques à la croissance des plantes

Les quinze isolats du tissu chloragogène d'*Aporrectodea molleri* présentaient de multiples traits PGP qui ont été testés qualitativement et qui variaient selon le trait et l'isolat. Les résultats sont décrits dans le tableau 17.

III. 1. 1. Production des sidérophores

La production de sidérophores par les isolats a été analysée qualitativement sur boîtes de Pétri contenant le milieu CAS. Neuf des quinze souches ont réussi à produire des sidérophores, entraînant la formation d'une zone de halo variable. En effet, tous les isolats faisant partie du genre *Aeromonas* étaient incapables de synthétiser des sidérophores et tous les isolats Gram-positifs possédaient ce trait. Des recherches antérieures ont établi la capacité des genres bactériens *Enterobacter*, *Pseudomonas* et *Bacillus* à produire une variété de différents types de sidérophores (Kumar S. et al., 2017 ; Das et al., 2018 ; Thi Thuy Ha et al., 2018), qui agissent comme des agents de solubilisation du fer à partir de minéraux ou de composés organiques (Fukushima et al., 2014), dans des conditions de carence en fer.

III. 1. 2. Fixation d'azote

La présente étude a révélé que 66,7 % des 15 souches isolées se sont développées dans le milieu de culture sans source d'azote, ce qui indique leur capacité à utiliser et fixer l'azote atmosphérique, pour synthétiser leurs protéines cellulaires. L'azote, étant le principal élément nutritif nécessaire à la croissance des plantes, est présent dans le sol en petites quantités et est le plus souvent indisponible pour l'absorption par les plantes. Les bactéries fixatrices d'azote convertissent le gaz diazote (N_2) en ammoniac (NH_3), ce qui constitue la principale voie de fixation biologique de l'azote (Tillinghast, 1968).

III. 1. 3. Solubilisation du phosphate et du potassium insolubles

Tout comme l'azote, le phosphore (P) et le potassium (K) sont des macronutriments essentiels à la croissance des plantes et jouent un rôle important dans l'activation de plusieurs processus métaboliques. 46,7 % (7 souches) des isolats appartenant aux genres *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Enterobacter* solubilisait à la fois le phosphate tricalcique et le potassium de la poudre de muscovite, additionnés comme source unique de ces nutriments dans des milieux solides. En effet, , de nombreux genres bactériens libèrent P et K des minéraux insolubles et des composés inorganiques par divers mécanismes, comme la production d'acides organiques pour les rendre solubles pour l'absorption par les plantes (Sessitsch et al. 2013 ; Biswas et al. 2018 ; Banerjee et al. 2019).

Tableau 17 : Caractères favorisant la croissance des plantes exprimées par 15 les bactéries isolées

Isolats	Production des Sidérophores	Fixation d'azote	Solubilisation	
			P	K
<i>Aeromonas encheleia</i> TC22	-	+	-	-
<i>Aeromonas media</i> TC38	-	-	-	-
<i>Aeromonas sp.</i> TC48	-	-	-	-
<i>Leclercia adecarboxylata</i> TC9	-	-	+	+
<i>Enterobacter soli</i> TC44	+	+	+	-
<i>Citrobacter gillenii</i> TC8	+	+	-	+
<i>Pseudomonas azotoformans</i> TC1	+	+	+	-
<i>Pseudomonas sp.</i> TC11	-	+	+	+
<i>Pseudomonas mohnii</i> TC29	-	-	-	+
<i>Pseudomonas sp.</i> TC33	+	+	+	-
<i>Bacillus sp.</i> TC4	+	+	+	+
<i>Bacillus circulans</i> TC7	+	+	+	+
<i>Bacillus sp.</i> TC10	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> TC34	+	+	+	+
<i>Terribacillus sp.</i> TC45	+	-	+	+

III. 2. Caractérisation quantitative des 15 souches isolées, à produire des éléments bénéfiques à la croissance des plantes

III. 2. 1. Production d'Acide Indole Acétique AIA

Les 15 isolats ont été criblés pour la production d'AIA en présence de 3 g L⁻¹ de L-tryptophane, utilisé comme précurseur. Sept isolats appartenant aux genres *Aeromonas*, *Pseudomonas* et *Bacillus* se sont révélés capables de produire des quantités variables de cette phytohormone (figure 47), allant de 4,32 à 75,83 µg mL⁻¹. *Aeromonas encheleia* TC22 a produit la plus forte concentration d'AIA, suivie de *Bacillus circulans* TC7, qui a produit 44,58 µg mL⁻¹. Les 4 isolats bactériens *Pseudomonas* sp. TC33, *Bacillus* sp. TC10, *Bacillus subtilis* TC34, et *Pseudomonas mohnii* TC29 ont tous produit de l'AIA à des concentrations modérées de 31,95 ; 29,90 ; 27,86 et 22,95 µg mL⁻¹, respectivement. D'autres études ont confirmé la capacité des souches appartenant à ces genres, à produire de l'AIA en présence de L-tryptophane, à des concentrations allant de 1,16 à 300 µg mL⁻¹ (Halda-Alija 2003 ; Li et al. 2017 ; Lopes et al. 2018 ; Kramer et al. 2020 ; Huang et al. 2020 ; Pandey and Gupta 2020).

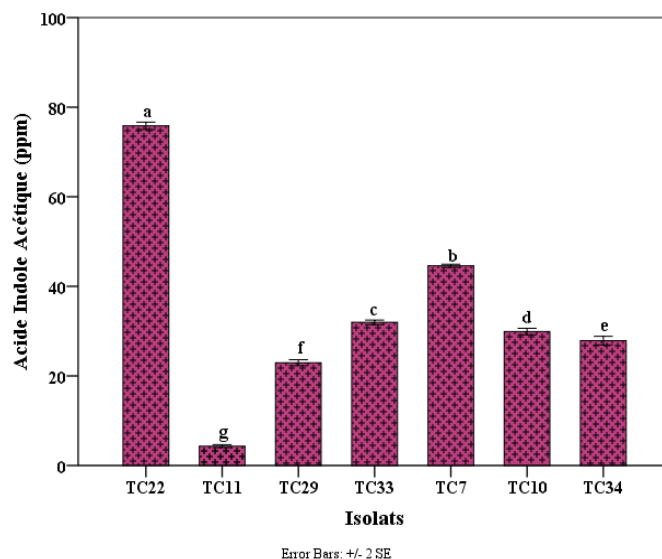


Figure 47 : Production d'AIA (µg mL⁻¹) par 7 souches isolées du ver de terre *Aporrectodea molleri*. (n=3)

III. 2. 2. Production de l'ammonium et de nitrate

Les résultats (Figure 48) montrent que neufs des 15 souches bactériennes étaient capables de produire de l'ammonium avec des valeurs variant de 2,4 à 30,1 ppm, la plus grande quantité d'ammonium étant produite par la souche *Pseudomonas azotoformans* TC1. Dans les mêmes solutions bactériennes, le nitrate a été synthétisé par seulement quatre souches bactériennes qui étaient capables d'oxyder l'ammonium – la concentration la plus élevée (31,0 ppm) a été enregistrée par la souche *Aeromonas encheleia* TC22.

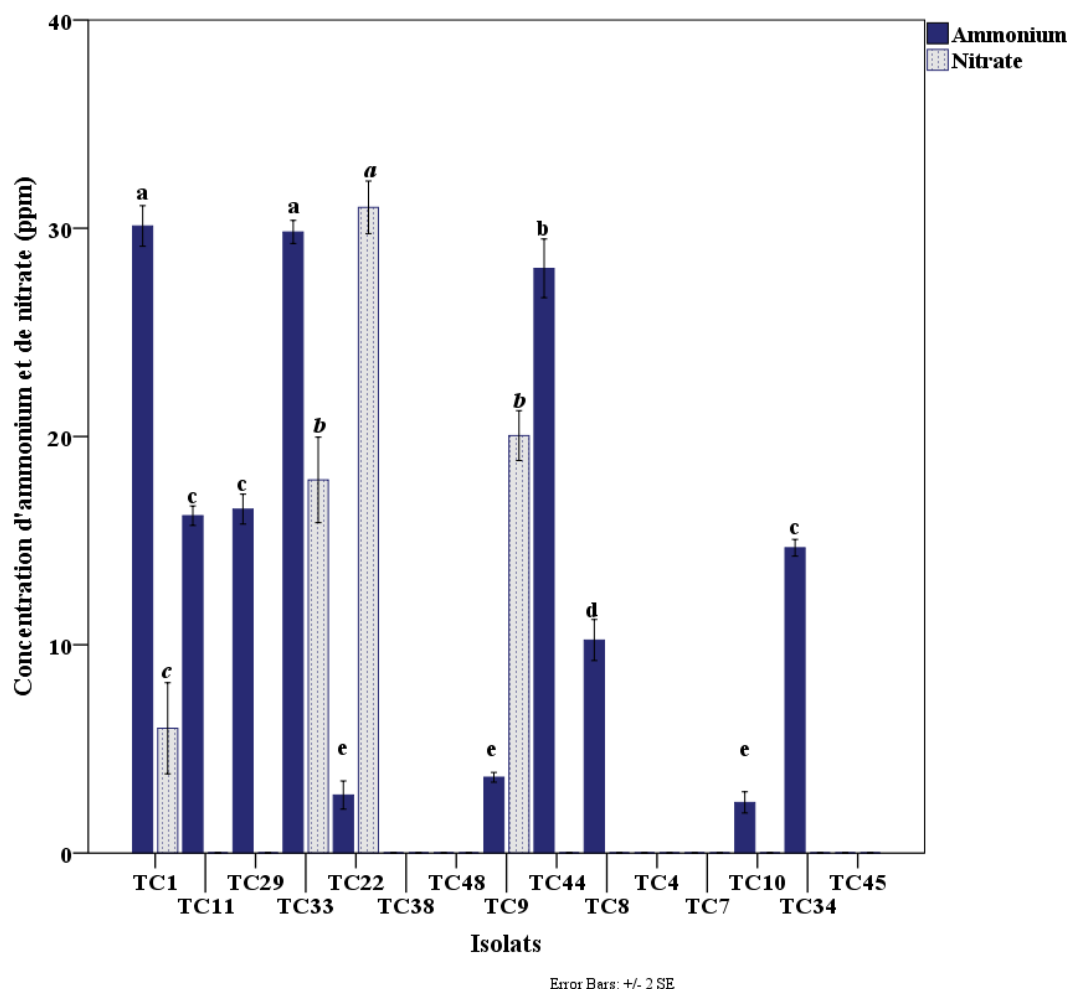


Figure 48 : Production d'ammonium et de nitrate dans un milieu dépourvu de source d'azote par les isolats bactériens. Résultats présentés par moyenne de trois répétitions, la barre d'erreur représente l'erreur standard.

La capacité des 9 souches à produire de l'ammonium, dans des milieux sans azote, à différentes concentrations, indique leur potentiel à fixer le N_2 atmosphérique et à rendre ce nutriment disponible pour être absorbé par les plantes. Quatre souches : *Aeromonas encheleia* TC22, *Pseudomonas azotoformans* TC1, *Pseudomonas sp.* TC33 et *Leclercia adecarboxylata* TC9 étaient positives à la production de nitrate (conversion de l'ammonium). En fait, les *Gammaproteobacteria* sont connues pour leur pouvoir à oxyder l'ammonium-N, par le biais de l'ammonium monooxygénase, et les espèces *Aeromonas* ont été rapportées précédemment, pour leur pouvoir à oxyder l'ammonium-N en anaérobie et en aérobie, car elles possèdent la glutamate synthase, impliquée dans l'assimilation de l'ammonium (Taabodi et al., 2020).

III. 2. 3. Solubilisation du phosphate et du potassium insolubles

Les potentiels de solubilisation du phosphate des 15 isolats variaient entre 5,9 et 36,2 ppm, la souche *Pseudomonas azotoformans* TC1 a libéré la plus grande quantité de P soluble (Figure 49), suivie par *A. encheleia* TC22 (32,1 ppm) et *B. subtilis* TC34 (29,6 ppm).

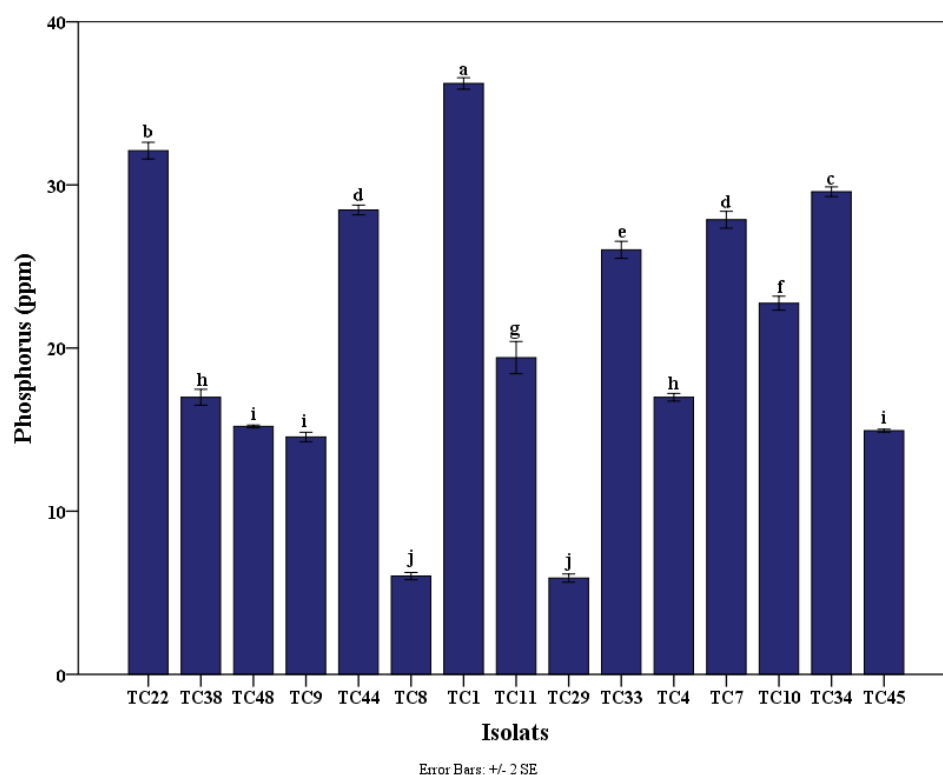


Figure 49 : Solubilisation du phosphate tricalcique en milieu liquide par les 15 isolats bactériens. Résultats présentés par moyenne de trois répétitions, la barre d'erreur représente l'erreur standard.

Des bactéries appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Enterobacter*, et *Bacillus*, *Pantoea*, *Rhizobium*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, et *Leclercia* ont été décrites précédemment, comme étant des solubilisatrices de phosphate efficaces (Billah et al., 2019 ; Rawat et al., 2021). La minéralisation, la solubilisation et l'immobilisation sont les méthodes prédominantes de diffusion du phosphore dans le sol, par les bactéries solubilisatrices de phosphate, qui sont influencées par les minéraux inorganiques disponibles dans le sol. De nombreux acides organiques produits par ces bactéries, comme l'acide gluconique, l'acide 2 - céto gluconique, l'acide lactique, l'acide iso valérique, l'acide isobutyrique, l'acide acétique, l'acide oxalique et l'acide citrique, sont impliqués dans l'amélioration de la solubilité des phosphates insolubles (Biswas et al., 2018).

Cependant, la solubilisation du potassium a une valeur allant de 10,3 à 16,0 ppm. *Pseudomonas mohnii* TC29, *Citrobacter gillenii* TC8 et *Leclercia adecarboxylata* TC9 ont le potentiel de solubilisation du potassium le plus élevé, avec une libération de K soluble à des concentrations variantes entre 15,6 et 16,0 ppm (Figure 50).

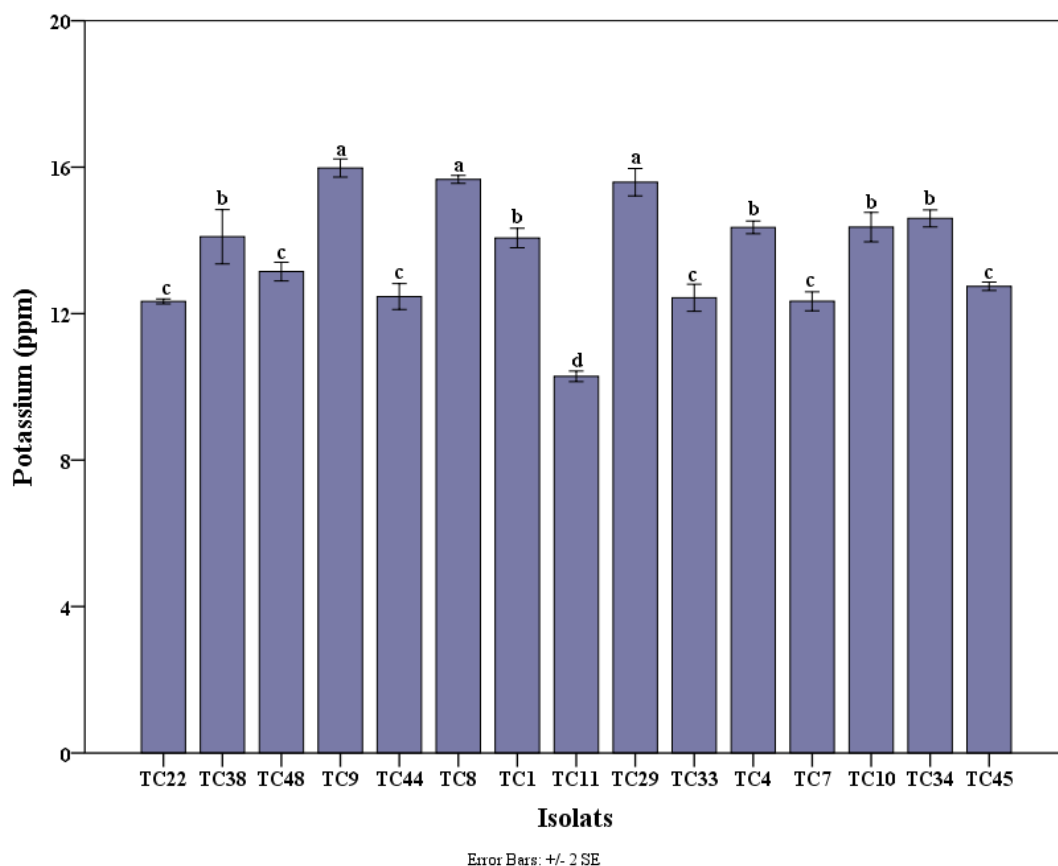


Figure 50 : Solubilisation du potassium du feldspath en milieu liquide par les 15 isolats bactériens. Résultats présentés par moyenne de trois répétitions, la barre d'erreur représente l'erreur standard.

En effet, un large éventail de bactéries, dont nos isolats, solubilisant le potassium, a été reporté auparavant. Cependant, le potentiel de *Citrobacter gillenii* à solubiliser le potassium est reporté pour la première fois dans cette étude. La production d'acides organiques est un mécanisme majeur de la solubilisation du potassium. Les bactéries solubilisatrices de K, synthétisent et libèrent des acides organiques dans l'environnement, acidifiant à la fois la cellule microbienne et son environnement, permettant la libération du K^+ des minéraux (Meena et al., 2016). Les acides tartrique, citrique, oxalique, gluconique, lactique et malique sont tous connus pour y être impliqués. Ces acides organiques produisent des protons, qui peuvent déplacer le potassium insoluble des minéraux tels que les micas, le feldspath et l'orthose (Kour et al., 2020).

III. 3. Tolérance des bactéries aux métaux lourds : détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice CMI

La résistance des 15 bactéries sélectionnées, à cinq métaux lourds différents (Mn, Zn, Cu, Cd ou Ni), ajoutés à des concentrations variables sur un milieu gélosé SLP, est présentée dans le tableau 18. Les souches bactériennes présentent des degrés variables de résistance aux différents métaux lourds. Le manganèse était l'élément le moins toxique ; les quinze souches ont toutes toléré les ions manganèse à une concentration d'au moins 50 mM ; six souches ont démontré une tolérance élevée, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) comprises entre 2750 et 4675 ppm. Les résultats ont indiqué que Zn était le deuxième métal le plus toléré par les bactéries, avec des valeurs de CMI allant de 15 à 360 ppm. Cinq bactéries tolèrent le Zn à 160 ppm ou plus, tandis que deux souches, TC 34 et TC 45, avaient des valeurs CMI de 260 et 360 mM, respectivement. Le cuivre et le cadmium, en revanche, étaient plus toxiques pour les souches isolées, seules cinq souches toléraient plus de 50 ppm de Cu, tandis que 9 souches toléraient le cadmium à des CMI supérieures à 55 ppm. Ni était le plus toxique des métaux lourds testés ; les valeurs CMI des bactéries isolées allaient de 15 à 35 ppm.

Les résultats ont montré que le comportement des bactéries vis-à-vis des métaux lourds toxiques variait selon l'espèce bactérienne et les métaux lourds. Six souches bactériennes, *Citrobacter gillenii* TC8, *Pseudomonas sp.* TC33, *Bacillus sp.* TC4, *Bacillus circulans* TC7, *Bacillus subtilis* TC34 et *Terribacillus sp.* TC45, avaient une concentration minimale inhibitrice (CMI) égale ou supérieure à 3850 ppm pour le Manganèse, 100 ppm pour le Zinc, 50 ppm pour le Cuivre, 55 ppm pour le Cadmium et 30 ppm pour le Nickel. De nombreuses études ont confirmé la capacité des souches PGP appartenant aux genres *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Terribacillus* à résister et à éliminer divers métaux lourds (Tiwari et al., 2018 ; Verma et al., 2019 b). Les bactéries favorisant la croissance des plantes ont démontré leur capacité à résister au stress des métaux lourds ; elles le font en liant les métaux aux sidérophores, aux métabolites et aux transporteurs bactériens (Tiwari et al., 2018).

Tableau 18 : Concentration minimale inhibitrice (CMI, ppm) des métaux lourds pour les 15 isolats bactériens

Isolats	Mn	Zn	Cu	Cd	Ni
<i>Aeromonas encheleia</i> TC22	2750	30	15	35	25
<i>Aeromonas media</i> TC38	4400	80	15	90	25
<i>Aeromonas sp.</i> TC48	3300	65	15	10	25
<i>Leclercia adecarboxylata</i> TC9	2750	80	15	110	25
<i>Enterobacter soli</i> TC44	2750	160	30	90	30
<i>Citrobacter gillienii</i> TC8	4400	100	80	55	35
<i>Pseudomonas azotoformans</i> TC1	3850	100	20	10	15
<i>Pseudomonas sp.</i> TC11	3850	15	15	25	30
<i>Pseudomonas mohnii</i> TC29	3850	40	15	10	15
<i>Pseudomonas sp.</i> TC33	3850	150	50	70	35
<i>Bacillus sp.</i> TC4	4675	160	50	70	35
<i>Bacillus circulans</i> TC7	4950	160	50	90	35
<i>Bacillus sp.</i> TC10	4400	175	15	25	15
<i>Bacillus subtilis</i> TC34	3850	260	80	145	35
<i>Terribacillus sp.</i> TC45	4400	360	80	145	30

III. 4. Analyse Catégorielle en Composantes Principales (Cat-PCA)

Une analyse de différenciation entre les aptitudes bactériennes a été réalisée par le biais d'une analyse catégorielle en composantes principales (CAT-PCA) qui vise à souligner le profil de chaque isolat et la corrélation entre les traits PGP étudiés. La CAT-PCA a capturé plus de 53,2 % de la variance, et la direction du vecteur de chaque variable a indiqué des corrélations généralement bonnes entre les variables tracées très près les unes des autres. La position du centroïde et la séparation des clusters dans cette analyse discriminante sont résumées dans la figure 51.

Dans l'ensemble, le potentiel de production d'AIA et d'ammonium par les 15 souches isolées était fortement corrélé, ce qui était également modérément corrélé par leur potentiel de solubilisation du phosphate et de production de nitrate. Cependant, une corrélation fortement

négative a été remarquée entre la solubilisation du phosphate et du potassium, ce qui indique que les mécanismes utilisés dans la solubilisation des deux minéraux par les souches pourraient être différents. Nos résultats ont révélé une corrélation positive intrigante entre les souches capables de produire des sidérophores et la tolérance aux métaux. En effet, tous les isolats bactériens producteurs de sidérophores étaient capables de tolérer des concentrations élevées de Zn, Cu, Cd et Ni. Cette corrélation est soutenue par le fait que les sidérophores sont impliqués dans le transport et la séquestration des métaux, sans leur permettre de traverser la membrane cellulaire (Rajkumar et al. 2010 ; Khan et al. 2018 ; Kramer et al. 2020).

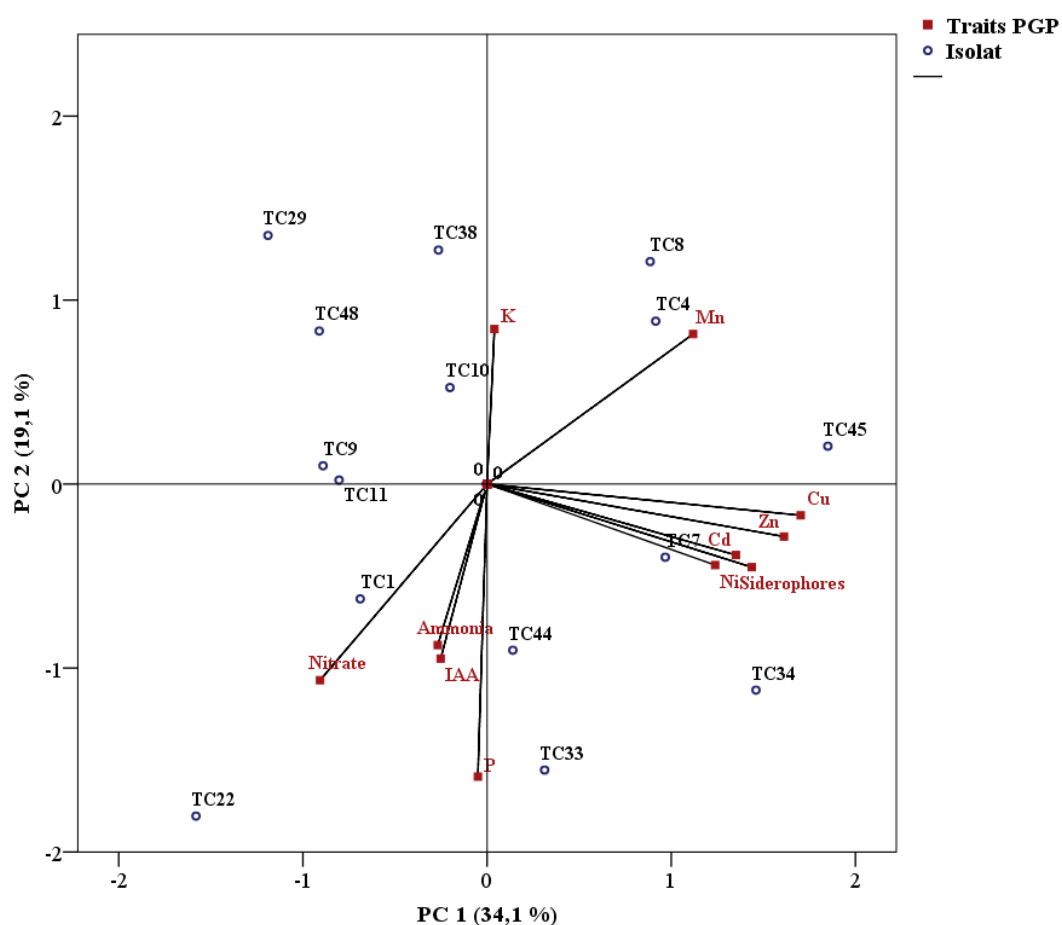


Figure 51 : CAT-PCA illustrant le profil des 15 isolats bactériens par rapport à leur différent trait PGP et leur résistance aux métaux lourds

En tenant compte de leur potentiel de production de sidérophores et de leur tolérance aux métaux, en plus de leurs autres caractéristiques favorisant la croissance des plantes PGP, cinq isolats bactériens (*Bacillus* sp. TC4, *Bacillus circulans* TC7, *B. subtilis* TC34, *Terribacillus* sp. TC45 et *Pseudomonas* sp. TC33) ont été sélectionnés pour des études *in vivo* postérieures.

IV. Effets des isolats bactériens sur la promotion de la croissance des plantules et leur résistance aux métaux lourds

IV. 1. Résistance et croissance des souches sous stress des métaux lourds

La capacité de 5 souches bactériennes à se développer dans des milieux contenant des mélanges de différents métaux lourds (Mix1, Mix2 ou Mix3) a été déterminée, en comparaison avec leur croissance dans le même milieu sans métaux lourds supplémentaires, après 72 heures d'incubation (Figure 52). Les courbes de croissance des souches *Bacillus circulans* TC7 (Figure 52-A), *Pseudomonas sp.* TC33 (Figure 52-B), et *B. subtilis* TC34 (Figure 52-C) étaient presque identiques dans les différents milieux de culture. Au cours des 24 premières heures, la croissance bactérienne était significativement plus lente dans les milieux supplémentés avec un mélange de différentes concentrations de métaux lourds, par rapport aux milieux de contrôle. Cependant, après 48 heures, la croissance des souches bactériennes dans le milieu SLP + HMs Mix1 (Mn 100 ; Zn 20 ; Cu, Cd, et Ni 5 ppm) approchait celle du milieu témoin SLP. La croissance bactérienne était significativement comparable dans les milieux SLP + HMs Mix2 (Mn 150 ; Zn 30 ; Cu, Cd, et Ni 10 ppm) et SLP + HMs Mix3 (Mn 200 ; Zn 40 ; Cu, Cd, et Ni 15 ppm).

De plus, les courbes de croissance de *Bacillus sp.* TC4 (Figure 52 - D) et de *Terribacillus sp.* TC45 (Figure 52 - E) étaient presque identiques ; la croissance bactérienne était plus lente dans les premières 24 heures que dans le contrôle (milieu SLP), mais comparable entre les milieux SLP + HMs Mix1 et SLP + HMs Mix2. Ensuite, la croissance sur le milieu SLP + HMs Mix2 a considérablement diminué, tandis que la croissance sur SLP + HMs Mix1 a augmenté de manière significative pour atteindre le niveau de contrôle pour la souche TC45. Les mélanges contenant de fortes concentrations de métaux lourds ont eu un effet significatif sur les deux souches, car la croissance était significativement plus lente par rapport aux autres milieux de culture.

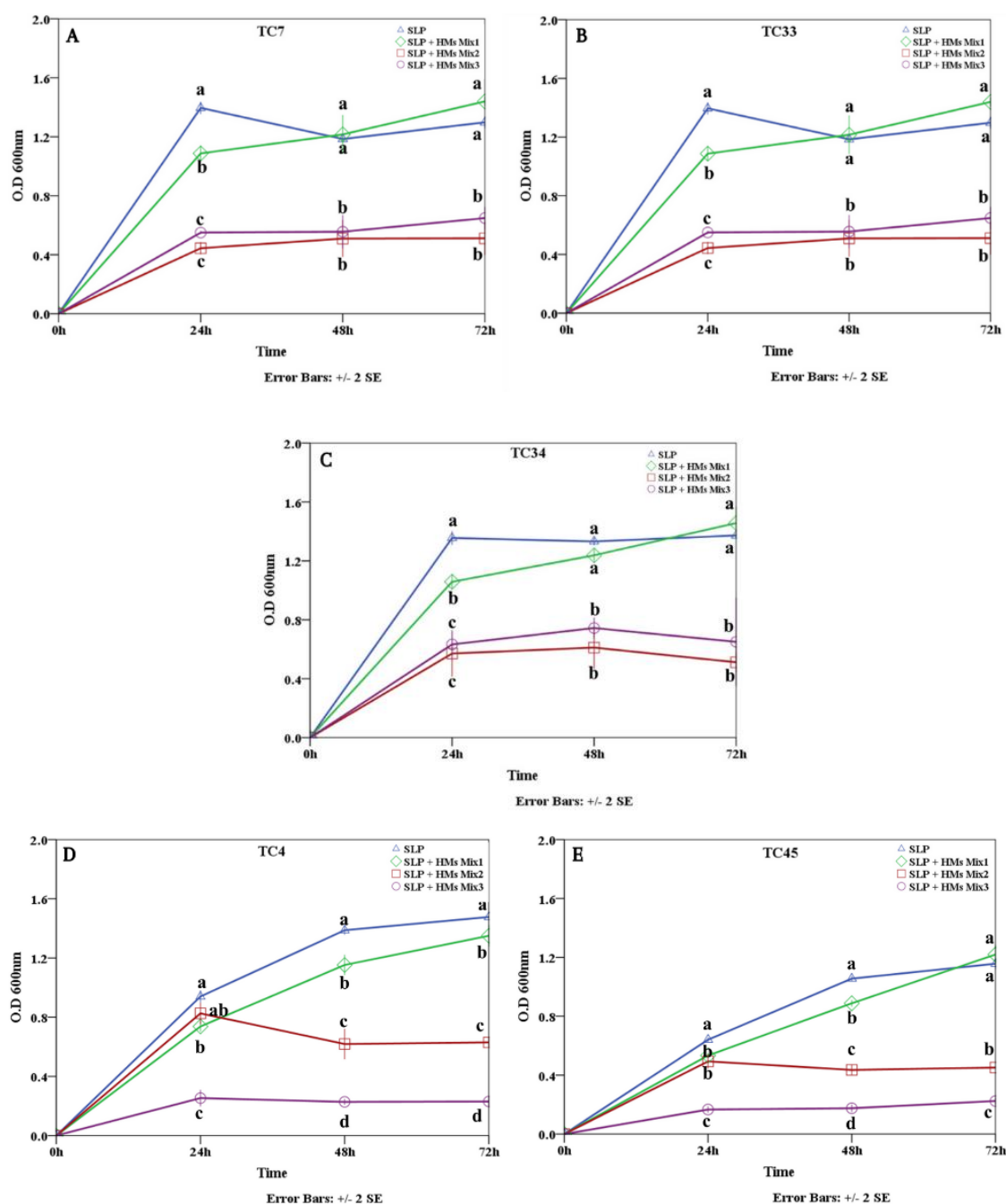


Figure 52 : Courbes de croissance des 5 souches bactériennes : TC7 (A), TC33 (B), TC34 (C), TC4 (D), et TC45 (E) sur les milieux de croissance Sucrose Low Phosphates SLP (triangles) et SLP supplémentés avec différents mélanges de métaux lourds : SLP + HMs Mix1 (losanges) : Mn 100 ; Zn 20 ; Cu, Cd et Ni 5 ppm, SLP + HMs Mix2 (carrés) : Mn 150 ; Zn 30 ; Cu, Cd et Ni 10 ppm et SLP + HMs Mix3 (cercles) : Mn 200 ; Zn 40 ; Cu, Cd et Ni 15 ppm. Chaque valeur est la moyenne de déterminations triples. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard, les lettres représentent la différence significative telle que déterminée par le Tukey HSD à $P < 0,05$.

En effet, le tissu chloragène des vers de terre est un habitat unique, où les métaux lourds sont accumulés en raison de la présence de métallothionéines (une famille de protéines riches en

cystéine) qui assurent le transport des métaux lourds vers ce tissu ; et la neutralisation des toxines (Fischer 1978 ; Vogel and Seifert 1992 ; Fischer and Molnár 1992 ; Roubalová et al. 2015, 2018). L'isolement de bactéries issues d'environnements pollués par des métaux a démontré son efficacité dans le criblage de flores bactériennes adaptables à la toxicité des métaux lourds (Babu et al. 2015 ; Oubohssaine et al. 2022). Ceci expliquerait la capacité des cinq souches à se développer en présence d'un mélange de métaux lourds, puisqu'aucune différence significative n'a été observée entre la croissance des isolats dans un mélange de concentrations modérées de Mn, Zn, Cu, Cd et Ni et la croissance dans le contrôle. Cependant, à des concentrations élevées de métaux, la croissance bactérienne a relativement chuté, avec une phase de latence prolongée, cette variation des taux de croissance peut être liée à la toxicité initiale des métaux et/ou à l'adaptabilité bactérienne. La croissance a été corrélée à une baisse du pH dans les différents milieux (Figure 53), les plus fortes baisses de pH ont été observées dans les milieux de culture SLP et SLP + HMs Mix1, ce qui s'est avéré relativement corrélé avec la croissance élevée qui est liée à une libération de protons et d'acides organiques (He et al., 2013).

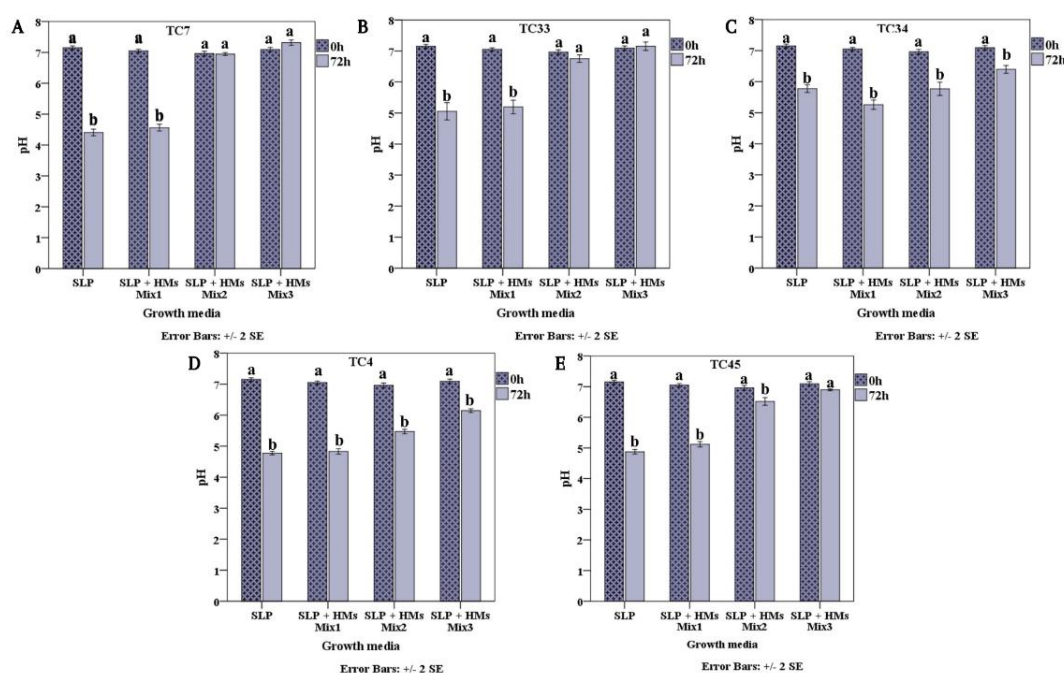


Figure 53 : Changements de pH après 72 heures de croissance des 5 souches bactériennes TC7 (A), TC33 (B), TC34 (C), TC4 (D), et TC45 (E) sur les milieux de culture Sucrose Low Phosphates SLP et SLP supplémentés avec différents mélanges de métaux lourds. Chaque valeur est la moyenne de déterminations en trois exemplaires. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard ; les lettres représentent la différence significative telle que déterminée par le HSD de Tukey à $P < 0,05$.

Plusieurs études ont été publiées dans lesquelles il a été démontré que les bactéries PGP fonctionnent comme des éliciteurs possibles de la tolérance aux métaux lourds (Tiwari et al., 2018). Pour minimiser le stress lié aux métaux lourds dans l'environnement avoisinant, elles élaborent plusieurs processus tels que, le transport des métaux à travers la membrane cytoplasmique, la biosorption et la bioaccumulation sur les parois cellulaires, la rétention des métaux dans les capsules extracellulaires, la précipitation des métaux lourds et la détoxification des métaux par oxydoréduction (Zubair et al., 2016).

IV. 2. Effet de l'enrobage des semences des épinards avec les isolats bactériens sur le taux de germination et la croissance des plantules

L'effet des cinq souches bactériennes sur la germination des graines d'épinard a été évalué *in vivo* dans des conditions normales et stressantes causées par la contamination du sol par des métaux lourds (Tableau 19). Nos résultats ont révélé que l'enrobage des graines avec les différentes souches bactériennes a montré son efficacité, puisqu'elles ont augmenté le pourcentage de germination en l'absence et en présence de métaux lourds dans le sol, par rapport au contrôle (graines non inoculées).

En effet, les graines semées dans un sol normal et enrobées de *Bacillus* sp. TC4, *B. circulans* TC7, *Pseudomonas* sp. TC33, *B. subtilis* TC34, et *Terribacillus* sp. TC45 ont eu une germination significativement plus élevée de 39 %, 52 %, 30 %, 39 %, et 30 %, respectivement, par rapport au contrôle (graines non traitées). L'efficacité de ces isolats était plus apparente lorsque les graines étaient semées dans un environnement stressant — un sol hautement contaminé par le cadmium et modérément contaminé par le manganèse, le zinc, cuivre et nickel — puisqu'ils ont augmenté de manière significative le pourcentage de germination par des taux allant de 30 % (*B. subtilis* TC34) à 65 % (*B. circulans* TC7) par rapport au contrôle non traité.

Tableau 19 : Effet des 5 traitements bactériens sur le taux de germination des graines par rapport au contrôle (graines non enrobées).

Traitements	Germination (%)	
	Sol normal	Sol contaminé
Contrôle (graines non enrobées)	63,9 ± 5,1 ^b	55,6 ± 5,6 ^b
<i>Bacillus sp.</i> TC4	88,9 ± 5,6 ^a	77,8 ± 5,6 ^a
<i>B. circulans</i> TC7	97,2 ± 2,8 ^a	91,7 ± 3,7 ^a
<i>Pseudomonas sp.</i> TC33	83,3 ± 6,1 ^{ab}	80,6 ± 5,1 ^a
<i>B. subtilis</i> TC34	88,9 ± 5,6 ^a	72,2 ± 3,5 ^a
<i>Terribacillus sp.</i> TC45	83,3 ± 6,1 ^{ab}	77,8 ± 3,5 ^a

Des lettres différentes (a, b) représentent des différences significatives selon le test de Tukey ($P < 0,05$).

Les métaux présents dans le sol ont eu un effet consécutif sur la germination et la croissance des plantules, limitant la germination par 13 % et la longueur, le poids frais et le poids sec des plantules par 38 %, 75 %, et 54 %, respectivement (Tableau 19 et Figure 54).

Le traitement des semences par inoculation des graines avant d'être semées dans le sol, a prouvé son efficacité, car il a induit un état physiologique dans lequel les inocula bactériens entrent en contact direct avec la graine, ce qui améliore la survie des inocula dans la rhizosphère de la plante et leur compatibilité avec le système végétal. Dans la plupart des cas, les graines traitées germent plus uniformément, et les jeunes plants qui en résultent sont souvent, plus vigoureux et plus résistants aux stress abiotiques, que les plantes obtenues à partir de graines non traitées (Mahmood et al. 2016 ; Singh et al. 2020 ; Sarkar et al. 2021). Ces constats concordent avec les résultats obtenus avec des graines de *Spinacia oleracea* enrobées de l'une de nos cinq souches bactériennes, qui ont toutes amélioré les taux de germination. En outre, le traitement des semences avec les 5 souches bactériennes a augmenté de manière significative la croissance et la biomasse des plantules, puisque la longueur des plantules (Figure 54-A) a été significativement augmentée par des taux variants entre 27 % (*B. subtilis* TC34) et 43 % (*B. circulans* TC4) dans le sol normal, et entre 28 % (*Bacillus sp.* TC4) et 42 % (*Pseudomonas sp.* TC33) dans le sol contaminé, par rapport au contrôle non traité. Le poids frais des plantules (figure 54-B) a également augmenté de manière significative dans les sols normaux et contaminés après l'inoculation des graines avec les différentes souches bactériennes, jusqu'à 109 % dans le sol normal et jusqu'à 230 % dans le sol contaminé. Le poids sec des plantules

(Figure 54-C) a lui aussi été augmenté par les traitements bactériens à des taux allant de 19 à 76 %, pour les plantules poussant dans un sol normal et entre 61 % et 100 % pour les plantules poussant dans un sol contaminé par des métaux lourds.

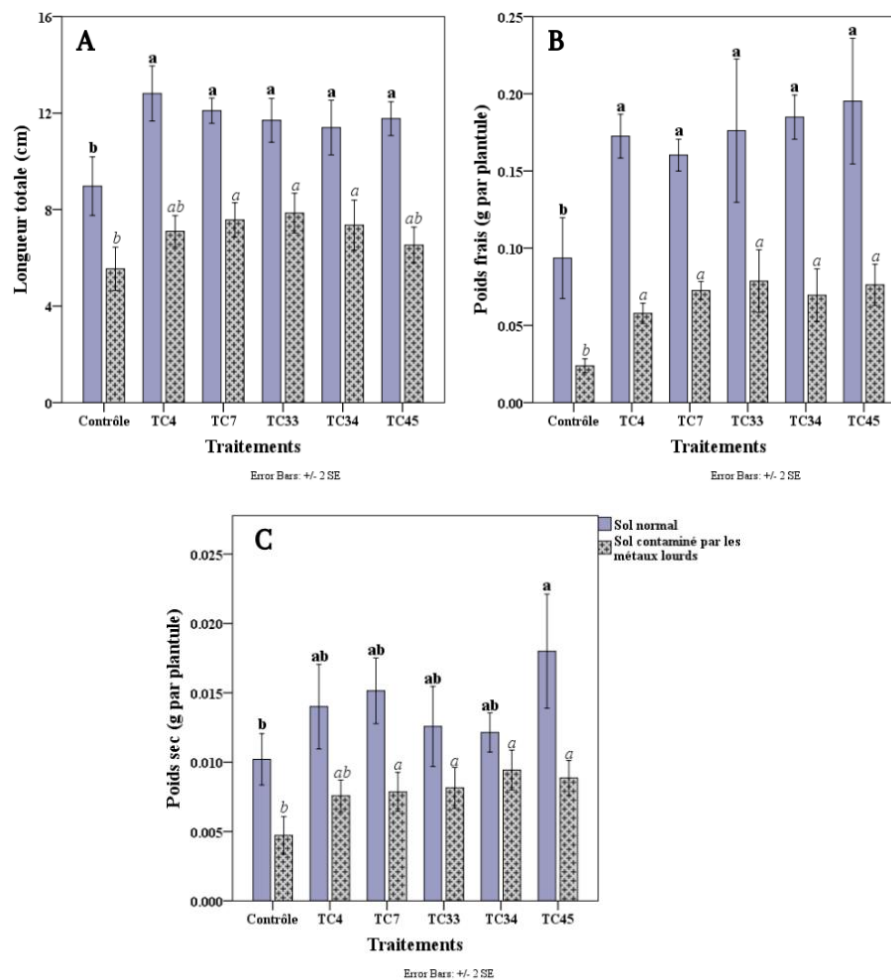


Figure 54 : Effet du traitement des graines par les 5 souches bactériennes sur la croissance des plantules de *Spinacia oleracea* cultivée dans un sol normal et un sol contaminé par les métaux lourds : Longueur des plantules (A), poids frais (B) et poids sec (C).

Des lettres différentes indiquent des différences significatives (test Tukey HSD, $P < 0,05$),

V. Étude du pouvoir des isolats à bioremédier le sol et à assister la phytoremédiation des métaux lourds par *Spinacia oleracea* L.

V. 1. Effet des isolats bactériens sur la mobilité des métaux du sol

La concentration de métaux lourds solubles dans l'eau, dans le sol, a été évaluée pour examiner si les inocula bactériens avaient le potentiel de mobiliser ou d'immobiliser les métaux lourds dans la solution du sol (Tableau 20).

Les différents métaux lourds étaient solubles en différentes concentrations : $Mn > Cu > Ni > Zn > Cd$ (Tableau 20). Tous les inocula bactériens ont réduit de manière significative la disponibilité du manganèse (Mn) dans la solution du sol à des concentrations allant de 14,8 % à 52,2 %. D'autre part, la mobilité du zinc, a été significativement augmentée par les différents inocula bactériens, atteignant un taux de 2,6 fois, par les 2 souches bactériennes *Pseudomonas* sp. TC33 et *Bacillus subtilis* TC34. L'ajout des souches bactériennes dans le sol contaminé a augmenté la mobilité du Cu du sol de 1,44 à 3,53 fois par rapport au contrôle, à l'exception de *Bacillus circulans* TC7, qui n'a pas changé de manière significative la quantité de Cu soluble dans le sol. D'autre part, pour le Cd, seules les 2 souches : *Bacillus* sp. TC4 et *Bacillus circulans* TC7, ont significativement augmenté la solubilité du Cd de 2,17 et 1,22 fois, respectivement. De plus, les 3 souches : *Bacillus* sp. TC4, *Bacillus subtilis* TC34 et *Terribacillus* sp. TC45, ont significativement augmenté la mobilité du nickel de 2,37 ; 1,25 et 1,64 fois, respectivement, par rapport au contrôle non inoculé. Dans l'ensemble, la souche *Bacillus* sp. TC4 était plus susceptible d'augmenter la mobilité du Cu, du Cd et du Ni, tandis que les 3 souches : *Pseudomonas* sp. TC33, *Bacillus subtilis* TC34 et *Terribacillus* sp. TC45, augmentaient plus spécifiquement la mobilité du Zn. *Bacillus circulans* TC7 a eu un effet équivalent au contrôle et n'a donc pas affecté la mobilité des métaux lourds.

Tableau 20 : Effets de l'inoculation des 5 souches bactériennes sur la solubilisation de Mn, Zn, Cu, Cd et Ni dans le sol contaminé

Traitements	Concentrations de métaux lourds (mg Kg ⁻¹)				
	Mn	Zn	Cu	Cd	Ni
Contrôle	65,17 ± 0,67 ^a	1,11 ± 0,04 ^d	6,75 ± 0,26 ^d	0,78 ± 0,03 ^c	3,55 ± 0,09 ^d
<i>Bacillus</i> sp. TC4	31,17 ± 0,39 ^d	1,49 ± 0,07 ^c	23,85 ± 0,46 ^a	1,69 ± 0,06 ^a	8,43 ± 0,33 ^a
<i>B. circulans</i> TC7	55,53 ± 0,40 ^b	1,21 ± 0,01 ^d	7,53 ± 0,48 ^d	0,95 ± 0,02 ^b	3,81 ± 0,14 ^d
<i>Pseudomonas</i> sp. TC33	37,66 ± 0,85 ^c	2,93 ± 0,07 ^a	10,71 ± 0,42 ^{bc}	0,79 ± 0,03 ^c	3,67 ± 0,13 ^d
<i>B. subtilis</i> TC34	38,21 ± 0,71 ^c	2,89 ± 0,04 ^a	9,70 ± 0,11 ^c	0,70 ± 0,01 ^c	4,45 ± 0,30 ^c
<i>Terribacillus</i> sp. TC45	39,49 ± 0,40 ^c	2,41 ± 0,09 ^b	11,75 ± 0,47 ^b	0,66 ± 0,01 ^c	5,82 ± 0,17 ^b

La mobilité des métaux et la solubilisation dans le sol sont des facteurs importants qui déterminent l'efficacité de la phytoremédiation. De nombreux facteurs physico-chimiques du sol, notamment le pH, la texture, le potentiel redox, la teneur en métaux totaux, la teneur en matières organiques, en minéraux argileux et en oxydes, ainsi que le temps de contact avec la matrice du sol, peuvent affecter la biodisponibilité et la mobilité des métaux lourds (Bruemmer et al. 1986 ; Kim et al. 2015 ; Caporale and Violante 2016 ; Cipullo et al. 2018). Dans ce contexte, les bactéries mobilisatrices ou immobilisatrices de métaux sont utilisées pour influencer l'habitat de la rhizosphère, influençant ainsi la spéciation et la mobilité des éléments métalliques dans le sol. Les bactéries peuvent utiliser plusieurs processus pour améliorer la mobilité des métaux tels que : l'acidification, la protonation, et la chélation, les empêchant ainsi de se résorber (Ma et al., 2016 a).

V. 2. Influence de la contamination du sol par des métaux lourds sur la croissance de *Spinacia oleracea*

L'effet des métaux lourds, en particulier le cadmium, sur la croissance de *Spinacia oleracea* Ayaz F1 a été particulièrement remarquable par rapport sa culture dans un sol normal (Figure 55, 56).



Figure 55 : Différences de croissance entre les épinards cultivés dans un environnement stressant sous présence de métaux lourds (Contrôle positif) et les épinards cultivés dans un environnement sain (Contrôle négatif).

Le stress dû aux métaux lourds a fortement affecté la longueur des racines et des pousses, qui ont chuté de 42,8 % et 60,1 %, respectivement, par rapport aux plantes cultivées dans un environnement sain. La présence de métaux lourds dans le sol a montré une influence substantielle sur les poids frais et sec des plantes, qui ont diminué de 89,8 % et 81,5 %, respectivement, dans le contrôle positif par rapport aux plantes cultivées dans un sol normal.

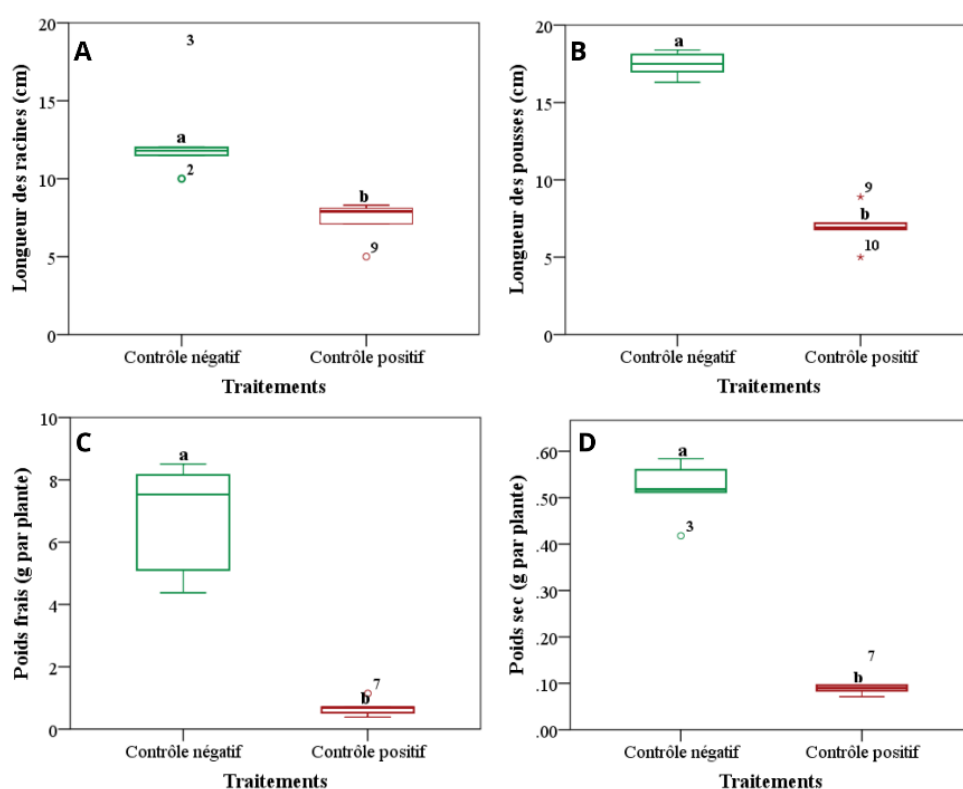


Figure 56 : Différences de croissance entre les épinards stressés par les métaux lourds cultivés dans le contrôle positif (sol contaminé, non inoculé) et les épinards cultivés dans le contrôle négatif (sol non contaminé, non inoculé). À : Longueur des racines ; B : Longueur des pousses ; C : Poids frais par plante ; D : Poids sec par plante.

En outre, la teneur en chlorophylle a diminué de 41,6 % dans les feuilles des plantes cultivées dans un sol contaminé par des métaux lourds (Figure 57).

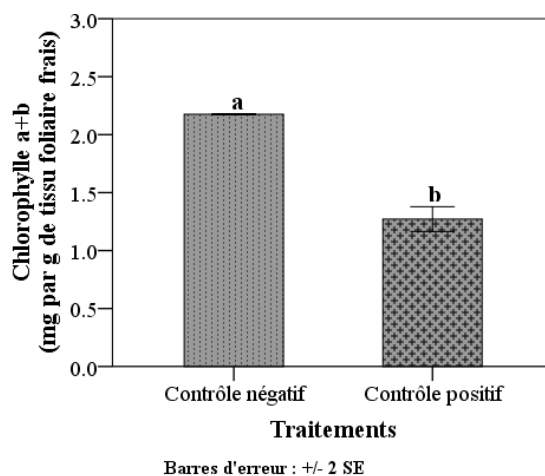


Figure 57 : Influence de la contamination du sol par des métaux lourds sur la teneur en chlorophylle a+ b. Contrôle négatif : sol non contaminé ; Contrôle positif : sol contaminé.

En effet, même si certains métaux lourds (Zn, Cu, Fe, Mn, Ni, Mo et Co) sont nécessaires à faible concentration, pour une croissance optimale des plantes et à des activités métaboliques variées, des niveaux excessifs, notamment ceux du Cd, qui est un métal non essentiel, sont dangereux pour les plantes, ils peuvent provoquer des anomalies morphologiques et des troubles métaboliques, qui conduisent à une réduction du rendement des plantes (Amari et al., 2017 ; Tiwari et al., 2018). Cette toxicité est apparemment due à l'interférence des métaux lourds avec l'apport et la distribution des nutriments essentiels, ainsi qu'au déplacement des métaux importants, de leurs emplacements de liaison habituels, sur les molécules biologiques.

Par ailleurs, le stress oxydatif est associé à une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui perturbent l'équilibre de l'homéostasie ionique dans les cellules végétales. L'augmentation des ROS inhibe la synthèse de la chlorophylle et favorise la peroxydation des lipides de la membrane du chloroplaste et l'obstruction du transport des électrons photosynthétiques, ce qui entraîne la détérioration du mécanisme de photosynthèse (Jiang et al., 2008), qui est signalé comme la principale cause de la diminution des paramètres de croissance des plantes, poussant dans des sols pollués par des métaux lourds (Kabata-Pendias, 2010). Ceci est cohérent avec nos résultats, car la réduction de la croissance a été couplée à une diminution significative de la teneur en chlorophylle, lorsque les plantes de *Spinacia oleracea* ont été soumises au stress métallique. Nos résultats sont en accord avec les études précédentes, évaluant la phytotoxicité des métaux lourds sur *Spinacia oleracea*. En effet,

Renu et al. (2021) ont rapporté que, lorsque les épinards étaient soumis à un stress par l'As, le Cr, le Ni et le Pb, différents paramètres de croissance tels que la longueur des racines et des pousses, le poids des racines et des pousses (sec et humide) et la chlorophylle totale, diminuaient considérablement. Shahid et al. (2020) ont rapporté une diminution significative de la biomasse fraîche et sèche des plantes, ainsi que de la teneur en chlorophylle des épinards, lorsqu'ils sont exposés au Cd. Desoky et al. (2020) ont révélé que l'application de 2 mM de Cd^{2+} et de Pb^{2+} au sol étudié a diminué la biomasse des plantes et la teneur en chlorophylle jusqu'à 79,9 et 60 %, respectivement. Alia et al. (2015) ont évalué dans leur étude les effets toxicologiques du : Cd, Pb et Zn, sur la biomasse des pousses et des racines (poids frais et sec) de *S. oleracea*, et ont indiqué que l'ajout de concentrations individuelles du Cd, Pb et Zn, ainsi que leurs mélanges, avait un effet substantiel sur la croissance des épinards.

V. 3. Influence de l'inoculation du sol par les cinq isolats bactériens (Bioaugmentation) sur la croissance de *Spinacia oleracea* sous stress métallique

Contrairement à la diminution spectaculaire de la croissance des épinards au niveau du contrôle positif, le stress des métaux lourds a été considérablement atténué dans les traitements supplémentés avec les cinq souches bactériennes (Figure 58, 59). Par rapport au témoin positif, la longueur des racines a augmenté de manière significative à des taux allant de 45,6 % (*Bacillus* sp. TC4) à 74,5 % (*B. circulans* TC7), tandis que la longueur des pousses a augmenté de manière substantielle à des taux allant de 70 % (*B. circulans* TC34) à 106,3 % (*B. circulans* TC7). De plus, les traitements bactériens ont amélioré le poids frais et sec des épinards de 4,1 à 5,5 fois et de 2,4 à 3,4 fois, respectivement.



Figure 58 : Effet apparent de l'inoculation du sol avec les cinq souches bactériennes sur la croissance des épinards cultivés dans un sol contaminé par des métaux lourds, comparé aux

plantes cultivées dans les mêmes conditions dans un sol non inoculé (contrôle positif) et aux épinards cultivés dans un sol non inoculé et non contaminé (contrôle négatif).

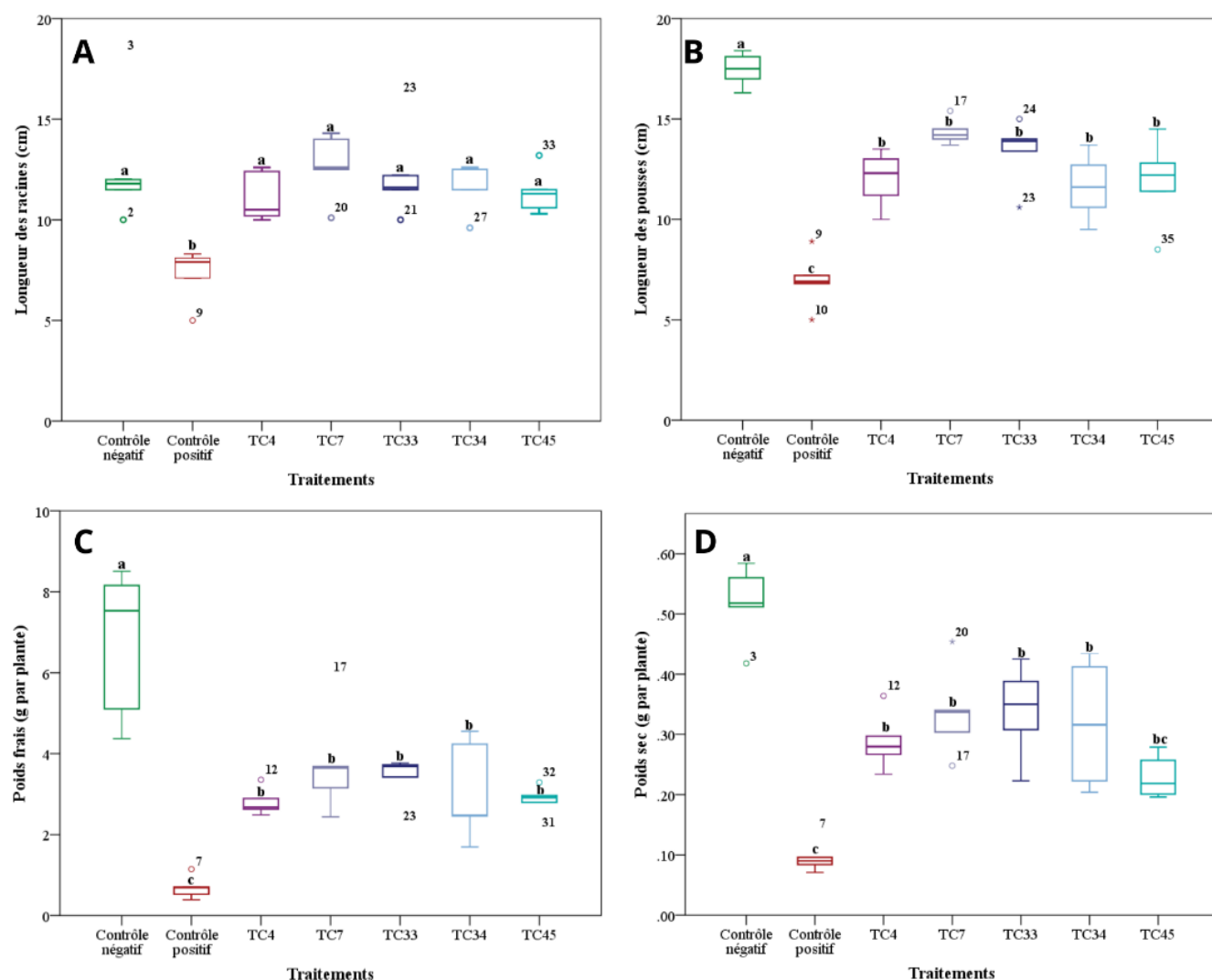


Figure 59 : Effets de l'inoculation du sol avec les cinq souches bactériennes (TC4 : *Bacillus* sp. ; TC7 : *Bacillus circulans* ; TC33 : *Pseudomonas* sp. ; TC34 : *Bacillus subtilis* ; TC45 : *Terribacillus* sp.) sur la croissance des épinards cultivés dans un sol contaminé par des métaux lourds, comparés aux plantes cultivées dans les mêmes conditions dans un sol non inoculé (contrôle positif). Les attributs ont été comparés aux épinards cultivés dans un sol non inoculé et non contaminé (contrôle négatif). Les mesures sont basées sur cinq répétitions, tandis que les lettres indiquent la différence statistiquement significative déterminée par le HSD de Tukey à $P < 0,05$.

L'impact de la présence des métaux sur la teneur en chlorophylle n'a pas été enregistré chez les plantes cultivées dans un sol enrichi de différentes bactéries (Figure : 60). Le traitement bactérien a significativement augmenté la teneur en chlorophylle de 61,5 à 90,4 % par rapport au contrôle positif.

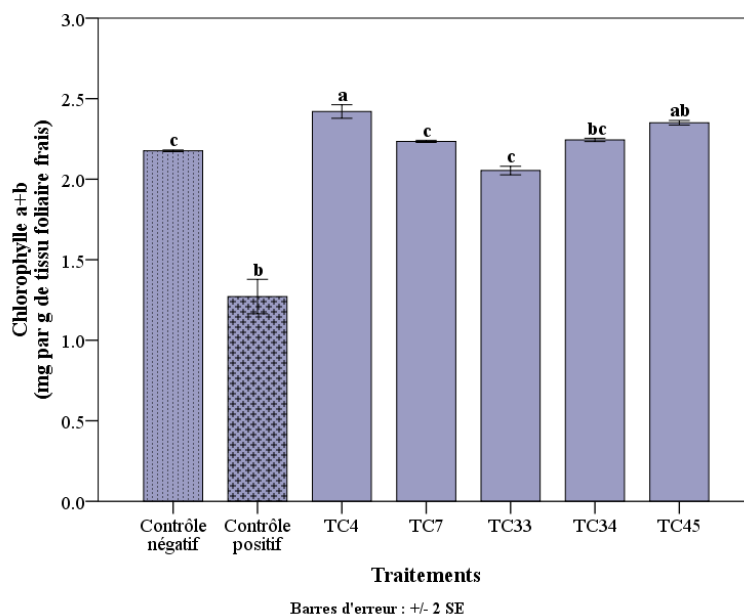


Figure 60 : Effet de l'inoculation du sol avec les cinq souches bactériennes sur la teneur en chlorophylle des épinards cultivés dans un sol contaminé par des métaux lourds, comparé aux plantes cultivées dans les mêmes conditions : dans un sol non inoculé (contrôle positif) et dans un sol non inoculé et non contaminé (contrôle négatif). Les mesures sont basées sur cinq répétitions, tandis que les lettres indiquent la différence statistiquement significative déterminée par le HSD de Tukey à $P < 0,05$.

En revanche, les traitements bactériens ont aidé avec succès les épinards à surmonter la toxicité des métaux lourds, due particulièrement à la contamination excessive par du cadmium et ont donc amélioré leur croissance, mais pas à des valeurs comparables à celles obtenues dans le contrôle négatif (sol non contaminé). Des études antérieures ont rapporté les capacités des souches appartenant aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas* à promouvoir la croissance des épinards sous le stress des métaux lourds (Desoky et al., 2020 ; Shahid et al., 2020 ; Najm-ul-Seher et al., 2021 ; Renu et al., 2021). Il a été découvert que, les bactéries bénéfiques adoptent une variété de mécanismes, impliqués dans la promotion de la croissance des plantes sous le stress des métaux lourds (Etesami, 2018 ; Tiwari et al., 2018). Ainsi, la synthèse de l'ACC désaminase, une enzyme qui pourrait cliver l'ACC, le précurseur immédiat de l'éthylène dans la voie de biosynthèse de l'éthylène chez les plantes, a été largement reconnue. Elle stimule la croissance des plantes, réduit la toxicité des métaux traces et abaisse les niveaux d'éthylène

dans les plantes en hydrolysant par voie enzymatique l'ACC en NH_3 et en α -cétobutyrate, qui sont utilisés comme sources d'azote par les bactéries de la rhizosphère. La complexation extracellulaire des métaux par des sidérophores, sécrétés par les bactéries, est une autre méthode bien connue des bactéries résistantes aux métaux. Les sidérophores fixent les ions métalliques, ce qui entraîne une biodisponibilité limitée des ions métalliques, ces complexes métaux-sidérophores ne pouvant être absorbés par les plantes (Etesami, 2018 ; Tiwari et al., 2018). Aussi, il a été découvert que la réduction du stress oxydatif, causé par les sidérophores bactériens, augmente la croissance de la biomasse végétale et minimise donc l'effet nocif des métaux sur les plantes. En outre, les micro-organismes peuvent contribuer à réduire l'accessibilité des plantes aux métaux lourds, en produisant des biosurfactants (biomolécules tensioactives). Le caractère amphiphile des biosurfactants leur permet de se lier aux métaux traces dangereux, plus fortement que les autres cations métalliques. Dans les sols contaminés par des métaux, le principal événement est la complexation des biosurfactants avec les métaux, ce qui réduit la concentration biodisponible des métaux dans la phase de solution et les rend donc moins disponibles pour l'absorption par les plantes. Les substances polymères extracellulaires (EPS) bactériennes sont fixées à la surface des cellules des bactéries sous forme de capsules ou d'exsudats. Ces exsudats bactériens jouent un rôle important dans la complexation des métaux toxiques, ainsi que dans la diminution de leur mobilité et de leur accessibilité dans les sols et leur absorption par les plantes (Rajkumar et al., 2008). Pour contrer la toxicité des métaux lourds, les microorganismes produisent des phytohormones telles que l'acide indole acétique (AIA), qui induisent l'élongation des racines et le développement de racines latérales et adventives. Dans l'ensemble, les EPS des membranes externes des bactéries, les biosurfactants, les sidérophores, les composés organiques volatils, les antibiotiques et quelques autres métabolites produits par les microorganismes, ont tous été liés à l'éllicitation de la tolérance systémique induite (TSI) dans les plantes hôtes, par la transduction du signal des gènes de résistance (Mishra et al., 2017 ; Ahemad, 2019 ; Guo et al., 2020).

V. 4. Effet des métaux lourds et de l'inoculation du sol sur les activités enzymatiques du sol

L'activité enzymatique dans la rhizosphère reflète les interactions plantes-microorganismes et constitue une métrique sensible pour surveiller les changements dans la composition, l'activité et la fonction des communautés microbiennes (Wyszkowska et al., 2010). En raison de leurs stabilités et sensibilités, une activité enzymatique élevée reflète une bonne qualité du sol, tandis

qu'une faible activité peut être liée à la toxicité des polluants pour les processus biologiques (Duan et al., 2018). La phosphatase acide prédomine dans les sols acides, tandis que la phosphatase alcaline prédomine dans les sols alcalins (Eivazi et al., 1977 ; Billah et al., 2019), ce qui concorde avec nos résultats, car l'activité de la phosphatase alcaline était significativement plus grande que l'activité de la phosphatase acide dans le sol étudié (pH = 7,8).

Les phosphatases et l'uréase du sol sont extrêmement vulnérables au stress abiotique, induit par les métaux lourds, qui bloquent les processus enzymatiques en adhérant au substrat, en interagissant avec les groupes protéiques actifs des enzymes, ou en réagissant avec les complexes enzyme-substrat. Ils peuvent provoquer la dénaturation des protéines enzymatiques et limiter la capacité de colonisation bactérienne dans la rhizosphère (LI et al., 2017 ; Li et al., 2021 b). Dans la présente étude, la présence de métaux lourds dans le sol a eu un impact substantiel sur les activités enzymatiques du sol, qui ont été réduites de 59,3 % pour la phosphatase alcaline (Figure 61 —A), de 54,4 % pour la phosphatase acide (Figure 61 — B) et de 42,1 % pour l'activité uréase (Figure 61 —C), par rapport au même sol sans présence de métaux lourds (Figure 61).

Toutefois, l'inoculation du sol avec les cinq souches bactériennes, a augmenté de manière significative les activités enzymatiques, même à des concentrations aberrantes du cadmium. Les 4 souches : *Bacillus sp.* TC4, *B. circulans* TC7, *B. subtilis* TC34, et *Terribacillus sp.* TC45, ont significativement amélioré l'activité de la phosphatase alcaline du sol de 144,0 %, 68,8 %, 122,8 %, et 21,9 %, respectivement. Par ailleurs, seules les 2 souches *Bacillus sp.* TC4 et *B. subtilis* TC34, ont été capables d'améliorer l'activité de la phosphatase acide de 44,7 % et 51,1 %, respectivement. Par rapport au contrôle positif, l'inoculation bactérienne du sol avec les 4 souches : *Bacillus circulans* TC7, *Pseudomonas sp.* TC33, *Bacillus subtilis* TC34, et *Terribacillus sp.* TC45, a augmenté significativement cette activité enzymatique, à des taux variant entre 24,3 % et 46,9 %. Ces résultats étaient cohérents avec des études précédentes, où les activités enzymatiques du sol étaient généralement augmentées, après l'inoculation de souches de *Bacillus spp.* et de *Pseudomonas spp.*, dans des sols contaminés par des métaux lourds (Chen et al., 2014 ; Babu et al., 2015 ; Sun et al., 2017 ; Ma et al., 2020 ; Wang et al., 2020 c ; Li et al., 2021 b).

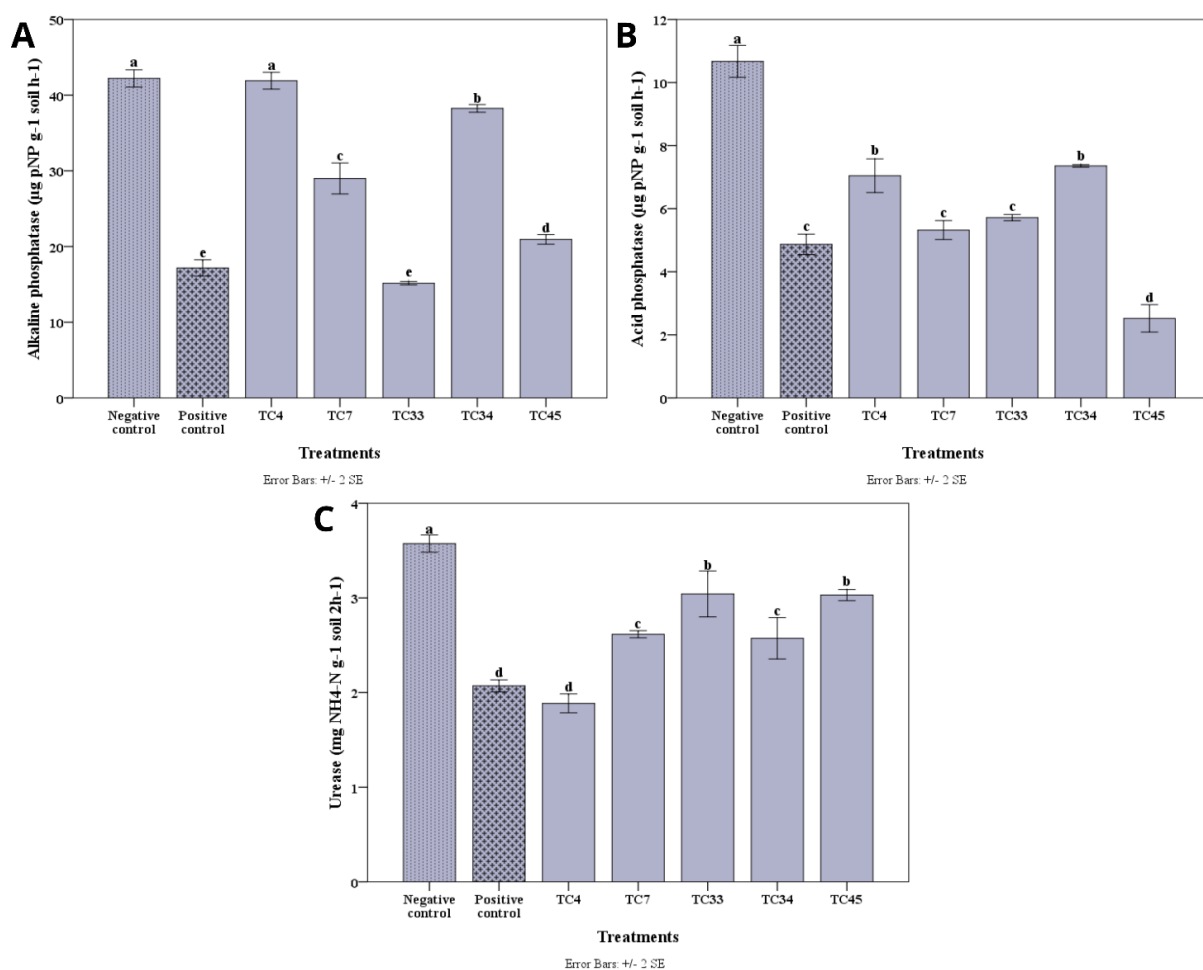


Figure 61 : Effet des métaux lourds et de l'inoculation des 5 souches bactériennes sur l'activité des enzymes du sol, par rapport au sol normal (contrôle négatif). A : phosphatase alcaline, B : phosphatase acide et C : activité uréasique.

Moyenne $\pm$ erreur standard (n=3). Des lettres différentes représentent des différences significatives après le test Tukey HSD, $p < 0,05$.

V.5. Effet des métaux lourds et de l'inoculation du sol sur les propriétés physicochimiques du sol

La présence de métaux lourds dans le sol, et/ou l'inoculation du sol avec les différentes souches bactériennes, ont eu un impact significatif sur certaines des caractéristiques physico-chimiques du sol (Tableau : 21). En effet, la présence de métaux lourds a légèrement diminué le pH du sol, ce qui était négativement corrélé avec la conductivité électrique du sol (EC). La EC a augmenté de manière significative dans les sols contaminés par les métaux lourds. Une augmentation plus importante a été rapportée dans les traitements avec *Bacillus* sp. TC4, *B. subtilis* TC34, et *Terribacillus* sp. TC45.

Tableau 21 : Propriétés physico-chimiques des échantillons de sol à la fin de la période de culture des plantes

Traitements	pH	EC (dS m ⁻¹)	Azote N minéral total (mg Kg ⁻¹)	Phosphore P disponible (mg Kg ⁻¹)	Potassium K disponible (mg Kg ⁻¹)
Contrôle négatif	8,3 ± 0,06 ^a	1,346 ± 0.003 ^d	43,24 ± 0,16 ^{ab}	15,50 ± 0,28 ^c	49,28 ± 3,58 ^e
Contrôle positif	7,9 ± 0,03 ^c	1,515 ± 0.003 ^c	34,22 ± 0.16 ^e	16,12 ± 0,06 ^{bc}	57,82 ± 1,25 ^d
<i>Bacillus</i> sp. TC4	8,0 ± 0,03 ^b	1,985 ± 0.003 ^a	43,86 ± 0,27 ^a	15,30 ± 0,41 ^c	70,75 ± 0,25 ^a
<i>B. circulans</i> TC7	8,0 ± 0,02 ^{bc}	1,504 ± 0.003 ^c	37,80 ± 0,27 ^{cd}	17,97 ± 0,21 ^a	62,23 ± 0,53 ^{bcd}
<i>Pseudomonas</i> sp. TC33	8,1 ± 0,02 ^b	1,504 ± 0.001 ^c	42,31 ± 0,16 ^b	18,37 ± 0,08 ^a	65,75 ± 0,82 ^{abc}
<i>B. subtilis</i> TC34	8,0 ± 0,02 ^{bc}	1,594 ± 0.003 ^b	38,58 ± 0,31 ^c	17,12 ± 0,60 ^{ab}	58,61 ± 0,72 ^{cd}
<i>Terribacillus</i> sp. TC45	8,1 ± 0,01 ^b	1,587 ± 0.002 ^b	37,5 ± 0,16 ^d	17,30 ± 0,27 ^{ab}	66,67 ± 0,91 ^{ab}

L'inoculation des 5 souches bactériennes a augmenté de manière significative, l'azote minéral total du sol, par rapport au contrôle positif. Les 4 inocula bactériens : *B. circulans* TC7, *Pseudomonas* sp. TC33, *B. subtilis* TC34, et *Terribacillus* sp. TC45, ont augmenté significativement la disponibilité du phosphore dans le sol, et l'inoculation du sol avec les 3 souches : *Bacillus* sp. TC4, *Pseudomonas* sp. TC33, et *Terribacillus* sp. TC45, a fortement augmenté la disponibilité du potassium dans le sol, par rapport aux contrôles. Cette augmentation de la teneur en NPK du sol, a été associée avec une augmentation de l'activité des enzymes du sol et une croissance accrue des épinards, ce qui peut être directement lié aux capacités de minéralisation et de solubilisation des bactéries étudiées, qui augmentent la disponibilité des nutriments pour l'absorption par les plantes (Etesami, 2018 ; Tiwari et al., 2018).

V. 6. Pouvoir remédiateur des métaux lourds du sol

La capacité des différents traitements bactériens à diminuer la concentration en métaux du sol en présence de *Spinacia oleracea* est présentée dans la Figure 62 à partir de laquelle les efficacités d'élimination ont été calculées.

La croissance des épinards dans un sol non inoculé (contrôle positif), a significativement diminué les concentrations de manganèse, zinc, cadmium et nickel dans le sol de 24 %, 11,9 %, 14,6 % et 20,2 %, respectivement. Cependant, *Spinacia oleracea* dans un sol non inoculé, n'a

eu aucun effet significatif sur la remédiation du cuivre. les 5 souches bactériennes ont diminué de manière significative, la concentration du Zn, Cu, et Cd lorsqu'elles ont été inoculées dans le sol. Cependant, l'inoculation du sol avec *Pseudomonas sp.* TC33 et *B. subtilis* TC34 a montré la plus grande efficacité d'élimination des métaux lourds, puisqu'ils ont atteint, respectivement, 73,7 % et 71,8 % pour le manganèse, 72,1 % et 73,3 % pour le zinc, 70,3 % et 74,8 % pour le cuivre, 69,4 % et 73,9 % pour le cadmium, et 59,5 % et 66,3 % pour le nickel.

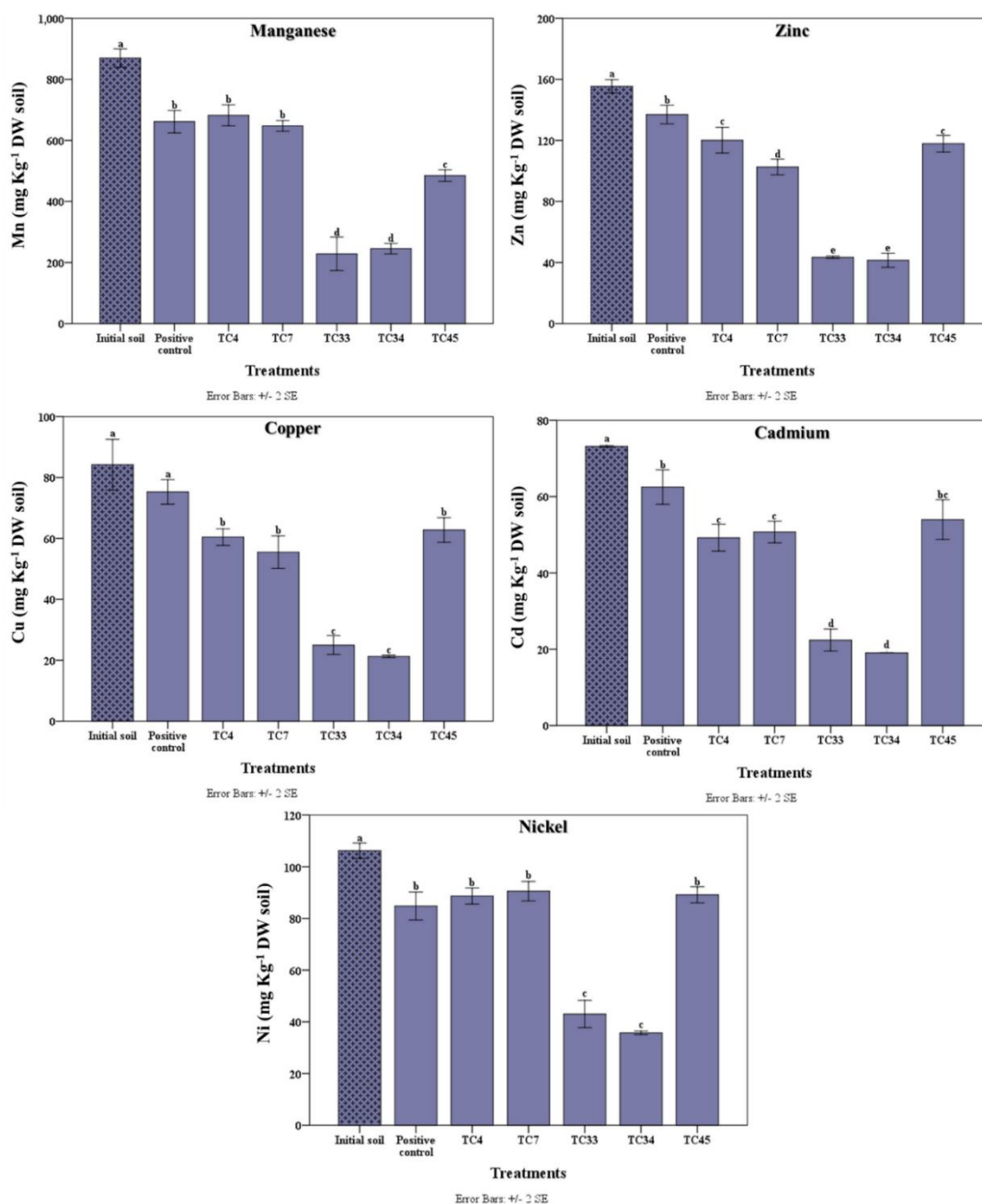


Figure 62 : Concentration en métaux lourds (mg Kg⁻¹) dans le sol initial et dans chaque traitement à la fin de l'expérience après 6 semaines.

V. 7. Accumulation des métaux lourds dans les tissus de *Spinacia oleracea*

Spinacia oleracea a été examinée pour sa capacité, à absorber divers métaux lourds, provenant de sols contaminés par divers métaux lourds, en présence et en l'absence de divers inocula bactériens (Tableau 22). Les concentrations de métaux lourds dans les tissus des racines étaient significativement plus élevées que dans les tissus des pousses, dans presque tous les traitements et les métaux. Alors que les concentrations du Mn dans les racines, dépassaient clairement les niveaux phytotoxiques, leurs concentrations dans les pousses ne le faisaient pas, démontrant la capacité de *Spinacia oleracea* à phytostabiliser les métaux par ses tissus racinaires, empêchant ainsi leur stockage dans les tissus aériens. En dehors de ces métaux, qui sont nécessaires à de faibles concentrations, la forte contamination du sol par le cadmium a conduit à une absorption dans les tissus des épinards, qui est significativement plus élevée que les niveaux de phytotoxicité à la fois dans les racines et les pousses, ce qui supporte sa haute toxicité due à son potentiel d'accumulation élevé.

L'absorption de métaux au niveau des racines était significativement plus importante chez les plantes cultivées dans un sol dépourvu de bactéries que chez les plantes cultivées dans un sol inoculé de bactéries, sauf pour le Zn au traitement du sol par *Terribacillus sp.* TC45. Cependant, l'inoculation du sol avec *Bacillus circulans* TC7 a diminué de façon significative l'absorption du manganèse, du zinc, du cuivre, du cadmium et du nickel par les racines de 43,3 %, 49,9 %, 62,0 %, 22,03 % et 46,9 %, respectivement ; d'autre part, les concentrations de Mn, Cd et Ni au niveau des pousses ont diminué de 71,2 %, 59,8 % et 44,2 %, respectivement. À l'exception de *Bacillus sp.* TC4, tous les traitements bactériens du sol, ont réduit de manière significative, l'accumulation de Cd dans les racines de 14,3 % à 67,3 %. De plus, l'inoculation des souches bactériennes dans le sol contaminé a entraîné une diminution significative de l'absorption du nickel par les racines, allant de 41,4 à 75,9 %. D'autre part, les concentrations de zinc et de cuivre dans les pousses d'épinards, ont été significativement augmentées par l'inoculation du sol avec des souches bactériennes, augmentant de 1,8 à 3,6 fois pour le Zn et de 1,2 à 1,5 fois pour le Cu, respectivement. De plus, l'inoculation du sol avec la souche *Bacillus sp.* TC4 a augmenté l'accumulation de nickel dans les pousses de 52,8 % ; l'inoculation du sol avec TC33, TC34 et TC45 a augmenté la concentration de nickel dans les pousses de 33,7 %, 34,7 % ou 35,7 %, respectivement.

L'effet de l'inoculation bactérienne du sol sur la capacité de phytoremédiation de *Spinacia oleracea* a été évalué, en calculant le facteur de bioaccumulation BAF (bioaccumulation des métaux lourds du sol au niveau des racines et des pousses) et le facteur de translocation TF (translocation des métaux des racines aux pousses) (Tableau 23).

Au niveau de presque tous les traitements, le BAF au niveau des racines a été plus élevé par rapport à celui au niveau des pousses. L'inoculation du sol avec *Pseudomonas sp.* TC33 et *B. subtilis* TC34 a considérablement augmenté, respectivement, le BAF_{racine} du manganèse par 100,7 % et 99 % et du zinc par 112,7 % et 144,7 % ; par ailleurs, le BAF_{pousses} a largement augmenté par 2,52 et 1,65 fois pour le manganèse et par 7,3 et 2,4 fois pour le zinc à la suite de l'inoculation du sol par *Pseudomonas sp.* TC33 et *B. subtilis* TC34, respectivement. La plante *Spinacia oleracea* cultivée dans un sol non inoculé et hautement contaminé par le cadmium avait un BAF_{racines} supérieur à 1 (1,74), prouvant la capacité de la plante à absorber et accumuler le cadmium à une forte concentration, lorsqu'elle est exposée à une forte contamination par ce métal toxique. Cependant, ce facteur était relativement faible, ne dépassant pas 1 au niveau des pousses, en revanche l'inoculation du sol par *Pseudomonas sp.* TC33 et *B. subtilis* TC34 a significativement augmenté le BAF_{pousses} par 94,9 % et 66,1 %, respectivement.

Seule la présence de *Pseudomonas sp.* TC 33 dans le sol a augmenté la translocation du manganèse des racines des épinards vers les pousses de 28,4 %, tandis que la translocation du zinc et du cuivre vers les zones aériennes des épinards a été augmentée de 2,2 à 3,74 fois pour le Zn et de 2,0 à 3,2 fois pour le Cu, dans tous les traitements bactériens. En revanche, la translocation du cadmium a été multipliée par 3,6 ; 2,6 et 1,5 lorsque le sol a été inoculé par *Pseudomonas sp.* TC33, *B. subtilis* TC34 et *Terribacillus sp.* TC45, respectivement. D'autre part, la bioaugmentation du sol avec *B. circulans* TC7 a affecté la translocation du Mn et du Cd, puisqu'ils ont diminué de 49,6 % et 48 %, respectivement.

Tableau 22 : Effet des différents 5 souches bactériennes sur les concentrations de métaux lourds Métal (mg Kg⁻¹ Poids sec) dans les racines et les pousses d'épinards récoltés après 42 jours de transfert dans un sol contaminé par des métaux lourds.

Métal (mg Kg ⁻¹)	Tissu	Traitements						Niveaux phytotoxiques (Kabata-Pendias, 2010)
		Contrôle positif	<i>Bacillus sp.</i> TC4	<i>B. circulans</i> TC7	<i>Pseudomonas sp.</i> TC33	<i>B. subtilis</i> TC34	<i>Terribacillus sp.</i> TC45	
Mn	Racines	829,9 ± 7,5 ^a	845,5 ± 18,5 ^a	470,6 ± 25,9 ^c	573,48 ± 9,0 ^{bc}	619,6 ± 16,5 ^b	845,8 ± 26,6 ^a	< 500
	Pousses	311,9 ± 10,0 ^a	229,5 ± 26,5 ^{ab}	87,9 ± 16,3 ^c	276,1 ± 32,4 ^{ab}	193,9 ± 19,7 ^{bc}	307,9 ± 7,0 ^{ab}	
Zn	Racines	46,5 ± 1,9 ^{ab}	44.8 ± 0.4 ^b	23.3 ± 0.1 ^c	43.5 ± 1.0 ^b	47.6 ± 0.8 ^{ab}	54.5 ± 2.8 ^a	150 – 200
	Pousses	15,5 ± 0,3 ^c	55.8 ± 1.0 ^a	27.7 ± 1.5 ^b	47.7 ± 4.2 ^a	34.5 ± 2.4 ^b	49.8 ± 0.9 ^a	
Cu	Racines	69,2 ± 0,4 ^a	32.2 ± 1.9 ^{bc}	26.3 ± 2.7 ^c	38.1 ± 1.4 ^{bc}	35.9 ± 3.1 ^{bc}	43.8 ± 4.2 ^b	20 – 100
	Pousses	6,1 ± 0,1 ^b	7.1 ± 0.7 ^{ab}	7.3 ± 0.3 ^{ab}	8.9 ± 0.2 ^a	8.37 ± 0.3 ^a	7.61 ± 0.2 ^{ab}	
Cd	Racines	64,9 ± 0,6 ^a	63,2 ± 1,4 ^a	50,6 ± 3,1 ^b	21,2 ± 1,8 ^c	22,1 ± 0,6 ^c	55,7 ± 0,4 ^b	5 – 10
	Pousses	21,9 ± 0,1 ^{bc}	24,7 ± 1,1 ^{ab}	8,8 ± 0,6 ^d	25,7 ± 1,4 ^{ab}	18,7 ± 2,0 ^c	28,4 ± 0,5 ^a	
Ni	Racines	38,2 ± 0,2 ^a	11.9 ± 0.8 ^c	20.3 ± 0.5 ^b	12.0 ± 0.7 ^c	9.2 ± 0.6 ^c	22.4 ± 2.0 ^b	20 – 30
	Pousses	1,99 ± 0,01 ^{bc}	3.04 ± 0.14 ^a	1.11 ± 0.24 ^c	2.66 ± 0.27 ^{ab}	2.68 ± 0.22 ^{ab}	2.70 ± 0.01 ^{ab}	

Les moyennes d'une même ligne suivies de lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0,05$ selon le test HSD de Tukey.

Tableau 23 : Moyenne $\pm$ erreur standard (n = 3) des facteurs de bioaccumulation (BAF) et des facteurs de translocation (TF), des métaux lourds dans des épinards cultivés dans un sol contaminé.

Métal	Facteur	Traitements					
		Contrôle positif	<i>Bacillus sp.</i> TC4	<i>B. circulans</i> TC7	<i>Pseudomonas sp.</i> TC33	<i>B. subtilis</i> TC34	<i>Terribacillus sp.</i> TC45
Mn	BAF _{racines}	1,27 $\pm$ 0,14 ^{bc}	1,24 $\pm$ 0,05 ^{bc}	0,59 $\pm$ 0,07 ^c	2,55 $\pm$ 0,35 ^a	2,53 $\pm$ 0,02 ^a	1,58 $\pm$ 0,01 ^b
	BAF _{pousses}	0,48 $\pm$ 0,07 ^c	0,34 $\pm$ 0,05 ^c	0,11 $\pm$ 0,01 ^d	1,21 $\pm$ 0,01 ^a	0,79 $\pm$ 0,11 ^b	0,58 $\pm$ 0,03 ^c
	TF	0,38 $\pm$ 0,02 ^{ab}	0,27 $\pm$ 0,03 ^{ab}	0,18 $\pm$ 0,05 ^b	0,48 $\pm$ 0,06 ^a	0,31 $\pm$ 0,04 ^{ab}	0,36 $\pm$ 0,02 ^{ab}
Zn	BAF _{racines}	0,47 $\pm$ 0,05 ^b	0,37 $\pm$ 0,01 ^{bc}	0,19 $\pm$ 0,02 ^c	1,0 $\pm$ 0,01 ^a	1,15 $\pm$ 0,05 ^a	0,45 $\pm$ 0,09 ^b
	BAF _{pousses}	0,15 $\pm$ 0,01 ^b	0,47 $\pm$ 0,02 ^b	0,22 $\pm$ 0,01 ^b	1,10 $\pm$ 0,09 ^a	0,84 $\pm$ 0,11 ^a	0,41 $\pm$ 0,03 ^a
	TF	0,33 $\pm$ 0,01 ^d	1,25 $\pm$ 0,03 ^a	1,19 $\pm$ 0,07 ^{ab}	1,10 $\pm$ 0,07 ^{ab}	0,72 $\pm$ 0,06 ^c	0,92 $\pm$ 0,06 ^{bc}
Cu	BAF _{racines}	1,34 $\pm$ 0,06 ^{ab}	0,53 $\pm$ 0,02 ^b	0,43 $\pm$ 0,01 ^b	1,53 $\pm$ 0,18 ^a	1,69 $\pm$ 0,13 ^a	0,70 $\pm$ 0,23 ^{bc}
	BAF _{pousses}	0,12 $\pm$ 0,01 ^b	0,12 $\pm$ 0,01 ^b	0,12 $\pm$ 0,02 ^b	0,36 $\pm$ 0,03 ^a	0,39 $\pm$ 0,01 ^a	0,12 $\pm$ 0,03 ^b
	TF	0,09 $\pm$ 0,001 ^b	0,22 $\pm$ 0,03 ^a	0,28 $\pm$ 0,04 ^a	0,23 $\pm$ 0,01 ^a	0,24 $\pm$ 0,01 ^a	0,18 $\pm$ 0,02 ^{ab}
Cd	BAF _{racines}	1,74 $\pm$ 0,12 ^a	1,32 $\pm$ 0,03 ^{ab}	1,12 $\pm$ 0,04 ^{ab}	0,95 $\pm$ 0,11 ^b	1,19 $\pm$ 0,05 ^{ab}	1,16 $\pm$ 0,19 ^{ab}
	BAF _{pousses}	0,59 $\pm$ 0,04 ^b	0,51 $\pm$ 0,01 ^b	0,19 $\pm$ 0,01 ^c	1,15 $\pm$ 0,12 ^a	0,98 $\pm$ 0,07 ^a	0,59 $\pm$ 0,1 ^b
	TF	0,34 $\pm$ 0,001 ^d	0,38 $\pm$ 0,009 ^{de}	0,17 $\pm$ 0,001 ^e	1,21 $\pm$ 0,04 ^a	0,83 $\pm$ 0,09 ^b	0,57 $\pm$ 0,1 ^c
Ni	BAF _{racines}	0,50 $\pm$ 0,07 ^a	0,13 $\pm$ 0,002 ^b	0,24 $\pm$ 0,02 ^b	0,28 $\pm$ 0,002 ^b	0,26 $\pm$ 0,01 ^b	0,25 $\pm$ 0,03 ^b
	BAF _{pousses}	0,03 $\pm$ 0,003 ^b	0,03 $\pm$ 0,003 ^b	0,01 $\pm$ 0,001 ^b	0,06 $\pm$ 0,003 ^a	0,08 $\pm$ 0,007 ^a	0,03 $\pm$ 0,001 ^b
	TF	0,05 $\pm$ 0,01 ^c	0,26 $\pm$ 0,03 ^a	0,05 $\pm$ 0,01 ^c	0,22 $\pm$ 0,01 ^{ab}	0,29 $\pm$ 0,04 ^a	0,12 $\pm$ 0,01 ^{bc}

Les moyennes d'une même ligne suivies de lettres différentes sont significativement différentes à $p < 0,05$ selon le test HSD de Tukey.

V. 7. 1. Assimilation du calcium et du fer par des épinards cultivés sous différents traitements

Les plantes cultivées dans le contrôle positif non inoculé, présentaient une forte absorption de calcium, à la fois dans les racines et les pousses (Figure 63 - A), par rapport aux plantes cultivées dans un sol contaminé par des métaux lourds et inoculé avec les différentes souches bactériennes. Bien que la concentration en fer dans les racines des plantes, cultivées dans le traitement témoin positif, était supérieure à celle des autres traitements (Figure 63 - B), sa concentration dans les pousses était relativement très minime, ce qui indique sa faible translocation vers les tissus aériens.

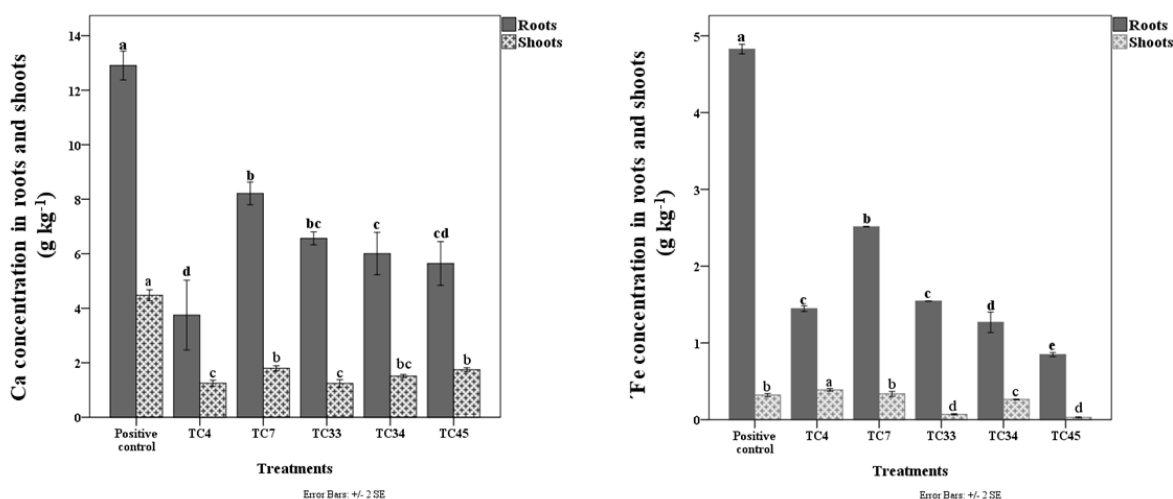


Figure 63 : Effet de 5 souches bactériennes sur les concentrations du calcium et du fer dans les racines et les pousses d'épinards cultivés dans un sol contaminé par les métaux lourds. Les barres d'erreur indiquent l'erreur standard, tandis que les lettres indiquent la différence statistiquement significative déterminée par le HSD de Tukey à $P < 0,05$.

V. 7. 2. Liens plante – métaux

Les corrélations (Pearson), entre la croissance des plantes et les concentrations de métaux lourds dans les tissus des épinards, ont révélé une corrélation positive significative ($p < 0,01$), entre les attributs de croissance des plantes. La teneur en chlorophylle était positivement corrélée ($p < 0,05$) avec la longueur des racines et le poids frais des épinards (Figure 64). L'absorption élevée de Cu et Ni dans les racines, ainsi que l'accumulation de Ca dans les pousses, ont entravé la croissance des épinards. De plus, l'accumulation de cuivre, de fer et de calcium dans les racines, ainsi que l'accumulation de calcium dans les pousses, a eu un impact significativement négatif sur la teneur en chlorophylle des feuilles. La concentration de métaux dans les tissus

des épinards, révèle certaines corrélations significatives, comme l'accumulation de Ni dans les racines qui est positivement corrélée à l'accumulation de Cu, Ca et Fe dans les racines ; la concentration de fer dans les racines étant fortement corrélée à la concentration de Ca dans le même tissu. De plus, la concentration de Cd dans les pousses s'est avérée être positivement corrélée avec les concentrations de Ni et de Mn dans le même tissu. Les facteurs de translocation du zinc et du cuivre étaient fortement corrélés et influençaient favorablement la croissance des épinards, tandis que la bioaccumulation du Ni et du Fe avait un impact négatif sur leur croissance. Selon les résultats de la corrélation de Pearson, la bioaccumulation de certains métaux dans les tissus des épinards était statistiquement associée : Les BAF de Mn, Zn et Cu étaient positivement corrélés ; le BAF de Ni était positivement lié au BAF de Fe, tandis que le BAF de Cu était positivement lié au BAF de Ca.

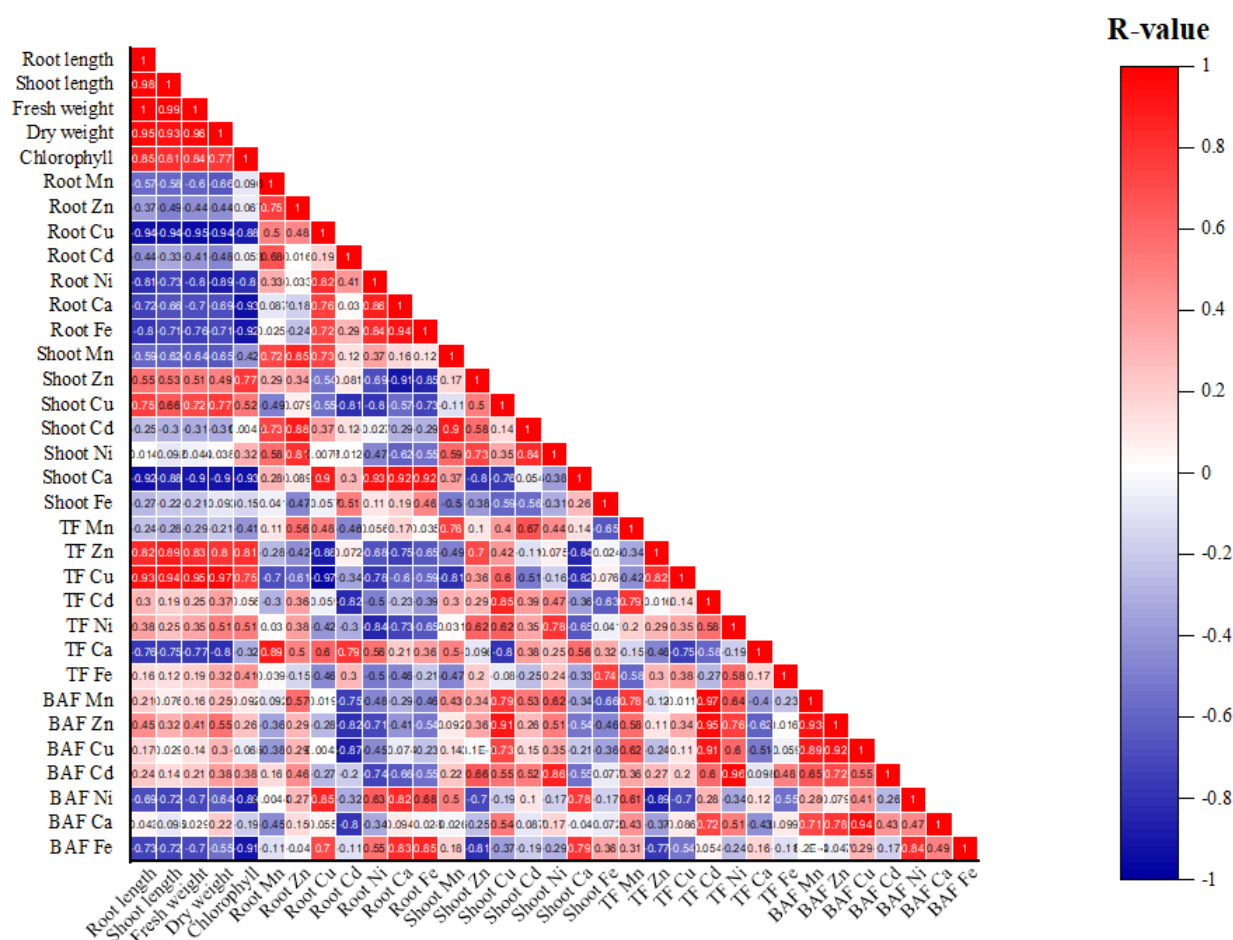


Figure 64 : Heatmap montrant les corrélations entre les paramètres de croissance des épinards et l'absorption de métaux lourds, la translocation des métaux TF et leur bioaccumulation BAF (totale).

La distribution des métaux dans les différents tissus végétaux est déterminée par leur forme, le transport de l'eau et les espèces végétales (Ma et al., 2017). Nos résultats ont révélé que les tissus racinaires des épinards, cultivés dans des sols inoculés et non inoculés, ont accumulé plus de métaux que les pousses. Cela correspond à d'autres études qui ont étudié la distribution des métaux lourds dans les tissus végétaux (Babu et al., 2015 ; Tirry et al., 2018 ; Eid et al., 2019 ; Renu et al., 2021). Les racines absorbent de plus grandes quantités d'éléments essentiels et non essentiels que les pousses, ce qui peut être attribué au fait que les racines sont le premier organe cible à entrer en contact avec les métaux lourds. Elles fonctionnent comme une barrière à la translocation et protègent les sections comestibles de la contamination toxique (Eid et al., 2017). Dans un sol non inoculé, les épinards ont absorbé une concentration élevée de métaux (Cu, Cd et Ni) dans leurs racines, par rapport aux sols inoculés, ce qui est positivement corrélé avec les effets phytotoxiques observés chez ces plantes.

Nos résultats ont révélé que les épinards stressés par les métaux et cultivés dans un sol non inoculé, ont accumulé les plus fortes concentrations de fer, de calcium et d'autres métaux dans leurs racines, avec la plus faible translocation vers les pousses, ce qui pourrait être lié à la production de précipités de fer dans les racines, qui ont une grande capacité d'absorption des métaux, les empêchant d'atteindre les parties aériennes (Kabata-Pendias, 2010).

En outre, on a constaté que l'excès de Ni augmentait l'absorption et la translocation du Fe, ce qui était fortement corrélé à une diminution de la teneur en chlorophylle. La physiologie des plantes régule l'absorption et la translocation des métaux lourds dans les plantes et détermine largement la fraction qui peut potentiellement entrer dans la chaîne alimentaire (Yan et al., 2020). Le transport des éléments traces entre les organes des plantes dépend également des variables électrochimiques des éléments. En général, les éléments modérément transportés des racines vers les parties aériennes sont Mn, Ni, Cd et Zn ; et ceux fortement liés aux cellules des racines sont Co, Cu, Cr, Pb, Hg et Fe (Kabata-Pendias, 2010). Dans la présente étude, dans les traitements inoculés, la translocation des métaux vers les parties supérieures de l'épinard était modérément améliorée, mais les facteurs de translocation ont révélé que presque tous les métaux lourds s'accumulaient préférentiellement dans les racines. Tous les métaux lourds étudiés (à l'exception du Zn) semblent être bien localisés dans les racines des épinards. Nos résultats sont en accord avec de nombreuses études, qui indiquent la nature des épinards, avec un faible potentiel de translocation vers les parties aériennes (Eid et al., 2018 ; Tang et al., 2019 b).

Le zinc avait le facteur de translocation le plus élevé, et sa translocation avec celle du cuivre était fortement corrélée et influençait positivement la croissance des épinards. Cela pourrait être lié à leurs rôles métaboliques essentiels dans les plantes, dont le plus important est leur activité en tant que composant d'une variété d'enzymes (Kabata-Pendias, 2010). De manière surprenante, *Pseudomonas sp.* TC33 et *B. subtilis* TC34 ont considérablement augmenté la translocation du cadmium, un élément non essentiel, de 3,6 et 2,6 fois, respectivement. Des études antérieures ont indiqué que l'inoculation du sol, avec des bactéries mobilisant les métaux, augmentait l'absorption du Cd dans les pousses des plantes, ce qui démontre que l'absorption/accumulation du cadmium dans les plantes, dépend fortement de la capacité des bactéries à mobiliser les métaux lourds (Jiang et al., 2008 ; He et al., 2013 ; Rojjanateeranaj et al., 2017). En outre, la concentration de cadmium dans les pousses s'est avérée être positivement corrélée avec les concentrations de nickel et de manganèse dans le même tissu. Au contraire, d'autres études ont rapporté que l'interaction du cadmium avec le Mn/Ni est souvent antagoniste et semble être liée à leur remplacement par le Cd pendant les processus d'absorption (Kabata-Pendias, 2010).

Une analyse de différenciation entre les traitements du sol a été effectuée par une analyse catégorielle en composantes principales (CAT-PCA) qui vise à souligner l'effet de chaque traitement du sol (les 5 inoculant bactériens + le contrôle positif non inoculé) sur la croissance des plantes et la bioaccumulation des métaux lourds (Figure 74). La CAT-PCA a capturé plus de 70,81 % de la variance, et la direction du vecteur de chaque variable a indiqué des corrélations généralement bonnes entre les variables tracées très près les unes des autres. La position du centroïde et la séparation des clusters dans cette analyse discriminante (Figure 65), résument la réponse des épinards à la présence ou à l'absence d'inoculant dans le sol contaminé et indiquent l'efficacité de l'inoculation du sol avec *Bacillus circulans* TC7, sur la promotion des paramètres de croissance des plantes (longueur et biomasse des épinards), tout en minimisant la bioaccumulation de tous les métaux. Au contraire, la présence de *Bacillus subtilis* TC34 et de *Pseudomonas sp.* TC33 dans le sol, tend à promouvoir la bioaccumulation des métaux dans les tissus des épinards ; il est vrai que le traitement du sol avec *Bacillus subtilis* TC34 a intensifié la bioaccumulation du calcium, du manganèse et du cuivre.

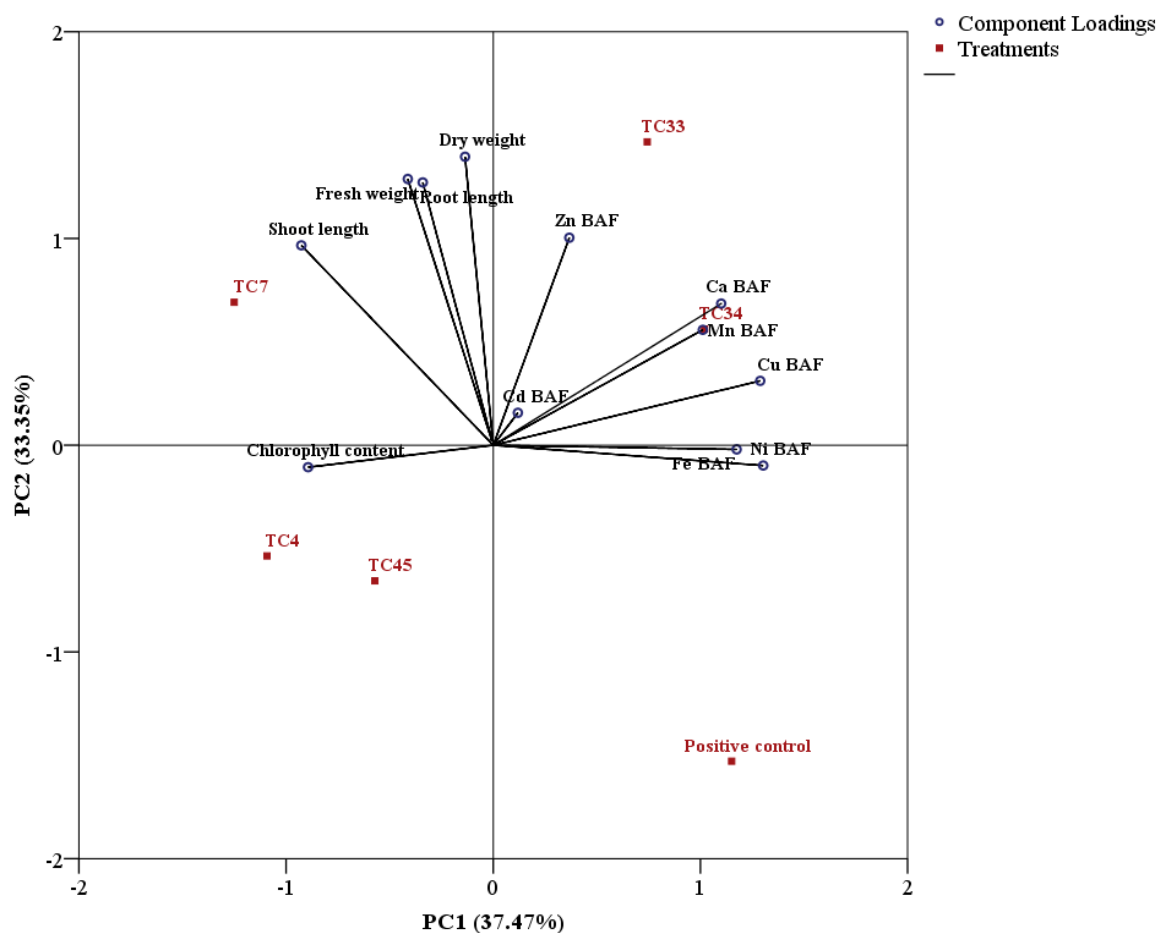


Figure 65 : Analyse en composantes principales catégorielles (Cat-PCA) de divers paramètres de croissance des plantes et de facteurs de bioaccumulation des métaux (BAF), représentés par les cercles bleus, mesurés dans les traitements, représentés par les carrés rouges, témoin positif : sol non inoculé, TC4 : *Bacillus* sp., TC7 : *B. circulans*, TC33 : *Pseudomonas* sp., TC34 : *B. subtilis*, et TC45 : *Terribacillus* sp. Variance totale expliquée : 70,82 % ; PC1 = 37,47 %, PC2 = 33,35 %.

Chapitre 3 : Discussion générale et perspectives

Les vers de terre, étant la biomasse d'invertébrés la plus abondante du sol, ont démontré leur capacité à participer de manière bénéfique à presque tous les cycles biogéochimiques du sol (Edwards et al., 1996 ; Edwards, 2004 ; Bohlen, 2017), ce qui en fait une cible intéressante pour des chercheurs, afin d'étudier leurs interactions avec les composantes du sol et les communautés microbiennes. Les vers de terre sont abondants dans les régions tempérées, avec suffisamment d'humidité et de matière organique, c'est pourquoi le site d'échantillonnage des vers de terre a été choisi près du barrage d'eau de la région d'Akrach, Rabat. Les vers de terre ont été échantillonnés en creusant à une profondeur de 20-30 cm et en apportant des spécimens au laboratoire, où l'espèce la plus abondante a été choisie pour les expériences ultérieures.

Contrairement à l'identification morphologique, l'identification moléculaire a été faite avec succès en utilisant quatre gènes (COI, ARNr 16S, ND1, et ARNr 28S), et le spécimen de ver de terre a été identifié comme *Aporrectodea molleri*, démontrant l'efficacité des méthodes moléculaires dans l'identification, puisque les quatre gènes produisaient des résultats concordants. En effet, *Aporrectodea molleri* est une espèce de ver de terre commune dans les climats méditerranéens, sa présence a été rapportée auparavant au Maroc, en Algérie, au Portugal, en Espagne, en France et au Mexique (Trigo et al., 1988 ; Baha, 1997 ; Monroy et al., 2003 ; Pérez-Losada et al., 2012 ; Bazri, 2013 ; Reynolds et al., 2019). *Aporrectodea molleri*, en revanche, est une espèce peu étudiée en ce qui concerne son rôle écologique et ses interactions microbiennes. De plus, il serait intéressant de cartographier les différentes espèces de vers de terre présentes dans les différentes régions du Maroc, car aucune étude de ce type n'a été menée auparavant.

Dans notre laboratoire, nous avons mené une étude préliminaire sur l'effet des extraits de vers de terre (excrétions brutes et cutanées) sur une variété de microorganismes du sol, en mettant l'accent dans cette étude sur la croissance des levures. Les résultats ont indiqué que les extraits bruts de vers de terre à une concentration de 3,75 g L⁻¹ permettaient une croissance significativement plus importante des levures (pour les deux espèces testées) que le milieu de culture universel Sabouraud Dextrose Agar, qui a été utilisé comme contrôle de croissance. Les résultats étaient comparables entre les extraits de vers de terre à jeun et ceux provenant de vers de terre fraîchement récoltés, ce qui indique que les nutriments et les substances de croissance contenus dans les extraits proviennent principalement de la composition intrinsèque des vers et

non de leur contenu intestinal. La poudre de vers de terre secs contient 60-70 % de protéines, 8-20 % de glucides, 7-10 % de lipides, 2-3 % de minéraux, diverses vitamines et des composés indoliques rhizogènes, qui constituent tous une source de nutriments pour les microorganismes du sol à des concentrations optimales (Edwards, 1985 ; El Harti et al., 2001 ; Sogbesan et al., 2008 ; Anitha et al., 2012 ; Köse et al., 2017). Ces études préliminaires ont ouvert la voie au développement d'un milieu de culture, basé sur des extraits de vers de terre, qui pourrait optimiser la culture et la croissance des microorganismes du sol. Contrairement aux extraits bruts, les excréments cutanés ont inhibé la croissance des deux espèces de levures testées, même à de faibles concentrations de 0,06 g L⁻¹. En effet, les excréments cutanés comprennent tous les fluides produits par la surface du ver de terre, tels que le mucus, le fluide coelomique et l'urine (Salmon, 2001 ; Santocki et al., 2016 ; Raouane et al., 2020 ; Chelkha et al., 2021). Ils contiennent des mucopolysaccharides et des protéines qui agissent comme un bactéricide, en diluant le nombre de microorganismes à la surface du ver de terre, protégeant ainsi le ver de terre de l'invasion des microorganismes (Cooper et al., 2003 ; Wang et al., 2011). D'autres études, utilisant l'activité des coelomocytes vivants, ont confirmé l'effet inhibiteur du liquide coelomique du ver de terre sur la croissance de divers microorganismes phytopathogènes (Ueda et al., 2008 ; Plavšin et al., 2017 ; Ečimović et al., 2021). Cependant, le fait que ces excréments aient été stérilisés à 121°C, indique que la ou les molécules responsables de cet effet inhibiteur sont très probablement dérivées de l'activité humorale responsable de l'immunité des vers et possèdent une propriété thermostable, et sa purification, sa caractérisation, son identification et son application adéquate seraient intéressantes à investiguer.

Ces dernières années, des recherches approfondies ont été menées sur les bactéries isolées des vers de terre, la majorité d'entre elles ayant été isolées de leur tube digestif et de leurs turricules. Aucune d'entre elles, cependant, n'a été menée sur le tissu chloragène, une couche de cellules qui entoure le tube digestif. Nous avons isolé et identifié 15 souches bactériennes, pour la première fois, liées au tissu chloragène du ver de terre *Aporrectodea molleri*. Ces souches ont été classées dans deux phylums majeurs (*Firmicutes* et *Proteobacteria*) et regroupées en quatre taxa : *Aeromonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* et *Bacillaceae*. Bien que les isolats aient été classés phylogénétiquement, de la même manière que la majorité des études précédentes sur les communautés bactériennes, cultivables isolées de vers de terre, l'isolement des seules bactéries appartenant aux taxons *Firmicutes* et *Gammaproteobacteria* peut être dû à un effet inhibiteur du liquide coelomique du ver de terre (Byzov et al. 2009 ;

Singh et al. 2016 ; Wani et al. 2017) et/ou des conditions de la culture choisies. Ainsi, une éventuelle étude métagénomique permettrait d'en savoir plus sur cette communauté bactérienne.

La caractérisation fonctionnelle des souches isolées a révélé qu'elles présentent un profil enzymatique diversifié, indiquant qu'elles sont métaboliquement actives, ce qui a été confirmé dans des études antérieures, selon lesquelles les bactéries isolées des vers de terre produisaient plusieurs enzymes, qui peuvent être impliquées dans la décomposition de matières organiques complexes et de polymères naturels, au cours du processus de digestion, tout en coexistant en symbiose transitoire ou permanente avec leur hôte (Byzov et al. 2009, 2015 ; Samson et al. 2020). En outre, plusieurs études ont établi l'efficacité des isolats de vers de terre, en raison de leurs nombreuses propriétés bénéfiques (Biswas et al., 2018 ; Banerjee et al., 2019 ; Sun et al., 2020), ce qui était cohérent avec notre étude, car trois des quinze isolats bactériens étaient capables de produire de l'AIA et du sidérophore, de fixer l'azote atmosphérique et de produire de l'ammoniac, et de solubiliser le phosphate et le potassium simultanément. Alors que cinq souches présentaient au moins quatre des caractéristiques PGP à la fois. De plus, les isolats étaient capables de tolérer de fortes concentrations de métaux lourds, avec une corrélation positive intrigante entre les souches produisant des sidérophores et la tolérance aux métaux. En effet, tous les isolats bactériens producteurs de sidérophores étaient capables de supporter de fortes concentrations de Zn, Cu, Cd et Ni. Le fait que les sidérophores soient impliqués dans le transport et la séquestration des métaux, sans leur permettre de traverser la membrane cellulaire, appuie cette corrélation (Rajkumar et al. 2010 ; Khan et al. 2018 ; Kramer et al. 2020). Ce qui nous a conduit à sélectionner cinq bactéries (*Bacillus* sp. TC4, *B. circulans* TC7, *Pseudomonas* sp. TC33, *B. subtilis* TC34, and *Terribacillus* sp. TC45) productrices de sidérophores, qui présentaient simultanément d'autres caractéristiques PGP bénéfiques pour les expérimentations *in vivo*.

La pollution environnementale est devenue un problème croissant, qui contribue à l'augmentation des événements climatiques catastrophiques et qui fait des ravages dans les écosystèmes mondiaux, y compris les agroécosystèmes (Ebert et al., 2020). En effet, les plantes sont constamment exposées à une variété de stress, y compris les stress abiotiques (tels que les métaux lourds). Les stress métalliques réduisent considérablement les rendements des plantes, cultivées à l'échelle mondiale et peuvent également avoir un effet néfaste sur l'uniformité d'émergence des graines, la vigueur et, par conséquent, le rendement des cultures. De plus,

l'occurrence de ces climats extrêmes, doit avoir un impact significatif sur la qualité et la quantité des récoltes, mettant en péril la sécurité alimentaire mondiale (Shahzad et al., 2021). Dans ces perspectives, la majorité des méthodes actuelles emploient un processus de prétraitement des semences, qui sont écologiquement durables, rentables et nécessitent moins de terres pour produire la même quantité de grains (Reddy, 2012). La méthode d'enrobage des graines a été choisie dans cette étude, pour évaluer les effets de cinq isolats bactériens sélectionnés, sur la germination des graines et la croissance des plantules, dans des conditions normales et anormales (dus aux métaux lourds). Les graines de *Spinacia oleracea* enrobées d'une de nos cinq souches bactériennes, ont toutes augmenté de manière significative les taux de germination, la croissance et la biomasse des semis lorsqu'elles ont été cultivées à la fois dans un sol normal et dans un sol fortement contaminé par le cadmium. De nombreux PGPB tolérants aux métaux lourds, dont *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Methylobacterium* et *Streptomyces*, ont précédemment démontré qu'ils atténuaient la toxicité des métaux lourds, lorsqu'ils étaient utilisés comme inoculant de semences, stimulant ainsi la croissance des racines en augmentant leur surface et l'absorption des nutriments par les jeunes plantules (Prajapati et al., 2020 ; Chakraborti et al., 2022).

Le développement de l'industrialisation et de l'urbanisation a entraîné une augmentation accrue de la quantité de métaux lourds dans l'environnement au cours des dernières décennies, suscitant de graves préoccupations dans le monde entier. Contrairement à d'autres contaminants, les métaux lourds ne sont pas dégradables par des processus biologiques ou physiques et persistent dans le sol pendant une longue période, ce qui constitue une menace à long terme pour l'environnement. Par conséquent, des mesures d'assainissement sont nécessaires pour empêcher la pénétration des métaux lourds dans les environnements terrestres, atmosphériques et aquatiques et pour atténuer la contamination des sols. À ce jour, diverses stratégies de remédiation ont été élaborées pour remettre en état les sols contaminés par des métaux lourds (Kumar et al., 2021 a). En raison des nombreuses limitations des approches physico-chimiques conventionnelles, notamment le coût élevé, l'inefficacité lorsque les contaminants sont présents en faibles concentrations, les changements irréversibles des propriétés physico-chimiques et biologiques des sols, qui entraînent une dégradation de l'écosystème du sol, et l'introduction d'une pollution secondaire, il existe un besoin croissant de développer des technologies de remédiation rentables, efficaces et respectueuses de l'environnement, pour récupérer les sols contaminés par les métaux lourds (RoyChowdhury et

al., 2018). La présente étude a utilisé une combinaison de deux approches de biorestauration, la phytoremédiation assistée par des bactéries favorisant la croissance des plantes en présence des métaux lourds, pour bio-restaurer un sol fortement contaminé par le cadmium, ainsi que par le zinc, le cuivre, le nickel et le manganèse à des concentration modérée. *Spinacia oleracea* a répondu efficacement à la présence ou à l'absence de l'inoculant dans un sol contaminé par des métaux lourds. L'inoculation du sol avec les cinq bactéries sélectionnées a favorisé la croissance et la teneur en chlorophylle des plantes *Spinacia oleracea*, cultivées dans des conditions de forte toxicité métallique, principalement due au cadmium. Exposées à ces conditions toxiques, les isolats bactériens ont augmenté, de manière significative, l'activité enzymatique du sol et la teneur en azote-phosphore-potassium, ce qui est probablement lié à leurs caractéristiques PGP prouvées *in vitro*, qui ont en général contribué à l'atténuation du stress métallique. La stimulation de la croissance des plantes par les bactéries PGP sous le stress du Cd a été rapportée dans de nombreuses études (Castro et al., 2015 ; Wiangkham et al., 2018 ; Ma et al., 2020 ; Liu et al., 2022). Ces bactéries peuvent affecter la croissance des plantes en produisant de l'ACC désaminase, des sidérophores et de l'hydrocyanure (HCN), de l'AIA, et de la solubilisation de nutriments. En parallèle avec nos résultats, les effets positifs de l'inoculation bactérienne sur la protection des plantes à l'exposition aux métaux, ont été observés par Shilev et al., (2020), Wang et al., (2020 b) et Renu et al., (2021), pour les épinards inoculés avec les PGPB en présence de Cd. L'analyse de l'ensemble de nos résultats a démontré la capacité de *Bacillus circulans* TC7, inoculée dans le sol, à promouvoir les paramètres de croissance des plantes (longueur et biomasse des épinards), tout en minimisant la bioaccumulation des métaux, ce qui indique son utilisation potentielle comme promoteur de croissance des plantes, en cas de stress lié aux métaux lourds avec une forte contamination par le cadmium.

D'autre part, l'amendement du sol avec *Bacillus subtilis* TC34 et *Pseudomonas* sp. TC33 a amélioré la mobilité des métaux et a favorisé la bioaccumulation des métaux (sauf Ni) dans les tissus des épinards, améliorant ainsi leur potentiel de phytoextraction et les rendant résistants à la toxicité élevée du cadmium. Néanmoins, l'interaction entre la plante et l'inoculant bactérien, dans un environnement contaminé par les métaux reste complexe, car les facteurs déterminants si les bactéries vont augmenter ou diminuer l'accumulation des métaux lourds, par les plantes doivent être étudiés plus avant. Il aurait été intéressant d'effectuer des analyses complémentaires, comme la détermination de l'accumulation de proline, de la peroxydation des

lipides et de l'activité antioxydante. La détermination de la réponse des plantes à l'inoculation du sol par les bactéries PGP, par le biais de l'analyse de l'induction de la résistance génique systémique et par l'analyse des changements du métabolisme aiderait à comprendre mieux le process. Pour conclure, on peut considérer le tissu chloragène des vers de terre comme un réservoir de bactéries multi-bénéfiques qui peuvent être utilisé dans des approches biotechnologiques pour aider à résoudre, au moins, certains des problèmes environnementaux actuels.

Références bibliographiques

- Adeoye, A. O.; Adebayo, I. A.; Afodun, A. M.; Ajijolakewu, K. A., 2022: Benefits and limitations of phytoremediation: Heavy metal remediation review. In: Bhat, R. A., F. M. P. Tonelli, G. H. Dar & K. B. T. P. Hakeem (eds.), *Phytoremediation*. Elsevier, pp. 227–238.
- Ahemad, M., 2019: Remediation of metalliferous soils through the heavy metal resistant plant growth promoting bacteria: Paradigms and prospects. *Arabian Journal of Chemistry*., **12**, 1365–1377.
- Ahmad, M. S. A.; Ashraf, M., 2012: Essential Roles and Hazardous Effects of Nickel in Plants. In: Whitacre, D. M. (ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer New York, New York, NY, pp. 125–167.
- Ahsan, M. T.; Najam-ul-haq, M.; Idrees, M.; Ullah, I.; Afzal, M., 2017: Bacterial endophytes enhance phytostabilization in soils contaminated with uranium and lead. *International Journal of Phytoremediation*., **19**, 937–946.
- Aira, M.; Pérez-Losada, M.; Domínguez, J., 2018: Diversity, structure, and sources of bacterial communities in earthworm cocoons. *Scientific Reports*., **8**, 6632.
- Aira, M.; Pérez-Losada, M.; Domínguez, J., 2019: Microbiome dynamics during cast ageing in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Applied Soil Ecology*., **139**, 56–63.
- Alejandro, S.; Höller, S. ; Meier, B. ; Peiter, E., 2020 : Manganese in Plants: From Acquisition to Subcellular Allocation. *Frontiers in Plant Science*., **11**, 1–23.
- Ali, A.; Guo, D.; Mahar, A.; Wang, Z.; Muhammad, D.; Li, R.; Wang, P.; Shen, F.; Xue, Q.; Zhang, Z., 2017: Role of *Streptomyces pactum* in phytoremediation of trace elements by *Brassica juncea* in mine polluted soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*., **144**, 387–395.
- Alia, N.; Sardar, K.; Said, M.; Salma, K.; Sadia, A.; Sadaf, S.; Toqeer, A.; Miklas, S., 2015: Toxicity and Bioaccumulation of Heavy Metals in Spinach (*Spinacia oleracea*) Grown in a Controlled Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*., **12**, 7400–7416.

- Al-Maliki, S.; Al-Taey, D. K. A.; Al-Mammori, H. Z., 2021: Earthworms and eco-consequences: Considerations to soil biological indicators and plant function: A review. *Acta Ecologica Sinica.*, **41**, 512–523.
- Amaresan, N.; Patel, P.; Amin, D. (Eds.), 2022: *Practical Handbook on Agricultural Microbiology*. Springer Protocols Handbooks. Springer US, New York, NY.
- Amari, T.; Ghnaya, T.; Abdelly, C., 2017: Nickel, cadmium, and lead phytotoxicity and potential of halophytic plants in heavy metal extraction. *South African Journal of Botany.*, **111**, 99–110.
- Amprayn, K. on; Rose, M. T.; Kecskés, M.; Pereg, L.; Nguyen, H. T.; Kennedy, I. R., 2012: Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth. *Applied Soil Ecology.*, **61**, 295–299.
- Angulo-Bejarano, P. I.; Puente-Rivera, J.; Cruz-Ortega, R., 2021: Metal and metalloid toxicity in plants: An overview on molecular aspects. *Plants.*, **10**, 1–28.
- Anitha, J.; Jayraaj, I. A., 2012: Nutritional and antioxidant evaluation of earthworm powder (*Eudrillus euginae*). *International Research Journal of Pharmacy.*, **3**, 177–180.
- Arif, N.; Yadav, V.; Singh, S.; Singh, S.; Ahmad, P.; Mishra, R. K.; Sharma, S.; Tripathi, D. K.; Dubey, N. K.; Chauhan, D. K., 2016: Influence of High and Low Levels of Plant-Beneficial Heavy Metal Ions on Plant Growth and Development. *Frontiers in Environmental Science.*, **4**.
- Armendariz, A. L.; Talano, M. A.; Olmos Nicotra, M. F.; Escudero, L.; Breser, M. L.; Porporatto, C.; Agostini, E., 2019: Impact of double inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* E109 and *Azospirillum brasilense* Az39 on soybean plants grown under arsenic stress. *Plant Physiology and Biochemistry.*, **138**, 26–35.
- Arya, N.; Rana, A.; Rajwar, A.; Sahgal, M.; Sharma, A. K., 2018: Biocontrol Efficacy of Siderophore Producing Indigenous *Pseudomonas* Strains Against *Fusarium* Wilt in Tomato. *National Academy Science Letters.*, **41**, 133–136.
- Babu, A. G.; Shea, P. J.; Sudhakar, D.; Jung, I. B.; Oh, B. T., 2015: Potential use of *Pseudomonas koreensis* AGB-1 in association with *Miscanthus sinensis* to remediate heavy metal(loid)-contaminated mining site soil. *Journal of Environmental Management.*, **151**, 160–166.

- Baha, M., 1997: The earthworm fauna of Mitidja, Algeria. *Tropical Zoology*, **10**, 247–254.
- Bakshi, A.; Moin, M. ; Madhav, M. S., 2020: Metagenomics in Agriculture: State-of-the-Art. *Metagenomics: Techniques, Applications, Challenges and Opportunities*. Springer Singapore, Singapore, pp. 167–187.
- Balali-Mood, M.; Naseri, K.; Tahergorabi, Z.; Khazdair, M. R.; Sadeghi, M., 2021: Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Frontiers in Pharmacology*, **12**, 1–19.
- Banerjee, A.; Biswas, J. K.; Pant, D.; Sarkar, B.; Chaudhuri, P.; Rai, M.; Meers, E., 2019: Enteric bacteria from the earthworm (*Metaphire posthuma*) promote plant growth and remediate toxic trace elements. *Journal of Environmental Management*, **250**, 109530.
- Banerjee, P.; Nath, R., 2022: Prospects of molybdenum fertilization in grain legumes-A review. *Journal of Plant Nutrition*, **45**, 1425–1440.
- Barakat, A.; Ennaji, W.; Krimissa, S.; Bouzaid, M., 2020: Heavy metal contamination and ecological-health risk evaluation in peri-urban wastewater-irrigated soils of Beni-Mellal city (Morocco). *International Journal of Environmental Health Research*, **30**, 372–387.
- Barker, A. v.; Pilbeam, D. J. (Eds.), 2015: *Handbook of Plant Nutrition*. CRC Press.
- Bartlett, M. D.; Briones, M. J. I.; Neilson, R.; Schmidt, O.; Spurgeon, D.; Creamer, R. E., 2010: A critical review of current methods in earthworm ecology: From individuals to populations. *European Journal of Soil Biology*, **46**, 67–73.
- Bazri, K., 2013 : La diversité des lombriciens dans l’Est algérien depuis la côte jusqu’au désert The earthworm’s diversity in Eastern Algeria from the coast to deser, **39**.
- Belimov, A. A.; Hontzeas, N.; Safronova, V. I.; Demchinskaya, S. V.; Piluzza, G.; Bullitta, S. & Glick, B. R., 2005: Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology and Biochemistry*, **37**, 241–250.
- Beloqui, A.; Nechitaylo, T. Y.; López-Cortés, N.; Ghazi, A.; Guazzaroni, M. E.; Polaina, J.; Strittmatter, A. W.; Reva, O.; Waliczek, A.; Yakimov, M. M.; Golyshina, O. v.; Ferrer, M.; Golyshin, P. N., 2010: Diversity of glycosyl hydrolases from cellulose-depleting communities

enriched from casts of two earthworm species. *Applied and Environmental Microbiology.*, **76**, 5934–5946.

Bhatti, S. S.; Kumar, V.; Sambyal, V.; Singh, J.; Nagpal, A. K., 2018: Comparative analysis of tissue compartmentalized heavy metal uptake by common forage crop: A field experiment. *Catena.*, **160**, 185–193.

Bilej, M.; Procházková, P.; Šilerová, M.; Josková, R., 2010: Earthworm Immunity. In: Söderhäll, K. (ed.), *Invertebrate Immunity*. Springer, Boston, MA, pp. 66–79.

Bilen, S.; Yildirim, E., 2017: Effects of Bacterial Isolates on Absorption of Heavy Metals in Soil. *Turkish Journal of Agriculture and Natural Sciences.*, **4**, 355–365.

Bilen, S.; Turan, V., 2022: Enzymatic Analyses in Soils. In: Amaresan, N., P. Patel & D. Amin (eds.), *Practical Handbook on Agricultural Microbiology*. 1st edn. Humana, New York, NY, pp. 377–385.

Billah, M.; Khan, M.; Bano, A.; Hassan, T. U.; Munir, A.; Gurmani, A. R., 2019: Phosphorus and phosphate solubilizing bacteria: Keys for sustainable agriculture. *Geomicrobiology Journal.*, **36**, 904–916.

Biswas, J. K.; Banerjee, A.; Rai, M.; Naidu, R.; Biswas, B.; Vithanage, M.; Dash, M. C.; Sarkar, S. K.; Meers, E., 2018: Potential application of selected metal resistant phosphate solubilizing bacteria isolated from the gut of earthworm (*Metaphire posthuma*) in plant growth promotion. *Geoderma.*, **330**, 117–124.

Bittner, F., 2014: Molybdenum metabolism in plants and crosstalk to iron. *Frontiers in Plant Science.*, **5**, 1–6.

Bodhankar, S.; Grover, M.; Hemanth, S.; Reddy, G.; Rasul, S.; Yadav, S. K.; Desai, S.; Mallappa, M.; Mandapaka, M.; Srinivasarao, C., 2017: Maize seed endophytic bacteria: dominance of antagonistic, lytic enzyme-producing *Bacillus* spp. *3 Biotech.*, **7**, 232.

Bohlen, P. J., 2017: Earthworms. *Encyclopedia of Soil Science, Third Edition*. CRC Press, pp. 701–705.

Bouché, M. B., 1972 : *Lombriciens de France. Ecologie et systématique*. INRA, Paris.

Bouché, M. B., 1977 : Strategies lombriciennes. *Ecological Bulletins.*, 122–132.

- Boularbah, A.; Schwartz, C.; Bitton, G.; Morel, J. L., 2006: Heavy metal contamination from mining sites in South Morocco: 1. Use of a biotest to assess metal toxicity of tailings and soils. *Chemosphere.*, **63**, 802–810.
- Bremner, J. M.; Keeney, D. R., 1965: Steam distillation methods for determination of ammonium, nitrate, and nitrite. *Analytica chimica acta.*, **32**, 485–495.
- Bremner, J. M., 1996: Nitrogen-Total. *Methods of Soil Analysis, Part 3: Chemical Methods*. 5th edn. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, pp. 1085–1121.
- Brown A.E.; Smith H.R., 2010: Benson's microbiological applications: laboratory manual in general microbiology, 14th edn. McGraw- Hill Education
- Brown, G. G.; Doube, B. M., 2004: Functional Interactions between Earthworms, Microorganisms, Organic Matter, and Plants. In: Edwards, C. A. (ed.), *Earthworm ecology*. 2nd edn. CRC Press LLC: Boca Raton, FL, pp. 213–239.
- Bruemmer, G. W.; Gerth, J.; Herms, U., 1986: Heavy metal species, mobility, and availability in soils. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde.*, **149**, 382–398.
- Bruins, M. R.; Kapil, S.; Oehme, F. W., 2000: Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety.*, **45**, 198–207.
- Brumbarova, T.; Bauer, P., 2008 : Iron uptake and transport in plants. *Plant Membrane and Vacuolar Transporters.*, **109**, 149–172.
- Brunoni, F. ; Collani, S. ; Šimura, J.; Schmid, M.; Bellini, C.; Ljung, K., 2019: A bacterial assay for rapid screening of IAA catabolic enzymes. *Plant Methods.*, **15**, 1–10.
- Byzov, B. A.; Nechitaylo, T. Yu.; Bumazhkin, B. K.; Kurakov, A. v.; Golyshin, P. N.; Zvyagintsev, D. G., 2009: Culturable microorganisms from the earthworm digestive tract. *Microbiology.*, **78**, 360–368.
- Byzov, B. A.; Tikhonov, V. v.; Nechitailo, T. Y.; Demin, V. v.; Zvyagintsev, D. G., 2015: Taxonomic composition and physiological and biochemical properties of bacteria in the digestive tracts of earthworms. *Eurasian Soil Science.*, **48**, 268–275.
- Cabot, C.; Martos, S.; Llugany, M.; Gallego, B.; Tolrà, R.; Poschenrieder, C., 2019: A Role for Zinc in Plant Defense Against Pathogens and Herbivores. *Frontiers in Plant Science.*, **10**, 1–15.

Canbolat, M. Y.; Bilen, S.; Çakmakçı, R.; Şahin, F.; Aydın, A., 2006: Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. *Biology and Fertility of Soils.*, **42**, 350–357.

Caporale, A. G.; Violante, A., 2016: Chemical Processes Affecting the Mobility of Heavy Metals and Metalloids in Soil Environments. *Current Pollution Reports.*, **2**, 15–27.

Castro, L.; White, R. Á., 2015: Rhizobacteria isolated from a metal-polluted area enhance plant growth in zinc and cadmium-contaminated soil. *International Journal of Environmental Science and Technology.*, 2127–2142.

Cepa, C. E. P. A., 2007: *Canadian soil quality guidelines for the protection of environmental and human health. National Guidelines and Standards Office.* Quebec, Canada.

Chakraborti, S.; Bera, K.; Sadhukhan, S.; Dutta, P., 2022: Bio-priming of seeds: Plant stress management and its underlying cellular, biochemical, and molecular mechanisms. *Plant Stress.*, **3**, 100052.

Chaoua, S.; Boussaa, S.; el Gharmali, A.; Boumezzough, A., 2019: Impact of irrigation with wastewater on accumulation of heavy metals in soil and crops in the region of Marrakech in Morocco. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences.*, **18**, 429–436.

Chaturvedi, R.; Favas, P. J.; Pratas, J.; Varun, M.; Paul, M. S., 2019: Metal(loid) induced toxicity and defense mechanisms in *Spinacia oleracea* L.: Ecological hazard and Prospects for phytoremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety.*, **183**, 109570.

Chaudhary, D. K.; Khulan, A.; Kim, J., 2019: Development of a novel cultivation technique for uncultured soil bacteria. *Scientific Reports.*, **9**, 1–11.

Chauhan, A.; Jindal, T., 2020: Biochemical and Molecular Methods for Bacterial Identification. *Microbiological Methods for Environment, Food and Pharmaceutical Analysis.* Springer International Publishing, Cham, pp. 425–468.

Chelkha, M.; Blanco-Pérez, R.; Vicente-Díez, I.; Bueno-Pallero, F. Á.; Amghar, S.; el Harti, A.; Campos-Herrera, R., 2021: Earthworms and their cutaneous excreta can modify the virulence and reproductive capability of entomopathogenic nematodes and fungi. *Journal of Invertebrate Pathology.*, **184**, 107620.

- Chen, L.; Luo, S.; Li, X.; Wan, Y.; Chen, J.; Liu, C., 2014: Interaction of Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and functional endophyte *Pseudomonas* sp. Lk9 on soil heavy metals uptake. *Soil Biology and Biochemistry.*, **68**, 300–308.
- Chen, Y. P.; Rekha, P. D.; Arun, A. B.; Shen, F. T.; Lai, W. A.; Young, C. C., 2006: Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology.*, **34**, 33–41.
- Chibuike, G. U.; Obiora, S. C., 2014: Heavy Metal Polluted Soils: Effect on Plants and Bioremediation Methods. *Applied and Environmental Soil Science.*, **2014**, 1–12.
- Choudhary, M.; Kumar, R.; Datta, A.; Nehra, V.; Garg, N., 2017: Bioremediation of Heavy Metals by Microorganismes. In: Arora, S., A. K. Singh & Y. P. Singh (eds.), *Bioremediation of Salt Affected Soils: An Indian Perspective*. Springer International Publishing, Cham, pp. 233–255.
- Christensen, O., 1988: The direct effects of earthworms on nitrogen turnover in cultivated soils. *Ecological Bulletins.*, 41–44.
- Chu, D., 2018: Effects of heavy metals on soil microbial community. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.*, **113**.
- Cipullo, S.; Snapir, B.; Tardif, S. ; Campo, P. ; Prpich, G.; Coulon, F., 2018 : Insights into mixed contaminants interactions and its implication for heavy metals and metalloids mobility, bioavailability, and risk assessment. *Science of The Total Environment.*, **645**, 662–673.
- Cloete, K. J.; Valentine, A. J.; Stander, M. A.; Blomerus, L. M.; Botha, A., 2009: Evidence of symbiosis between the soil yeast *cryptococcus laurentii* and a sclerophyllous medicinal shrub, *agathosma betulina* (berg.) pillans. *Microbial Ecology.*, **57**, 624–632.
- Cooper, E. L.; Roch, P., 2003: Earthworm immunity: a model of immune competence. *Pedobiologia.*, **47**, 676–688.
- Courtois, P. ; Rorat, A. ; Lemiere, S. ; Levard, C.; Chaurand, P.; Grobelak, A.; Lors, C. ; Vandenbulcke, F., 2021a: Accumulation, speciation, and localization of silver nanoparticles in the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Science and Pollution Research.*, **28**, 3756–3765.
- Cunha, L.; Brown, G. G.; Stanton, D. W. G.; da Silva, E.; Hansel, F. A.; Jorge, G.; McKey, D.; Vidal-Torrado, P.; Macedo, R. S.; Velasquez, E.; James, S. W.; Lavelle, P.; Kille, P., 2016: Soil

- animals and pedogenesis: The role of earthworms in anthropogenic soils. *Soil Science.*, **181**, 110–125.
- Curd, E. E.; Martiny, J. B. H.; Li, H.; Smith, T. B., 2018: Bacterial diversity is positively correlated with soil heterogeneity. *Ecosphere.*, **9**.
- da Silva, M. J. C.; Palmeira, S. F.; Fortes, K.; Nascimento, V. X.; de Medeiros, A. S.; da Silva, S. J. C.; de Sousa Alves, M. M.; Sant'Ana, A. E. G., 2020: IAA production of indigenous isolate of plant growth promoting rhizobacteria in the presence of tryptophan. *Australian Journal of Crop Science.*, **14**, 537–544.
- Das, A.; Osborne, J. W., 2018: Bioremediation of Heavy Metals. In: Gothandam, K. M., S. Ranjan, N. Dasgupta, C. Ramalingam & E. Lichtfouse (eds.), *Nanotechnology, Food Security and Water Treatment*. Springer International Publishing, pp. 277–311.
- Das, S.; Dash, H. R.; Chakraborty, J., 2016: Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants. *Applied Microbiology and Biotechnology.*, **100**, 2967–2984.
- Davidson, S. K.; Stahl, D. A., 2006: Transmission of nephridial bacteria of the earthworm *Eisenia fetida*. *Applied and Environmental Microbiology.*, **72**, 769–775.
- Davidson, S. K.; Powell, R. J.; Stahl, D. A., 2010: Transmission of a bacterial consortium in *Eisenia fetida* egg capsules. *Environmental Microbiology.*, **12**, no-no.
- Davidson, S. K.; Powell, R.; James, S., 2013: A global survey of the bacteria within earthworm nephridia. *Molecular Phylogenetics and Evolution.*, **67**, 188–200.
- Delgado-Baquerizo, M.; Reich, P. B.; Trivedi, C.; Eldridge, D. J.; Abades, S.; Alfaro, F. D.; Bastida, F.; Berhe, A. A.; Cutler, N. A.; Gallardo, A.; García-Velázquez, L.; Hart, S. C.; Hayes, P. E.; He, J. Z.; Hseu, Z. Y.; Hu, H. W.; Kirchmair, M.; Neuhauser, S.; Pérez, C. A. et al., 2020: Multiple elements of soil biodiversity drive ecosystem functions across biomes. *Nature Ecology and Evolution.*, **4**, 210–220.
- Delmont, T. O.; Robe, P.; Cecillon, S.; Clark, I. M.; Constancias, F.; Simonet, P.; Hirsch, P. R.; Vogel, T. M., 2011: Accessing the soil metagenome for studies of microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology.*, **77**, 1315–1324.

- Desoky, E. S. M.; Merwad, A. R. M.; Semida, W. M.; Ibrahim, S. A.; El-Saadony, M. T.; Rady, M. M., 2020: Heavy metals-resistant bacteria (HM-RB): Potential bioremediators of heavy metals-stressed *Spinacia oleracea* plant. *Ecotoxicology and Environmental Safety.*, **198**, 110685.
- di Salvo, L. P.; Cellucci, G. C.; Carlino, M. E.; García de Salamone, I. E., 2018 : Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation and nitrogen fertilization increase maize (*Zea mays* L.) grain yield and modified rhizosphere microbial communities. *Applied Soil Ecology.*, **126**, 113–120.
- Dighton, J.; Krumins, J. A., 2015: *Interactions in soil: promoting plant growth. Choice Reviews Online.*, Vol. 52.
- Domínguez, J.; Aira, M. ; Breinholt, J. W.; Stojanovic, M.; James, S. W.; Pérez-Losada, M., 2015: Underground evolution: New roots for the old tree of lumbricid earthworms. *Molecular Phylogenetics and Evolution.*, **83**, 7–19.
- Dowdy, R. H.; Volk, V. v., 2015: Movement of heavy metals in soils. *Chemical Mobility and Reactivity in Soil Systems.*, **11**, 229–240.
- Drake, H. L.; Horn, M. A., 2006: Earthworms as a Transient Heaven for Terrestrial Denitrifying Microorganismes: a Review. *Engineering in Life Sciences.*, **6**, 261–265.
- Drake, H. L.; Horn, M. A., 2007: As the worm turns: The earthworm gut as a transient habitat for soil microbial biomes. *Annual Review of Microbiology.*, **61**, 169–189.
- Drancourt, M.; Bollet, C.; Carlouz, A.; Martelin, R.; Gayral, J. P.; Raoult, D., 2000: 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates. *Journal of Clinical Microbiology.*, **38**, 3623–3630.
- Duan, P.; Wu, Z.; Zhang, Q.; Fan, C.; Xiong, Z., 2018: Thermodynamic responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria explain N₂O production from greenhouse vegetable soils. *Soil Biology and Biochemistry.*, **120**, 37–47.
- Dubois, M.; van den Broeck, L.; Inzé, D., 2018: The Pivotal Role of Ethylene in Plant Growth. *Trends in Plant Science.*, **23**, 311–323.
- Duca, D.; Lorv, J.; Patten, C. L.; Rose, D. ; Glick, B. R., 2014: Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek.*, **106**, 85–125.

- Dweba, C. C.; Zishiri, O. T.; el Zowalaty, M. E., 2019: Isolation and molecular identification of virulence, antimicrobial, and heavy metal resistance genes in livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pathogens.*, **8**.
- Ebert, A. W.; Engels, J. M. M., 2020: Plant biodiversity and genetic resources matter! *Plants.*, **9**, 1–10.
- Ećimović, S.; Vrandečić, K.; Kujavec, M.; Žulj, M.; Ćosić, J.; Velki, M., 2021: Antifungal Activity of Earthworm Coelomic Fluid Obtained from *Eisenia andrei*, *Dendrobaena veneta* and *Allolobophora chlorotica* on Six Species of Phytopathogenic Fungi. *Environments.*, **8**, 102.
- Edwards, C. A.; Lofty, J. R., 1977: *Biology of Earthworms*. Springer US, Boston, MA.
- Edwards, C. A., 1985: Production of Feed Protein From Animal Waste by Earthworms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences.*, **310**, 299–307.
- Edwards, C. A.; Bohlen, P., 1996: The role of earthworms in organic matter and nutrient cycles. *Biology and ecology of earthworms*. Chapman and Hall, New York., pp. 155–180.
- Edwards, C. A., 2004: *Earthworm Ecology* 2nd Editio. CRC Press.
- Eid, E. M.; El-Bebany, A. F.; Alrumman, S. A.; Hesham, A. E. L.; Taher, M. A.; Fawy, K. F., 2017: Effects of different sewage sludge applications on heavy metal accumulation, growth, and yield of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *International Journal of Phytoremediation.*, **19**, 340–347.
- Eid, E. M.; Alrumman, S. A.; Galal, T. M.; El-Bebany, A. F., 2018: Prediction models for evaluating the heavy metal uptake by spinach (*Spinacia oleracea* L.) from soil amended with sewage sludge. *International Journal of Phytoremediation.*, **20**, 1418–1426.
- Eid, E. M.; Shaltout, K. H.; Moghanm, F. S.; Youssef, M. S. G.; El-Mohsnawy, E.; Haroun, S. A., 2019: Bioaccumulation and translocation of nine heavy metals by *Eichhornia crassipes* in Nile Delta, Egypt: perspectives for phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation.*, **21**, 821–830.
- Eivazi, F.; Tabatabai, M. A., 1977: Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry.*, **9**, 167–172.

- El Azhari, A.; Rhoujjati, A.; el Hachimi, M. L.; Ambrosi, J. paul, 2017: Pollution and ecological risk assessment of heavy metals in the soil-plant system and the sediment-water column around a former Pb/Zn-mining area in NE Morocco. *Ecotoxicology and Environmental Safety.*, **144**, 464–474.
- El Fadeli, S.; Bouhouch, R.; El Abbassi, A.; Lahrouni, M.; Aziz, F.; Zimmermann, M. B.; Sedki, A., 2015: Assessment of heavy metals contamination in soils around a mining site in Marrakech region, Morocco. *Moroccan Journal of Chemistry.*, 741–747.
- El Hamiani, O.; El Khalil, H.; Lounate, K.; Sirguy, C.; Hafidi, M.; Bitton, G.; Schwartz, C.; Boularbah, A., 2010: Toxicity assessment of garden soils in the vicinity of mining areas in Southern Morocco. *Journal of Hazardous Materials.*, **177**, 755–761.
- El Hamzaoui, E. H.; El Baghdadi, M.; Oumenskou, H.; Aadraoui, M.; Hilali, A., 2020: Spatial repartition and contamination assessment of heavy metal in agricultural soils of Beni-Moussa, Tadla plain (Morocco). *Modeling Earth Systems and Environment.*, **6**, 1387–1406.
- El Harti, A. ; Saghi, M. ; Molina, J. A. E. ; Teller, G., 2001 : Production de composés indoliques rhizogènes par le ver de terre *Lumbricus terrestris*. *Canadian Journal of Zoology.*, **79**, 1921–1932.
- El Harti, A. ; Raouane, M., 2009 : Détermination de la région d'excrétion des substances rhizogènes chez *Lumbricus terrestris* L. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment.*, **13**, 85–92.
- El Khalil, H. ; el Hamiani, O.; Bitton, G.; Ouazzani, N.; Boularbah, A., 2008: Heavy metal contamination from mining sites in South Morocco: Monitoring metal content and toxicity of soil runoff and groundwater. *Environmental Monitoring and Assessment.*, **136**, 147–160.
- El-Tarabily, K. A.; Sivasithamparam, K., 2006: Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience.*, **47**, 25–35.
- Ennaji, W.; Barakat, A.; el Baghdadi, M.; Rais, J., 2020: Heavy metal contamination in agricultural soil and ecological risk assessment in the northeast area of Tadla plain, Morocco. *Journal of Sedimentary Environments.*, **5**, 307–320.

Estefan, G.; Sommer, R.; Ryan, J., 2013: *Methods of Soil, Plant, and Water Analysis. Manual for the West Asia and North Africa region*. 3rd edn. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Beirut, Lebanon.

Etesami, H., 2018: Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: Mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*., **147**, 175–191.

Falih, A. M.; Wainwright, M., 1995: Nitrification, S-oxidation and P-solubilization by the soil yeast *Williopsis californica* and by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycological Research*., **99**, 200–204.

FAO ; ITPS; GSBI; CBD; EC (Eds.), 2020: *State of knowledge of soil biodiversity. State of knowledge of soil biodiversity - Status, challenges, and potentialities*.

Ferreira, C. M. H.; Soares, H. M. V. M.; Soares, E. v., 2019: Promising bacterial genera for agricultural practices: An insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. *Science of the Total Environment*., **682**, 779–799.

Ferreira, J.; Sandhu, D.; Liu, X.; Halvorson, J., 2018: Spinach (*Spinacia oleracea* L.) Response to Salinity: Nutritional Value, Physiological Parameters, Antioxidant Capacity, and Gene Expression. *Agriculture*., **8**, 163.

Ferris, H.; Tuomisto, H., 2015: Unearthing the role of biological diversity in soil health. *Soil Biology and Biochemistry*., **85**, 101–109.

Fiołka, M. J.; Czaplewska, P.; Wójcik-Mieszawska, S.; Lewandowska, A.; Lewtak, K.; Sofińska-Chmiel, W.; Buchwald, T., 2021: Metabolic, structural, and proteomic changes in *Candida albicans* cells induced by the protein-carbohydrate fraction of *Dendrobaena veneta* coelomic fluid. *Scientific Reports*., **11**, 1–22.

Fischer, E., 1978: DOPA peroxidase activity in the chloragogen cells of the earthworm, *Lumbricus terrestris* L. *Acta Histochemica*., **63**, 219–223.

Fischer, E.; Molnár, L., 1992: Environmental aspects of the chloragogenous tissue of earthworms. *Soil Biology and Biochemistry*., **24**, 1723–1727.

Friedlova, M., 2010: The influence of heavy metals on soil biological and chemical properties. *Soil and Water Research*., **5**, 21–27.

- Fu, Z.; Xi, S., 2020: The effects of heavy metals on human metabolism. *Toxicology Mechanisms and Methods.*, **30**, 167–176.
- Fukushima, T.; Allred, B. E.; Raymond, K. N., 2014: Direct Evidence of Iron Uptake by the Gram-Positive Siderophore-Shuttle Mechanism without Iron Reduction. *ACS Chemical Biology.*, **9**, 2092–2100.
- Funes Pinter, I. ; Salomon, M. V. ; Berli, F. ; Bottini, R. ; Piccoli, P., 2017: Characterization of the As(III) tolerance conferred by plant growth promoting rhizobacteria to in vitro-grown grapevine. *Applied Soil Ecology*, **109**, 60–68.
- Gad, N.; Sekara, A.; Abdelhamid, M. T., 2019: The Potential Role of Cobalt and/or Organic Fertilizers in Improving the Growth, Yield, and Nutritional Composition of Moringa oleifera. *Agronomy.*, **9**.
- Gang, S.; Sharma, S.; Saraf, M.; Buck, M.; Schumacher, J., 2019: Analysis of indole-3-acetic acid (IAA) production in *Klebsiella* by LC-MS/MS and the Salkowski method. *Bio-Protocol.*, **9**, 1–9.
- Ghori, N. H.; Ghori, T.; Hayat, M. Q.; Imadi, S. R.; Gul, A.; Altay, V.; Ozturk, M., 2019: Heavy metal stress and responses in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology.*, **16**, 1807–1828.
- Gordon, S. A.; Weber, R. P., 1951: Colorimetric estimation of Indoleacetic Acid. *Plant Physiology.*, **26**, 192–195.
- Guo, J.; Muhammad, H.; Lv, X.; Wei, T.; Ren, X.; Jia, H.; Atif, S.; Hua, L., 2020: Prospects and applications of plant growth promoting rhizobacteria to mitigate soil metal contamination: A review. *Chemosphere.*, **246**, 125823.
- Gupta, D. K.; Chatterjee, S.; Datta, S.; Veer, V.; Walther, C., 2014: Role of phosphate fertilizers in heavy metal uptake and detoxification of toxic metals. *Chemosphere*, **108**, 134–144.
- Gupta, N.; Vats, S.; Bhargava, P., 2018: Sustainable agriculture: Role of metagenomics and metabolomics in exploring the soil microbiota. *In Silico Approach for Sustainable Agriculture.*, 183–199.

- Haider, F. U.; Liqun, C.; Coulter, J. A.; Cheema, S. A.; Wu, J.; Zhang, R.; Wenjun, M.; Farooq, M., 2021: Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **211**, 111887.
- Halda-Alija, L., 2003: Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effusus* L. *Canadian Journal of Microbiology*, **49**, 781–787.
- Hao, X.; Taghavi, S.; Xie, P.; Orbach, M. J.; Alwathnani, H. A.; Rensing, C.; Wei, G., 2014: Phytoremediation of Heavy and Transition Metals Aided by Legume-Rhizobia Symbiosis. *International Journal of Phytoremediation*, **16**, 179–202.
- Hassall, M.; Adl, S.; Berg, M.; Griffiths, B.; Scheu, S., 2006: Soil fauna-microbe interactions: towards a conceptual framework for research. *European Journal of Soil Biology*, **42**, 54–60.
- Hassen, A.; Saidi, N.; Cherif, M.; Boudabous, A., 1998: Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresource Technology*, **64**, 7–15.
- He, H.; Ye, Z.; Yang, D.; Yan, J.; Xiao, L.; Zhong, T.; Yuan, M.; Cai, X.; Fang, Z.; Jing, Y., 2013: Characterization of endophytic *Rahnella* sp. JN6 from *Polygonum pubescens* and its potential in promoting growth and Cd, Pb, Zn uptake by *Brassica napus*. *Chemosphere*, **90**, 1960–1965.
- Hemmat-Jou, M. H.; Safari-Sinegani, A. A.; Mirzaie-Asl, A.; Tahmourespour, A., 2018: Analysis of microbial communities in heavy metals-contaminated soils using the metagenomic approach. *Ecotoxicology*, **27**, 1281–1291.
- Hepperle, D., 2011: DNA Dragon 1.4. 1–DNA Sequence Contig Assembler Software.
- Hilali, A.; El Baghdadi, M.; Barakat, A.; Ennaji, W.; El Hamzaoui, E. H., 2020: Contribution of GIS techniques and pollution indices in the assessment of metal pollution in agricultural soils irrigated with wastewater: case of the Day River, Beni Mellal (Morocco). *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration*, **5**, 52.
- Hoagland, D. R.; Arnon, D. I., 1950: Preparing the nutrient solution. *Water-Cult. Method Grow. Plants Soil*, **347**, 2–33.

- Hou, J.; Liu, W.; Wu, L.; Ge, Y.; Hu, P.; Li, Z.; Christie, P., 2019: *Rhodococcus sp.* NSX2 modulates the phytoremediation efficiency of a trace metal-contaminated soil by reshaping the rhizosphere microbiome. *Applied Soil Ecology*, **133**, 62–69.
- Hu, X.; Chen, J.; Guo, J., 2006: Two Phosphate- and Potassium-solubilizing Bacteria Isolated from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **22**, 983–990.
- Huang, H.; Zhao, Y.; Fan, L.; Jin, Q.; Yang, G.; Xu, Z., 2020: Improvement of manganese phytoremediation by *Broussonetia papyrifera* with two plant growth promoting (PGP) *Bacillus* species. *Chemosphere*, **260**, 127614.
- Jaiswal, A.; Verma, A.; Jaiswal, P., 2018: Detrimental effects of heavy metals in soil, plants, and aquatic ecosystems and in humans. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, **37**, 183–197.
- Jeffery, S.; Gardi, C.; Jones, A.; Montanarella, L.; Marmo, L.; Miko, L.; Ritz, K.; Peres, G.; Römbke, J.; van der Putten, W. H. (Eds.), 2010 : *European atlas of soil biodiversity*. European Commission, Publications Office of the European Union., Luxembourg.
- Jiang, C. yu; Sheng, X. fang; Qian, M.; Wang, Q. ya, 2008: Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia sp.* from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere*, **72**, 157–164.
- Jiang, L.; Liu, S.; Liu, Y.; Zeng, G.; Guo, Y.; Yin, Y.; Cai, X.; Zhou, L.; Tan, X.; Huang, X., 2017: Enhanced adsorption of hexavalent chromium by a biochar derived from ramie biomass (*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.) modified with β -cyclodextrin/poly(L-glutamic acid). *Environmental Science and Pollution Research*, **24**, 23528–23537.
- Jiao, X.; Takishita, Y.; Zhou, G.; Smith, D. L., 2021: Plant Associated Rhizobacteria for Biocontrol and Plant Growth Enhancement. *Frontiers in Plant Science*, **12**.
- Jiménez-Mejía, R.; Medina-Estrada, R. I.; Carballar-Hernández, S.; Orozco-Mosqueda, M. D. C.; Santoyo, G.; Loeza-Lara, P. D., 2022: Teamwork to Survive in Hostile Soils: Use of Plant Growth-Promoting Bacteria to Ameliorate Soil Salinity Stress in Crops. *Microorganisms*, **10**.

- Kabata-Pendias, A., 2010: *Trace Elements in Soils and Plants*. (Taylor & Francis, Ed.) 4th Editio. CRC Press, Vol. 50.
- Keller, C.; Hammer, D.; Kayser, A.; Richner, W.; Brodbeck, M.; Sennhauser, M., 2003: Root development and heavy metal phytoextraction efficiency. *Plant and Soil.*, **249**, 67–81.
- Khan, A.; Singh, P.; Srivastava, A., 2018: Synthesis, nature, and utility of universal iron chelator – Siderophore: A review. *Microbiological Research.*, **212–213**, 103–111.
- Kim, R. Y.; Yoon, J. K.; Kim, T. S.; Yang, J. E.; Owens, G.; Kim, K. R., 2015: Bioavailability of heavy metals in soils: definitions and practical implementation—a critical review. *Environmental Geochemistry and Health.*, **37**, 1041–1061.
- Kimura, M., 1980: A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution.*, **16**, 111–120.
- Kirk, J. L.; Beaudette, L. A.; Hart, M.; Moutoglis, P.; Klironomos, J. N.; Lee, H.; Trevors, J. T., 2004: Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods.*, **58**, 169–188.
- Knudsen, D.; Peterson, G. A.; Pratt, P. F., 1982: Lithium, Sodium, and Potassium. In: A.L. Page (ed.), *Methods of Soil Analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties*. Second Edi. The American Society of Agronomy, Inc., Soil Science Society of America, Inc., pp. 225–246.
- Köse, B.; Öztürk, E., 2017: Evaluation of Worms as a Source of Protein in Poultry. *Selcuk Journal of Agricultural and Food Sciences.*, **31**, 107–111.
- Kouchou, A.; Rais, N.; Elsass, F.; Duplay, J.; Fahli, N.; el Ghachtouli, N., 2017: Effects of long-term heavy metals contamination on soil microbial characteristics in calcareous agricultural lands (Saiss plain, North Morocco). *Journal of Materials and Environmental Science.*, **8**, 691–695.
- Kour, D.; Rana, K. L.; Yadav, N.; Yadav, A. N., 2019: *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability*. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability*.
- Kour, D.; Rana, K. L.; Kaur, T.; Yadav, N.; Halder, S. K.; Yadav, A. N.; Sachan, S. G.; Saxena, A. K., 2020: *Potassium solubilizing and mobilizing microorganismes: Biodiversity*,

mechanisms of solubilization, and biotechnological implication for alleviations of abiotic stress. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Trends of Microbial Biotechnology for Sustainable Agriculture and Biomedicine Systems: Diversity and Functional Perspectives. Elsevier Inc.

Kramer, J.; Özkaya, Ö.; Kümmerli, R., 2020: Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nature Reviews Microbiology.*, **18**, 152–163.

Król, A.; Mizerna, K.; Bożym, M., 2020: An assessment of pH-dependent release and mobility of heavy metals from metallurgical slag. *Journal of Hazardous Materials.*, **384**.

Kumar, M.; Seth, A.; Singh, A. K.; Rajput, M. S.; Sikandar, M., 2021: Remediation strategies for heavy metals contaminated ecosystem: A review. *Environmental and Sustainability Indicators.*, **12**, 100155.

Kumar, P.; Dubey, R. C.; Maheshwari, D. K., 2012: *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research.*, **167**, 493–499.

Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K., 2018: MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. (Battistuzzi, F. U., Ed.) *Molecular Biology and Evolution.*, **35**, 1547–1549.

Kumar S., V.; Menon, S.; Agarwal, H.; Gopalakrishnan, D., 2017: Characterization and optimization of bacterium isolated from soil samples for the production of siderophores. *Resource-Efficient Technologies.*, **3**, 434–439.

Kuzyakov, Y.; Blagodatskaya, E., 2015: Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. *Soil Biology and Biochemistry.*, **83**, 184–199.

Kwon-Chung, K. J., 1977: Perfect State of *Cryptococcus uniguttuzatus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, **27**, 293–299.

Lal, R. (Ed.), 2017: *Encyclopedia of Soil Science* Third Edit. Taylor & Francis CRC Press.

Lam, V. P.; Lee, M. H.; Park, J. S., 2020: Optimization of indole-3-acetic acid concentration in a nutrient solution for increasing bioactive compound accumulation and production of *Agastache rugosa* in a plant factory. *Agriculture (Switzerland).*, **10**, 1–14.

- Lambrecht, M.; Okon, Y.; vande Broek, A.; Vanderleyden, J., 2000: Indole-3-acetic acid: A reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends in Microbiology.*, **8**, 298–300.
- Lavelle, P.; Lattaud, C.; Trigo, D. ; Barois, I., 1995: Mutualism and biodiversity in soils. *Plant and Soil.*, **170**, 23–33.
- Lavelle, P. ; Decaëns, T. ; Aubert, M. ; Barot, S. ; Blouin, M. ; Bureau, F. ; Margerie, P. ; Mora, P.; Rossi, J. P., 2006 : Soil invertebrates and ecosystem services. *European Journal of Soil Biology.*, **42**.
- Li, C.; Zhou, K.; Qin, W.; Tian, C.; Qi, M.; Yan, X.; Han, W., 2019: A Review on Heavy Metals Contamination in Soil: Effects, Sources, and Remediation Techniques. *Soil and Sediment Contamination.*, **28**, 380–394.
- Li, P.; Kong, D.; Zhang, H.; Xu, L.; Li, C.; Wu, M.; Jiao, J.; Li, D.; Xu, L.; Li, H.; Hu, F., 2021a: Different regulation of soil structure and resource chemistry under animal- and plant-derived organic fertilizers changed soil bacterial communities. *Applied Soil Ecology.*, **165**.
- LI, Y.; LI, H. guan; LIU, F. cheng, 2017: Pollution in the urban soils of Lianyungang, China, evaluated using a pollution index, mobility of heavy metals, and enzymatic activities. *Environmental Monitoring and Assessment.*, **189**, 34.
- Li, Y.; Liu, K.; Wang, Y.; Zhou, Z.; Chen, C.; Ye, P.; Yu, F., 2018: Improvement of cadmium phytoremediation by *Centella asiatica* L. after soil inoculation with cadmium-resistant *Enterobacter* sp. FM-1. *Chemosphere.*, **202**, 280–288.
- Li, Y.; Ali, A.; Jeyasundar, P. G. S. A.; Azeem, M.; Tabassum, A.; Guo, D.; Li, R.; Mian, I. A.; Zhang, Z., 2021b: *Bacillus subtilis* and saponin shifted the availability of heavy metals, health indicators of smelter contaminated soil, and the physiological indicators of *Symphytum officinale*. *Chemosphere.*, **285**, 131454.
- Liu, C.; Li, B.; Dong, Y.; Lin, H., 2022: Endophyte colonization enhanced cadmium phytoremediation by improving endosphere and rhizosphere microecology characteristics. *Journal of Hazardous Materials.*, 128829.

- Liu, H.; Zhang, Y.; Xu, W.; Fang, Y.; Ruan, H., 2021a: Characterization of five new earthworm mitogenomes (Oligochaeta: *Lumbricidae*): Mitochondrial phylogeny of *lumbricidae*. *Diversity*, **13**.
- Liu, L.; Li, W.; Song, W.; Guo, M., 2018: Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils: Principles and applicability. *Science of the Total Environment*, **633**, 206–219.
- Liu, L.; Alpert, P.; Dong, B. C.; Yu, F. H., 2020a: Modification by earthworms of effects of soil heterogeneity and root foraging in eight species of grass. *Science of the Total Environment*, **708**, 134941.
- Liu, P.; Yang, Y.; Li, M., 2020b: Responses of soil and earthworm gut bacterial communities to heavy metal contamination. *Environmental Pollution*, **265**, 114921.
- Liu, S.; Yang, B.; Liang, Y.; Xiao, Y.; Fang, J., 2020c: Prospect of phytoremediation combined with other approaches for remediation of heavy metal-polluted soils. *Environmental Science and Pollution Research*, **27**, 16069–16085.
- Liu, Z.; Bai, Y. ; Luo, L. ; Wan, J.; Wang, W.; Zhao, G., 2021b: Effects of high dose copper on plant growth and mineral nutrient (Zn, Fe, Mg, K, Ca) uptake in spinach. *Environmental Science and Pollution Research*, **28**, 37471–37481.
- Liu, Z. F.; Ge, H. G.; Li, C.; Zhao, Z. P.; Song, F. M.; Hu, S. bin, 2015: Enhanced phytoextraction of heavy metals from contaminated soil by plant co-cropping associated with PGPR. *Water, Air, and Soil Pollution*, **226**.
- Lopes, M. J. dos S.; Dias-Filho, M. B. ; Gurgel, E. S. C., 2021: Successful Plant Growth-Promoting Microorganismes: Inoculation Methods and Abiotic Factors. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, **5**, 1–13.
- Lopes, R.; Tsui, S.; Gonçalves, P. J. R. O.; de Queiroz, M. V., 2018 : A look into a multifunctional toolbox: endophytic *Bacillus* species provide broad and underexploited benefits for plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **34**, 94.
- Louden, B. C.; Haarmann, D.; Lynne, A. M., 2011: Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *Journal of Microbiology & Biology Education*, **12**, 51–53.

- Lőw, P.; Molnár, K.; Kriska, G., 2016: *Atlas of Animal Anatomy and Histology*. Springer International Publishing, Cham.
- Lund, M. B.; Mogensen, M. F.; Marshall, I. P. G.; Albertsen, M.; Viana, F.; Schramm, A., 2018: Genomic insights into the *Agromyces*-like symbiont of earthworms and its distribution among host species. *FEMS Microbiology Ecology*., **94**, 1–8.
- Ma, H.; Wei, M.; Wang, Z.; Hou, S. ; Li, X.; Xu, H., 2020: Bioremediation of cadmium polluted soil using a novel cadmium immobilizing plant growth promotion strain *Bacillus sp.* TZ5 loaded on biochar. *Journal of Hazardous Materials*., **388**, 122065.
- Ma, Y.; Oliveira, R. S.; Freitas, H.; Zhang, C., 2016a : Biochemical and Molecular Mechanisms of Plant-Microbe-Metal Interactions: Relevance for Phytoremediation. *Frontiers in Plant Science*., **7**, 1–19.
- Ma, Y. ; Rajkumar, M.; Zhang, C.; Freitas, H., 2016b: Inoculation of *Brassica oxyrrhina* with plant growth promoting bacteria for the improvement of heavy metal phytoremediation under drought conditions. *Journal of Hazardous Materials*., **320**, 36–44.
- Ma, Y.; Rajkumar, M.; Moreno, A.; Zhang, C.; Freitas, H., 2017: Serpentine endophytic bacterium *Pseudomonas azotoformans* ASS1 accelerates phytoremediation of soil metals under drought stress. *Chemosphere*., **185**, 75–85.
- Ma, Y.; Rajkumar, M.; Oliveira, R. S.; Zhang, C.; Freitas, H., 2019: Potential of plant beneficial bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of metal-contaminated saline soils. *Journal of Hazardous Materials*., **379**, 120813.
- Madigan, M. T.; Bender, K. S.; Buckley, D. H.; Sattley, W. M.; Stahl, D. A. (Eds.), 2021: *Brock Biology of Microorganisms Sixteenth Edition*. Pearson Academic.
- Mahmood, A.; Turgay, O. C.; Farooq, M.; Hayat, R., 2016: Seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria: a review. (Muyzer, G., Ed.)*FEMS Microbiology Ecology*., **92**, fiw112.
- Mansfield, J.; Genin, S.; Magori, S.; Citovsky, V.; Sriariyanum, M.; Ronald, P.; Dow, M.; Verdier, V.; Beer, S. v.; Machado, M. A.; Toth, I.; Salmond, G.; Foster, G. D., 2012: Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*., **13**, 614–629.

- Marathe, R. J.; Phatake Y. B.; Shaikh A. C.; Shinde B. P.; Gajbhiye M. H., 2017: Effect of IAA produced by *Pseudomonas aeruginosa* 6a (bc4) on seed germination and plant growth of *Glycin max*. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*., 351–358.
- Marchán, D. F.; Decaëns, T.; Domínguez, J.; Novo, M., 2022: Perspectives in Earthworm Molecular Phylogeny: Recent Advances in Lumbricoidea and Standing Questions. *Diversity*., **14**, 1–13.
- Medfu Tarekegn, M.; Zewdu Salilih, F.; Ishetu, A. I., 2020: Microorganismes used as a tool for bioremediation of heavy metal from the environment. (Yildiz, F., Ed.) *Cogent Food & Agriculture*., **6**, 1783174.
- Medina, A.; Vassileva, M.; Caravaca, F.; Roldán, A.; Azcón, R., 2004: Improvement of soil characteristics and growth of *Dorycnium pentaphyllum* by amendment with agrowastes and inoculation with AM fungi and/or the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Chemosphere*., **56**, 449–456.
- Medina-Sauza, R. M.; Álvarez-Jiménez, M.; Delhal, A.; Reverchon, F. ; Blouin, M. ; Guerrero-Analco, J. A. ; Cerdán, C. R. ; Guevara, R. ; Villain, L. ; Barois, I., 2019 : Earthworms Building Up Soil Microbiota, a Review. *Frontiers in Environmental Science*., **7**, 1–20.
- Medina-Sauza, R. M. ; Álvarez-Jiménez, M. ; Ortiz-Huerta, Y. ; Ruiz-Sayago, E. ; Blouin, M. ; Villain, L.; Guevara, R.; Sangabriel, W. ; Reverchon, F. ; Barois, I., 2022: Bulk and rhizosphere soil properties under two *Coffea* species influenced by the earthworm *Pontoscolex corethrurus*. *Rhizosphere*., **21**.
- Meena, V. S.; Maurya, B. R.; Verma, J. P.; Meena, R. S., 2016: Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture. *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture*., 1–331.
- Midhat, L.; Ouazzani, N.; Esshaimi, M.; Ouhammou, A.; Mandi, L., 2017: Assessment of heavy metals accumulation by spontaneous vegetation: Screening for new accumulator plant species grown in Kettara mine-Marrakech, Southern Morocco. *International Journal of Phytoremediation*., **19**, 191–198.
- Mikanova, O., 2006: Effects of heavy metals on some soil biological parameters. *Journal of Geochemical Exploration*., **88**, 220–223.

- Mishra, J.; Singh, R.; Arora, N. K., 2017: Alleviation of Heavy Metal Stress in Plants and Remediation of Soil by Rhizosphere Microorganisms. *Frontiers in Microbiology*., **8**.
- Mishra, P.; Mishra, J.; Dwivedi, S. K.; Arora, N. K., 2020: Microbial Enzymes in Biocontrol of Phytopathogens, 259–285.
- Mitra, S.; Chakraborty, A. J.; Tareq, A. M.; Emran, T. bin; Nainu, F. ; Khusro, A.; Idris, A. M.; Khandaker, M. U.; Osman, H.; Alhumaydhi, F. A.; Simal-Gandara, J., 2022: Impact of heavy metals on the environment and human health: Novel therapeutic insights to counter the toxicity. *Journal of King Saud University - Science*., **34**, 101865.
- Møller, P.; Lund, M. B.; Schramm, A., 2015: Evolution of the tripartite symbiosis between earthworms, *Verminephrobacter* and *Flexibacter*-like bacteria. *Frontiers in Microbiology*., **6**.
- Mondal, S.; Pramanik, K.; Ghosh, S. K.; Pal, P.; Mondal, T.; Soren, T.; Maiti, T. K., 2021: Unraveling the role of plant growth-promoting rhizobacteria in the alleviation of arsenic phytotoxicity: A review. *Microbiological Research*., **250**, 126809.
- Monroy, F.; Aira, M.; Domínguez, J.; Mariño, F., 2003: Distribution of earthworms in the north-west of the Iberian Peninsula. *European Journal of Soil Biology*., **39**, 13–18.
- Mudziwapasi, R.; Mlambo, S. S.; Chigu, N. L.; Kuipa, P. K.; Sanyika, W. T., 2016: Isolation and molecular characterization of bacteria from the gut of *Eisenia fetida* for biodegradation of 4,4 DDT. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*.
- Murugkar, P. P.; Collins, A. J.; Chen, T.; Dewhirst, F. E., 2020: Isolation and cultivation of candidate phyla radiation *Saccharibacteria* (TM7) bacteria in coculture with bacterial hosts. *Journal of Oral Microbiology*., **12**.
- Nagatani, H.; Shimizu, M.; Valentine, R. C., 1971 : The mechanism of ammonia assimilation in nitrogen fixing bacteria. *Archiv für Mikrobiologie*., **79**, 164–175.
- Najam, T.; Shah, S. S. A.; Rahman, M. M., 2021: *Water-stable metal–organic framework for environmental remediation. Bioremediation for Environmental Sustainability*.
- Najm-ul-Seher; Ahmad, M.; Ahmad, I.; Nazli, F.; Mumtaz, M. Z.; Latif, M.; Al-Mosallam, M. S.; Alotaibi, F. S.; Dewidar, A. Z.; Mattar, M. A.; El-Shafei, A. A., 2021: Lead-Tolerant *Bacillus* Strains Promote Growth and Antioxidant Activities of Spinach (*Spinacia oleracea*) Treated with Sewage Water. *Agronomy*., **11**, 2482.

- Nannipieri, P.; Ascher-Jenull, J.; Ceccherini, M. T.; Pietramellara, G.; Renella, G.; Schloter, M., 2020: Beyond microbial diversity for predicting soil functions: A mini review. *Pedosphere.*, **30**, 5–17.
- Nassar, A. H.; El-Tarabily, K. A.; Sivasithamparam, K., 2005: Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. *Biology and Fertility of Soils.*, **42**, 97–108.
- Nassiri, O.; Rhoujjati, A.; el Hachimi, M. L., 2021: Contamination, sources, and environmental risk assessment of heavy metals in water, sediment, and soil around an abandoned Pb mine site in North East Morocco. *Environmental Earth Sciences.*, **80**, 96.
- Nath, S.; Paul, P.; Roy, R.; Bhattacharjee, S.; Deb, B., 2019: Isolation and identification of metal-tolerant and antibiotic-resistant bacteria from soil samples of Cachar district of Assam, India. *SN Applied Sciences.*, **1**, 1–9.
- Ngugi, M. M.; Gitari, H. I.; Muiri, C.; Gweyi-Onyango, J. P., 2021: Cadmium mobility, uptake, and accumulation in spinach, kale, and amaranths vegetables as influenced by silicon fertilization. *Bioremediation Journal.*, **0**, 1–13.
- Nouri, M.; Haddioui, A., 2016: Human and animal health risk assessment of metal contamination in soil and plants from Ait Ammar abandoned iron mine, Morocco. *Environmental Monitoring and Assessment.*, **188**, 6.
- Nouri-Aiin, M.; Schall, J. J.; Keough, C. A.; Wen, Y.; Görres, J. H., 2021: Identifying the unidentifiable: A PCR multiplex protocol for the diagnosis of invasive pheretimoid earthworm species, verified by morphological and barcode identification. *Applied Soil Ecology.*, **161**.
- Nunan, N.; Schmidt, H.; Raynaud, X., 2020: The ecology of heterogeneity: Soil bacterial communities and C dynamics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.*, **375**.
- O’Callaghan, M., 2016: Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *Applied Microbiology and Biotechnology.*, **100**, 5729–5746.
- Olanrewaju, O. S.; Glick, B. R.; Babalola, O. O., 2017: Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.*, **33**, 1–16.

- Olsen, S. R.; Sommers, L. E., 1982: Phosphorus. In: A.L. Page (ed.), *Methods of Soil Analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties*. Second Edi. The American Society of Agronomy, Inc., Soil Science Society of America, Inc., pp. 403–430.
- Oubohssaine, M.; Dahmani, I.; Sbabou, L.; Bruneel, O.; Aurag, J., 2022: The rhizosphere of *Sulla spinosissima* growing in abandoned mining soils is a reservoir of heavy metals tolerant plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.*, **39**, 102236.
- Oumenskou, H.; El Baghdadi, M.; Barakat, A.; Aquit, M.; Ennaji, W.; Karroum, L. A.; Aadraoui, M., 2018: Assessment of the heavy metal contamination using GIS-based approach and pollution indices in agricultural soils from Beni Amir irrigated perimeter, Tadla plain, Morocco. *Arabian Journal of Geosciences.*, **11**, 692.
- Palta, J. P., 1990: Leaf chlorophyll content. *Remote Sensing Reviews.*, **5**, 207–213.
- Pandey, S.; Gupta, S., 2020: Evaluation of *Pseudomonas* sp. for its multifarious plant growth promoting potential and its ability to alleviate biotic and abiotic stress in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *Scientific Reports.*, **10**, 20951.
- Parthasarathi, K., 2007: Life cycle of *Lampito mauritii* (Kinberg) in comparison with *Eudrilus eugeniae* (Kinberg) cultured on different substrates. *Journal of environmental biology.*, **28**, 803–812.
- Pass, D. A., 2015: The earthworm microbiome, 158.
- Patten, C. L.; Blakney, A. J. C.; Coulson, T. J. D., 2013: Activity, distribution, and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology.*, **39**, 395–415.
- Paul, E. (Ed.), 2007: *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* 3rd edn. Elsevier.
- Paul, E. A., 2015 : *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. Elsevier.
- Pérez-Losada, M.; Ricoy, M.; Marshall, J. C.; Domínguez, J., 2009: Phylogenetic assessment of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* species complex (*Oligochaeta: Lumbricidae*) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution.*, **52**, 293–302.

- Pérez-Losada, M.; Bloch, R.; Breinholt, J. W.; Pfenninger, M.; Domínguez, J., 2012: Taxonomic assessment of *Lumbricidae* (*Oligochaeta*) earthworm genera using DNA barcodes. *European Journal of Soil Biology.*, **48**, 41–47.
- Pham, V. H. T.; Kim, J., 2012: Cultivation of unculturable soil bacteria. *Trends in Biotechnology.*, **30**, 475–484.
- Pietrini, F.; Carnevale, M.; Beni, C.; Zacchini, M.; Gallucci, F.; Santangelo, E., 2019: Effect of different copper levels on growth and morpho-physiological parameters in giant reed (*Arundo donax* L.) in semi-hydroponic mesocosm experiment. *Water (Switzerland).*, **11**.
- Pikuła, D.; Stępień, W., 2021: Effect of the degree of soil contamination with heavy metals on their mobility in the soil profile in a microplot experiment. *Agronomy.*, **11**, 1–11.
- Plavštin, I.; Velki, M.; Ečimović, S.; Vrandečić, K.; Čosić, J., 2017a: Inhibitory effect of earthworm coelomic fluid on growth of the plant parasitic fungus *Fusarium oxysporum*. *European Journal of Soil Biology.*, **78**, 1–6.
- Pourbabae, A. A.; Koohbori Dinekaboodi, S.; Seyed Hosseini, H. M.; Alikhani, H. A.; Emami, S., 2020: Potential Application of Selected Sulfur-Oxidizing Bacteria and Different Sources of Sulfur in Plant Growth Promotion under Different Moisture Conditions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis.*, **51**, 735–745.
- Prabina, B. J.; Kumutha, K.; Anandham, R.; Durga, P., 2019: Isolation and Characterization of Multifunctional Yeast as Plant Probiotics for Better Crop Nutrition in Pulses. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.*, **8**, 2711–2718.
- Prajapati, R.; Kataria, S.; Jain, M., 2020: Seed priming for alleviation of heavy metal toxicity in plants: An overview. *Plant Science Today.*, **7**, 308–313.
- Priya, P.; Aneesh, B.; Harikrishnan, K., 2021: Genomics as a potential tool to unravel the rhizosphere microbiome interactions on plant health. *Journal of Microbiological Methods.*, **185**, 106215.
- Rajendran, S.; Priya, T. A. K.; Khoo, K. S.; Hoang, T. K. A.; Ng, H. S.; Munawaroh, H. S. H.; Karaman, C.; Orooji, Y.; Show, P. L., 2022: A critical review on various remediation approaches for heavy metal contaminants removal from contaminated soils. *Chemosphere.*, **287**, 132369.

- Rajkumar, M.; Freitas, H., 2008: Influence of metal resistant-plant growth-promoting bacteria on the growth of *Ricinus communis* in soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere.*, **71**, 834–842.
- Rajkumar, M.; Ae, N.; Prasad, M. N. V.; Freitas, H., 2010: Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology.*, **28**, 142–149.
- Rakshit, A.; Meena, V. S.; Parihar, M.; Singh, H. B.; Singh, A. K., 2021: *Biofertilizers*. Elsevier.
- Ramirez, K. S.; Knight, C. G.; de Hollander, M.; Brearley, F. Q.; Constantinides, B.; Cotton, A.; Creer, S.; Crowther, T. W.; Davison, J.; Delgado-Baquerizo, M.; Dorrepaal, E.; Elliott, D. R.; Fox, G.; Griffiths, R. I.; Hale, C.; Hartman, K.; Houlden, A.; Jones, D. L.; Krab, E. J. et al., 2018: Detecting macroecological patterns in bacterial communities across independent studies of global soils. *Nature Microbiology.*, **3**, 189–196.
- Rangel, W. de M.; de Oliveira Longatti, S. M.; Ferreira P. A. A.; Bonaldi, D. S.; Guimarães, A. A.; Thijs, S.; Weyens, N.; Vangronsveld, J.; Moreira, F. M. S., 2017: Leguminosae native nodulating bacteria from a gold mine As-contaminated soil: Multi-resistance to trace elements, and possible role in plant growth and mineral nutrition. *International Journal of Phytoremediation*, **19**, 925–936.
- Raouane, M.; El Harti, A., 2020: Effect of electrical stimulation on the production of cutaneous excreta by the earthworm *Lumbricus terrestris* L. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège.*, **89**, 74–84.
- Rascio, N.; Navari-Izzo, F., 2011: Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science.*, **180**, 169–181.
- Rawat, P.; Das, S.; Shankhdhar, D.; Shankhdhar, S. C., 2021: Phosphate-Solubilizing Microorganisms: Mechanism and Their Role in Phosphate Solubilization and Uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition.*, **21**, 49–68.
- Reddy, P. P., 2012: Bio-priming of Seeds. *Recent advances in crop protection*. Springer India, New Delhi, pp. 83–90.
- Renu; Sarim, K. M.; Sahu, U.; Bhoyar, M. S.; Singh, D. P.; Singh, U. B.; Sahu, A.; Gupta, A.; Mandal, A.; Thakur, J. K.; Manna, M. C., 2021: Augmentation of metal-tolerant bacteria elevates growth and reduces metal toxicity in spinach. *Bioremediation Journal.*, **25**, 108–127.

- Reynolds, J. W.; Reeves, W. K., 2019: New earthworm (Oligochaeta: *Lumbricidae*) records in the United States and Morocco, plus a key to Moroccan earthworms. *Megadrilogica.*, **24**, 107–127.
- Rizvi, A.; Zaidi, A.; Ameen, F.; Ahmed, B.; Alkahtani, M. D. F.; Khan, M. S., 2020: Heavy metal induced stress on wheat: Phytotoxicity and microbiological management. *RSC Advances.*, **10**, 38379–38403.
- Rojjanateeranaj, P.; Sangthong, C.; Prapagdee, B., 2017: Enhanced cadmium phytoremediation of *Glycine max* L. through bioaugmentation of cadmium-resistant bacteria assisted by biostimulation. *Chemosphere.*, **185**, 764–771.
- Roubalová, R.; Procházková, P.; Dvo, J.; Škanta, F.; Bilej, M., 2015: The role of earthworm defense mechanisms in ecotoxicity studies., 203–213.
- Roubalová, R.; Dvořák, J.; Procházková, P.; Škanta, F.; Navarro Pacheco, N. I.; Semerád, J.; Cajthaml, T.; Bilej, M., 2018: The role of CuZn- and Mn-superoxide dismutases in earthworm *Eisenia andrei* kept in two distinct field-contaminated soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety.*, **159**, 363–371.
- Roubalová, R.; Procházková, P.; Hanč, A.; Dvořák, J.; Bilej, M., 2019: Mutual interactions of *E. andrei* earthworm and pathogens during the process of vermicomposting. *Environmental Science and Pollution Research.*
- Roubalová, R.; Procházková, P.; Papežová, H. ; Smitka, K.; Bilej, M.; Tlaskalová-Hogenová, H., 2020: *Anorexia nervosa*: Gut microbiota-immune-brain interactions. *Clinical Nutrition.*, **39**, 676–684.
- RoyChowdhury, A.; Datta, R.; Sarkar, D., 2018: Heavy Metal Pollution and Remediation. *Green Chemistry*. Elsevier, pp. 359–373.
- Salaskar, D.; Shrivastava, M.; Kale, S. P., 2011: Bioremediation potential of spinach (*Spinacia oleracea* L.) for decontamination of cadmium in soil. *Current Science.*, **101**, 1359–1363.
- Salmon, S., 2001: Earthworm excreta (mucus and urine) affect the distribution of springtails in forest soils. *Biology and Fertility of Soils.*, 304–310.

- Samanta, T. T.; Das, A., 2016: Isolation, identification, and characterization of gut microflora of *Perionyx excavatus* collected from Midnapore, West Bengal. *Journal of Basic Microbiology*., **56**, 286–293.
- Samson, J. S.; Choresca, C. H.; Quiazon, K. M. A., 2020: Selection and screening of bacteria from African nightcrawler, *Eudrilus eugeniae* (Kinberg, 1867) as potential probiotics in aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*., **36**, 16.
- Santocki, M.; Falniowski, A.; Plytycz, B., 2016: Restoration of experimentally depleted coelomocytes in juvenile and adult composting earthworms *Eisenia andrei* *E. fetida* and *Dendrobaena veneta*. *Applied Soil Ecology*., **104**, 163–173.
- Sapkota, R.; Santos, S.; Farias, P.; Krogh, P. H.; Winding, A., 2020: Insights into the earthworm gut multi-kingdom microbial communities. *Science of The Total Environment*., **727**, 138301.
- Sarkar, D.; Singh, S.; Parihar, M.; Rakshit, A., 2021: Seed bio-priming with microbial inoculants: A tailored approach towards improved crop performance, nutritional security, and agricultural sustainability for smallholder farmers. *Current Research in Environmental Sustainability*., **3**, 100093.
- Sattar, A.; Naveed, M.; Ali, M.; Zahir, Z. A.; Nadeem, S. M.; Yaseen, M.; Meena, V. S.; Farooq, M.; Singh, R.; Rahman, M.; Meena, H. N., 2019: Perspectives of potassium solubilizing microorganismes in sustainable food production system: A review. *Applied Soil Ecology*., **133**, 146–159.
- Scheu, S., 2003: Effects of earthworms on plant growth: patterns and perspectives. *Pedobiologia*., **47**, 846–856.
- Schmidt, W.; Thomine, S.; Buckhout, T. J., 2020: Editorial: Iron Nutrition and Interactions in Plants. *Frontiers in Plant Science*., **10**, 1–4.
- Schramm, A.; Davidson, S. K.; Dodsworth, J. A.; Drake, H. L.; Stahl, D. A.; Dubilier, N., 2003: *Acidovorax*-like symbionts in the nephridia of earthworms. *Environmental Microbiology*., **5**, 804–809.
- Sessitsch, A.; Kuffner, M.; Kidd, P.; Vangronsveld, J.; Wenzel, W. W.; Fallmann, K.; Puschenreiter, M., 2013: The role of plant-associated bacteria in the mobilization and

- phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry.*, **60**, 182–194.
- Sethi, S.; Gupta, S., 2015: Responses of soil enzymes to different heavy metals. *Biolife.*, **3**, 147–153.
- Setubal, J. C.; Moreira, L. M.; da Silva, A. C. R., 2005: Bacterial phytopathogens and genome science. *Current Opinion in Microbiology.*, **8**, 595–600.
- Shackira, A. M.; Puthur, J. T., 2019: Phytostabilization of Heavy Metals: Understanding of Principles and Practices. *Plant-Metal Interactions*. Springer International Publishing, Cham, pp. 263–282.
- Shah, V.; Daverey, A., 2020: Phytoremediation: A multidisciplinary approach to clean up heavy metal contaminated soil. *Environmental Technology and Innovation.*, **18**, 100774.
- Shahid, M.; Javed, M. T.; Tanwir, K.; Akram, M. S.; Tazeen, S. K.; Saleem, M. H.; Masood, S.; Mujtaba, S.; Chaudhary, H. J., 2020: Plant growth-promoting *Bacillus sp.* strain SDA-4 confers Cd tolerance by physio-biochemical improvements, better nutrient acquisition, and diminished Cd uptake in *Spinacia oleracea* L. *Physiology and Molecular Biology of Plants.*, **26**, 2417–2433.
- Shahzad, A.; Ullah, S.; Dar, A. A.; Sardar, M. F.; Mehmood, T.; Tufail, M. A.; Shakoor, A.; Haris, M., 2021 : Nexus on climate change: agriculture and possible solution to cope future climate change stresses. *Environmental Science and Pollution Research.*, **28**, 14211–14232.
- Shahzad, R.; Waqas, M.; Khan, A. L.; Al-Hosni, K.; Kang, S. M.; Seo, C. W.; Lee, I. J., 2017: Indoleacetic acid production and plant growth promoting potential of bacterial endophytes isolated from rice (*Oryza sativa* L.) seeds. *Acta Biologica Hungarica.*, **68**, 175–186.
- Sharma, S.; Tiwari, S.; Hasan, A.; Saxena, V.; Pandey, L. M., 2018: Recent advances in conventional and contemporary methods for remediation of heavy metal-contaminated soils. *3 Biotech.*, **8**, 1–18.
- Sharma, S. S.; Dietz, K. J.; Mimura, T., 2016 : Vacuolar compartmentalization as indispensable component of heavy metal detoxification in plants. *Plant Cell and Environment.*, **39**, 1112–1126.

- Shekhovtsov, S. v.; Peltek, S. E., 2019: The complete mitochondrial genome of *Aporrectodea rosea* (Annelida: Lumbricidae). *Mitochondrial DNA Part B: Resources.*, **4**, 1752–1753.
- Shen, X.; Dai, M.; Yang, J.; Sun, L.; Tan, X.; Peng, C.; Ali, I.; Naz, I., 2022: A critical review on the phytoremediation of heavy metals from environment: Performance and challenges. *Chemosphere.*, **291**, 132979.
- Sherameti, I.; Varma, A. (Eds.), 2010: *Soil Heavy Metals*. Soil Biology. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, Vol. 19.
- Sheremet, A.; Jones, G. M.; Jarett, J.; Bowers, R. M.; Bedard, I.; Culham, C.; Eloie-Fadrosh, E. A.; Ivanova, N.; Malmstrom, R. R.; Grasby, S. E.; Woyke, T.; Dunfield, P. F., 2020: Ecological and genomic analyses of *candidate* phylum WPS-2 bacteria in an unvegetated soil. *Environmental Microbiology.*, **22**, 3143–3157.
- Shilev, S.; Babrikova, I.; Babrikov, T., 2020: Consortium of plant growth-promoting bacteria improves spinach (*Spinacia oleracea* L.) growth under heavy metal stress conditions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.*, **95**, 932–939.
- Silambarasan, S.; Abraham, J., 2020: Biodegradation of carbendazim by a potent novel *Chryseobacterium* sp. JAS14 and plant growth promoting *Aeromonas caviae* JAS15 with subsequent toxicity analysis. *3 Biotech.*, **10**, 326.
- Singh, A.; Singh, D. P.; Tiwari, R.; Kumar, K.; Singh, R. V.; Singh, S.; Prasanna, R.; Saxena, A. K.; Nain, L., 2015: Taxonomic and functional annotation of gut bacterial communities of *Eisenia foetida* and *Perionyx excavatus*. *Microbiological Research.*, **175**, 48–56.
- Singh, A.; Tiwari, R.; Sharma, A.; Adak, A.; Singh, S.; Prasanna, R.; Saxena, A. K.; Nain, L.; Singh, R. V., 2016: Taxonomic and functional diversity of the culturable microbiomes of epigeic earthworms and their prospects in agriculture. *Journal of Basic Microbiology.*, **56**, 1009–1020.
- Singh, S.; Singh, U. B. ; Trivedi, M.; Sahu, P. K.; Paul, S.; Paul, D.; Saxena, A. K., 2020: Seed biopriming with salt-tolerant endophytic *pseudomonas geniculata*-modulated biochemical responses provide ecological fitness in maize (*Zea mays* L.) grown in saline sodic soil. *International Journal of Environmental Research and Public Health.*, **17**.

- Sogbesan, A. O.; Ugwumba, A. A. A., 2008: Nutritional Values of Some Non-Conventional Animal Protein Feedstuffs Used as Fishmeal Supplement in Aquaculture Practices in Nigeria. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.*, **8**, 159–164.
- Šrut, M.; Menke, S.; Höckner, M.; Sommer, S., 2019: Earthworms and cadmium – Heavy metal resistant gut bacteria as indicators for heavy metal pollution in soils? *Ecotoxicology and Environmental Safety.*, **171**, 843–853.
- Sun, L.; Cao, X.; Li, M.; Zhang, X.; Li, X.; Cui, Z., 2017: Enhanced bioremediation of lead-contaminated soil by *Solanum nigrum* L. with *Mucor circinelloides*. *Environmental Science and Pollution Research.*, **24**, 9681–9689.
- Sun, M.; Chao, H.; Zheng, X.; Deng, S.; Ye, M.; Hu, F., 2020: Ecological role of earthworm intestinal bacteria in terrestrial environments: A review. *Science of the Total Environment.*, **740**, 140008.
- Sun, Z. J.; Huang, J.; Tang, G. L.; Su, Z. Y.; Xu, Q., 2007: Identifying earthworms through DNA barcodes. *Pedobiologia.*, **51**, 301–309.
- Suthar, V.; Mahmood-ul-Hassan, M.; Memon, K. S.; Rafique, E., 2013: Heavy-Metal Phytoextraction Potential of Spinach and Mustard Grown in Contaminated Calcareous Soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis.*, **44**, 2757–2770.
- Sytar, O.; Ghosh, S.; Malinska, H.; Zivcak, M.; Brestic, M., 2021: Physiological and molecular mechanisms of metal accumulation in hyperaccumulator plants. *Physiologia Plantarum.*, **173**, 148–166.
- Taabodi, M.; May, E. B.; Bryant, R. B.; Saporito, L. S.; Skeen, O. K.; Hashem, F. M.; Allen, A. L., 2020: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* utilization of Ammonium-N, Nitrate-N and Urea-N in culture. *Heliyon.*, **6**.
- Tabatabai, M. A.; Bremner, J. M., 1972: Assay of urease activity in soils. *Soil Biology and Biochemistry.*, **4**, 479–487.
- Tabatabai, M. A., 1994: Soil Enzymes. In: Weaver, R. W., S. Angle, P. Bottomley, D. Bezdicek, S. Smith, A. Tabatabai & A. Wollum (eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2: Microbiological and Biochemical Properties*. 2nd edn. Soil Science Society of America, Inc., pp. 775–833.

- Tamartash, R.; Ehsani, S. M., 2021: The effect of earthworms on plant diversity and soil properties under different land uses. *Acta Ecologica Sinica.*, **41**, 171–176.
- Tang, J.; Zhang, J.; Ren, L.; Zhou, Y.; Gao, J.; Luo, L.; Yang, Y.; Peng, Q.; Huang, H.; Chen, A., 2019a: Diagnosis of soil contamination using microbiological indices: A review on heavy metal pollution. *Journal of Environmental Management.*, **242**, 121–130.
- Tang, L.; Hamid, Y.; Sahito, Z. A.; Gurajala, H. K.; He, Z.; Feng, Y.; Yang, X., 2019b: Evaluation of variation in essential nutrients and hazardous materials in spinach (*Spinacia oleracea* L.) genotypes grown on contaminated soil for human consumption. *Journal of Food Composition and Analysis.*, **79**, 95–106.
- Tapia-Torres, Y.; Morón-Cruz, A., 2019: Bacteria Have Superpowers to Recycle Soil Nutrients. *Frontiers for Young Minds.*, **7**.
- Tejada, M. ; Gómez, I.; Franco-Andreu, L. ; Hernandez, T.; García, C., 2017: The Impact of *Allolobophora molleri* on Soil Biology Under Different Organic Amendments. *Land Degradation & Development.*, **28**, 918–925.
- Thakare, M.; Sarma, H.; Datar, S.; Roy, A.; Pawar, P.; Gupta, K.; Pandit, S.; Prasad, R., 2021: Understanding the holistic approach to plant-microbe remediation technologies for removing heavy metals and radionuclides from soil. *Current Research in Biotechnology.*, **3**, 84–98.
- Thakuria, D.; Schmidt, O.; Finan, D.; Egan, D.; Doohan, F. M., 2010: Gut wall bacteria of earthworms: a natural selection process. *The ISME Journal.*, **4**, 357–366.
- Thi Thuy Ha, T.; Thi Lam, T.; Thanh Huyen, N.; Xuan Canh, N., 2018: Characterization and identification of nitrogen- fixing bacteria isolated from agricultural soil. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering.*, **60**, 48–54.
- Tillinghast, E. K., 1968: Variations in blood and coelomic fluid ammonia and urea levels in the earthworm *Lumbricus terrestris* L. *Comparative Biochemistry and Physiology.*, **24**, 621–623.
- Tirry, N.; Tahri Joutey, N.; Sayel, H.; Kouchou, A.; Bahafid, W.; Asri, M.; El Ghachtouli, N., 2018: Screening of plant growth promoting traits in heavy metals resistant bacteria: Prospects in phytoremediation. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology.*, **16**, 613–619.

- Tiwari, N.; Lone, A. R.; Thakur, S. S.; Yadav, S., 2021: Interrogation of earthworm (*Clitellata: Haplotaxida*) taxonomy and the DNA sequence database. *Journal of Asia-Pacific Biodiversity*., **14**, 40–52.
- Tiwari, S.; Lata, C., 2018 : Heavy Metal Stress, Signaling, and Tolerance Due to Plant-Associated Microorganismes: An Overview. *Frontiers in Plant Science*., **9**, 1–12.
- Tondoh, J. E.; Dimobe, K.; Guéi, A. M.; Adahe, L.; Baidai, Y.; N'Dri, J. K.; Forkuor, G., 2019: Soil health changes over a 25-year chronosequence from forest to plantations in rubber tree (*Hevea brasiliensis*) landscapes in southern Côte d'Ivoire: Do earthworms play a role? *Frontiers in Environmental Science*., **7**.
- Trigo, D.; Mascato, R.; Mato, S.; Cosin, D. J. D., 1988: Biogeographical divisions of continental Portugal as regards earthworm fauna. *Bolletino di zoologia*., **55**, 85–92.
- Ueda, M.; Noda, K.; Nakazawa, M.; Miyatake, K.; Ohki, S.; Sakaguchi, M.; Inouye, K., 2008: A novel anti-plant viral protein from coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida*: Purification, characterization, and its identification as a serine protease. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*., **151**, 381–385.
- Uksa, M.; Schlöter, M.; Endesfelder, D.; Kublik, S.; Engel, M.; Kautz, T.; Köpke, U.; Fischer, D., 2015: Prokaryotes in subsoil-evidence for a strong spatial separation of different phyla by analysing co-occurrence networks. *Frontiers in Microbiology*., **6**, 1–13.
- Upton, R. N.; Bach, E. M.; Hofmockel, K. S., 2019: Spatio-temporal microbial community dynamics within soil aggregates. *Soil Biology and Biochemistry*., **132**, 58–68.
- van Groenigen, J. W.; van Groenigen, K. J.; Koopmans, G. F.; Stokkermans, L.; Vos, H. M. J.; Lubbers, I. M., 2019: How fertile are earthworm casts? A meta-analysis. *Geoderma*., **338**, 525–535.
- Verma, A.; Ali, D.; Farooq, M.; Pant, A. B.; Ray, R. S.; Hans, R. K., 2011: Expression and inducibility of endosulfan metabolizing gene in *Rhodococcus* strain isolated from earthworm gut microflora for its application in bioremediation. *Bioresource Technology*., **102**, 2979–2984.
- Verma, D. K. (Ed.), 2019 a: *Microbiology for Sustainable Agriculture, Soil Health, and Environmental Protection*. Apple Academic Press, Toronto; New Jersey: Apple Academic Press, 2019.

- Verma, S.; Kuila, A., 2019 b: Bioremediation of heavy metals by microbial process. *Environmental Technology & Innovation.*, **14**, 100369.
- Viana, F.; Paz, L. C.; Methling, K.; Damgaard, C. F.; Lalk, M.; Schramm, A.; Lund, M. B., 2018: Distinct effects of the nephridial symbionts *Verminephrobacter* and *Candidatus Nephrothrix* on reproduction and maturation of its earthworm host *Eisenia andrei*. *FEMS Microbiology Ecology.*, **94**, 1–7.
- Viehweger, K., 2014: How plants cope with salinity. *Botanical Studies.*, **55**, 1–8.
- Vishwakarma, K.; Kumar, N.; Shandilya, C.; Mohapatra, S.; Bhayana, S.; Varma, A., 2020: Revisiting Plant–Microbe Interactions and Microbial Consortia Application for Enhancing Sustainable Agriculture: A Review. *Frontiers in Microbiology.*, **11**, 1–21.
- Vodyanitskii, Y. N., 2013: Contamination of soils with heavy metals and metalloids and its ecological hazard (analytic review). *Eurasian Soil Science.*, **46**, 793–801.
- Vogel, J.; Seifert, G., 1992: Histological changes in the chloragogen tissue of the earthworm *Eisenia fetida* after administration of sublethal concentrations of different fluorides. *Journal of Invertebrate Pathology.*, **60**, 192–196.
- Wang, C.; Sun, Z.; Zheng, D.; Liu, X., 2011: Function of mucilaginous secretions in the antibacterial immunity system of *Eisenia fetida*. *Pedobiologia.*, **54**, S57–S62.
- Wang, D.; Xu, A.; Elmerich, C.; Ma, L. Z., 2017 a: Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions. *ISME Journal.*, **11**, 1602–1613.
- Wang, G.; Wang, L.; Ma, F., 2022: Effects of earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi on improvement of fertility and microbial communities of soils heavily polluted by cadmium. *Chemosphere.*, **286**, 131567.
- Wang, L.; Lin, H.; Dong, Y.; Li, B.; He, Y., 2020a: Effects of endophytes inoculation on rhizosphere and endosphere microecology of Indian mustard (*Brassica juncea*) grown in vanadium-contaminated soil and its enhancement on phytoremediation. *Chemosphere.*, **240**, 124891.

- Wang, R. ; Zhang, H. ; Sun, L.; Qi, G.; Chen, S.; Zhao, X., 2017 b: Microbial community composition is related to soil biological and chemical properties and bacterial wilt outbreak. *Scientific Reports.*, **7**, 343.
- Wang, T.; Wang, X.; Tian, W.; Yao, L.; Li, Y.; Chen, Z.; Han, H., 2020b: Screening of heavy metal-immobilizing bacteria and its effect on reducing Cd²⁺ and Pb²⁺ concentrations in water spinach (*Ipomoea aquatic* forsk.). *International Journal of Environmental Research and Public Health.*, **17**.
- Wang, Y.; Luo, Y.; Zeng, G.; Wu, X.; Wu, B.; Li, X.; Xu, H., 2020c: Characteristics and in situ remediation effects of heavy metal immobilizing bacteria on cadmium and nickel co-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety.*, **192**, 110294.
- Wani, K. A.; Mamta; Shuab, R.; Lone, R. A., 2017: Earthworms and Associated Microbiome: Natural Boosters for Agro-Ecosystems. In: Kumar, V., M. Kumar, S. Sharma & R. Prasad (eds.), *Probiotics in Agroecosystem*. Springer Singapore, Singapore, pp. 469–489.
- Watanabe, F. S.; Olsen, S. R., 1965: Test of an Ascorbic Acid Method for Determining Phosphorus in Water and NaHCO₃ Extracts from Soil. *Soil Science Society Proceedings.*, 677–678.
- Whalen, J. K.; Parmelee, R. W.; McCartney, D. A.; Vanarsdale, J. L., 1999: Movement of N from decomposing earthworm tissue to soil, microbial and plant N pools. *Soil Biology and Biochemistry.*, **31**, 487–492.
- Wiangkham, N.; Prapagdee, B., 2018: Potential of Napier grass with cadmium-resistant bacterial inoculation on cadmium phytoremediation and its possibility to use as biomass fuel. *Chemosphere.*, **201**, 511–518.
- Wu, G.; Kang, H.; Zhang, X.; Shao, H.; Chu, L.; Ruan, C., 2010: A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: Issues, progress, eco-environmental concerns, and opportunities. *Journal of Hazardous Materials.*, **174**, 1–8.
- Wuana, R. A.; Okieimen, F. E., 2011: Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *ISRN Ecology.*, **2011**, 1–20.

- Wyszkowska, J.; Wyszkowski, M., 2010: Activity of Soil Dehydrogenases, Urease, and Acid and Alkaline Phosphatases in Soil Polluted with Petroleum. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, **73**, 1202–1210.
- Xiao, F.; Gu, Z.; Sarkissian, A.; Ji, Y.; RuonanYang; Yang, L.; Zeng, Q.; Huang, P.; Chen, H., 2021: Phytoremediation of potentially toxic elements in a polluted industrial soil using Poinsettia. *Physiology and Molecular Biology of Plants*., **27**, 675–686.
- Xiao, Z.; Wang, X.; Koricheva, J.; Kergunteuil, A.; le Bayon, R. C. ; Liu, M.; Hu, F.; Rasmann, S., 2018: Earthworms affect plant growth and resistance against herbivores: A meta-analysis. *Functional Ecology*., **32**, 150–160.
- Xu, X.; Huang, Q.; Huang, Q.; Chen, W., 2012: Soil microbial augmentation by an EGFP-tagged *Pseudomonas putida* X4 to reduce phytoavailable cadmium. *International Biodeterioration & Biodegradation*., **71**, 55–60.
- Yan, A.; Wang, Y.; Tan, S. N.; Mohd Yusof, M. L.; Ghosh, S.; Chen, Z., 2020: Phytoremediation: A Promising Approach for Revegetation of Heavy Metal-Polluted Land. *Frontiers in Plant Science*., **11**, 1–15.
- Yang, Z.; Yang, F.; Liu, J. L.; Wu, H. T.; Yang, H.; Shi, Y.; Liu, J.; Zhang, Y. F.; Luo, Y. R.; Chen, K. M., 2022: Heavy metal transporters: Functional mechanisms, regulation, and application in phytoremediation. *Science of the Total Environment*., **809**, 151099.
- Yao, Z.; Li, J.; Xie, H.; Yu, C., 2012: Review on Remediation Technologies of Soil Contaminated by Heavy Metals. *Procedia Environmental Sciences*., **16**, 722–729.
- Ye, S.; Zeng, G.; Wu, H.; Zhang, C.; Dai, J.; Liang, J.; Yu, J.; Ren, X.; Yi, H.; Cheng, M.; Zhang, C., 2017: Biological technologies for the remediation of co-contaminated soil. *Critical Reviews in Biotechnology*., **37**, 1062–1076.
- Yin, A.; Yang, Z.; Ebbs, S.; Yuan, J.; Wang, J.; Yang, J., 2016: Effects of phosphorus on chemical forms of Cd in plants of four spinach (*Spinacia oleracea* L.) cultivars differing in Cd accumulation. *Environmental Science and Pollution Research*., **23**, 5753–5762.
- Yu, X.; Ai, C.; Xin, L.; Zhou, G., 2011: The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium wilt* and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*., **47**, 138–145.

- Yurkov, A. M.; Chernov, I. Y.; Tiunov, A. v., 2008: Influence of *Lumbricus terrestris* earthworms on the structure of the yeast community of forest litter. *Microbiology.*, **77**, 107–111.
- Zachmann, J. E.; Molina, J. A. E., 1993: Presence of Culturable Bacteria in Cocoons of the Earthworm *Eisenia fetida*. *Applied and Environmental Microbiology.*, **59**, 1904–1910.
- Zafar-ul-Hye, M.; Tahzeeb-ul-Hassan, M.; Abid, M.; Fahad, S.; Brtnicky, M.; Dokulilova, T.; Datta, R.; Danish, S., 2020: Potential role of compost mixed biochar with rhizobacteria in mitigating lead toxicity in spinach. *Scientific Reports.*, **10**, 12159.
- Zaidi, A.; Wani, P. A.; Khan, M. S., 2014: *Toxicity of Heavy Metals to Legumes and Bioremediation*, **2012**, 1–244.
- Zhang, C.; Nie, S.; Liang, J.; Zeng, G.; Wu, H.; Hua, S.; Liu, J.; Yuan, Y.; Xiao, H.; Deng, L.; Xiang, H., 2016: Effects of heavy metals and soil physicochemical properties on wetland soil microbial biomass and bacterial community structure. *Science of the Total Environment.*, **557–558**, 785–790.
- Zhang, Q.; Wang, C., 2020a: Natural and Human Factors Affect the Distribution of Soil Heavy Metal Pollution: a Review. *Water, Air, & Soil Pollution.*, **231**, 350.
- Zhang, X.; Su, C.; Liu, X.; Liu, Z.; Liang, X.; Zhang, Y.; Feng, Y., 2020b: Effect of plant-growth-promoting rhizobacteria on phytoremediation efficiency of *Scirpus triqueter* in pyrene-Ni co-contaminated soils. *Chemosphere.*, **241**, 125027.
- Zhang, Y. F.; Ganin, G. N.; Atopkin, D. M.; Wu, D. H., 2020c: Earthworm *Drawida* (*Moniligastridae*) Molecular phylogeny and diversity in Far East Russia and Northeast China. *European Zoological Journal.*, **87**, 180–191.
- Zhao, G.; Zhong, T., 2013: Influence of exogenous IAA and GA on seed germination, vigor, and their endogenous levels in *Cunninghamia lanceolata*. *Scandinavian Journal of Forest Research.*, **28**, 511–517.
- Zhao, T.; Deng, X.; Xiao, Q.; Han, Y.; Zhu, S.; Chen, J., 2020: IAA priming improves the germination and seedling growth in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via regulating the endogenous phytohormones and enhancing the sucrose metabolism. *Industrial Crops and Products.*, **155**.

Zhao, X.; Huang, J.; Lu, J.; Sun, Y., 2019: Study on the influence of soil microbial community on the long-term heavy metal pollution of different land use types and depth layers in mine. *Ecotoxicology and Environmental Safety.*, **170**, 218–226.

Zheng, W.; Zhao, Z.; Gong, Q.; Zhai, B.; Li, Z., 2018: Responses of fungal–bacterial community and network to organic inputs vary among different spatial habitats in soil. *Soil Biology and Biochemistry.*, **125**, 54–63.

Zine, H.; Midhat, L.; Hakkou, R.; El Adnani, M.; Ouhammou, A., 2020: Guidelines for a phytomanagement plan by the phytostabilization of mining wastes. *Scientific African.*, **10**, e00654.

Zubair, M.; Shakir, M.; Ali, Q.; Rani, N.; Fatima, N.; Farooq, S.; Shafiq, S.; Kanwal, N.; Ali, F.; Nasir, I. A., 2016: Rhizobacteria and phytoremediation of heavy metals. *Environmental Technology Reviews.*, **5**, 112–119.

Zwolak, A.; Sarzyńska, M.; Szpyrka, E.; Stawarczyk, K., 2019: Sources of Soil Pollution by Heavy Metals and Their Accumulation in Vegetables: a Review. *Water, Air, and Soil Pollution.*, **230**.