

THESE

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

Centre de Recherche : Biotechnologies végétale et Microbienne, Biodiversité et
Environnement

Structure de Recherche : Equipe de Microbiologie et Biologie Moléculaire

Discipline : Biologie

Spécialité : Microbiologie et biotechnologie environnementale

Présentée et soutenue le 28/06/2022 par :

Malika OUBOHSSAINE

***Isolement et caractérisation des populations bactériennes des déblais miniers
et évaluation de leur potentiel de valorisation dans la phytoremédiation des
sols pollués par les éléments traces métalliques***

JURY

Mustapha MISSBAH EL IDRISSE
Ali BOULARBAH

Abdelaziz SMOUNI
Abdelkarim GUEDIRA
Hicham EL ARROUSSE
Laila SBABOU
Jamal AURAG

PES, Université Mohammed V, Faculté des sciences-Rabat
PES, Université Cadi Ayyad, Faculté des sciences et
techniques-Marrakech
PES, Université Mohammed V, Faculté des sciences-Rabat
PES, Université Mohammed V, Faculté des sciences-Rabat
Dr, Fondation MASCIR
PH, Université Mohammed V, Faculté des sciences-Rabat
PES, Université Mohammed V, Faculté des sciences-Rabat

Président/Rapporteur
Rapporteur/Examineur
Rapporteur/Examineur
Examineur
Invité
Co-encadrante de thèse
Directeur de thèse

Année Universitaire : 2021/2022

Dédicace

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, je n'arriverai jamais à leur exprimer mon amour sincère.

A mon très cher père.

A ma mère qui a souffert sans me laisser souffrir.

Aucun mot, aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération, et mon amour pour les sacrifices qu'ils ont consentis pour mon bien-être.

Puisse Dieu leur accorder santé, bonheur, prospérité et longue vie.

A mes frères, mes sœurs qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de cette thèse. Ils m'ont chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours.

A ma famille, mes proches.

A tous mes amis qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès.

A tous ceux que j'aime.

Merci !

Avant-propos

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé au sein de l'Equipe de Microbiologie et Biologie Moléculaire (EMBM), Centre de Recherche de Biotechnologies Végétale et Microbienne, Biodiversité et Environnement (BioBio), Faculté des sciences, Université Mohammed V de Rabat.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes vifs remerciements à Monsieur le professeur **Jamal AURAG**, directeur du Centre et actuel responsable de l'EMBM pour l'honneur qu'il m'a fait en me permettant d'intégrer le son équipe et d'avoir accepté la direction de cette thèse. Ses encouragements continus, son encadrement rigoureux tout au long de ces années, sa grande expérience qu'il m'a fait largement profiter, sa confiance, ses précieuses connaissances, ses conseils judicieux et ses commentaires rigoureux m'ont aidé considérablement dans ce travail. Qu'il trouve ici, l'expression de ma sincère gratitude et mon profond respect.

J'exprime aussi toute ma gratitude et ma respectueuse reconnaissance à ma co-encadrante de thèse Mme **Laila SBABOU**, professeur habilité à la Faculté des sciences Rabat, qui a suivi de près la progression de ce travail et m'a fait bénéficier de ses conseils, ses précieuses connaissances. Qu'elle trouve ici, l'expression de ma sincère gratitude et mon profond respect.

Je remercie chaleureusement Mr **Mustapha MISBAH EL IDRISSE**, professeur de l'enseignement supérieur à la Faculté des sciences Rabat de m'avoir fait l'honneur de faire le rapport de ma thèse et de présider le jury de ce travail.

Mes profonds remerciements s'adressent à Mrs **Abdel Aziz SMOUNI**, professeurs de l'enseignement supérieur à la Faculté des sciences Rabat, et Mr **Ali BOULARBAH**, Professeur de l'enseignement supérieur à la Faculté des sciences et techniques de Marrakech, pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de faire les rapports de ma thèse et participer au jury d'évaluation de mon modeste travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma gratitude et mon profond respect.

J'exprime tous mes remerciements à Monsieur **Abdelkarim GUEDIRA**, professeur de l'enseignement supérieur à la Faculté des sciences Rabat, d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

J'exprime toute ma considération à Monsieur **Hicham EL ARROUSSE**, docteur chercheur à la fondation MASCIR, pour l'intérêt qu'il a accordé à mon travail, pour avoir consacré du temps à sa lecture et accepté de le juger.

A Monsieur **Abdelkrim FILALI MALTOUF**, professeur à la Faculté des sciences de Rabat et ancien responsable de l'EMBM, j'exprime ma haute reconnaissance pour ces encouragements et son soutien.

A Monsieur **El Bekkay BERRAHO**, professeur à la Faculté des sciences de Rabat, j'exprime ma profonde gratitude pour ses encouragements tout au long de la réalisation de ma thèse et à tous les professeurs de l'EMBM qui permettent au laboratoire de fonctionner dans les meilleures conditions possibles

Je remercie également l'IRD qui a aidé financièrement à la réalisation de certaines parties de ce travail à travers le LMI (Laboratoire Mixte International) « Biotechnologie Microbienne et Végétale » et plus particulièrement aux chercheurs Drs **Gilles BENA** et **Odile BRUNEEL** et à l'ingénieur **Patricia MOULIN**.

Je remercie aussi Mme **Aicha EL AISSAMI**, professeur à la Faculté des sciences de Rabat, pour son aide et encouragements.

Résumé

Les bactéries du sol jouent un rôle essentiel dans les cycles biogéochimiques, la biotransformation des métaux et les processus de bioremédiation. Dans ce contexte, plus de 700 bactéries ont été isolées des sols nus ou rhizosphériques de *Sulla spinosissima*, *Stipa tenuissima* et *Acacia cyanophylla* poussant dans trois sites miniers de la région d'Oujda. La tolérance des isolats au plomb, au zinc et à l'arsenic, de même que les activités favorisant la croissance des plantes (PGP) ont été étudiées. Les sols rhizosphériques contiennent plus de souches tolérantes aux éléments traces métalliques que les sols nus. Le séquençage de l'ADNr 16S a montré que les phylums dominants étaient les Firmicutes, Actinobacteria et Proteobacteria, tandis qu'au niveau du genre *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Stenotrophomonas* et *Rhodococcus* prédominaient. Les souches les plus performantes étaient LMR283 pour la production d'auxine, LMR308 et LMR291 pour la solubilisation du phosphate, LMR250 pour la production de sidérophores et LMR249 pour l'activité ACC désaminase. Parmi les bactéries PGP tolérantes, 27 isolats ont montré une activité antagoniste contre *Fusarium oxysporum* et 81 ont produit des enzymes lytiques. Six souches multi-tolérantes aux ETMs et possédants de multiples traits PGP ont été inoculées à *Sulla* cultivée dans du sable stérilisé. L'inoculation avec la souche LMR340 a stimulé la biomasse végétale, la teneur en chlorophylle et en caroténoïdes et les activités enzymatiques antioxydantes. De plus, cinq souches ont restauré la croissance des plantes cultivées dans un sol très contaminé par les ETMs. La souche la plus performante, LMR291, est un bon candidat pour la biofertilisation et/ou la biostimulation des plantes sélectionnées pour des programmes de revégétalisation et/ou de phytostabilisation de sols contaminés.

Mots clés : Sites miniers, communautés bactériennes cultivables, traits PGP, tolérance aux éléments traces métalliques, inoculation, phytoremediation.

Abstract

Soil bacteria play an essential role in biogeochemical cycles, biotransformation of metals and bioremediation processes. In this context, more than 700 bacteria were isolated from the bulk soils and rhizosphere of three plant species (*Sulla spinosissima*, *Stipa tenuissima*, *Acacia cyanophylla*) growing in three different mining sites in the Oujda region (Morocco). Isolates were tested for lead, zinc and arsenic tolerance, screened for plant growth promotion traits (PGP) and identified by 16S rDNA sequencing. Rhizospheric soils showed a large number of metal-tolerant strains compared to bulk soils. The dominant phyla were Firmicutes, Actinobacteria and Proteobacteria, while at the genus level *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Stenotrophomonas* and *Rhodococcus* predominated. The best performing strains were LMR283 for auxin production, LMR308 and LMR291 for phosphate solubilization, LMR250 for siderophore production and LMR249 for ACC deaminase activity. Among PGP-tolerant bacteria, 27 isolates showed antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* and 81 produced lytic enzymes. Six strains multi-resistant to heavy metals and possessing multiple plant growth promoting traits were tested with *Sulla* plants grown in sterilized sand. Inoculation with strain LMR340 boosted plant biomass, chlorophyll and carotenoids content, and antioxidant enzyme activities. Selected strains were also inoculated to plants growing in a metal multi-polluted and poor soil. Under these conditions, five bacterial inoculants restored plants growth. The best performing strain, LMR291, is a good biofertilizer and/or biostimulant candidate to be used for selected plants in re-vegetation and/or phytostabilization programs of contaminated soils.

Keywords: Mining sites, cultivable bacterial communities, PGP traits, heavy metals tolerance, inoculation, phytoremediation.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Quelques exemples de plantes employées pour la phytoremédiation

Tableau 2 : Type et localisation des échantillonnages de sol

Tableau 3 : Composition chimique des échantillons de sol des sites étudiés

Tableau 4 : La concentration minimal inhibitrice des trois éléments traces métalliques (Pb, Zn et As)

Tableau 5 : Quantification des activités phytobénéfiques chez les souches intéressantes

Tableau 6 : Activité ACC déaminase et fixation libre de l'azote chez les souches intéressantes

Tableau 7 : Activités antifongiques des souches intéressantes étudiées par 3 techniques différentes

Tableau 8 : Caractéristiques des souches sélectionnées pour les essais d'inoculation des plantes (Tolérance aux ETMs et caractères PGP *in vitro*)

Liste des figures

Figure 1 : Mécanismes généraux adoptés par les bactéries pour la résistance aux éléments traces métalliques.

Figure 2 : Principaux mécanismes de transformation et de résistance à l'arsenic chez les bactéries.

Figure 3 : Les principales familles de protéines impliquées et les divers transporteurs jouant un rôle dans le transport des éléments traces métalliques, le maintien de l'homéostasie et la résistance aux éléments traces.

Figure 4 : Les rôles des polymères extracellulaires microbiens dans le sol.

Figure 5 : Le réseau complexe du système oxydant-antioxydant hautement régulé.

Figure 6 : Différentes stratégies de bioremédiation.

Figure 7 : Mécanismes impliqués dans la bioremédiation des sols contaminés par les éléments traces métalliques.

Figure 8 : Techniques de bioremédiation *in situ* et *ex-situ*.

Figure 9 : Différentes techniques de phytoremédiation.

Figure 10 : Les interactions entre plantes et PGPR dans la rhizosphère.

Figure 11 : Présentation schématique du cycle de l'azote.

Figure 12 : Les diverses substances organiques / inorganiques produites par des bactéries responsables de la solubilisation du phosphate dans les sols.

Figure 13 : Diagramme simplifié des différentes voies de biosynthèse de l'AIA dérivée du tryptophane chez les bactéries.

Figure 14 : Mode d'action de l'ACC déaminase pour la levée du stress chez les plantes et son interaction avec l'AIA.

Figure 15 : Localisation de la région d'Oujda et des trois sites étudiés.

Figure 16 : Photos des sites étudiés.

Figure 17 : Photos de site Oued El Heimer.

Figure 18 : Diagramme ombrothermique (A) et courbe des températures (B) d'Oujda.

Figure 19 : Analyse en composantes principales (PCA) de la composition chimique des échantillons du sol (Touissit, Sidi Boubker, Oued El Heimer).

Figure 20 : Nombre total d'isolats obtenus dans les trois sites étudiés.

Figure 21 : Pourcentage des souches isolées de chaque échantillon de sol des trois sites.

Figure 22 : Pourcentage de souches présentant des activités biologiques (production d'auxine et de sidérophore, solubilisation du phosphate, activité ACC déaminase) et une tolérance au Pb et au Zn.

Figure 23 : Arbres phylogénétiques des séquences partielles d'ADNr 16S d'isolats représentatifs affiliés aux Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Actinobacteria et Firmicutes.

Figure 24 : Structure des communautés bactériennes au niveau embranchement dans les différents sites étudiés.

Figure 25 : Structure des communautés bactériennes au niveau genre dans les différents sites étudiés.

Figure 26 : Effet de différents inoculants bactériens sur les paramètres de croissance des plantes de *Sulla* cultivées dans du sable stérilisé.

Figure 27 : Photos montrant l'effet de l'inoculation avec des souches de PGPR tolérantes aux ETMs sur la croissance des plantes de *Sulla spinosissima* poussant sous serre sur du sable stérilisé.

Figure 28 : Teneurs en chlorophylle totale (mg g^{-1} FW) et en caroténoïdes (mg g^{-1} FW) des plantes de *Sulla* inoculées cultivées sur du sable stérilisé.

Figure 29 : Mesures des activités des enzymes antioxydantes dans les racines et les feuilles des plantes *Sulla* 100 jours après l'inoculation bactérienne.

Figure 30 : Biplot de corrélation entre le Dim1 et le Dim2.

Figure 31 : Effet de l'inoculation bactérienne sur les tiges et les racines des plantes de *Sulla* poussant dans un sol contaminé par des éléments traces métalliques.

Figure 32 : Photos montrant l'état des plantes de *Sulla* inoculées par les souches sélectionnées poussant sous serre sur un sol contaminé par des éléments traces métalliques.

Figure 33 : Teneurs en chlorophylle totale (mg g^{-1} FW) et en caroténoïdes (mg g^{-1} FW) des plantes *Sulla* poussant dans des sols contaminés.

Figure 34 : Activités des enzymes antioxydantes dans les racines et les feuilles des plantes *Sulla* 100 jours après l'inoculation bactérienne.

Figure 35 : Biplot de corrélation entre le Dim1 et le Dim2.

Liste des abréviations

A : Absorbance

ACC : 1-aminocyclopropane-1 acide carboxylique

ACP : Analyse en composantes principales

Acyl-HSL : Acylhomoserine lactone

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ag : Argent

AIA : Acide indole 3-acétique

Al : Aluminium

ANOVA : Analyse de la variance

APX : Ascorbate peroxydase

ARN: Acide ribonucléique

As : Arsenic

Asc: Acide ascorbique

ATP: Adénosine tri-phosphate

C: Carbone

Ca : Calcium

CAS : Chrome azurol-S

CAT : Catalase

Cd : Cadmium

CDF : Cation diffusion facilitators

CEC : Capacité d'échange cationique

Chl a : Chlorophylle a

Chl b : Chlorophylle b

CMI : Concentration minimale inhibitrice

Co : Cobalt

Cr : Chrome

°C : Degré Celsius

EDTA : Acide éthylène-diamine-tétraacétique

EPS : Exopolysaccharides

ETMs : Eléments traces métalliques

Fe : Fer

GPOX : Gaïacol peroxydase

GR : Glutathion réductase

GSH : Glutathion réduit

GSHS : Glutathion Synthétase

GST : Glutathion-S-Transférase

h : Heure

H : Hydrogène

HCl : Acide chlorhydrique

Hg : Mercure

ICP-AES : Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry

J : Jour

K : Potassium

Kg : Kilogramme

MF : Masse fraîche

MDHA : Monodéhydroascorbate

Mg : Magnésium

ml : Millilitre

mm : Millimètre

Mn : Manganèse

MO : Matière organique

MS : Masse sèche

MT : Métallothionéine

N : Azote

NADPH : Nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate réduit

NB : Bouillon nutritif

Ni : Nickel

NRPS : Peptides synthetases non ribosomiques

OTU : Unité taxonomique opérationnelle

P : Phosphore

Pb : Plomb

pb : Paire de base

PC : Phytochélatines

PCR : Polymerase chain reaction

PGPR : Rhizobactérie promotrice de la croissance des plantes

pH : Potentiel d'hydrogène

PDA : Potatoe Dextrose Agar

PKS : Polykétides synthases

PME : Protéines de la membrane externe

POD : Peroxydases

POX : Peroxydase

PSM : Microorganismes solubilisant le phosphate

PVK : Milieu Pikovskaya

PVP : Polyvinylpyrrolidone

QS : Quorum sensing

Redox : Oxydo-réduction

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

Rpm : Rotation par minute

RND : Resistance-nodulation-cell division

SAM : S-adénosyl-L-méthionine

SDS : Sodium Dodécyle Sulfate

SOD : Superoxyde Dismutase

T_m : Température de fusion

Trp : Tryptophane

TY : Tryptone Yeast Extract

UV : Ultraviolets

v/v : Volume/volume

Zn : Zinc

Sommaire

Introduction.....	1
Synthèse bibliographique	
I. Les éléments traces métalliques.....	5
I.1. Les principaux éléments traces métalliques rencontrés dans les sites miniers.....	6
I.1.1. Plomb.....	6
I.1.2. Arsenic.....	7
I.1.3. Zinc.....	7
I.1.4. Cuivre.....	8
I.1.5. Cadmium.....	8
I.1.6. Chrome.....	9
I.1.7. Mercure.....	9
I.2. Facteurs modifiant la rétention des éléments traces métalliques.....	10
I.2.1. Constituants impliqués dans la mobilité des éléments traces métalliques.....	10
I.2.2. Le pH.....	11
I.2.3. La température.....	11
I.2.4. L'Adsorption.....	11
I.2.5. Le potentiel d'oxydo-réduction.....	11
I.2.6. Activité biologique.....	12
I.3. Sources de éléments traces métalliques dans les sols contaminés.....	12
II. Les mécanismes impliqués dans la résistance des bactéries aux éléments traces métalliques.....	12
II.1. Exclusion du métal par l'imperméabilité membranaire.....	13
II.2. Séquestration intracellulaire des éléments traces métalliques.....	14
II.3. Détoxification enzymatique.....	14

II.4. Réduction de la sensibilité des cibles cellulaires des éléments traces métalliques.....	15
II.5. Transport actif du métal : mécanisme d'efflux.....	15
II.6. La biogenèse.....	17
II.7. La motilité	18
II.8. La production d'exopolysaccharides de surface (EPS).....	19
II.9. Le système quorum sensing (QS).....	20
III. Mécanismes d'adaptation et de tolérance des plantes aux éléments traces métalliques.....	20
III.1. Les éléments traces métalliques dans la plante.....	21
III.2. Toxicité et tolérance chez les plantes.....	21
III.2.1. La membrane plasmique.....	22
III.2.2. Système anti-oxydant.....	22
III.3. La chélation.....	23
IV. Techniques de bioremédiation.....	24
IV.1. La bioaugmentation.....	26
IV.2. LA biofiltration.....	26
IV.3. La biostimulation.....	26
IV.4. Autres procédés microbiens de bioremédiation.....	27
IV.5. La phytoremédiation.....	28
IV.5.1. La phytoextraction (phytoaccumulation).....	30
IV.5.2. La phytostabilisation	31
IV.5.3. La phytofiltration.....	31
IV.5.4. La phytostimulation.....	31
IV.5.5. La phytovolatilisation.....	32
V. Les PGPR comme acteurs efficace pour la restauration des régions contaminées.....	32

V.1. Mécanismes d'action des PGPR.....	33
V.1.1. Mécanismes directs.....	33
V.1.1.1. Fixation biologique de l'azote.....	33
V.1.1.2. Nitrification	34
V.1.1.3. Solubilisation des phosphates.....	35
V.1.1.4. Production de phytohormones bactériennes	37
V.1.1.4.1. Acide indole-3-acétique (AIA) : biosynthèse et place dans l'interaction plante-PGPR.....	37
V.1.1.4.2. L'ACC déaminase.....	39
V.1.2. Mécanismes indirectes de PGPR.....	40
V.1.2.1. Production de sidérophores.....	40
V.1.2.2. Enzymes hydrolytiques.....	41
V.1.2.3. Production d'antibiotiques	41
VI. Phytoremédiation assistée par les microorganismes.....	42

Matériels et méthodes

1. Description de la zone d'étude.....	43
1.1. Les mines de Sidi Boubker et Touissit.....	44
1.2. La fonderie de Oued El Heimer.....	45
1.3. Caractéristiques climatiques.....	45
2. Choix de plante <i>Sulla spinosissima</i>	46
3. Collecte d'échantillons de sol et analyse physico-chimiques.....	46
4. Isolement, purification et conservation des souches bactériennes.....	47
5. Criblage des souches intéressantes.....	47
5.1. Activités favorisant la croissance des plantes (PGP).....	47
5.2. Tolérance des souches aux éléments traces métalliques.....	48
6. Identification moléculaire des bactéries par séquençage de l'ADNr 16S.....	48

6.1.	Extraction de l'ADN total bactérien.....	48
6.2.	Amplification par PCR de l'ADNr 16S et séquençage.....	49
6.3.	Analyse phylogénétique.....	49
7.	Quantification du potentiel phytobénéfique des souches sélectionnées	49
8.	Activités antifongiques des souches bactériennes.....	51
9.	Effet de l'inoculation par des souches sélectionnées sur la croissance des plantes de <i>Sulla spinosissima</i>	53
9.1.	Caractérisation des souches bactériennes	53
9.2.	Evaluation de l'effet des PGPRs sur la croissance de <i>Sulla spinosissima</i> sous conditions normales.....	53
9.3.	Effet des PGPRs sur la croissance des plantes <i>Sulla</i> dans les conditions de sol contaminé	54
9.4.	Paramètres mesurés dans les essais d'inoculation.....	54
9.4.1.	Mesure de la biomasse végétale et des teneurs en chlorophylle/caroténoïdes	54
9.4.2.	Dosages d'enzymes antioxydantes.....	55
10.	Analyses statistiques.....	55

Résultats

1.	Contamination des sols par les éléments traces métalliques.....	56
2.	Isolement de bactéries à partir de sols nus et rhizosphériques.....	58
3.	Criblage des meilleurs isolats bactériens (tests qualitatifs).....	60
3.1.	Caractéristiques PGP.....	60
3.2.	Tolérance aux éléments traces métalliques.....	61
4.	Identification moléculaire des meilleurs isolats bactériens.....	63
5.	Caractérisation physiologique des souches sélectionnées.....	71
5.1.	Détermination des CMI de chaque souche	71
5.2.	Quantification des activités phytobénéfiques des souches intéressantes	74
5.2.1.	Solubilisation du phosphate.....	74

5.2.2. Production d'auxine.....	74
5.2.3. Production de sidérophores.....	74
5.2.4. Activité ACC déaminase et fixation libre d'azote.....	77
5.2.5. Activités antifongiques des souches intéressantes.....	78
6. Essais d'inoculation des plantes de <i>Sulla spinosissima</i> avec des souches sélectionnées.....	80
6.1. Caractéristiques des souches utilisées.....	80
6.2. Effet de l'inoculation par les souches sélectionnées sur la croissance de <i>Sulla spinosissima</i> en conditions normales.....	82
6.2.1. Effet sur les paramètres de croissance	82
6.2.2. Effet sur les teneurs en chlorophylle et en caroténoïdes.....	84
6.2.3. Effet sur les activités des enzymes antioxydantes.....	85
6.2.4. Analyse PCA.....	88
6.3. Effet de l'inoculation avec les souches sélectionnées sur la croissance de <i>Sulla spinosissima</i> poussant dans un sol contaminé.....	90
6.3.1. Effet de l'inoculation sur les paramètres de croissance des plantes	90
6.3.2. Effet des inocula bactériens sur les teneurs en chlorophylle et en caroténoïdes des plantes.....	92
6.3.3. Enzymes antioxydantes des plantes.....	93
6.3.4. Analyse PCA.....	96
Discussion	
Discussion.....	98
Conclusions et perspectives.....	109
Références.....	111
Annexes.....	137

Production scientifique

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse et dans d'autres travaux de recherche auxquels j'ai participé durant mes années de thèse ont fait l'objet de publications dans des revues indexées à comité de lecture et ont été présentés dans plusieurs manifestations nationales et internationales sous forme de communications orales et affichées :

Articles publiés

Oubohssaine Malika, Sbabou Laila, Aurag Jamal, 2022. Native heavy metal-tolerant plant growth promoting rhizobacteria improves *Sulla spinosissima* (L.) growth in post-mining contaminated soils. *Microorganisms*, 10, 838

Oubohssaine Malika, Dahmani Ikram, Sbabou Laila, Bruneel Odile, Aurag Jamal, 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

Imane El Attar, Kaoutar Taha, **Malika Oubohssaine**, Boubacar Diouf, Hajar Ait Jenk, El Beakky Berraho, Imane Thami Alami and Jamal Aurag, 2022. Phytobeneficial bacterial inoculants for common bean growth and productivity in nitrogen and phosphorus deficient soils. *Pak. J. Agri. Sci.*, Vol. 59(2), 157-163;2022

Communications orales

Malika Oubohssaine, Laila Sbabou and Jamal Aurag, 2022. Native heavy metals tolerant plant growth promoting rhizobacteria improve *Sulla spinosissima* growth in post-mining contaminated soils. The international Workshop : Agrobiotechnology for Bioremediation of soils polluted by Metals BIOREMET 2022, Marrakech, Maroc

Malika Oubohssaine, Ikram Dahmani, Laila Sbabou, Odile Bruneel and Jamal Aurag, 2019. Structure and diversity of cultivable bacteria communities in heavy metal multi-polluted soils in the region of Oujda (Morocco). The 4 th international conference microbial biotechnology for development (MICROBIOD 4), Agadir, Maroc

Malika Oubohssaine, Ikram Dahmani, Laila Sbabou, Odile Bruneel and Jamal Aurag, 2016. Functional and genetic diversity of bacterial communities in heavy metal multi-polluted soils in the region of Oujda (Morocco). 10th International Society for Environmental Biotechnology (ISEB) Conference, Barcelona, Spain

Présentations flashes de communications affichées

Malika Oubohssaine, Laila Sbabou and Jamal Aurag, 2021. Heavy metals tolerant plant growth promoting rhizobacteria improve *Sulla spinosissima* growth in multipolluted soils. 11th Symposium of the International Society of Root Research (ISRR11) and 9th International Symposium on Root Development (ROOTING2021), Plant Group at the University of Missouri, Columbia, USA, and the University of Nottingham, UK (Virtual Meeting)

Malika Oubohssaine, Ikram Dahmani, Laila Sbabou, Odile Bruneel and Jamal Aurag, 2015. Characterization of bacteria isolated from heavy metal contaminated soils of the region of Oujda (Morocco), Rhizosphere 4, Maastricht, Hollande

Introduction

L'industrialisation et l'exploitation des ressources naturelles ont entraîné une contamination et une pollution environnementales à grande échelle et par la suite un déclin sérieux de la salubrité de l'environnement et la détérioration de nombreux écosystèmes. De grandes quantités de déchets toxiques ont été dispersées dans des milliers de sites contaminés à travers le monde. Ainsi, chacun de nous est exposé à la contamination par les pratiques industrielles passées et présentes, et le risque pour la santé humaine et environnementale augmente constamment. Ces polluants appartiennent à deux classes principales : inorganiques et organiques. Le défi consiste à développer des solutions novatrices et rentables pour décontaminer les environnements pollués, les rendre sûrs pour l'habitation et la consommation humaines et pour protéger le fonctionnement des écosystèmes qui soutiennent la vie. Les sites miniers abandonnés font partie des milieux les plus pollués par les éléments traces métalliques en raison des quantités considérables de déchets miniers (déchets de concentrés et stériles) abandonnés suite à la suspension des activités minières. En absence de programmes de gestion ou de réhabilitation adéquats, ces sites peuvent avoir des effets très néfastes sur l'environnement et les populations. C'est le cas des sites miniers abandonnés étudiés, le district minier Touissit-Sidi Boubker et la fonderie Oued El Heimer, qui sont situés à la frontière algéro-marocaine au sud de la ville d'Oujda. Les érosions et la dispersion des éléments traces métalliques (ETMs) par le vent vers les régions habitées avoisinantes sont parmi les problématiques de ces mines.

Heureusement, aujourd'hui il y a une prise de conscience des problèmes concernant la croissance industrielle et l'exploitation excessive des mines, qui a engendré une demande sociale en faveur de la restauration des écosystèmes. Face à cette situation, les méthodes traditionnelles de remédiation (telles que l'excavation et la relocalisation des contaminants dans les décharges ainsi que d'autres méthodes physico-chimiques), bien que toujours très performantes, atteignent leurs limites en tant qu'outils d'aide à la gestion environnementale, puisque ne prennent pas en compte la spéciation ou la biodisponibilité des contaminants et surtout elles sont coûteuses et souvent impraticables en raison de la quantité de sol utilisé, comme dans le cas des résidus miniers. Il est donc apparu nécessaire de compléter ces mesures par des méthodes biologiques. Les approches biotechnologiques conçues pour couvrir ces niches ont donc reçu une grande attention au cours des dernières années et la bioremédiation est une alternative potentielle pour le traitement des sites contaminés (Fulekar, 2009 ; Rahman et Singh, 2020).

La technologie de bioremédiation utilise des microorganismes pour fixer, séquestrer ou transformer les contaminants (présents dans les sols, les sédiments ou l'eau) en les rendant moins

mobiles et moins biodisponibles pour les êtres vivants. La bioremédiation dépend de la présence de microorganismes spécifiques dans les conditions environnementales appropriées. Les microorganismes vivant déjà dans des milieux contaminés sont souvent bien adaptés pour survivre en présence des contaminants existants, à la température, au pH et au potentiel d'oxydation/réduction du site (Alka et al., 2020 ; Rahman et Singh, 2020). Ces microorganismes indigènes ont tendance à utiliser les nutriments et les accepteurs d'électrons disponibles. Ce processus de bioremédiation implique la biotransformation des contaminants qui sont transformés en produits chimiques non dangereux ou moins dangereux. Dans ce contexte, il a été montré que les sols qui ont été exposés à long terme à des pollutions multiples avec des composés organiques et/ou des éléments traces métalliques contiennent des communautés microbiennes fonctionnelles et structurelles qui ont la capacité de s'adapter et de se développer dans ces conditions difficiles. Cela suggère que la bioremédiation en utilisant ce genre de microorganismes est une alternative intéressante pour la récupération de ces sites, grâce à la transformation microbienne des composés toxiques et des éléments traces métalliques en produits non toxiques. Ce type de stratégie dépend principalement des activités biologiques cataboliques des microorganismes et de leur capacité à utiliser les contaminants en tant que sources d'énergie et nutriments (Atlas et Unterman, 1999 ; Boopathy, 2000 ; Arora et al., 2020a, b).

La phytoremédiation est un autre moyen de remédiation qui fait appel à des plantes afin de diminuer le niveau de pollution présent. Cependant, il existe encore de nombreuses limitations aux systèmes utilisant cette approche. Pour améliorer l'efficacité de dépollution de cette méthode dans les conditions hostiles des sites miniers, de nombreuses études ont montré des résultats intéressants lorsque les plantes étaient associées à certains microorganismes. Ce genre de méthodes est considéré comme une alternative respectueuse de l'environnement pour la décontamination des éléments traces métalliques ou des polluants organiques. Elles sont aussi peu coûteuses, causent moins d'interférences avec la structure du sol et elles sont plus acceptables par le public que d'autres approches ou techniques conventionnelles (Pilon-Smits, 2005 ; Liu et al., 2013 ; Kazemalilou et al., 2020).

Au cours des dernières années, le rôle de la rhizosphère en tant que niche écologique importante pour le fonctionnement de la biosphère a permis aux bactéries rhizosphériques dites PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) de gagner l'attention des chercheurs. En effet, au vue de leurs propriétés diversifiées, ces bactéries sont reconnues comme des outils potentiels pour une agriculture durable et un bon choix pour la décontamination des sols contaminés par les éléments traces métalliques (Singh et al., 2020a). Les bactéries associées aux plantes peuvent favoriser la croissance et le développement des plantes soit directement en fixant l'azote; solubilisant du

phosphate; produisant des régulateurs de croissance végétale tels que les auxines, les cytokinines et les gibbérellines; et en supprimant la production d'éthylène par l'activité aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) déaminase (Glick et al., 2007), soit indirectement en empêchant l'activité des agents pathogènes par concurrence pour les nutriments et l'espace; l'antibiose; la production des enzymes lytiques et l'induction de mécanismes de défense des plantes (Zhuang et al., 2007 ; Weyens et al., 2009 ; Guo et al., 2020). Outre leurs effets positifs directs et indirects sur la production de biomasse, les bactéries associées aux plantes peuvent également contribuer à une augmentation de la disponibilité et de l'absorption des ETMs et à une diminution de la phytotoxicité de ces ETMs (Valls et de Lorenzo, 2002 ; Deb et al., 2020).

Par ailleurs, l'utilisation de souches de PGPR sélectionnées s'est révélée un puissant outil pour améliorer la phytoremédiation du pétrole et d'autres contaminants (Guo et al., 2015). Comparée à l'utilisation de plantes seules, la phytoremédiation assistée par PGPR peut fournir une meilleure croissance des plantes et résoudre la contamination des sols (Gurska et al., 2009 ; Huang et al., 2016 ; Shah, 2020).

Dans la présente étude, les sites choisis se situent dans le district minier d'Oujda. Ces sites sont extrêmement pollués car ils présentent des concentrations polymétalliques très fortes au niveau des déchets miniers, notamment en Pb, Zn et As (Smouni et al., 2010). Malgré un climat austère et une forte teneur en polluants, des plantes ainsi que les microorganismes qui leur sont associés parviennent à s'y développer. Ils sont à priori adaptés aux conditions de ces régions et représentent donc une ressource prometteuse pour le développement de stratégies de réhabilitation et de stabilisation des contaminants métalliques. On peut aussi espérer qu'ils pourraient promouvoir la transformation d'un environnement toxique en un substrat permettant l'établissement d'autres plantes, ce qui pourrait avoir un impact sociétal important en accélérant significativement les processus de réhabilitation des zones contaminées.

Toutes ces considérations nous ont amené à initier ce travail de thèse dont l'objectif global est de caractériser le système sols-plantes-microorganismes dans le district minier d'Oujda, à travers l'étude combinée des microorganismes associés à certaines plantes rencontrés dans différents types de déchets miniers (couverts ou nus, revégétalisés ou non, de façon naturelle ou artificielle...).

Dans le cadre de cet objectif global, plusieurs objectifs intermédiaires ont été fixés :

- (i) Caractériser les sols de cette région (sol nu ou rhizosphérique), en particuliers leur teneurs en éléments traces métalliques,

- (ii) obtenir une collection bactérienne des sols pollués de la région (rhizosphériques et non rhizosphériques) et analyser la diversité moléculaire de ces bactéries,
- (iii) étudier leur résistance aux ETMs et leurs activités biologiques potentiellement bénéfiques pour les plantes (solubilisation de phosphate, fixation d'azote, production de phytohormones, production des siderophores et autres...)
- (iv) évaluer le potentiel de l'inoculation par des souches élites sur la croissance de *Sulla spinossissima* L. dans les conditions de stress métallique.

Au terme de cette étude, nous espérons pouvoir proposer une collection de bactéries bénéfiques et tolérantes aux éléments traces métalliques, susceptibles d'être des candidats efficaces pour établir un programme de phytoremédiation assistée par les PGPR dans les sites miniers de l'Orient.

Synthèse bibliographique

I. Les éléments traces métalliques (ETMs)

Les éléments traces métalliques sont définis comme des éléments métalliques ayant une densité relativement élevée par rapport à l'eau ; ces éléments sont généralement définis comme des métaux lourds. Cependant, leur classification est toujours discutée puisque quelques métaux toxiques ne sont pas lourds tel que le zinc, et d'autres ne sont pas des métaux mais plutôt des métalloïdes comme l'arsenic. En bref, les éléments traces métalliques sont des éléments métalliques naturels dont la masse volumique dépasse 5 g/cm^3 . Ils englobent des métaux et métalloïdes toxiques pour l'environnement et la santé publique. Leur biodisponibilité est influencée par des facteurs chimiques, physiques et biologiques (Deb et al., 2020).

Les éléments traces métalliques sont subdivisés en :

- **Eléments traces essentiels** : ce sont des micronutriments essentiels, impliqués dans les fonctions vitales (Reeves et Baker, 2000) comme le fer (Fe), cuivre (Cu), le cobalt (Co), le zinc (Zn), le manganèse (Mn) et le chrome (Cr) et. Ces éléments traces sont tous toxiques à des concentrations élevées (GWRTAC, 1997 ; Reeves et Baker, 2000 ; Raikwar et al., 2008 ; Deb et al., 2020).
- **Eléments traces non essentiels** : Ils ne sont pas impliqués dans des fonctions vitales. C'est le cas du plomb (Pb), du mercure (Hg), de l'aluminium (Al) et du cadmium (Cd) (Deb et al., 2020). Ils sont généralement présents à l'état de traces dans la biosphère.

Les éléments traces métalliques les plus couramment rencontrés dans les sites contaminés sont le plomb, le chrome, l'arsenic, le zinc, le cadmium, le cuivre, le mercure (Hg) et le nickel (Ni) (GWRTAC, 1997).

La connaissance de la chimie de ces éléments traces métalliques, de l'environnement et leur effet sur la santé sont nécessaires pour comprendre leur spéciation, leur biodisponibilité et les solutions de traitement appropriées (Caporale et Violante, 2016 ; Qu et al., 2019). Leur répartition est contrôlée par des réactions telles que :

- (i) La précipitation et la dissolution des minéraux,
- (ii) L'échange d'ions, l'adsorption et la désorption,
- (iii) La complexation aqueuse,
- (iv) L'immobilisation et la mobilisation biologiques et
- (v) L'absorption des plantes (Levy et al., 1992).

I.1 Les principaux éléments traces métalliques rencontrés dans les sites miniers

I.1.1. Le plomb

Le plomb est un métal appartenant au groupe IV et à la période 6 du tableau périodique avec le numéro atomique 82, la masse atomique 207.2, la densité 11.4 g cm^{-3} , le point de fusion 327.4 °C et le point d'ébullition 1725 °C . Il s'agit d'un élément naturel, qui se trouve généralement comme un minéral combiné avec d'autres éléments, tels que le soufre (PbS , PbSO_4) ou l'oxygène (PbCO_3) ; il varie de 10 à 30 mg kg^{-1} dans la croûte terrestre. Bien que le plomb se manifeste naturellement dans l'environnement, les activités anthropiques telles que les mines et d'autres applications contribuent à la libération de concentrations élevées. Il est au cinquième rang derrière le Fe, Cu, Al et le Zn dans la production industrielle des ETMs (Bhat et al., 2020).

Les formes générales de Pb qui sont rejetées dans le sol, les eaux souterraines et les eaux de surface sont le plomb ionique, Pb (II), les oxydes et les hydroxydes de plomb. Les formes les plus stables de ce métal sont les complexes Pb (II) et plomb-hydroxy. Le plomb (II) est la forme la plus commune et la plus réactive, formant des oxydes et des hydroxydes mononucléaires et polynucléaires (GWRTAC, 1997). Les composés de Pb insolubles prédominants sont les phosphates de plomb et les carbonates de plomb qui se forment lorsque le pH est supérieur à 6 (Bhat et al., 2020).

L'exposition à cet élément peut entraîner des effets biologiques en fonction du niveau et de la durée de l'exposition ; les jeunes et les nourrissons étant les plus sensibles. Le plomb n'accomplit aucune fonction essentielle connue, c'est un métal particulièrement nocif, car il peut s'accumuler dans les organismes, et dans l'ensemble des chaînes alimentaires. Il peut causer des problèmes graves de santé publique en entraînant des lésions graves au niveau du système nerveux, des globules rouges, des reins et d'autres organes (Bhat et al., 2020 ; Shah, 2020).

A cela il faut rajouter ses effets indésirables sur les processus physiologiques chez les plantes. Il entraîne une inhibition des activités enzymatiques, des perturbations au niveau de la nutrition hydrique et minérale, il provoque une inhibition de la germination des graines et il est la cause du retard de la croissance des plantes. À de fortes concentrations, le Pb peut provoquer la mort cellulaire.

I.1.2. L'arsenic

L'arsenic est un métalloïde omniprésent, détecté à de faibles concentrations dans toutes les matrices environnementales. Il occupe le 20ème rang avec des concentrations dans la croûte continentale variant de 1 à 5 mg.kg⁻¹. C'est un métalloïde du groupe VA et la période 4 du tableau périodique qui se trouve dans une grande variété de minéraux, principalement sous forme de As₂O₃. Il a les propriétés suivantes : nombre atomique 33, masse atomique 75, densité 5.72 g cm⁻³, point de fusion 817 °C et point d'ébullition 613 °C et présente une chimie assez complexe et peut être présent dans plusieurs états d'oxydation (-III, 0, III, V) (Bhat et al., 2020).

Les fortes concentrations en arsenic retrouvées dans les écosystèmes sont liées aux apports issus de sources naturelles (activités volcaniques, érosion des sols...) et anthropiques (activités minières, industries chimiques et agricoles, ...). Ces dernières sont la principale cause de pollution des milieux tel que les sols, les eaux et l'atmosphère (Bhat et al., 2020).

La toxicité de l'arsenic est intimement liée à son processus de métabolisation, avec une toxicité différentielle entre l'As (III) et l'As (V) (Rahman et singh, 2020).

L'As(III) est la forme la plus toxique de l'arsenic, et cette toxicité est due à sa forte affinité pour les groupes hydrogéo-sulfurés qui font partie de nombreuses protéines et enzymes. Ces composés d'arsenic inhibent alors les activités enzymatiques, provoquant des symptômes plus ou moins sévères selon le mode et l'intensité de l'exposition. C'est un métalloïde qui peut causer des dommages cancérogènes, principalement à la peau, ainsi que des déficits au niveau de l'organisme (Rahman et Singh, 2020 ; Bhat et al., 2020).

I.1.3. Le zinc

Le zinc est un métal de transition avec les caractéristiques suivantes : période 4, groupe IIB, numéro atomique 30, masse atomique 65.4, densité 7.14 g cm⁻³, point de fusion 419.5 °C et point d'ébullition 906 °C. C'est un oligo-élément essentiel pour la santé humaine, caractérisé aussi par une bonne conductivité électrique. En biologie, le zinc est un cation divalent (Zn²⁺) qui s'associe facilement avec l'oxygène et les éléments non métalliques tels que les peptides, les acides aminés, les protéines et des nucléotides. C'est un métal qui se trouve naturellement dans le sol (environ 70 mg kg⁻¹ dans les roches de la croûte), mais les concentrations de Zn augmentent anormalement, en raison des activités anthropiques. La plupart du Zn est ajouté pendant les activités industrielles, telles que l'activité minière, la combustion des déchets et le charbon. Les sources industrielles ou les sites de déchets toxiques peuvent entraîner des concentrations de zinc susceptibles de causer des problèmes de santé.

En raison de l'accumulation de Zn dans les sols, les plantes ont souvent une absorption de Zn élevée qui ne peut être gérée par leurs systèmes. Le Zn peut aussi interrompre l'activité des sols, car il influence négativement l'activité des microorganismes, retardant ainsi la dégradation de la matière organique (Balafrej et al., 2020 ; Shah, 2020).

I.1.4. Le cuivre

Le cuivre est un métal essentiel à la croissance et au développement normal des plantes, bien qu'il soit également potentiellement toxique. Le cuivre (Cu) est considéré comme un micronutriment pour les plantes et joue un rôle important dans l'assimilation du CO₂ et la synthèse d'ATP. Mais l'intensification des activités industrielles et minières a contribué à l'augmentation de la présence de Cu dans les écosystèmes. Le Cu est également ajouté aux sols par différentes activités humaines, notamment l'extraction et la fusion de minerais contenant du Cu. L'excès de cet élément induit du stress et endommage les plantes. Cela entraîne un retard de croissance des plantes et une chlorose des feuilles. L'exposition des plantes à un excès de Cu induit un stress oxydatif et des ROS. Ce stress oxydatif perturbe les voies métaboliques et endommage les macromolécules (Pichhode et Nikhil, 2016 ; Rehman et al., 2022).

I.1.5. Le cadmium

Le cadmium est un métal largement distribué dans la croûte terrestre à une concentration moyenne d'environ 0,1 mg/kg. Il est fréquemment utilisé dans diverses activités industrielles, principalement dans la production de pigments et de batteries.

Les plantes cultivées dans un sol contenant des niveaux élevés de Cd présentent des symptômes visibles tels que la chlorose, l'inhibition de la croissance, le brunissement des extrémités des racines et finalement la mort. Il a été démontré que le Cd interfère avec l'absorption, le transport et l'utilisation de plusieurs éléments (Ca, Mg, P et K) et de l'eau par les plantes. Un excès de cadmium réduit aussi la germination des graines, diminue la teneur en éléments nutritifs des plantes et réduit la longueur des tiges et des racines.

Le cadmium peut être mortel s'il est inhalé ou ingéré. Après ingestion aiguë, des symptômes tels que douleurs abdominales, sensation de brûlure, nausées, vomissements, salivation, vertiges, choc, perte de conscience et convulsions apparaissent généralement dans les 15 à 30 minutes. L'exposition chronique au cadmium a un effet dépressif sur les niveaux de sérotonine et d'acétylcholine (Tchounwou et al., 2012 ; Pichhode et Nikhil, 2016 ; Jaiswal et al., 2022).

I.1.6. Le chrome

Le chrome (Cr) est un élément naturellement présent dans la croûte terrestre, avec des états d'oxydation allant du chrome (II) au chrome (VI). Le chrome pénètre dans diverses matrices environnementales (air, eau et sol) à partir d'une grande variété de sources naturelles et anthropiques, les rejets les plus importants proviennent d'établissements industriels. Les industries qui contribuent le plus à la libération de chrome comprennent le traitement des métaux, les installations de tannerie, la production de chromate, le soudage de l'acier inoxydable et la production de ferrochrome et de pigments de chrome. Le chrome rejeté dans l'environnement par l'activité anthropique se présente principalement sous la forme hexavalente [Cr(VI)], qui est un polluant industriel toxique classé cancérogène. Le danger pour la santé associée à l'exposition au chrome dépend de son état d'oxydation.

Le chrome est connu pour être un métal toxique qui peut causer des dommages aux plantes et aux animaux. Le stress oxydatif induit par le chrome implique l'induction d'une peroxydation lipidique chez les plantes qui cause de graves dommages aux membranes cellulaires. Le stress oxydatif induit par le chrome initie la dégradation des pigments photosynthétiques entraînant un déclin de la croissance. Une concentration élevée en chrome peut perturber l'ultrastructure du chloroplaste perturbant ainsi le processus photosynthétique. Ce stress peut induire d'autres modifications métaboliques chez les plantes comme la production accrue de métabolites (glutathion, acide ascorbique), qui peuvent causer des dommages aux plantes (Tchounwou et al., 2012 ; Pichhode et Nikhil, 2016 ; Kapoor et al., 2022).

I.1.7. Le mercure

Le mercure n'est pas essentiel à la croissance des plantes. La contamination des sols par le Hg est souvent due à l'ajout de ce métal lourd dans les engrais, les boues et les fumiers. La dynamique entre la quantité de Hg qui existe dans le sol et son absorption par les plantes n'est pas linéaire et dépend de plusieurs variables (la capacité d'échange cationique, le pH du sol, l'aération du sol et les espèces végétales). L'apport important de mercure (Hg) entraîne une contamination de la chaîne alimentaire. Le Hg est un métal unique en raison de son existence sous différentes formes, par exemple HgS, Hg^{+2} , Hg^0 et méthyl-Hg. Cependant, dans les sols agricoles, la forme ionique (Hg^{+2}) est prédominante. Le mercure rejeté dans le sol reste principalement en phase solide par adsorption sur les sulfures, les particules d'argile et les matières organiques. Un niveau élevé de Hg^{+2} est fortement phytotoxique pour les cellules végétales. Le niveau toxique de Hg^{+2} peut

induire des lésions visibles et des troubles physiologiques chez les plantes et peut interférer avec l'activité mitochondriale et induit un stress oxydatif en déclenchant la production de ROS.

Le mercure est une substance toxique et polluante répandue dans l'environnement qui induit de graves altérations des tissus corporels et provoque un large éventail d'effets néfastes sur la santé. Les humains et les animaux sont exposés à diverses formes chimiques de mercure dans l'environnement. Ceux-ci comprennent la vapeur de mercure élémentaire (Hg_0), le mercure inorganique (Hg^{+1}), le mercure (Hg^{+2}) et les composés organiques du mercure. Etant donné que le mercure est omniprésent dans l'environnement, les humains, les plantes et les animaux sont tous incapables d'éviter l'exposition à une certaine forme de mercure (Tchounwou et al., 2012 ; Pichhoda et Nikhil, 2016).

I.2. Les facteurs modifiant la rétention des éléments traces métalliques

L'accumulation des éléments traces métalliques dans les sols est une préoccupation majeure, et le risque n'est pas seulement dû aux concentrations totales mesurées dans les sols contaminés mais surtout à leur biodisponibilité (Adriano, 1986 ; McLaughlin et al., 2000). Des facteurs tels que les mécanismes de transport (la mobilité) et la chimie des sols et des eaux souterraines, peuvent influencer la distribution des polluants métalliques, leur forme et aussi leur concentration (GWRTAC, 1997). La mobilité des ETMs dans les sols est influencé par différents processus, tels que, l'adsorption, la dissolution et l'insolubilité (McBride, 1989). De plus des paramètres comme le pH, la température, le potentiel d'oxydo-réduction, la présence et la nature des colloïdes ainsi que la présence et la biomasse microbienne, influencent cette mobilité (McLaughlin et al., 2000 ; Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

I.2.1. Constituants impliqués dans la mobilité des éléments traces métalliques

Les minéraux primaires des sols sont issus de la roche mère, leur structure et leur grande taille présentent de très faibles propriétés réactives via les éléments trace métalliques (Seddoh et Pedro, 1975; Kabata-Pendias et Pendias, 2001), par la suite ses minéraux peuvent être la source des minéraux secondaires directement ou indirectement, ces minéraux secondaires (argiles, des phosphates, oxyhydroxydes d'aluminium et de fer et les sulfates) sont de petite taille par rapport aux minéraux primaires et ils sont les constituants principaux de sol qui jouent un rôle important dans la rétention des éléments traces métalliques par des mécanismes tels que la transformation redox, l'adsorption, et d'autres. A ces différents constituants, s'ajoute la matière organique issue de la décomposition des organismes vivants. L'ensemble de ces éléments joue un rôle important

dans le transport et l'accumulation des ions métalliques (Machemer et Wildeman, 1992 ; Kabata-Pendias et Pendias, 2001 ; Bradl, 2004 ; Huang et Gong, 2005 ; Caporale et Violante, 2016).

I.2.2. Le pH

L'influence du pH sur la mobilité et la rétention des éléments traces métalliques dans les sols a fait l'objet d'un intérêt et d'une préoccupation. À des niveaux de pH bas (environ 4,5 ou moins), beaucoup des éléments traces métalliques restent sous forme soluble, ce qui permet un bon potentiel de transport dans le système de lixiviat-sol (McBride, 1989 ; Schindler et Sposito, 1991 ; McLaughlin et al., 2000).

Kabata-Pendias et Pendias (2001) ont également montré qu'une augmentation de pH entraîne l'augmentation de la capacité d'échange cationique permettant une adsorption de cations. De plus, elle conduit à une dissolution de matières organiques. La quantité des éléments traces métalliques retenue et la sélectivité de la rétention dépend du sol et de sa composition aussi de la présence de ligands (Harter, 1979 ; Sposito et al., 1982 ; Yanful et al., 1988 ; Yong et al., 1990, 1993 ; Chaignon, 2001).

I.2.3. La température

La température a un impact direct sur la mobilité des contaminants métalliques par la dissolution des complexes fixant les ETMs et un impact indirect, en modifiant la teneur en eau du sol, le pH et le potentiel d'oxydo-réduction (Stumm et Morgan, 1981).

Par ailleurs, ce paramètre agit aussi sur l'activité biologique du sol, et la biomasse microbienne. Ainsi, une élévation de la température pourrait accélérer certains phénomènes tels que les processus d'oxydo-réduction, la production de composés acides et autres.

I.2.4. L'adsorption

C'est un mécanisme qui contrôle les concentrations des ETMs présents dans le sol. Il s'agit d'une accumulation des molécules à l'interface sol/eau ou à l'interface sol/air (Manceau et al, 2002), et selon les énergies de liaisons, on assiste à deux types d'adsorption : adsorption physique et adsorption chimique (Alloway, 1995 ; Chaignon, 2001 ; Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

I.2.5. Le potentiel d'oxydo-réduction

Le potentiel d'oxydo-réduction (redox), permet de caractériser les échanges d'électrons entre les éléments chimiques. Des variations de potentiels redox déterminent les équilibres de

dissolution/précipitation d'oxydes de Fe et de Mn dans les sols. En anaérobie, ces composés sont solubles et libèrent les ETMs qui leurs sont fixés. Par contre en aérobie, ces oxydes ferriques et manganiques étant peu solubles, permettent l'immobilisation des ETMs (Lindsay, 1979 ; Calmano et al., 1993 ; Alloway, 1995 ; Chuan et al., 1996). Dans un sol, le potentiel d'oxydo-réduction varie inversement au pH (Deneux-Mustin et al., 2003). Cependant, en raison du grand nombre des couples d'oxydo-réduction, l'impact de ce paramètre rest encore difficile à comprendre (Caporale et Violante, 2016 ; Qu et al., 2019 ; Rahman et Singh, 2020).

I.2.6. L'activité biologique

Les microorganismes et leurs activités métaboliques jouent un rôle prépondérant dans la solubilité des éléments traces métalliques, à travers multiples actions et interactions ce qui rend les phénomènes biologiques difficile à appréhender. Ils contribuent dans plusieurs processus du sol, commençant par la production, la consommation, jusque le transport des éléments des écosystèmes (Kabata-Pendias, 2004). Les microorganismes interviennent dans la mobilité des ETMs par plusieurs phénomènes, la dissolution, l'insolubilisation et la volatilisation (Chaignon, 2001 ; Sand et Gehrke, 2006 ; Rahman et Singh, 2020).

I.3. Sources des éléments traces métalliques dans les sols contaminés

Les ETMs se retrouvent naturellement dans l'environnement du sol à cause des processus pédogénétiques, des affleurements de roche-mère, dont l'altération provoque une libération des éléments métalliques dans le sol, mais aussi à cause des éruptions volcaniques (Friedland, 1990). La concentration naturelle de ces ETMs dépend de la nature de la roche, sa localisation et son âge (Zhang et al., 2009 ; Deb et al., 2020).

Cependant, la source majeure de contamination est d'origine anthropique à cause de leur mobilité et leur biodisponibilité. Ainsi, les ETMs peuvent provenir de diverses sources sous forme de résidus de mines des éléments traces, d'élimination de déchets métalliques élevés dans des décharges improprement protégées, de procédés d'extraction et de broyage des ETMs et déchets industriels, d'épandage d'engrais, d'engrais animaux et de biosolides (boues d'épuration), de compost, de pesticides, de résidus de combustion du charbon, de produits pétrochimiques et de dépôts atmosphériques (Deb et al., 2020, Saxena et al., 2020).

II. Les mécanismes impliqués dans la résistance des bactéries aux éléments traces métalliques

Afin de protéger ces propres composants et faire face à l'effet toxique des éléments traces métalliques, les cellules développent des systèmes d'adaptation et de résistance. Limiter l'accès des ETMs ou modifier les composants cellulaires diminue leur sensibilité aux ETMs. Plusieurs facteurs déterminent l'étendue de la résistance dans un microorganisme : le type et le nombre de

mécanismes pour l'absorption des ETMs, le rôle que chaque métal joue dans le métabolisme normal et la présence de gènes situés sur des plasmides, des chromosomes ou des transposons qui contrôlent la résistance des ETMs. Plusieurs mécanismes sont postulés pour être impliqués dans la résistance aux ETMs (Rouch et al., 1995).

Lors d'un excès des ETMs, les bactéries rétablissent l'homéostasie (synthèse de transporteurs...), et se protègent des effets du stress par la modification de l'enveloppe, formation de biofilm, motilité ou sporulation. La réponse peut être spécifique ou générale et cela selon la nature du stress (Trepreau, 2011). Pour que les bactéries puissent tolérer et résister aux ETMs, les concentrations intracellulaires en ces éléments traces doivent être régulées grâce à l'homéostasie ou au système de régulation de résistance des ETMs. Pour cela, différentes stratégies ont été développées face au stress métallique faisant intervenir un ou plusieurs mécanismes afin de protéger les cellules (Figure 1).

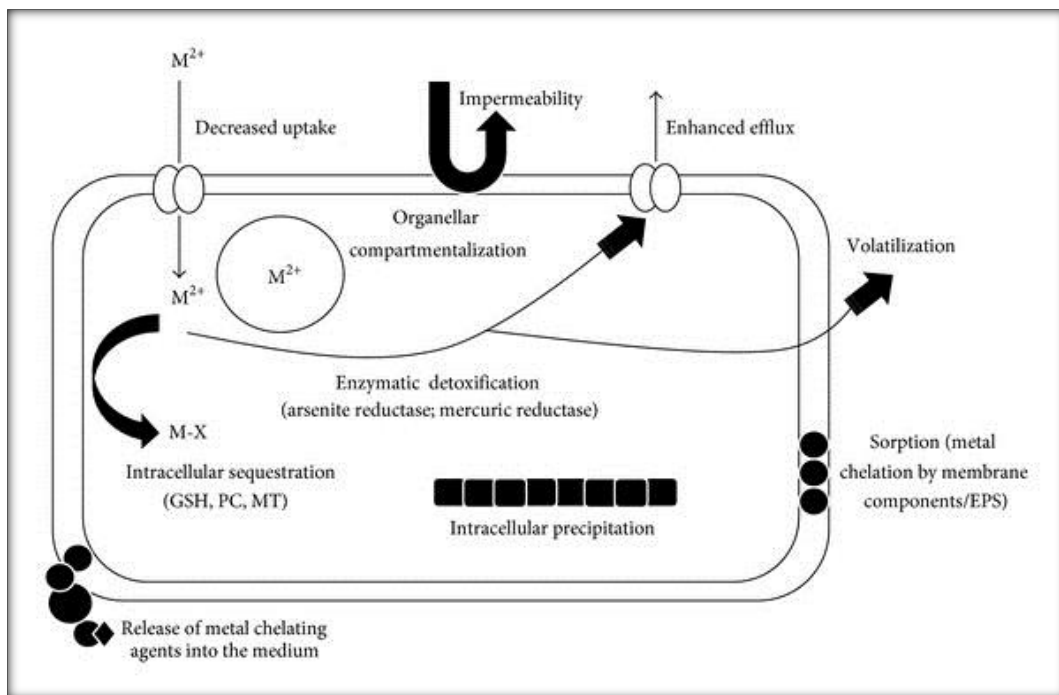


Figure 1 : Mécanismes généraux adoptés par les bactéries pour la résistance aux éléments traces métalliques (Srivastava et Kowshik, 2013).

II.1. Exclusion du métal par l'imperméabilité membranaire

Les modifications dans la paroi cellulaire, la membrane ou l'enveloppe d'un microorganisme sont des exemples d'exclusion de métal par barrière de perméabilité. Ce mécanisme est une tentative de l'organisme de protéger les composants cellulaires essentiels. Un exemple important est l'exclusion de Cu (II) résultant de la production altérée de la protéine du canal de membrane par *E. coli* B (Rouch et al., 1995). Il s'agit généralement d'une seule mutation du gène, qui diminue

la perméabilité de la membrane aux ions métalliques (Ji et Silver, 1995 ; Etesami, 2018 ; Singh et al., 2020b).

II.2. Séquestration intracellulaire des éléments traces métalliques

La séquestration intracellulaire est l'accumulation des ETMs dans le cytoplasme pour empêcher l'exposition aux composants cellulaires essentiels. Ce mécanisme repose sur la production des protéines chélatrices qui vont séquestrer les ions métalliques et vont permettre une protection aux composants de la cellule. Aussi l'accumulation intracellulaire des ETMs par les microorganismes est généralement médiée par un système de transport dépendant de l'énergie. Cet événement a été observé chez toutes les catégories de microorganismes (Brierley, 1990 ; Gadd, 1990 ; Etesami, 2018). Le potentiel de membrane peut être un déterminant important dans l'afflux des ETMs. L'absorption intracellulaire des ETMs peut être affectée par des facteurs, y compris le pH externe, la présence d'autres ions métalliques et la présence de matières organiques. Après l'accumulation des éléments traces intracellulaires, la neutralité électrique à l'intérieur de la cellule peut être maintenue par l'efflux des ions potassium. On observe que les ETMs accumulés précipitent dans la cellule ou se lient aux composants cellulaires (Gadd, 1990 ; Sakurai et al., 1990), ce qui diminue la toxicité des ETMs dans la cellule vivante (Etesami, 2018).

II.3. Détoxification enzymatique

Il s'agit de la transformation chimique des toxiques en des espèces moins nocives, en modifiant l'état d'oxydo-réduction. Exemple de l'arsenic qui pénètre dans la cellule à travers les canaux phosphate ou aquaglyceroporines, l'arséniate As(V) est réduit en arsénite As(III) à travers l'arséniate réductase (ArsC), puis extrudé à travers la protéine ArsB. L'arsénite peut aussi servir de donneur d'électrons et s'oxyder en arséniate, qui peut être utilisé comme accepteur final d'électrons pendant la respiration cellulaire. Par ailleurs l'arsenic inorganique peut être complexé avec des résidus de cystéine peptidique ou transformé en espèces organiques à partir de complexes avec des cascades de méthylation (Figure 2) (Etesami, 2018).

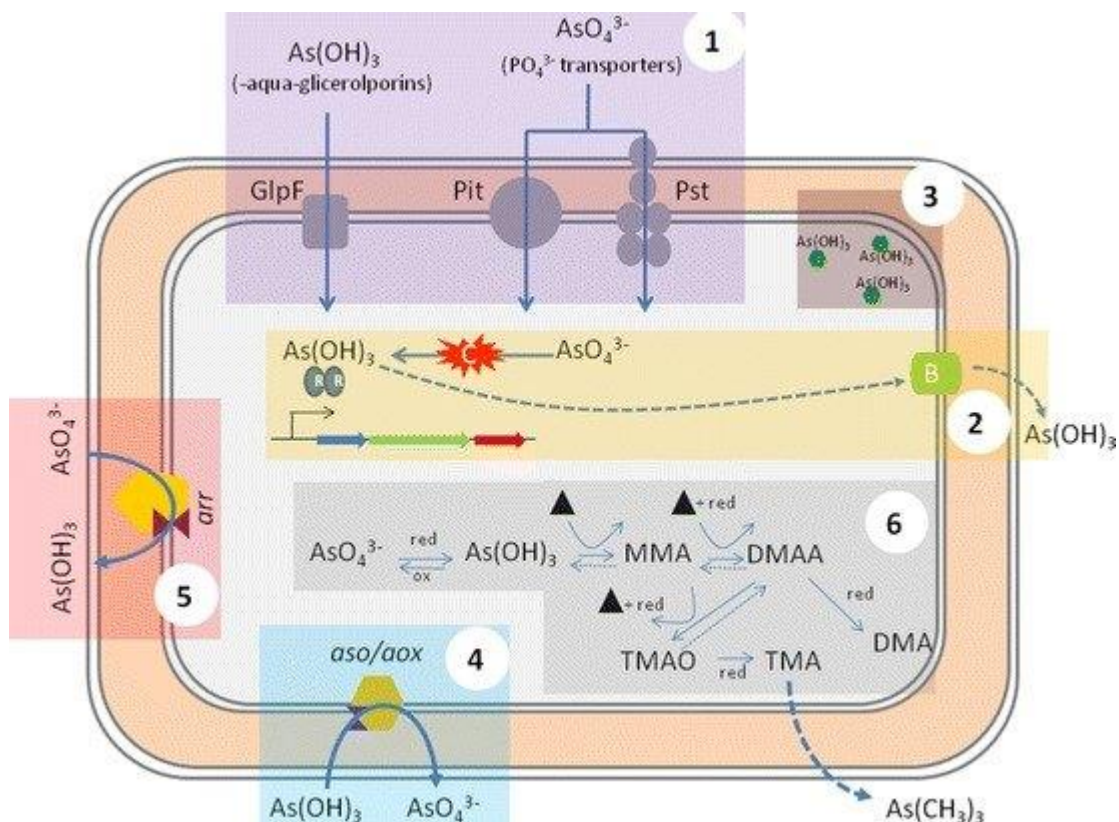


Figure 2 : Principaux mécanismes de transformation et de résistance à l'arsenic chez les bactéries (Paez-Espino et al., 2009).

II.4. La réduction de la sensibilité des cibles cellulaires des éléments traces métalliques

Ce système de défense s'appuie sur les mutations, qui permettent une diminution de la sensibilité sans perturber les fonctions de la cellule. Certains microorganismes s'adaptent à l'excès des éléments métalliques en affaiblissant la sensibilité de composants cellulaires essentiels ; cela fournit un degré de protection naturelle (McEntee et al., 1986 ; Mergeay, 1991 ; Rouch et al., 1995). A titre d'exemple le glutathion peut être protégé contre les ions métalliques comme Ag (I), Hg (II), Cu (I, II), Fe (II), et Cd (II) en supprimant la formation des radicaux libres (Rouch et al., 1995 ; Etesami, 2018).

II.5. Transport actif du métal : mécanisme d'efflux

Lors d'un stress, les plasmides portant les gènes codant pour les systèmes d'efflux, joue un rôle crucial dans la mobilisation entre les organismes d'une même communauté.

Ces systèmes de transport ou d'effluents actifs représentent la plus grande catégorie de systèmes de résistance aux éléments traces, ils sont utilisés par les microorganismes pour exporter des

éléments traces métalliques toxiques à partir de leur cytoplasme. Les éléments traces non essentiels entrent normalement dans la cellule par des systèmes de transport de nutriments normaux mais sont rapidement exportés. Ces systèmes d'efflux peuvent être non-ATPase ou liés à l'ATPase et hautement spécifiques pour le cation ou l'anion qu'ils exportent (Silver et al., 1989 ; Nies et Silver, 1995 ; Etesami, 2018).

Ces transporteurs possèdent une forte affinité et permettent le maintien de faibles concentrations métalliques dans le cytosol (Mergeay et al., 1987 ; Nies et Silver, 1995 ; Nies, 2003). On assiste aux trois principales familles de protéines de l'efflux chez les microorganismes (Nies, 2003) (Figure 3) :

- Les systèmes « **resistance-nodulation-cell division** » (RND) Le premier membre identifié de la famille RND était la protéine *CzcA* de *Cupriavidus metallidurans* suivie de la protéine *CnrA* de la même bactérie (Saier et al., 1994). Cette β -protéobactérie contient deux mégaplasmides impliqués dans la résistance aux éléments traces métalliques, pMOL30, qui permet la résistance au Zn, Co et au Cd, tandis que le second plasmide, pMOL28, assure la résistance au Ni et au Co. L'efficacité de ce système est due aux diminutions des concentrations cytoplasmique et périplasmique. Ce qui permet l'excrétion des cations avant même leur entrée dans la cellule (Nies, 2003).
- Les systèmes « **cation diffusion facilitators** » (CDF) sont des systèmes d'efflux contrôlés par le gradient de concentration. Ces systèmes sont responsables de la résistance de haut niveau du cadmium, cobalt et zinc, qui sont présents dans le cytoplasme. La plupart des protéines de cette famille sont appliquées dans la résistance aux zinc (*CzcD* chez *Cupriavidus metallidurans* CH34, *ZitB* chez *E. coli*...). Leur expression est induite par la présence de Zn (Nies, 1999).
- Les systèmes « **P-type ATPases** » forment une grande famille des transporteurs actifs impliquée dans l'efflux (import/export) des éléments traces métalliques, ils utilisent de l'ATP comme source d'énergie. Les Zn-CPx-type ATPases sont les exemples les plus connus de ce système, elles sont impliquées dans le transport de Pb, Zn et Cd du cytoplasme vers le milieu extérieur. *CadA*, est la première protéine ; décrite chez *Staphylococcus aureus* ; est impliquée dans le transport de cadmium, découverte (Nies, 2003).

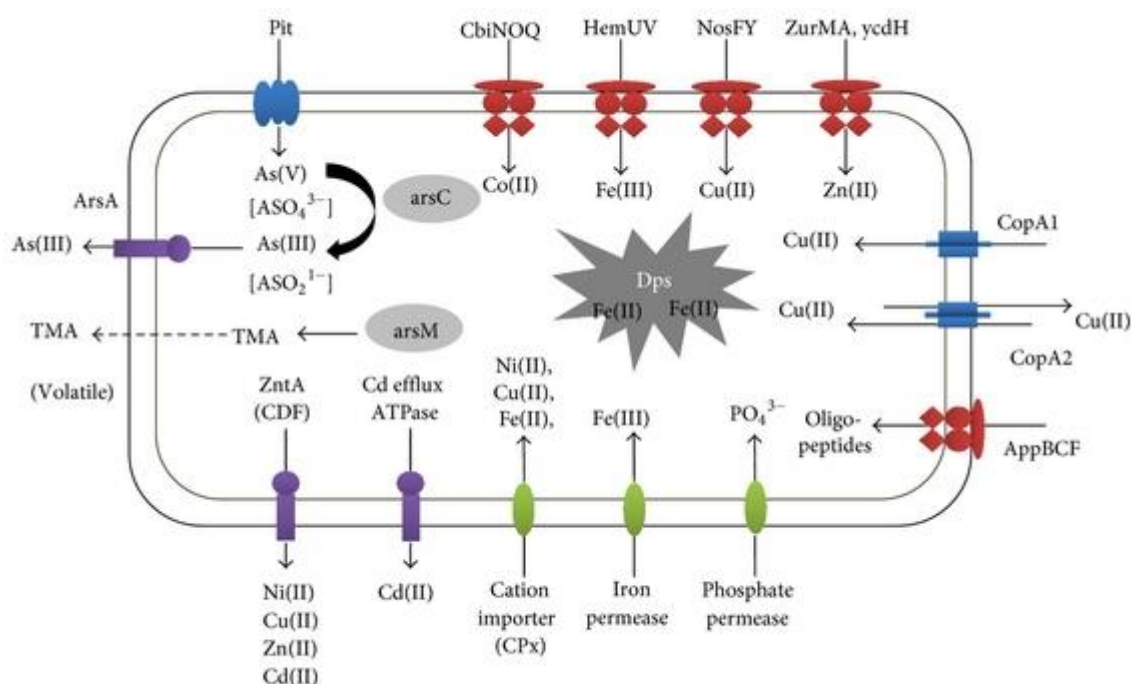


Figure 3 : Les principales familles de protéines impliquées et les divers transporteurs jouant un rôle dans le transport des éléments trace métalliques, le maintien de l'homéostasie et la résistance aux éléments traces (Srivastava et Kowshik, 2013).

II.6. La biogénèse

L'enveloppe cellulaire est une interface entre l'environnement extérieur et le milieu intracellulaire, elle est exposée au stress extracellulaire et sa physiologie joue un rôle clé dans l'adaptation aux variations environnementales. Le stress peut provoquer un problème de dénaturation des protéines de la membrane externe (PME) et peut conduire à une accumulation de protéines mal repliées dans le périplasma qui peut devenir toxique pour la bactérie. La morphologie de l'enveloppe cellulaire est contrôlée par une régulation fine lors d'un stress environnemental et cela se fait par la production de nouvelles protéines de la membrane, l'activation de la synthèse de protéase, de chaperones ou de protéines de maturation. On assiste aussi à une modification de la morphologie par la formation de spores de résistance, la production des exopolysaccharide, l'acquisition de structures extracellulaires utilisées pour la motilité ou pour l'adhésion à une surface (biofilm) (Cleiss-Arnold, 2010).

II.7. La motilité

La motilité permet aux bactéries de réagir à des stimuli (les sucres, les acides aminés, l'oxygène) et de fuir au microenvironnement stressé. Cette motilité permet aux bactéries de se développer selon deux modes de vie que l'on appelle planctonique ou biofilm (Cleiss-Arnold, 2010).

- **Motilité active**

Dans ce mode les bactéries se déplacent de manière isolée à l'aide d'un flagelle polaire ou plusieurs flagelles qui émergent de la surface cellulaire et leur confèrent une capacité de déplacement actif (motilité) (Cleiss-Arnold, 2010).

- **Mode biofilm**

Les bactéries formant des biofilms sont adaptées à la survie et aux stress environnementaux, on peut s'attendre à ce que différentes espèces microbiennes, individuellement ou en consortiums de biofilms, chacun avec des voies de dégradation métabolique différentes, puissent dégrader individuellement ou collectivement plusieurs polluants (Filloux et Vallet, 2003 ; Hall-Stoodley et al., 2004 ; Uroz et al., 2009). Le biofilm est une population bactérienne fixée sur un support et enveloppée d'une matrice d'exopolysaccharides hydratés (Flemming et Wingender, 2010). Souvent, les bactéries représentent un pourcentage très faible de la masse sèche du biofilm par rapport à la matrice qui constitue plus de 90% (Flemming et Wingender, 2010). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, la matrice est constituée d'un mélange de polysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques (Filloux et Vallet, 2003).

Cependant, la formation du biofilm est influencée par plusieurs facteurs tels le quorum sensing (QS) via des molécules de signalisation, la mobilisation des bactéries, les concentrations des exopolysaccharides et en protéines, la présence des nutriments (Gorbushina, 2007 ; Flemming et Wingender, 2010). Bien que leur altération est un processus complexe, les biofilms et leur matrice d'exopolysaccharides par le biais de pH peuvent modifier les substrats (Barker et al., 1997 ; Welch et Ullman, 1993).

II.8. La production d'exopolysaccharides de surface (EPS)

La plupart de microorganismes peuvent produire des exopolysaccharides qui sont susceptibles de modifier la mobilité des ETMs (Chen et al., 1995). Ce dernier est souvent décrit comme de la bioleaching (Gadd, 2009 ; Uroz et al., 2009).

Les EPS sont des polymères constitués de plusieurs oses, excrétés par des microorganismes dans le milieu. Ces substances acides sont mobiles et très réactives avec les éléments traces métalliques à cause de leur richesse en groupements chargés négativement, comme les phosphates, les hydroxyles, le pyruvate, et les acides uroniques (Geesey, 1982 ; Chen et al., 1995). La majorité des ETMs sont connus pour leur capacité à se lier aux polysaccharides. Ces polymères sont surproduits en réponse à un stress environnemental, ils ont de très bonne propriété de rétention des ETMs avec des variations d'affinité et de spécificité.

Ils jouent un rôle crucial dans la formation d'agrégats cellulaires et protègent les microorganismes du stress environnemental (Figure 4). Les EPS produits par les microorganismes sont d'un intérêt important dans la bioremédiation par leur participation dans la floculation des ions métalliques (Desaunay, 2011 ; Saur, 2014). L'utilisation de ces substances semble être une alternative efficace et économique. Les bactéries qui forment naturellement un revêtement d'exopolysaccharides extracellulaires ont la capacité de bioabsorption des ions métalliques, les empêchant d'interagir avec des composants cellulaires vitaux (Scott et Palmer, 1988,1990). Le revêtement d'exopolysaccharides de ces bactéries peut fournir des sites pour la fixation des cations métalliques (Scott et Palmer, 1988). Plusieurs bactéries démontrent la capacité de lier les ETMs de manière extracellulaire comme *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas putida* et *Arthrobacter viscosus* (Scott et Palmer, 1988, 1990 ; Mergeay, 1991 ; Gowri et Srivastava, 1996 ; Choudhary et Sar, 2009 ; Singh et al., 2020b).

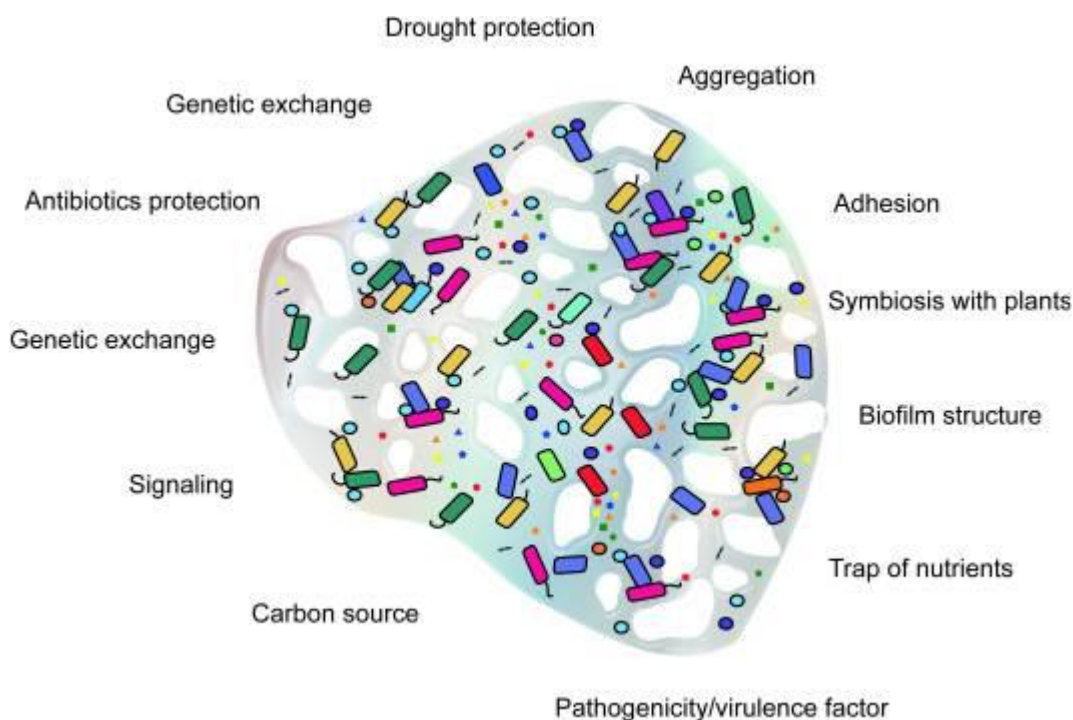


Figure 4: Les rôles des polymères extracellulaires microbiens dans le sol (Costa et al., 2018).

II.9. Le système quorum sensing (QS)

Il implique des systèmes cellulaires dédiés pour la sécrétion et la détection de molécules de communication, parfois appelées quormones (quorum sensing pheromones). Dans les espèces bactériennes qui utilisent le QS, chaque cellule sécrète une quantité de molécules de communication à faible densité cellulaire. Au fur et à mesure que la densité cellulaire augmente, la concentration de la molécule de communication augmente également, à condition que les cellules ne soient pas trop éloignées. Les molécules de communication se lient aux récepteurs spéciaux quand leur concentration dépasse un certain seuil. Chez les bactéries, les phénotypes régulés par le QS comprennent la bioluminescence, la production d'exopolysaccharides, la virulence, le transfert de plasmides conjugués, la formation de biofilm et l'inhibition de la croissance. Certains quorum sensing régulent la formation de biofilm durable, c'est le cas de l'acylhomoserine lactone (acyl-HSL), qui est une molécule de détection de quorum produite habituellement dans un biofilm qui la rend durable (Miller et al., 2001).

III. Mécanismes d'adaptation et de tolérance des plantes aux éléments traces métalliques

En réponse à la sélection, l'adaptation des plantes est progressivement acquise selon l'évolution. Seul quelques espèces seraient capables de se croître dans des sols contaminés (Wu et al., 1975 ; Macnair, 1993). En plus du phénomène d'adaptation, la tolérance aussi peut être un caractère

constitutif (McNaughton et al., 1974 ; Lehmann et Rebel, 2004 ; Matthews et al., 2004). Trois grands types de stratégies d'adaptation vis-à-vis des contaminants métalliques sont notés : Les accumulateurs, les excluders et les indicateurs (Antonovics et al., 1971 ; Baker, 1981 ; Kuleff et Djingova, 1984 ; Baker, 1987).

III.1. Les éléments traces métalliques dans la plante

La photosynthèse et la respiration nécessitent la présence des ETMs. Ces éléments traces assurent la biosynthèse des protéines, de chlorophylle, de substances de croissance, et ils jouent un rôle d'accepteurs ou de donneurs d'électrons, très important dans les systèmes enzymatiques par le biais des réactions d'oxydoréduction (Rengel, 1999 ; Chaignon, 2001 ; Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Cependant sont toujours considérés toxiques comme Hg, Ni, Cr, Cd et Pb (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

Les ETMs sont absorbés par diffusion à travers l'apoplaste du cortex racinaire, par la suite leur transport passif se fait par les pores de cellulose, de l'hémicellulose et des glycoprotéines de la paroi cellulaire (Briat et Lebrun, 1999). Le transport devient actif par la suite au niveau de la membrane plasmique des cellules de la bande de Caspary, permettant un transfert contre le gradient de concentration (Greger, 1999 ; Sanita di Toppi et Gabbrielli, 1999; Chaignon, 2001; Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

Après leur absorption, ces éléments sont transportés dans le xylème vers les parties aériennes, qui peut nécessiter ou non la prise en charge par les acides aminés, les acides organiques et divers peptides (Alloway, 1995 ; Foy et al., 1978 ; Greger, 1999). Chez certaines espèces la translocation, pouvant conduire à une accumulation des ETMs dans la partie aérienne (Foy et al., 1978). Toutefois, chez d'autres plantes, la nicotianamine, pourrait être responsable du transport des ETMs Fe, Cu, Zn et Mn, dans la sève du phloème (Briat et Lebrun, 1999).

Certaines plantes sont des hyperaccumulatrices à cause de leur capacité d'accumuler des quantités inhabituelles d'éléments traces (e.g. *Alyssum bertolonii*, *Pycnantha acuminata*, *Silene cobalticola*, *Noccaea caerulea*, *Brassica napus*). Les ETMs ayant pénétré dans le cytoplasme de la cellule, grâce à diverses molécules ils sont stockés pour éviter tout dommage cellulaire (Brooks, 1998).

III.2. Toxicité et tolérance chez les plantes

La présence des ETMs provoque la chlorose foliaire, le jaunissement progressif, des lésions nécrotiques et repliement ou dessèchement des feuilles et une inhibition de la croissance des plantes. Ces dommages résultent d'un stress oxydatif, dû à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les ROS entraînent une inhibition de l'activité enzymatique, une perturbation

de la photosynthèse et la respiration, l'induction de peroxydation lipidique, cassures au sein de l'ADN, pouvant conduire à la mort cellulaire (Devi et Prasad, 1999 ; Cheng, 2003). Pour éviter ces inconvénients, trois mécanismes largement prépondérant de stockage ou de détoxification des ETMs accumulés ont été étudiés, notamment la variation de la perméabilité membranaire, le système anti-oxydant, et la chélation intracellulaire.

III.2.1. La membrane plasmique

Le plasmalemmme joue un role important dans la régulation du transport métallique, car les ions ne peuvent pas diffuser librement à tavers la double couche phospholipidique de la membrane plasmique des cellules racinaires (Lasat, 2002). L'accumulation des ions toxiques, se fait par une modification des flux ioniques, par des systèmes spécifiques (Meharg, 1993). La protection de l'intégrité membranaire ou à la protection de la fonction des protéines associées au plasmalemmme (transporteurs, les canaux ioniques et les pompes à protons) permet une tolérance aux éléments traces métalliques (De Vos et al., 1992 ; Eide et al., 1996 ; Briat et Lebrun, 1999).

III.2.2. Système anti-oxydant

Le système anti-oxydant sont la première ligne de défense et joue un rôle prépondant dans la détoxification des ETMs ayant pénétrés dans la cellule. Il existe plusieurs enzymes antioxydantes associées chez les plantes, et la synthèse de ces enzymes est connue pour être améliorée lors de l'exposition à des stress oxydatifs. Les ROS comprennent des radicaux libres, tels que les radicaux superoxydes ($\bullet\text{O}_2^-$), les radicaux hydroxyles ($\bullet\text{OH}$), les radicaux perhydroxyles (HO_2^-) et les radicaux alcoxy, et des formes non radicalaires, c'est-à-dire le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), présent dans les parties intra- et extracellulaires de la plante.

En effet, les cations sont capables de céder un ou plusieurs électrons susceptibles de réduire l'oxygène et ses dérivés. La plus connue de ces réactions est la réaction de Fenton, le radical hydroxyle $\bullet\text{OH}$ produit, est un puissant agent oxydant. Ainsi que la réaction d'Haber-Weiss qui aboutit à la production du radical hydroxyle (Sanita di Toppi et Gabbrielli, 1999 ; Bonnot, 2009).

Trois activités enzymatiques importantes pour la détoxification des ROS : il s'agit des catalases (CAT), des peroxydases (POX) et des superoxyde-dismutases (SOD). Ces enzymes conduisent après une cascade de réactions à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (Girardi, 2006 ; Nzengue, 2008).

Les superoxyde-dismutases (SOD), catalysent la dismutation de l'anion superoxyde ($\bullet\text{O}_2^-$) pour former H_2O_2 et O_2 . Ces enzymes sont considérées comme l'un des principaux systèmes

enzymatiques et existent sous différentes isoformes, dont la structure est très conservée au cours de l'évolution.

Les catalases (CAT), ne nécessitent aucun réducteur pour son activité catalytique, car dans cette réaction en deux étapes, H_2O_2 oxyde d'abord le Fe présent dans le CAT, créant un peroxyde de fer intermédiaire appelé composé I. L'enzyme peut rester dans cet état de repos si la concentration de H_2O_2 est faible. Cependant, à une concentration plus élevée en H_2O_2 , la deuxième molécule de H_2O_2 sert de réducteur pour ce composé intermédiaire I, produisant ainsi l'enzyme et libérant de l'eau et de l'oxygène dans la deuxième étape.

Les peroxydases (POX), sont des glycoprotéines qui sont synthétisées via la voie du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, conduisant à leur sécrétion soit dans l'espace extracellulaire, soit dans les vacuoles. Sous sa forme native, POX fonctionne comme un seul polypeptide dans la majorité des plantes. Les POX nécessitent la présence d'un substrat particulier pour réaliser leurs activités (acide ascorbique (Asc) et le glutathion (GSH)) (Noctor et Foyer, 1998 ; Foyer et Noctor, 2000) (Figure 5).

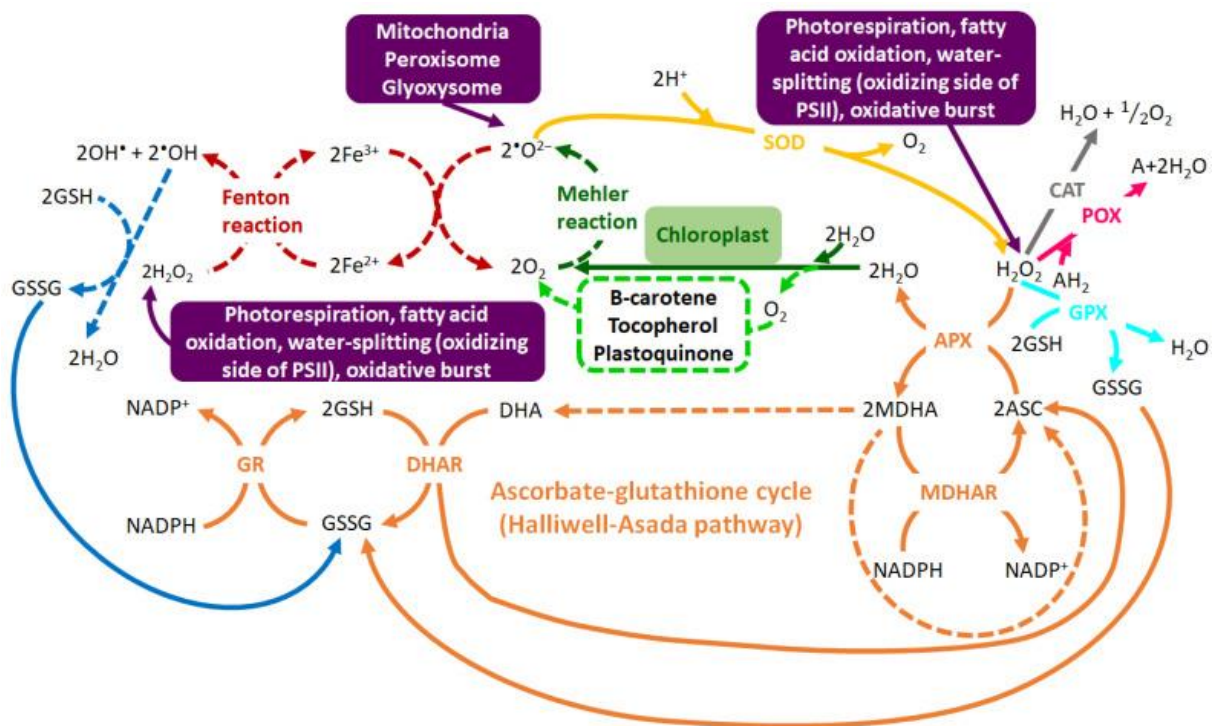


Figure 5 : Le réseau complexe du système oxydant-antioxydant hautement régulé (Da Silva et al., 2013).

III.3. La chélation

Chez les plantes, quatre groupes principaux de ligands intracellulaires qui jouent un rôle clé dans la complexation et donc dans la détoxification de nombreux ions métalliques :

- **Les métallothionéines (MT)** sont un groupe de protéines de bas poids moléculaire, elles se trouvent dans le cytoplasme des cellules. Elles ont une teneur élevée en cystéine (environ 30 %). Elles sont caractérisées par leur richesse en cations métalliques surtout le Cu et le Zn. Bien que leur structure tridimensionnelle soit bien conservée (Misra et Genamu, 1989 ; Murphy et Taiz, 1995).

- **Les phytochélatines (PC)** sont des chélateurs intracellulaires rencontrés chez les végétaux. De nature peptidique, elles ont assez de similarités de structure et de fonction avec les métallothionéines (Schild, 2013).

- **Les acides organiques** sont des molécules impliquées dans l'accumulation. Leur synthèse est stimulé par la présence des ETMs, elles assurent le transport xylémien des ions des racines vers les parties aériennes de la plante (Ma et al., 1997).

- **Les acides aminés libres**

Lors d'un stress métallique, les acides aminés libres s'accumulent et sont impliqués dans la chélation des ETMs, notamment du nickel et du zinc et (Krämer et al., 1996 ; Briat et Lebrun, 1999 ; Bert, 2000).

IV. Les techniques de bioremédiation

Bien que les ETMs soient présents naturellement dans la croûte terrestre, l'industrialisation et l'exploitation des mines permet la dispersion des ETMs dans les écosystèmes, en provoquant de graves conséquences sur l'environnement et les organismes vivants, d'où la nécessité de dépolluer les sites contaminés.

La plupart sites contaminés par des éléments trace métalliques était traitée par des approches physicochimiques tel que l'excavation, la fixation ou le lessivage du sol (Salt et al., 1995). Ces différentes méthodes altèrent significativement la qualité agronomique des sols en plus qu'il s'agit des méthodes onéreuses.

Pour cela les méthodes biologiques sont des alternatives acceptables, puisqu'elles permettent de rétablir efficacement les environnements pollués dans une approche écologique et à un coût très faible. Les chercheurs ont ainsi développé et modélisé différentes techniques de bioremédiation qui présentent de nombreux avantages environnementaux et économiques par rapport aux méthodes chimiques et physiques (Figure 6) (Agrwal et al., 2020) ; cependant, en raison de la nature et du type de polluant, il n'existe pas de technique de bioremédiation unique pour restaurer les environnements pollués (Rahman et Singh, 2020 ; Skinder et al., 2020). Parmi elles de

nouvelles technologies basées sur des procédés microbiologiques qui permettent de diminuer ou de rendre moins toxiques les polluants. Dans ce cadre, les microorganismes indigènes présents dans des environnements pollués peuvent constituer la clé pour résoudre la plupart des défis liés à la bioremédiation des substances polluantes à condition que les conditions environnementales conviennent à leur croissance et à leur métabolisme (Alka et al., 2020;).

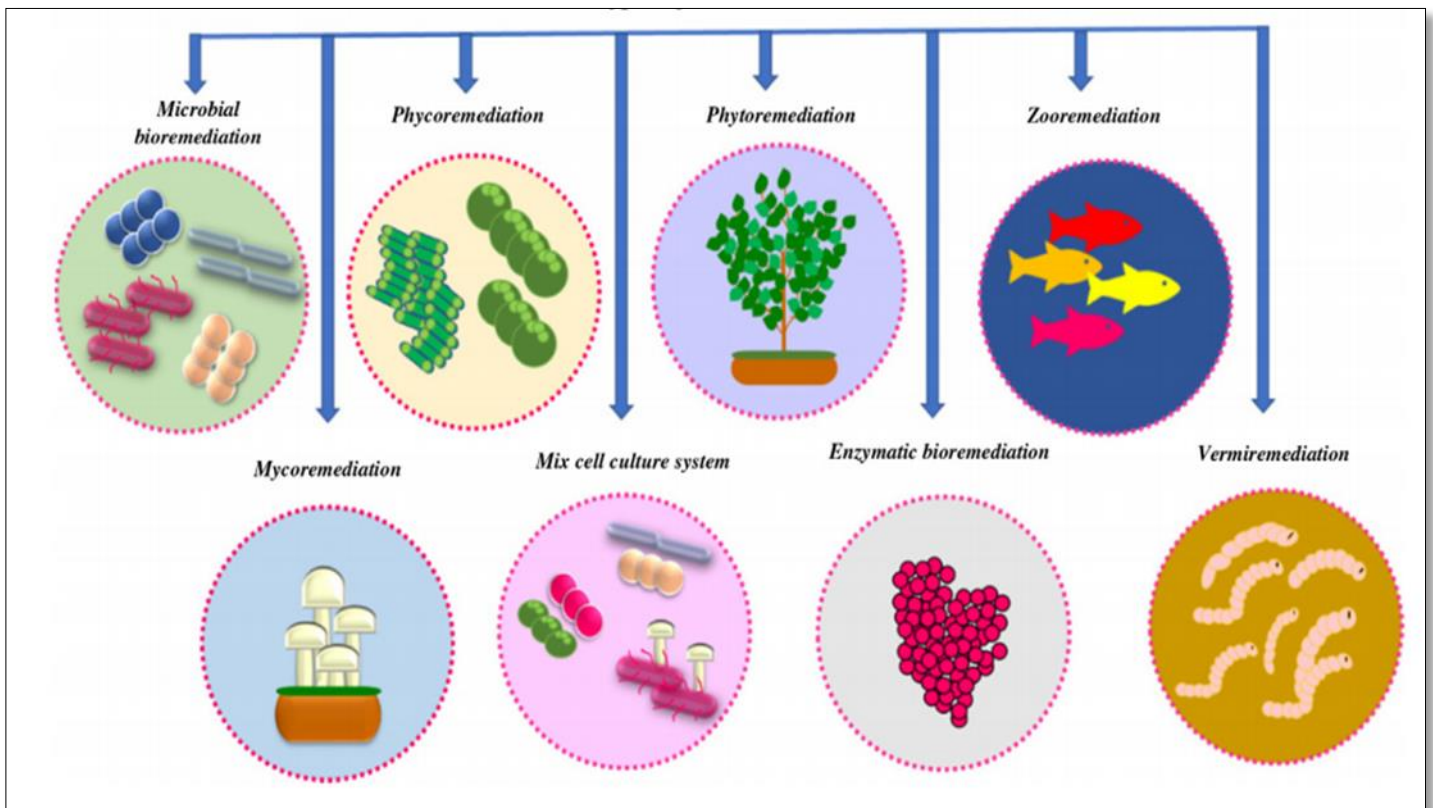


Figure 6 : Différentes stratégies de bioremédiation (Agrwal et al., 2020)

Les procédés de bioremédiation microbienne consistent à stimuler la capacité naturelle que possèdent de nombreux microorganismes (bactéries, champignons), à dégrader les polluants en composés inertes. Ces microorganismes peuvent être indigènes, exogènes, ou être prélevés sur le site contaminé, cultivées au laboratoire puis réintroduits dans le sol. Ils mettent en jeu des mécanismes biologiques pour réduire la concentration de polluants en un état inoffensif par dégradation, détoxification, minéralisation ou transformation (Figure 7) (Alka et al., 2020 ; Agrwal et al., 2020 ; Arora, 2020a).

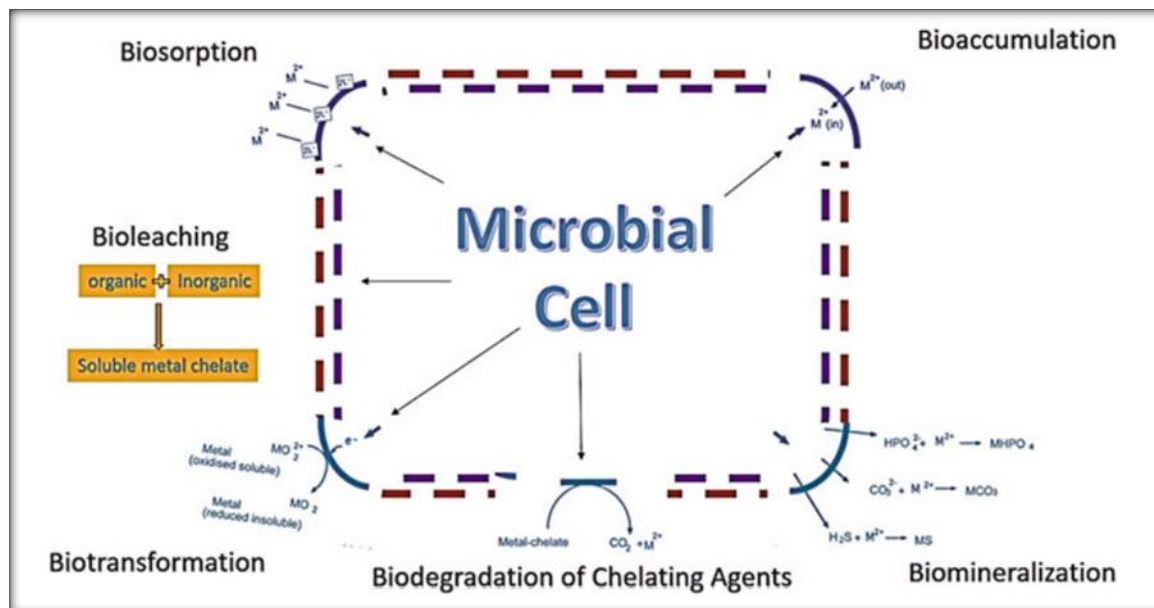


Figure 7 : Mécanismes impliqués dans la bioremediation des sols contaminés par les éléments traces métalliques lourds (Shah, 2020).

IV.1. La bioaugmentation

C'est l'une des méthodes d'élimination des éléments trace métalliques du sol, définie comme une technique d'amélioration de la capacité de dégradation des zones contaminées par l'introduction des souches compétentes spécifiques. Généralement les microorganismes choisis sont des bactéries dotées d'une grande capacité de bioremédiation. L'efficacité de cette méthode est déterminée par de nombreux facteurs abiotiques tels que la structure chimique, la concentration et la disponibilité des polluants ainsi que les propriétés physico-chimiques du sol. Des facteurs biotiques, peuvent aussi intervenir comme la sélection de microorganismes appropriés qui sont non seulement capables de dégrader les contaminants, mais aussi de concurrencer avec succès la communauté indigène (Mrozik et Piotrowska, 2010 ; Tyagi et al., 2011 ; Skinder et al., 2020 ; Arora et al., 2020a, b ; Shah, 2020 ; Bharagava, 2020).

IV.2. La biofiltration

Consiste à l'utilisation d'un biofiltre pour traiter les émissions gazeuses, à travers l'utilisation de microorganismes capables de dégrader les contaminants contenus dans l'air (MCNevin et Barford, 2000 ; Bharagava, 2020).

IV.3. La biostimulation

Cette technologie consiste à activer l'activité des microorganismes indigènes par l'apport de nutriments et par l'ajustement des conditions du milieu tel que l'humidité et le potentiel

d'oxydo-réduction, l'aération, le pH et le contrôle de la température. La biostimulation est considérée comme une technique de remédiation appropriée pour l'élimination des polluants pétrolières dans le sol. Elle nécessite l'évaluation à la fois des capacités de dégradation intrinsèque de la microflore autochtone et des paramètres environnementaux impliqués dans la cinétique du processus *in situ* (Skinder et al., 2020).

IV.4. Autres procédés microbiens de bioremédiation

En plus de ces procédés, il existe d'autres tels que la biolixiviation (Rahman et Singh, 2020), le compostage (Fogarty et Tuovinen, 1991), l'atténuation naturelle (Philp et Atlas, 2005), etc (Figure 8).

Ces différentes techniques de bioremédiation peuvent être classées comme *ex situ* ou *in situ*. Les techniques *ex situ* impliquent l'excavation de polluants provenant de sites pollués et ensuite leur transport vers un autre site pour le traitement. Elles sont généralement considérées en fonction du coût du traitement, de la profondeur de pollution, du type de polluant, du degré de pollution, de la localisation géographique et de la géologie du site pollué (Philp et Atlas, 2005). Tandis que les techniques *in situ*, impliquent le traitement des substances polluées sur le site de la pollution. Elles ne nécessitent aucune excavation et par conséquent elles sont accompagnées de peu ou pas de perturbation de la structure du sol et devraient être moins chères par rapport aux techniques de bioremédiation *ex situ*, en raison de l'absence de coût supplémentaire pour les processus d'excavation. Néanmoins, le coût de conception et l'installation sur site d'un équipement sophistiqué pour améliorer les activités microbiennes pendant la bioremédiation est une préoccupation majeure (Philp et Atlas, 2005 ; Kim et al., 2014 ; Bharagava, 2020 ; Skinder et al., 2020).

Le choix de toute technique de bioremédiation, dépend de la nature des polluants, la profondeur et le degré de pollution, le type d'environnement, les coûts et les politiques environnementales (Smith et al., 2015). Outre les critères de sélection, les critères de performance (concentrations d'oxygène et de nutriments, température, pH et autres facteurs abiotiques) sont déterminants pour le succès des processus de bioremédiation (Smith et al., 2015 ; Skinder et al., 2020).

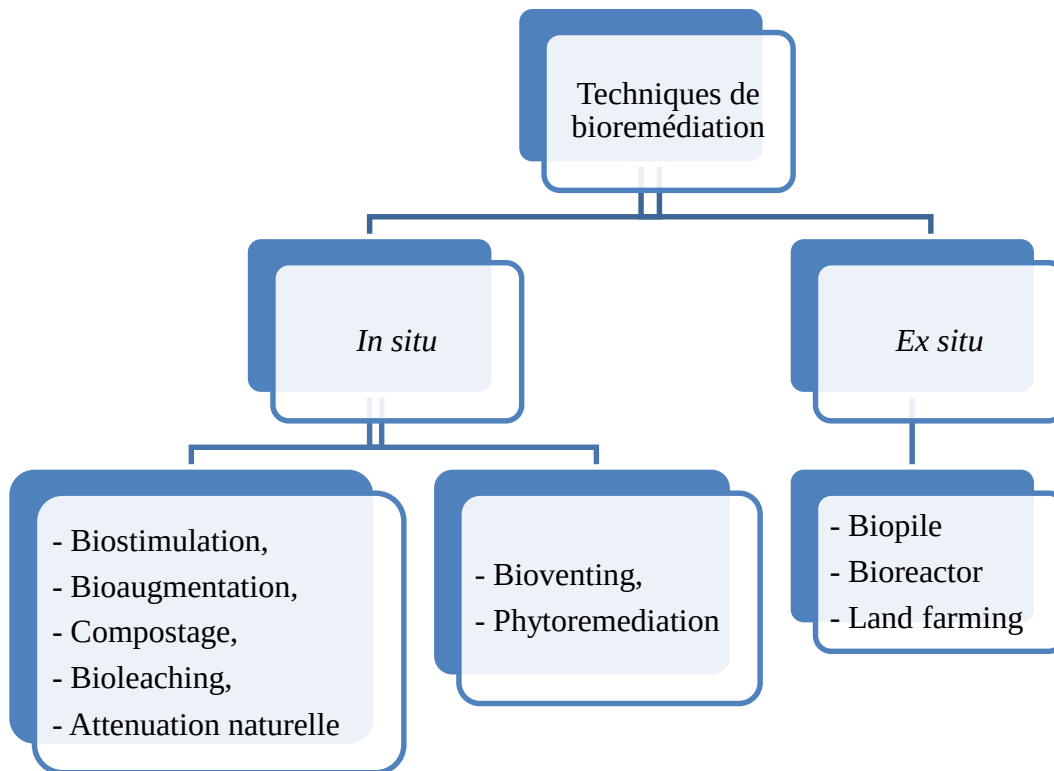


Figure 8 : Techniques de bioremédiation *in situ* et *ex-situ*

IV.5. La phytoremédiation

Cette technique repose sur l'utilisation d'interactions végétales (physiques, biochimiques, biologiques, chimiques et microbiologiques) dans des sites pollués pour atténuer les effets toxiques des polluants. Selon le type de polluant (élémentaire ou organique), plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans la phytoremédiation : accumulation ou extraction, dégradation, filtration, stabilisation et volatilisation (Figure 9). Les méthodes employées pour les contaminants métalliques sont légèrement différentes de celles utilisées pour remédier les sites pollués par des contaminants organiques (Figure 9). Les polluants élémentaires (ETMs toxiques) sont principalement éliminés par extraction, transformation et séquestration.

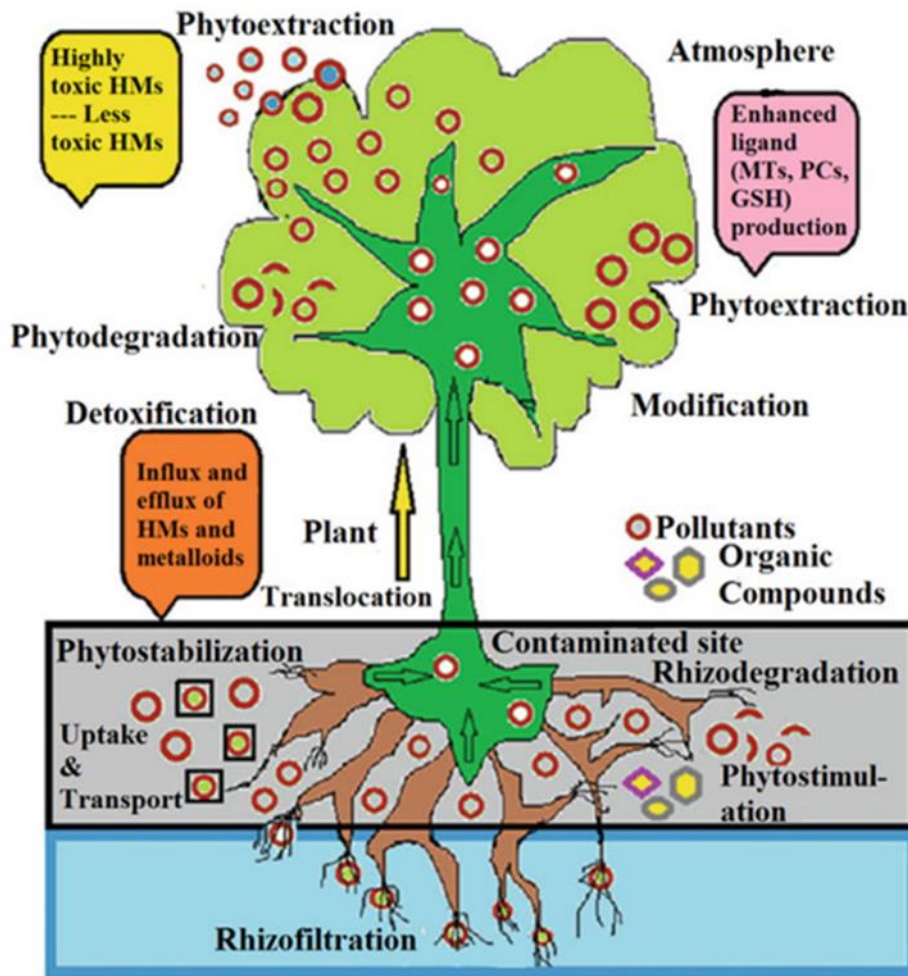


Figure 9 : Différentes techniques de phytoremédiation (Deb et al., 2020)

Certains facteurs jouent un rôle important lors du choix d'une plante en tant que phytodéterminateur tel que le système racinaire, la biomasse, la profondeur, la consommation animale ou non, la toxicité des polluants à la végétation, la survie des plantes et leur adaptabilité aux conditions environnementales, le taux de croissance des plantes. En outre, la plante devrait résister aux maladies et aux ravageurs (Alka et al., 2020 ; Abdullah et al., 2020 ; Skinder et al., 2020 ; Saxena et al., 2020 ; Hasanuzzaman, 2020). Un grand nombre d'espèces végétales agissant à travers divers mécanismes ont été utilisées avec succès pour l'élimination de divers polluants (Tableau 1).

Tableau 1 : Quelques exemples de plantes employées pour la phytoremédiation

Plantes	Polluants	Résultats	Références
<i>Ricinus communis L.</i>	Ni	Phytostabilization et élimination de Ni	Adhikari et Kumar (2012)
<i>Isatis pinnatiloba</i>	Ni	Phytoaccumulation	Altinozlu et al. (2012)
<i>Salix jiangsuensis</i> <i>Salix babylonica</i>	Cu	Phytostabilization et élimination de Cu	Chen et al. (2012)
<i>Corrigiola telephiiifolia</i>	As	Phytoaccumulation	García-Salgado et al. (2012)
<i>Hordeum vulgare</i>	Zn, Cd, Ni	Accumulation et tolérance de Zn, Cd, et Ni	Choudhary et al. (2013)
<i>Solenum nigrum L.</i> et <i>Spinacia oleracea L.</i>	Pb, Cu, Cd et Cr	Phytoaccumulation	Dinesh et al. (2014)
<i>Agrostis capillaries</i>	Contaminants multi-métaux	Rhizodegradation	Langella et al. (2014)
<i>Alternanthera philoxeroides</i> , <i>Artemisia princeps</i> , <i>Bidens frondosa</i> , <i>Bidens pilosa</i> , <i>Cynodon dactylon</i> , <i>Digitaria sanguinalis</i> , <i>Erigeron canadensis</i> et <i>Setaria plicata</i>	Cd, Mn, Pb et Zn	Phytovolatilization	Yang et al. (2014)
<i>Brassica juncea</i>	Cd	Accumulation d'une quantité impressionnante de Cd dans les parties aériennes	Abubakari et al. (2017)
<i>Moso bamboo</i>	Cu/Zn/Cd	Elimination de 0.10 kg Cu, 8.89 kg Zn, et 0.02 kg Cd ha ⁻¹ y ⁻¹	Bian et al. (2017)
<i>Typha latifolia</i>	Al, As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb et Zn	Phytoextraction	Bonanno et Cirelli (2017)

IV.5.1. La phytoextraction (phytoaccumulation)

Elle est basée sur l'utilisation des plantes hyperaccumulatrices naturelles avec une capacité d'accumulation de métal exceptionnelle. Les hyperaccumulatrices sont utilisées sur les sites métallifères en raison de leur tolérance à des niveaux de pollution relativement élevés. La phytoextraction peut impliquer des cultures répétées de la plante jusqu'à ce que la concentration de métal tombe à des niveaux acceptables (Alka et al., 2020 ; Kazemalilou et al., 2020).

IV.5.2. La phytostabilisation

Egalement appelée inactivation *in situ*, elle concerne principalement l'utilisation de certaines plantes pour immobiliser les sédiments. Les contaminants sont absorbés et accumulés par les racines, adsorbés sur les racines ou précipités dans la rhizosphère. Cela réduit ou même empêche la mobilité des contaminants empêchant la migration dans l'eau souterraine ou l'air et réduit également la biodisponibilité du contaminant empêchant ainsi la propagation à travers la chaîne alimentaire (Fournon, 1999).

Les plantes à utiliser dans la phytostabilisation devraient être capables de diminuer la quantité d'eau percolée à travers la matrice du sol, ce qui peut entraîner la formation d'un lixiviat dangereux, agir comme barrière pour empêcher le contact direct avec le sol contaminé et l'érosion des sols et la distribution du métal toxique à d'autres zones (Fournon, 1999 ; Braud, 2007). La phytostabilisation peut se produire par le processus de sorption, de précipitation, de complexation ou de réduction de valence métallique. Il peut également être utilisé pour rétablir une couverture végétale sur des sites contaminés avec des niveaux élevés de contamination des éléments traces métalliques. Une fois qu'une communauté d'espèces tolérantes a été établie, le potentiel d'érosion éolienne et donc la propagation du polluant est réduite et la lixiviation des contaminants du sol est également réduite (Alka et al., 2020 ; Kazemalilou et al., 2020).

IV.5.3. La phytofiltration

La phytofiltration est l'utilisation de racines de plantes (rhizofiltration). Elle est basée sur un concept semblable à celui de la phytoextraction, mais elle est utilisée pour absorber ou adsorber des polluants, principalement des ETMs, des eaux souterraines et des eaux résiduelles plutôt que la remédiation des sols pollués. Les plantes utilisées pour la rhizofiltration ne sont pas plantées directement sur place mais sont d'abord acclimatées pour le polluant. Les plantes sont cultivées hydroponiquement dans l'eau propre plutôt que dans le sol, jusqu'à ce qu'un système racinaire volumineux se développe. Une fois qu'un système racinaire important est en place, l'approvisionnement en eau est remplacé par une alimentation en eau polluée pour acclimater la plante. Après acclimatation des plantes, elles sont plantées dans la zone polluée où les racines absorbent l'eau polluée et les contaminants. Lorsque les racines deviennent saturées, elles sont récoltées et éliminées en toute sécurité (Alka et al., 2020 ; Kazemalilou et al., 2020).

IV.5.4. La phytostimulation

Grâce aux exsudats racinaires sécrétés par les plantes, le développement des communautés microbiennes et leurs activités au niveau de la rhizosphère sont stimulés. Cette stimulation modifie la bioaccumulation et l'oxydation/réduction biologique des ETMs (Alka et al., 2020).

IV.5.5. La phytovolatilisation

Elle consiste en l'utilisation de plantes qui absorbent des polluants toxiques, qui les transforment en éléments volatiles peu ou pas toxiques et qui sont par la suite libérés dans l'atmosphère par transpiration de la plante (Alka et al., 2020 ; Kazemalilou et al., 2020).

V. Les PGPR comme acteurs efficaces dans la restauration des régions contaminées

Les scientifiques recherchent des alternatives impliquant des solutions naturelles et écologiques qui permettent une meilleure croissance à la plante et une solution efficace pour la revégétalisation des espaces contaminés par des polluants. Parmi ces options, des stratégies d'ingénierie écologique à base de microbes (bactéries, champignons) ont été développées pour la conservation écologique et pour améliorer les pratiques agronomiques (Kumar et al., 2020a, c).

Ces microorganismes se retrouvent dans diverses niches écologiques, y compris les environnements extrêmes, où leurs capacités métaboliques jouent un rôle crucial dans le cycle des nutriments géochimiques (Aeron et al., 2011). Les populations bactériennes du sol, en particulier, ont la capacité de croître rapidement et d'utiliser une très large gamme de substances différentes comme sources nutritives. Les bactéries sont dispersées dans le sol, souvent attachées aux particules de sol, et interagissent dans la rhizosphère (Jha et al., 2010 ; Govindasamy et al., 2011). La rhizosphère est l'une de ces niches écologiques bien caractérisée, comprenant le volume du sol environnant les racines des plantes et ayant la plus forte population bactérienne qui est influencée par les exsudats racinaires tel que défini par Hiltner (1904) (Jha et al., 2010 ; Govindasamy et al., 2011). Certaines rhizobactéries ont des effets bénéfiques sur les plantes, elles sont de fait connues sous le terme de PGPR, pour Plant Growth Promoting Rhizobacteria. L'application des PGPR est considérée comme l'une des méthodes les plus prometteuses et les moins coûteuses pour augmenter la productivité des plantes grâce à la stimulation de leur croissance, au contrôle des agents pathogènes, et à la bioremédiation des polluants (Bhattacharyya et Jha, 2012 ; Alka et al., 2020 ; Deb et al., 2020).

La majorité des souches de PGPR les plus intéressantes appartiennent aux genres *Agrobacterium*, *Arthobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Frankia*, *Thiobacillus*, *Pseudomonas* et *Bacillus* (Glick, 1995 ; Vessey, 2003). Une compréhension approfondie des mécanismes d'action des PGPRs est inévitable pour manipuler la flore rhizosphérique afin de maximiser les processus qui enrichissent fortement la productivité des plantes (Figure 10).

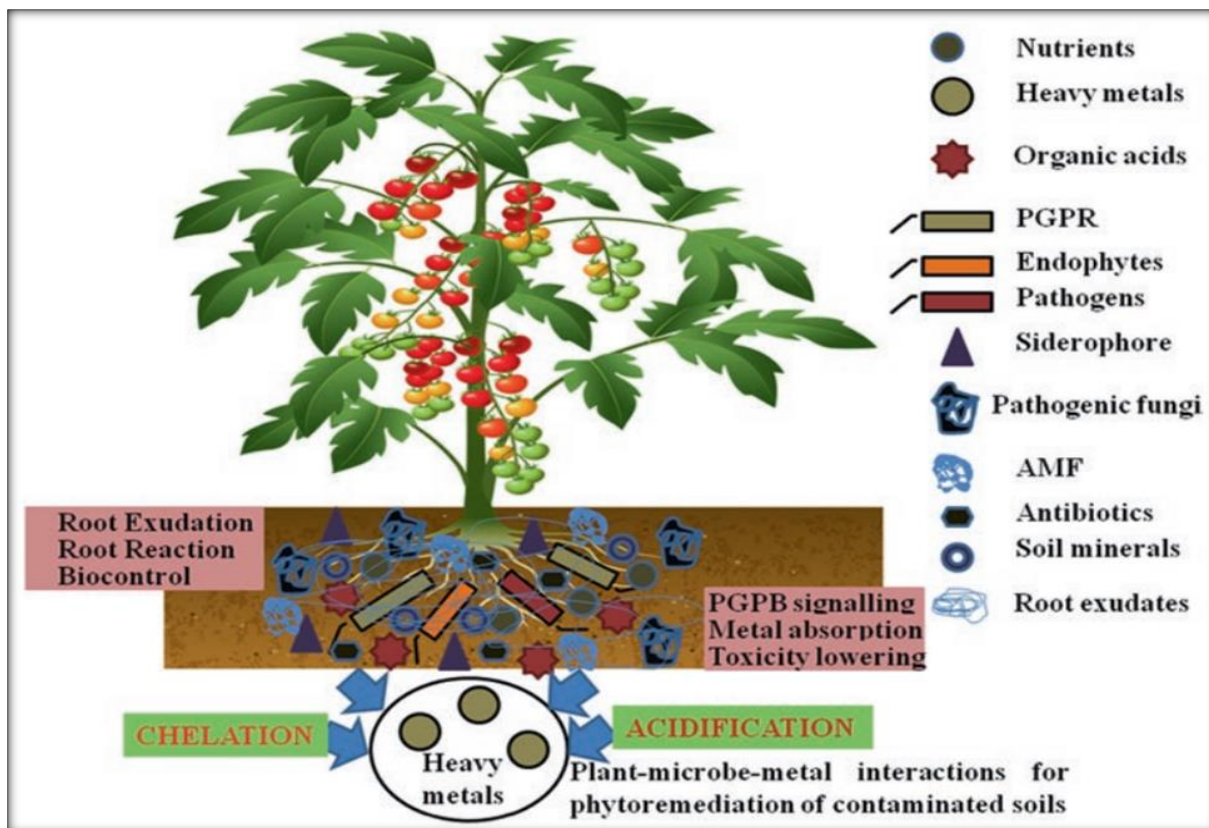


Figure 10 : Les interactions entre plantes et PGPR dans la rhizosphère (Deb et al., 2020).

V.1. Mécanismes d'action des PGPR

V.1.1. Mécanismes directs

V.1.1.1. Fixation biologique de l'azote

Les souches bactériennes possédant la capacité de fixation d'azote sont classées en deux catégories. La première comprend des bactéries symbiotiques associées en général à des racines de légumineuses, qui sont spécifiques et qui les infectent pour produire des nodules au sein desquels l'azote de l'air est transformé en ammoniac. Il s'agit des bactéries appartenant au groupe "rhizobia" (*R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. leguminosarum*, *R. phaseoli*, etc) qui fournissent l'azote fixé directement aux plantes. Un deuxième groupe de bactéries sont des fixateurs d'azote libre qui ne possèdent pas de spécificité pour la plante (Oberson et al., 2013). C'est le cas par exemple du genre *Paenibacillus* (*Paenibacillus odorifer*, *Paenibacillus graminis*, *Paenibacillus peoriae* et *Paenibacillus brasilensis*) (Govindasamy et al., 2011).

La fixation de l'azote est réalisée par une enzyme hautement conservée appelée nitrogénase, qui est présente chez toutes les bactéries fixatrices d'azote. Cette activité est considérée comme un trait important des PGPR car elle fournit directement de l'azote à la plante et elle contribue à l'enrichissement du sol. Les souches fixatrices d'azote sont commercialisées comme biofertilisants depuis plus de 100 ans pour les rhizobia (Goswami et al., 2015 ; Deb et al., 2020).

V.1.1.2. Nitrification

La nitrification bactérienne est un processus biologique dans lequel l'énergie est extraite par oxydation séquentielle de l'azote ammoniacal qui aboutit à la production de nitrate, ce dernier étant la source d'azote préférée des plantes et des microorganismes. L'oxydation complète de l'ion ammonium est effectuée par deux groupes de bactéries métaboliquement distinctes mais complémentaires :

- (i) Des bactéries oxydant l'ammoniac en nitrite, telque *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosolobus* et *Nitrosococcus*,
- (ii) Des bactéries qui transforment le nitrite en nitrate comme *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* et *Nitrospina*.

La nitrification est importante pour le maintien de la fertilité des sols et des écosystèmes car elle complète la minéralisation de l'azote organique par le processus d'ammonification. Entre autres, la nitrification est considérée comme un trait important pour sélectionner des bactéries bénéfiques capables d'améliorer la croissance des plantes et le rendement des cultures (Prasad et al., 2015). De même, on pense que la nitrification est la principale source d'oxyde nitrique (NO) émis par le sol, qui est une molécule signal importante impliquée dans l'interaction plante-PGPR (Figure 11).

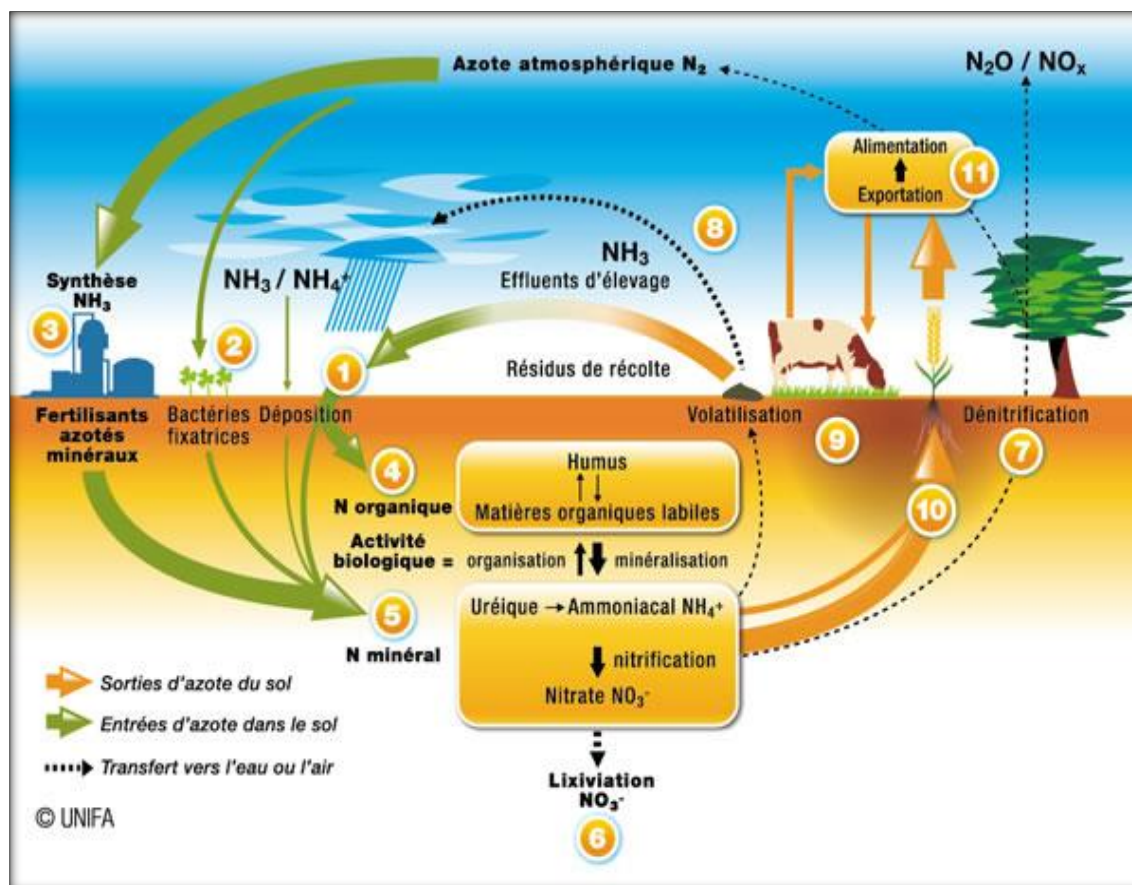


Figure 11 : Présentation schématique du cycle de l'azote (UNIFA).

V.1.1.3. Solubilisation des phosphates

Après l'azote, le phosphore (P) est le macronutriment le plus important pour les processus biologiques, par exemple la division et le développement cellulaire, le transport d'énergie, la transduction du signal, la biosynthèse macromoléculaire, la photosynthèse et la respiration végétale. C'est le nutriment le plus limitant pour les plantes puisqu'elles ne sont capables d'absorber que le phosphate mono- et dibasique qui sont les formes solubles de phosphate (Jha et Saraf, 2015). Le phosphore est présent à des concentrations de 400-1200 mg / kg de sol, cependant, seule une très petite quantité (1 mg ou moins) de P est sous forme soluble. Le phosphate a tendance à réagir avec le calcium (Ca), le fer (Fe) ou l'aluminium (Al), ce qui conduit à sa précipitation et le rend inaccessible à l'absorption par les plantes. Dans les sols acides, le phosphate inorganique est associé aux composés Al ou Fe, tandis que dans les sols calcaires il est surtout sous forme de phosphates calciques. Le phosphate organique constitue une grande fraction de phosphate soluble qui est d'environ 50% dans les sols à forte teneur en matière organique (Alexander, 1977). Il est important de mentionner qu'une grande partie du P appliqué dans les champs agricoles comme engrais est rapidement immobilisée et, par conséquent, devient

inaccessible pour les plantes (Oteino et al., 2015). En outre, le processus de production traditionnelle d'engrais phosphatés est délétère pour l'environnement en raison de la libération de contaminants tels le gaz et les sous-produits, et l'accumulation de Cd ou d'autres ETMs dans le sol et les cultures en raison de l'utilisation répétitive d'engrais phosphatés (Song et al., 2008 ; Sharma et al., 2013). Ce genre de problèmes peut être minimisé grâce à un groupe de microorganismes du sol, appelés microorganismes solubilisant le phosphate (PSM), qui constituent 20-40% de la population cultivable de micro-organismes du sol et dont une proportion significative peut être isolée du sol de la rhizosphère (Chabot et al., 1993). La plupart des solubilisants de phosphate isolés à partir de la rhizosphère de diverses plantes sont plus actifs que ceux isolés à partir de sources autres que la rhizosphère (Kumar et al., 2020a).

Grâce aux activités de solubilisation et de minéralisation des PSM, les formes insolubles de P sont hydrolysées en formes solubles (Sharma et al., 2013). Ainsi, certains micro-organismes minéralisent le phosphore organique dans le sol et d'autres solubilisent les phosphates inorganiques à structure complexe, comme le phosphate tricalcique, le phosphate de roche, le phosphate d'aluminium, etc, contribuant ainsi à la disponibilité du phosphate aux plantes. Plusieurs mécanismes différents sont mis en jeu (Figure 12), dont le principal est la solubilisation des phosphates basée sur la sécrétion d'acides organiques par les microbes lors de la métabolisation des sucres. Les microorganismes rhizosphériques utilisent les sucres provenant des exsudats racinaires puis ils produisent des acides organiques (Goswami et al., 2014). Ces acides agissent comme de bons chélateurs de cations de Ca^{2+} divalents accompagnant la libération de phosphates à partir de composés phosphatiques insolubles. Parmi les acides organiques sécrétés se trouvent les acides acétique, lactique, malique, succinique, tartrique, gluconique, 2-cétogluconique, oxalique et citrique (Rodriguez et Fraga, 1999 ; Buch et al., 2008 ; Govindasamy et al., 2011 ; Goswami et al., 2013, 2014 ; Jha et Saraf, 2015 ; Kumar et al., 2020b).

Parmi les bactéries du sol solubilisatrices des phosphates, on trouve certains rhizobia endosymbiotiques (Goswami et al., 2014), de même que diverses espèces appartenant à différents genres comme *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulans*, *Paenibacillus polymyxa*, , *Pseudomonas fluorescens*, et *Burkholderia cepacia*. Ils sont des producteurs efficaces d'acide gluconique qui est l'agent efficace le plus fréquemment utilisé dans la solubilisation des phosphates minéraux (Rodriguez et Fraga, 1999 ; Jha et Saraf, 2015).

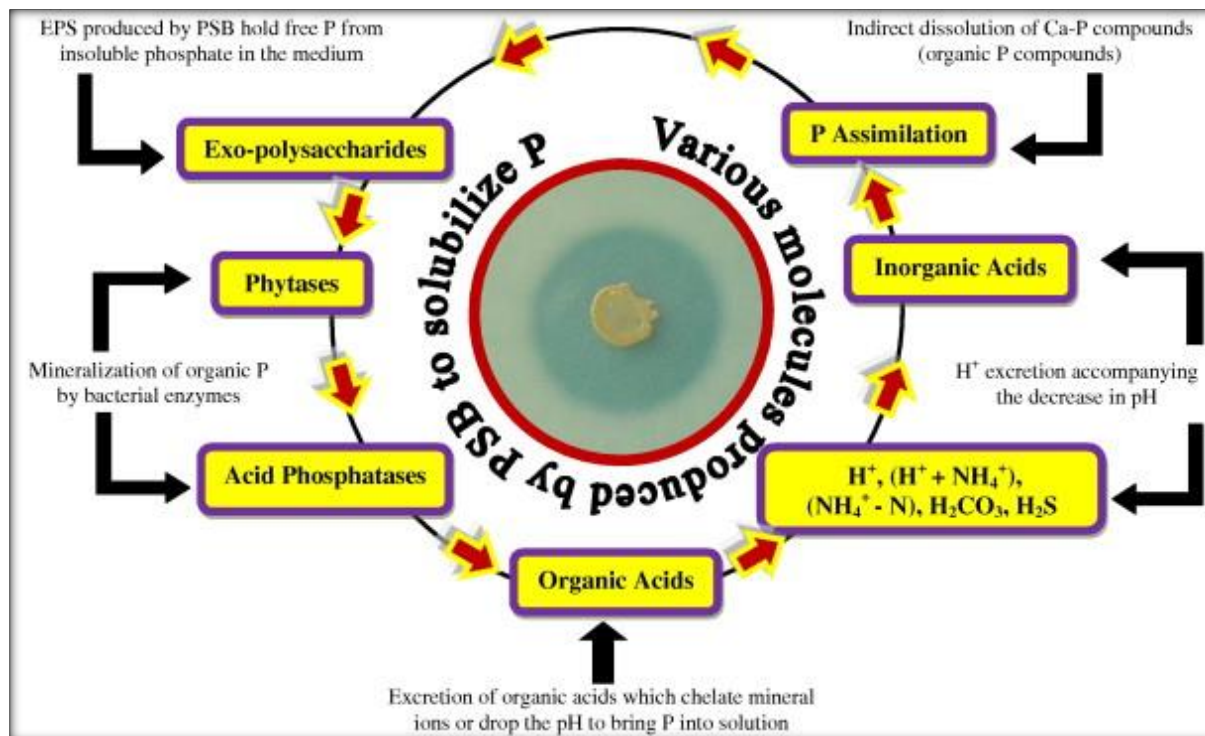


Figure 12: Les diverses substances organiques/inorganiques produites par des bactéries responsables de la solubilisation du phosphate dans les sols (Ahemad et Kibret, 2014).

V.1.1.4. Production de phytohormones bactériennes

Les phytohormones ou hormones de croissance des plantes sont des substances organiques naturelles qui exercent, à de faibles concentrations, une influence majeure sur la croissance des plantes et la régulation des processus physiologiques. Parmi les phytohormones, l'auxine, de même la gibbérelline, l'éthylène, la cytokinine et l'acide abscisique sont produites par les plantes (Bari et Jones, 2009), par des microorganismes (Narayanasamy, 2013), et même par des algues (Kiseleva et al., 2012). Parmi les microbes, les PGPRs peuvent également moduler les niveaux de phytohormone dans les tissus végétaux affectant l'équilibre hormonal de la plante hôte (Figueiredo et al., 2016).

V.1.1.4.1. Acide indole-3-acétique (AIA) : biosynthèse et place dans l'interaction plantes-PGPR

Les auxines ont la capacité d'affecter, pratiquement, tous les aspects physiologiques des plantes (la promotion, l'élargissement et la division des cellules, la domination apicale, l'initiation racinaire, la différenciation du tissu vasculaire et la modulation des espèces réactives d'oxygène). Principalement, l'AIA est connue pour stimuler à la fois des réponses rapides (par exemple augmentation de l'élongation des cellules) et à long terme (par exemple, division cellulaire et

différenciation) dans les plantes. Les plantes sous le traitement à long terme de l'AIA ont des racines très développées, ce qui permet à la plante d'absorber de meilleurs nutriments en fin de compte aider à la croissance globale de la plante (Aeron et al., 2011)

La biosynthèse microbienne et le mécanisme fondamental de l'action des auxines sur les plantes ont fait l'objet d'intenses recherches. Environ 80% de la flore bactérienne de la rhizosphère produit de l'AIA, avec le tryptophane (Trp) comme précurseur physiologique principal lors de sa synthèse (Spaepen et al., 2007). Récemment, il a été montré que les auxines affectent d'autres activités hormonales végétales, telles que la cytokinine, l'acide abscisique, l'éthylène, le jasmonate et l'acide salicylique, et modulent diverses voies de signalisation de défense. D'un point de vue pratique, plusieurs souches de PGPRs produisant l'auxine augmentent la croissance de la plante (Vessey, 2003 ; Amara et al., 2015).

La biosynthèse de l'AIA chez les bactéries implique cinq voies dépendantes de Trp : voie de l'indole-3-acétonitrile, voie de l'acide indole-3-pyruvique, voie de la tryptamine, voie de l'indole-3-acétonitrile et voie de la chaîne oxydase de la chaîne latérale de Trp et une voie indépendante de Trp (Figure 13) (Spaepen et al., 2007 ; Di et al., 2015).

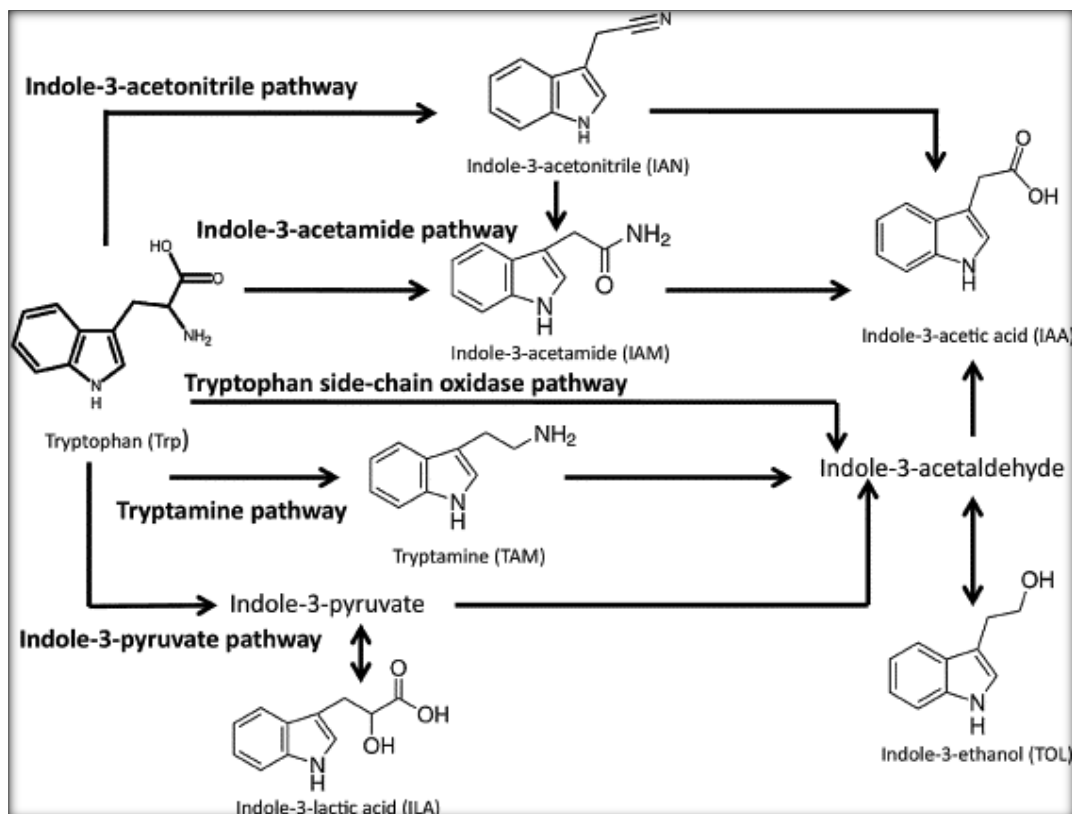


Figure 13 : Diagramme simplifié des différentes voies de biosynthèse de l'AIA dérivée du tryptophane chez les bactéries (Remans et al., 2006).

V.1.1.4.2. L'ACC déaminase

L'éthylène est une hormone gazeuse produite par les plantes et joue un rôle essentiel dans des processus de développement, tels que l'abscission des feuilles et leur sénescence, de même que la maturation des fruits. Il est synthétisé à partir de la méthionine en trois étapes qui commencent par l'activation de la méthionine en S-adenosyl-L-méthionine par l'enzyme SAM synthétase, suivie par la conversion du S-adenosyl-L-méthionine en 1-aminocyclopropane-1 acide carboxylique (ACC), qui est catalysée par l'ACC synthase, puis l'enzyme ACC oxydase assure la conversion de l'ACC en éthylène par une réaction d'oxygénation. Au début, l'éthylène était considéré comme une hormone de stress parce que dans des conditions de stress (salinité, sécheresse, ETMs et pathogénicité), les plantes synthétisent une grande quantité d'éthylène, entraînant une altération de leur performance physiologique et, en particulier la réduction de la croissance des racines. Plus tard, d'autres fonctions vitales ont été associées à l'éthylène telles que la germination des graines, le développement des poils racinaires, la nodulation, l'abscission des feuilles et des fruits et la sénescence des fleurs et des feuilles (Bakshi et al., 2015, Shrivastava et Kumar, 2015).

Une large gamme de bactéries rhizosphériques produit un enzyme, le 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) déaminase, qui diminue les quantités d'éthylène délétères et équilibre les niveaux d'acide abscissique (ABA) dans les plantes stressées (Glick et al., 2007). Les produits de cette dégradation sont l' α -ketobutyrate et l'ammoniac, qui sont utilisés par les bactéries concernées comme source de carbone et d'azote (Figure 14) (Penrose et Glick, 2003 ; Glick et al., 2007). Parmi les microorganismes concernés, on trouve des souches appartenant aux genres *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, et *Variovorax* (Saleem et al., 2007 ; Toklikishvili et al., 2010 ; Barnawal et al., 2012 ; Guo et al., 2020).

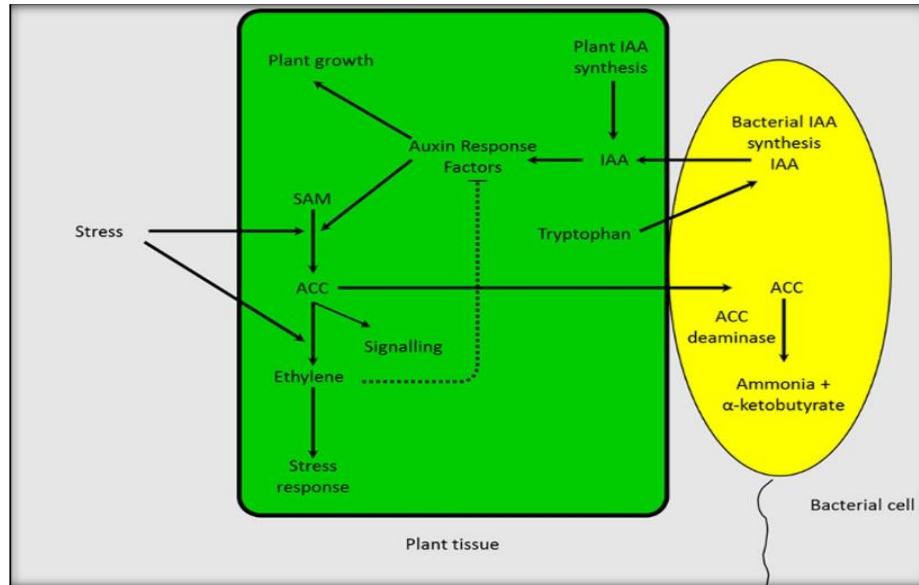


Figure 14 : Mode d'action de l'ACC déaminase pour la levée du stress chez les plantes et son interaction avec l'AIA (Gamalero et Glick, 2015)

V.1.2. Mécanismes indirectes de PGPR

V.1.2.1. Production de sidérophores

Le fer agit comme cofacteur pour un certain nombre d'enzymes essentielles aux processus physiologiques importants tels que la respiration, la photosynthèse et la fixation d'azote. Son déficit provoque des modifications métaboliques sévères. Plusieurs études sur l'utilisation du fer par les plantes ont permis aux scientifiques de distinguer des stratégies utilisées pour l'acquisition du fer à partir du sol (Bar-Ness et al., 1992 ; Neilands, 1995 ; Vessey, 2003). Certaines bactéries de la rhizosphère sont capables de libérer des molécules chélatantes de fer dans la rhizosphère, les sidérophores, et servent ainsi à attirer le fer vers la rhizosphère où elles peuvent être absorbées par la plante (Fekete et al., 1983 ; Payne, 1994 ; Haas et Défago, 2005 ; Tortora et al., 2011).

Plusieurs genres sont connus par leur capacité à favoriser la croissance de nombreuses plantes grâce à la production de sidérophores (Fekete et al., 1983 ; Tortora et al., 2011). Les bactéries de la rhizosphère libèrent ces composés pour augmenter leur potentiel concurrentiel, puisqu'ils améliorent la nutrition des plantes (Glick, 1995). Les rhizobactéries produisant des sidérophores améliorent les plantes à divers niveaux : elles améliorent la nutrition en fer, inhibent la croissance d'autres micro-organismes avec la libération de leur molécule antibiotique et limitent la croissance des agents phytopathogènes en limitant la disponibilité du fer (Shen et al., 2013).

En outre, les siderophores peuvent stimuler la biosynthèse d'autres composés antimicrobiens (Beneduzi et al., 2012).

V.1.2.2 Enzymes hydrolytiques

Les enzymes lytiques bactériennes telles que l'uréase, l'estérase, la lipase, la protéase, la chitinase, l'amylase et la cellulase sont des protagonistes clés dans les processus de transformation biologique de N, H et C (Rana et al., 2012 ; Xun et al., 2015). Les enzymes comme la chitinase et la cellulase jouent un rôle majeur en tant qu'agents de lutte biologique en dégradant les parois cellulaires fongiques (Sindhu et Dadarwal, 2001). Kathiresan et al. (2011) ont rapporté qu'*Azotobacter sp.* produisait de grandes quantités d'amylase, de cellulase, de lipase, de chitinase et de protéase et participait au processus de biodégradation de la matière organique du sol. Les bactéries appartenant aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas sp.* réduisent la croissance des champignons filamenteux en sécrétant des enzymes lytiques telles que les chitinases et les glucanases. L'application de telles bactéries permet la protection biologique des cultures contre les agents pathogènes, en particulier ceux qui contiennent de la chitine et des glucanes dans leur parois cellulaires (Prasad et al., 2015). Kohler et al. (2007) ont observé que l'inoculation de plantes de laitue avec *B. subtilis* augmentait significativement l'activité de l'uréase, de la protéase et de la phosphatase dans la rhizosphère, donc a participé à l'amélioration de la croissance des plantes et à l'absorption de potassium/calcium. Un isolat bactérien (MIC 3) a produit des enzymes lytiques (protéase, amylase, cellulase, chitinase et pectinase) et présentaient une forte activité antagoniste *in vitro* contre *Fusarium oxysporum* et *Phoma sp.* (Avinash et Rai, 2014).

V.1.2.3. Production d'antibiotiques

Certaines PGPRs jouent un rôle actif dans la suppression des micro-organismes pathogènes en produisant des antibiotiques. Ces antagonistes bactériens imposent la suppression des agents pathogènes des plantes par la sécrétion de métabolites extracellulaires qui sont inhibiteurs même à faible concentration. Les bactéries appartenant au genre *Bacillus* produisent une grande variété de substances antibactériennes et antifongiques. Certains de ces composés, dont la subtiline, la subtilosine A, la TasA et la subblancine, sont bien connus et dérivent d'une origine ribosomale, mais d'autres, comme la bacilysine, la chlorotétain, la mycobacilline, les rhizocticines, le bacillaène, la difficidine et les lipopeptides appartenant à la surfactine, et les familles de fengycines, sont formées par des peptides synthétases non ribosomiques (NRPS) et/ou des polykétides synthases (PKS) (Kumar et al., 2020c). Ces antibiotiques sont connus pour posséder

des activités antivirales, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, phytotoxiques, antioxydantes, et d'autres (Kumar et al., 2020a).

En définitive, les bactéries favorisant la croissance des plantes sont couramment utilisées dans l'agriculture pour améliorer les rendements des plantes. En plus, elles contribuent à résoudre certains problèmes environnementaux. Les PGPR peuvent empêcher l'érosion des sols en améliorant la croissance des plantes. Ils améliorent la croissance des racines et offrent à la plante une opportunité d'obtenir des nutriments pour une meilleure croissance. Parallèlement à la promotion de la croissance, les PGPR contribuent à l'amélioration de la tolérance au stress chez les plantes (chaleur, sécheresse, salinité et maladie), la bioremédiation des ETMs, les agents de lutte biologique et la formation de biofilm etc.

VI. Phytoremédiation assistée par les microorganismes

La phytoremédiation assistée par les PGPR dépend fortement de diverses conditions telles que les activités rhizosphériques, la croissance des plantes, la tolérance aux métaux et leur biodisponibilité. Dans un environnement contaminé, la majorité des ETMs se lient à différents constituants organiques et inorganiques et leur biodisponibilité est étroitement liée à leur spéciation chimique. Les souches PGPR produisent divers composés métaboliques tels que des acides organiques, des sidérophores, des EPS, des biosurfactants, etc., qui peuvent altérer la nature du métal (réactions d'acidification et d'oxydoréduction) et sa mobilité (chélation, précipitation et immobilisation) dans l'environnement rhizosphérique. Ils peuvent ainsi améliorer l'efficacité de la phytoremédiation, de la phytostabilisation et de la phytovolatilisation de la plante.

La gestion de la population microbienne dans la rhizosphère à l'aide d'un inoculum composé d'un consortium de PGPR en tant que biofertilisants, pourrait fournir aux plantes des avantages cruciaux pour la restauration de l'écosystème sur les terrains abandonnés (Khan, 2005 ; Manoj et al., 2020).

Matériels et méthodes

1. Description de la zone d'étude

La zone étudiée se situe dans la région d'Oujda. Il s'agit d'une bande montagneuse qui s'étend sur une longueur de 100 km et une largeur de 20 à 30 km. La région possède un potentiel minier important en raison de l'existence d'importants gisements de minéraux (Smouni et al., 2010).

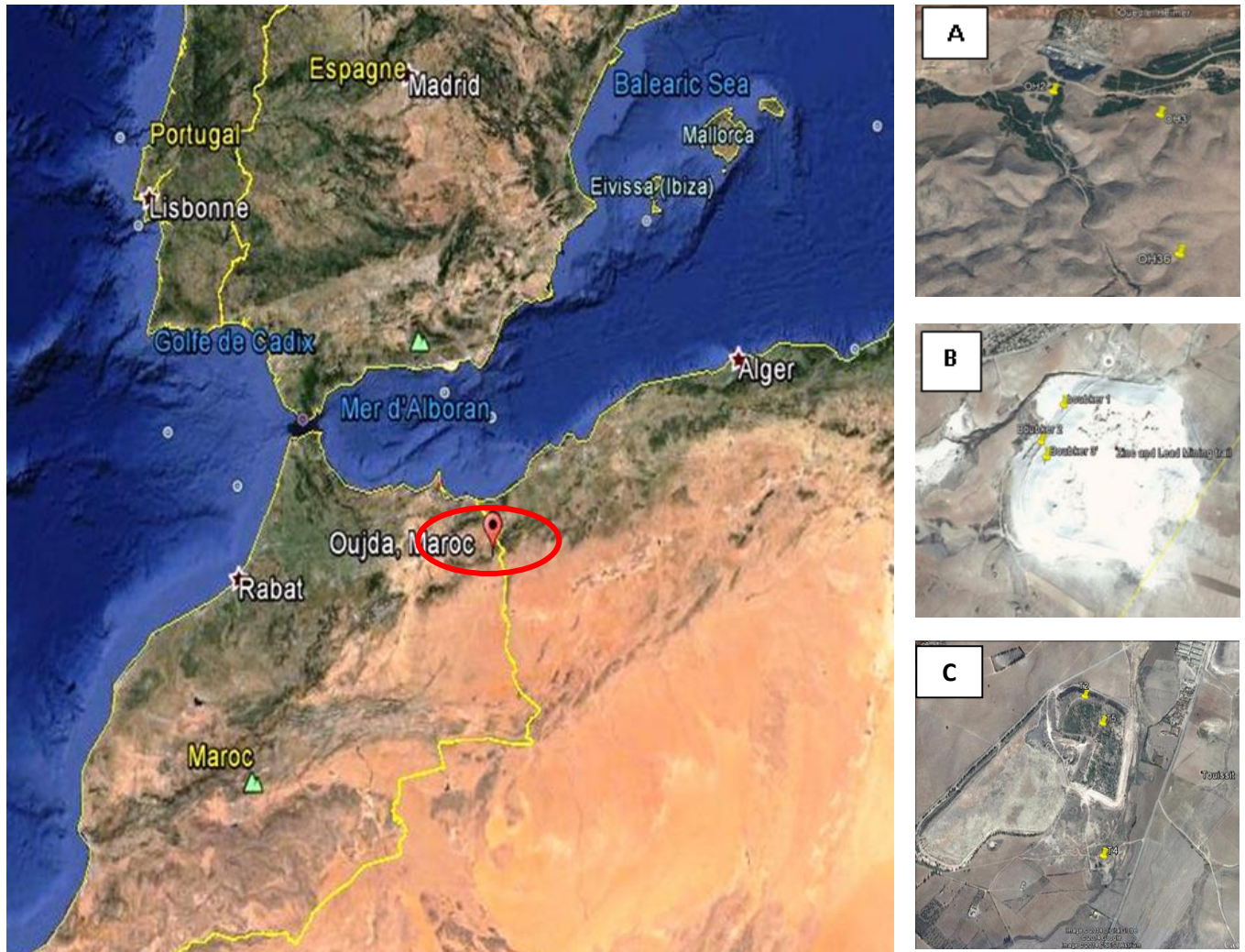


Figure 15 : Localisation de la région d'Oujda et des trois sites étudiés avec A : Oued El Heimer, B : Sidi Boubker, C : Touissit.

1.1. Les mines de Sidi Boubker et Touissit

Les sites miniers de Sidi Boubker et Touissit, sont situés à environ 30 kilomètres au sud d'Oujda. La source de pollution dans cette zone est principalement le résultat des digues de sable de lavage des déchets formant de vastes zones (Argane et al., 2014) (Figure 16). Ils ont été fermés respectivement en 1975 et 2002, suite à l'épuisement des réserves, après avoir fonctionné pendant près de 40 ans pour Sidi Boubker et 75 ans pour Touissit (Smouni et al., 2010). Ces sables sont facilement transportés par le vent et les précipitations sous forme de particules et constituent une menace pour les personnes qui vivent dans des maisons construites directement au pied des digues. De plus, un substrat (stérile) correspondant à des matières résiduelles provenant directement du minerai lors de l'exploitation minière a recouvert certaines digues (Smouni et al., 2010).

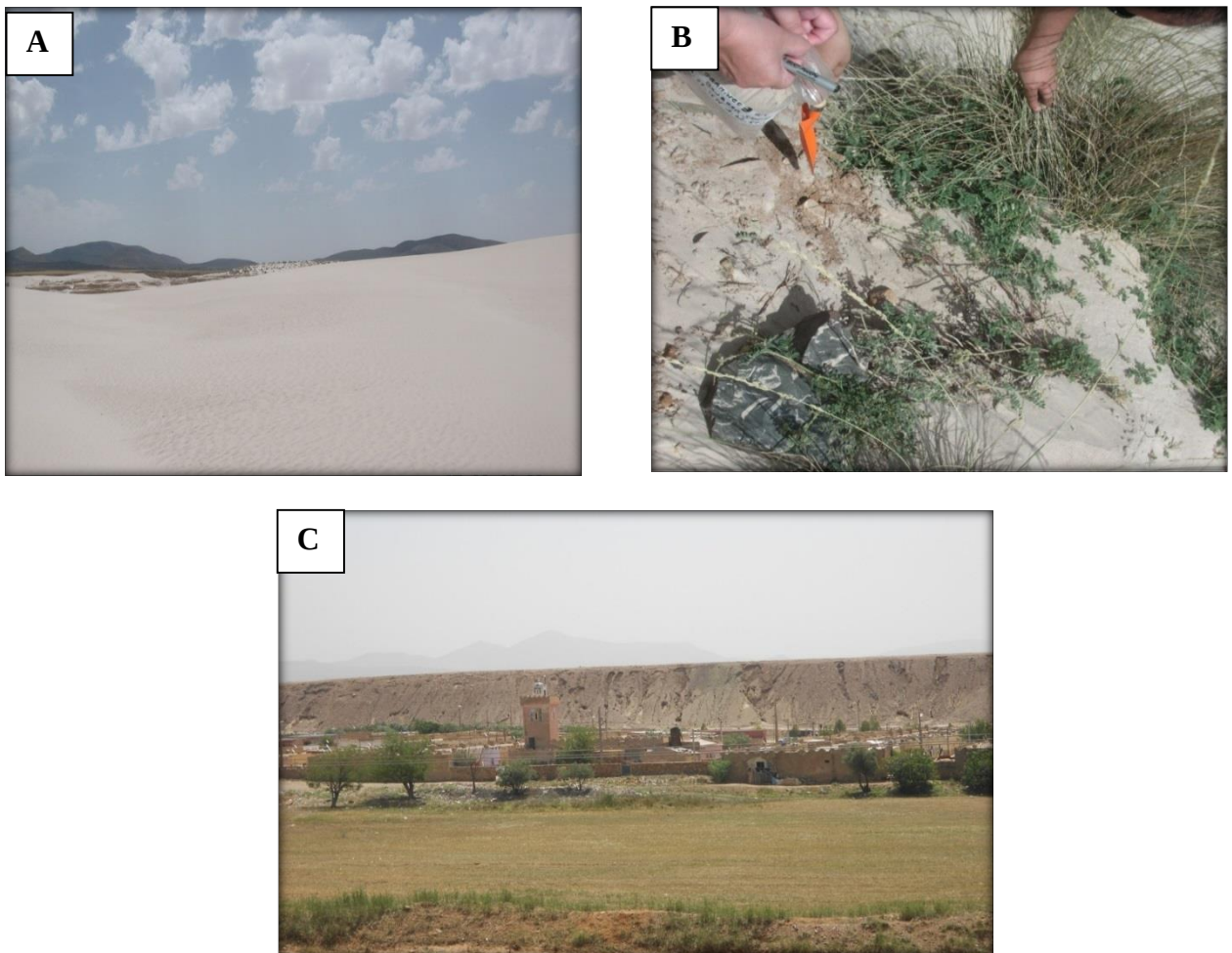


Figure 16 : Photos des sites étudiés avec A et B : Sidi Boubker et C : Touissi.

1.2. La fonderie de Oued El Heimer

La fonderie d'Oued El Heimer est spécialisée dans le traitement, la fonte et l'affinage du plomb et de l'argent (Stowasser, 1973). Elle a été construite en 1942 par les sociétés Penarroya et Zellidja et a commencé sa production en 1945. A cause d'épuisement des réserves, les activités de cette fonderie ont été arrêtées.

Les activités d'élevage qui sont dominantes dans l'Est du Maroc sont très limitées autour de la fonderie en raison de plusieurs années de sécheresse et de la rareté des pâturages résultant de la dégradation de l'environnement. La zone de l'Oued El Heimer (Figure 17) est exposée à différentes formes de pollution telles que le gaz SO_2 dans l'air, les poussières fines (en particulier les zones soumises aux vents dominants) et les scories transportées sous forme particulaire ou dissoute (Smouni et al., 2010).



Figure 17 : Photos de site Oued El Heimer

1.3. Caractéristiques climatiques

Le climat de la région d'Oujda est caractérisé par de faibles précipitations avec un hiver assez pluvieux et un été chaud et sec de durée variable (Figure 18). Elle est considérée comme une région à climat semi-aride froid (Climat Oujda (Maroc)). Les précipitations sont comprises entre 300 mm et 500 mm par an. Oujda est majoritairement plus chaude que dans les autres villes du Maroc, avec une température moyenne égale à 26.1 °C. Août est le mois le plus chaud de l'année. En janvier, la température moyenne est de 8.4 °C. Janvier est donc le mois le plus froid de l'année (Climat Oujda (Maroc)). Les précipitations et les vents sont un moyen efficace de dissémination des ETMs. Il existe deux types de vents dans la région : les vents d'ouest à nord-ouest qui sont humides et pluvieux, et les vents d'est qui sont chauds et secs.

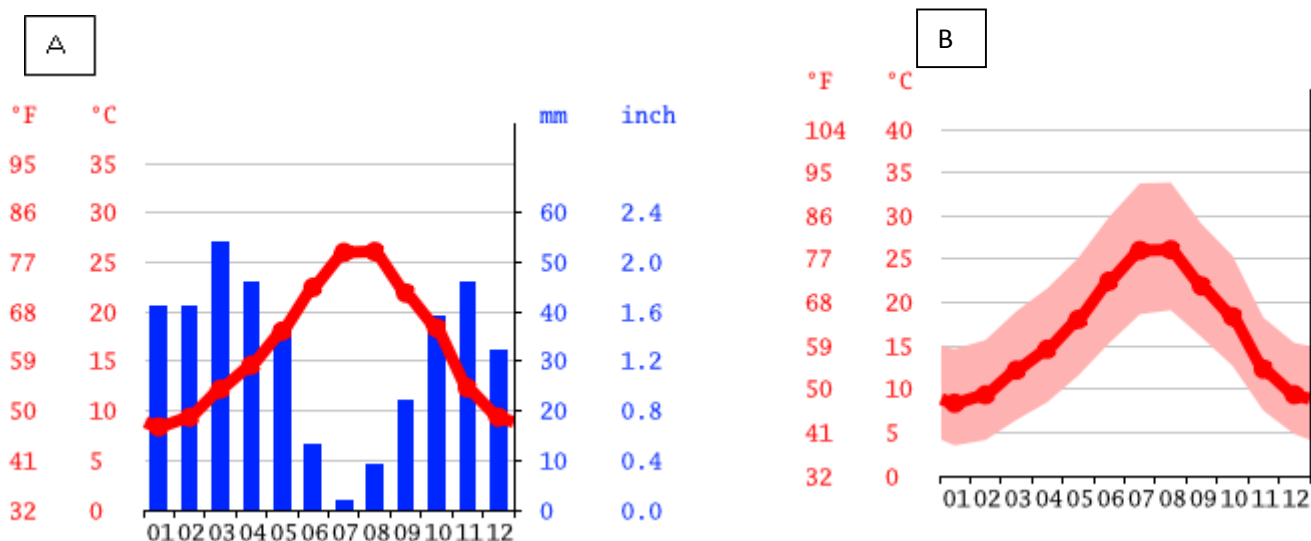


Figure 18 : Diagramme ombrothermique (A) et courbe des températures (B) d'Oujda

2. Choix de la plante *Sulla spinosissima* L.

Parmi les plantes qui se développent naturellement dans les sites miniers abandonnés situés dans la région d'Oujda, on trouve *Sulla spinosissima* (L.), une espèce fqui ait partie des légumineuses méditerranéennes multitolérantes connues pour leur capacité à accumuler les ETMs dans les racines et leur contribution à la fertilité des sols par l'apport d'azote et d'autres nutriments. Grâce à ses propriétés, *S. spinosissima* (L.) peut être une plante modèle intéressante pour l'étude de la phytoremédiation assistée par des bactéries (Sbabou et al., 2016).

3. Collecte d'échantillons de sol et analyse physico-chimiques

Neuf échantillons de sol ont été collectés à partir de trois sites différents (Touissit, Sidi Boubker et Oued El Heimer), avec 3 répétitions par échantillon. Le type de sol (rhizosphérique ou nu) et les coordonnées GPS des échantillons de chaque site sont présentés dans le tableau 2. La composition chimique des échantillons a été déterminée par par ICP-MS, réalisée par le laboratoire Eurde ins-France, sous ISO/IEC 17025 : Norme 2005 et accréditation par le CDE RAC 1-148, le pH a également été mesuré (Kalra, 1995).

Tableau 2 : Type et localisation des échantillonnages de sol

Sites	Echantillonnage	Type de sol	Coordonnées GPS
TOUISSIT	Touissit 2 (T2)	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	34°28'06"N/1°46'18"W
	Touissit N (TN)	Sol nu	
	Touissit 5 (T5)	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	
SIDI BOUBKER	Sidi Boubker 1 (B1)	Sol nu	34°28'18"N/1°42'59"W
	Sidi Boubker 2 (B2)	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	
	Sidi Boubker 3 (B3)	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	
OUED EL HEIMER	Oued El Heimer 2 (OH2)	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	34°26'37"N/1°53'54"W
	Oued El Heimer 3 (OH3)	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	
	Oued El Heimer 36 (OH36)	Sol nu	

4. Isolement, purification et conservation des souches bactériennes

Quatre grammes de chaque sol ont été suspendu dans 16 ml d'eau physiologique stérile (0.9 % NaCl) et mis sous agitation pendant 30 min. Ces suspensions ont été diluées en séries de 4 fois et par la suite étalées sur du milieu bouillon nutritif gélosé (NB) additionné de 1 mM ou 5 mM de Pb (sous forme de $Pb(NO_3)_2$), et de 1 mM ou 3 mM de Zn (sous forme de $Zn(SO_4)_2 \cdot 7H_2O$) (Becerra-Castro, 2012).

Les suspensions ont également été étalées sur du milieu Pikovskaya (PVK) modifié (Sundara et Sinha, 1963), du milieu Modi (Modi et al., 1985) (Annexe 8) et du milieu YEM-agar (Vincent, 1970) additionné de 0.5 mg ml^{-1} de tryptophane (Annexe 6).

Le milieu PVK modifié contenait 0.5 g de phosphate naturel (roche phosphatée finement broyée). Toutes les boîtes de Petri ont été incubées à 28 °C pendant au moins 48 heures (Annexe 7). Les colonies bactériennes ont été repiquées au moins trois fois pour assurer la pureté puis conservées à -80°C dans le milieu YEM supplémentés avec 40% de glycérol (v/v).

5. Criblage des souches intéressantes

5.1. Activités favorisant la croissance des plantes (PGP)

Les activités biologiques bénéfiques de tous les isolats ont été analysées grâce à des tests qualitatifs qui permettent un criblage rapide des souches. Leur capacité à produire de l'AIA a été

déterminée selon les méthodes de Gordon et Weber (1951) et de Sheng et al. (2008). 5 µl de chaque suspension bactérienne ont été dispersées sur le milieu gélosé YEM additionné de 0.5 mg ml⁻¹ de tryptophane, et incubées pendant 48 h à 28 °C. Les colonies obtenues ont été recouvertes d'un disque de papier filtre stérile imprégné de réactif de Salkowsky. Les boîtes de Petri ont été incubées à l'obscurité pendant 30 min. L'apparition d'une couleur rose indique la production d'auxine.

La production de sidérophores est la deuxième activité bénéfique étudiée en utilisant la méthode modifiée de Schwyn et Neilands (1987). A cet effet, les souches ont été étalées en triple sur des boîtes contenant le milieu Modi et incubées pendant 2 jours à 28 °C, après le réactif chrome azurol-S (CAS) a été ajouté. Les zones orangées autour des colonies sur gélose bleue ont été considérées comme des réactions positives pour la production de sidérophores.

La capacité de solubilisation de phosphate inorganique des isolats a été testée selon la méthode décrite par Nautiyal (1999). Les souches isolées ont été étalées dans des boîtes de milieu PVK gélosé modifié. Après sept jours d'incubation à 28 °C, les colonies entourées d'un halo ont été considérées comme positives pour la solubilisation du phosphate.

L'activité ACC déaminase des isolats a été étudiée selon la méthode de Penrose et Glick (2003) et Onde re-Lemus et al. (2009) en utilisant des plaques de 96 puits de milieu minimal contenant 3 mmol l⁻¹ d'ACC comme seule source d'azote. Les colonies bactériennes capables de croître dans ces plaques ont été considérées comme positives. Pour comparaison les souches sont aussi ensemencées sur un milieu contenant MgSO₄ (témoin négatif) et un autre contenant du (NH₄)₂SO₄ (témoin positif).

5.2. Tolérance des souches aux éléments traces métalliques

Pour estimer le niveau de tolérance des souches aux ETMs, la concentration minimale inhibitrice (CMI) de zinc, de plomb et d'arsenic a été déterminée. Les isolats ont été étalés en triple sur des boîtes de Petri contenant le milieu NB additionné par des quantités croissantes des ETM (5-35 mM de Zn, Pb et As). La CMI est définie comme la concentration du métal la plus faible à laquelle aucune croissance bactérienne n'a été observée (Becerra-Castro, 2011).

6. Identification moléculaire des bactéries par séquençage de l'ADNr 16S

6.1. Extraction de l'ADN total bactérien

Des suspensions bactériennes de chaque souche ont été transférées dans un tube stérile de 1.5 ml et centrifugées à 13 000 g pendant 15 min. Les culots résultants ont été dissous dans 1 ml de tampon (20% SDS, acétate de sodium 2 M, Tris-acétate 3 M, EDTA 20 mM) et transférés dans

des tubes stériles de 1.5 ml, puis traités avec NaCl et incubés pendant 10 min à 65 °C. Après, la suspension a été extraite avec 1.2 ml de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1) suivi par l'extraction de la phase aqueuse avec 1.2 ml de chloroforme-alcool isoamylique (24:1). L'ADN a été précipité par addition de 0.6 ml d'isopropanol à la phase aqueuse, incubation pendant 10 min à température ambiante et centrifugation à 12 000 g pendant 10 min. Le culot a été lavé avec de l'éthanol à 70 %, séché à l'air et dissous avec du tampon TE (Tris-EDTA, pH 8).

6.2. Amplification par PCR de l'ADNr 16S et séquençage

Pour l'amplification spécifique des gènes ARNr 16S, nous avons utilisé le couple d'amorces 27f (5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3_) et FGPS1509 (5-AAGGAGGGGATCCAGCCGCA-3_). Chaque 25 µl du mélange PCR contenait une matrice d'ADN (20 à 50 ng), 1 x tampon de réaction Taq, 25 pmol de chaque amorce et 1.5 U d'ADN polymérase Taq (Bioline). Les amplifications PCR ont été réalisées en utilisant le programme suivant : dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min, 30 cycles de 94°C (1 min), 55°C (30 s) et 72°C (1 min), suivis d'une dernière extension à 72°C (10 min). Les produits de PCR ont été séparés dans des gels d'agarose 1% par électrophorèse, et envoyés pour séquençage (Genoscreen, France). Les séquences nucléotidiques obtenues dans cette étude ont été déposées dans la base de données NCBI sous les numéros d'accès KU182753 à KU182861.

6.3. Analyse phylogénétique

L'homologie de la séquence d'ADNr 16S d'un isolat donné a été réalisée en utilisant le programme BLAST de la base de données NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Les séquences montrant plus de 97 % de similarité appartiennent à la même unité taxonomique opérationnelle (OTU). Les séquences ont été alignées à l'aide de l'algorithme ClustalW (Thompson et al., 1994) et les arbres phylogénétiques Neighbor-Joining ont été construits après calcul d'une matrice de distance avec le logiciel MEGA X (Tamura et al., 2007). La robustesse de la phylogénie a été évaluée par une analyse bootstrap avec 1000 répétitions.

7. Quantification du potentiel phytobénéfique des souches sélectionnées

Dans un deuxième temps, des méthodes quantitatives adaptées ont été utilisées pour caractériser plus précisément les meilleures souches enregistrées pour chaque test qualitatif d'activité PGP.

Production d'auxine : Elle a été mesurée selon les méthodes de Gordon et Weber (1951) et de Sheng et al. (2008). Les cellules bactériennes ont été cultivées dans un milieu YEM avec 0.5 mg ml⁻¹ de L-tryptophane à 28 °C pendant 1 jour dans un incubateur (180 tr/min). Le milieu YEM

ensemencé avec de l'eau stérile Milli-Q a servi de traitement témoin. Les cultures ont été centrifugées à 12 000 g pendant 5 mn et les surnageants ont été filtrés avec du filtre Millipore. Un aliquote de 1 ml de chaque surnageant a été mélangé avec 1 ml de réactif de Salkowsky. Le mélange a été incubé pendant 30 minutes à 28 °C dans l'obscurité. L'absorbance a été mesurée à 540 nm et la concentration d'auxine a été déterminée en utilisant une courbe standard préparée avec des concentrations d'auxine connues.

Production de sidérophores : L'estimation de la production de sidérophores a été réalisée selon la méthode analytique au chrome azurol-S (CAS) (Schwyn et Neillands, 1987 ; Manjanatha et al., 1992). Après la culture des souches bactériennes sur milieu liquide Modi et centrifugation, un ml de surnageant a été transféré dans un tube et mélangé avec un ml de réactif CAS et laissé au repos pendant 1 h (Manjanatha et al., 1992). Une référence a été préparée en mélangeant 1 mL du réactif CAS avec 1 mL du milieu non ensemencé. L'absorbance des échantillons a été mesurée à 630 nm et comparée au témoin (Manjanatha et al., 1992) (Annexe 8).

La teneur en sidérophores de l'échantillon a été calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Unités sidérophores} = A / A_r$$

Où A_r = absorbance du réactif CAS et A = absorbance de l'échantillon à 630 nm

Solubilisation du phosphate naturel : La quantité de phosphate solubilisé par chaque souche a été déterminée dans le milieu liquide de Pikovskaya (Zaidi et al., 2006) contenant 0.5 g L⁻¹ de phosphate naturel comme source de phosphate inorganique. Des erlenmeyers de 250 ml en triple contenant 100 ml de milieu ont été inoculés avec la suspension bactérienne pour atteindre une DO₆₀₀ initiale de 0.05. Les flacons ont été incubés à 28 °C pendant 2 jours dans un agitateur rotatif à 180 tr/min. Les surnageants de culture ont été collectés par centrifugation à 12 000 rpm pendant 10 min et le phosphate soluble libre est estimé par la méthode vanadate-molybdate (Watanabe et Olsen, 1965) (Annexe 7).

Activité ACC-déaminase : L'activité ACC-déaminase a été mesurée en utilisant une légère modification du test d'activité ACC-déaminase de Penrose et Glick (2003) et Li et al. (2011). L'activité ACC-déaminase a été déterminée par la mesure colorimétrique de la quantité de α -ketobutyrate résultant de la dégradation de l'ACC par l'enzyme ACC déaminase. La modification unique consistait à utiliser un milieu minimal pour la croissance des cellules bactériennes. Le milieu minimal utilisé contenait : Mannitol (3.64g), NaCl (0.05g), K₂HPO₄ 3H₂O (0.35g), MgSO₄ 6H₂O (0.2g), CaCl₂ 2H₂O (0.05g), FeCl₂ (2.7%) et 10 ml d'une solution de microéléments contenant H₃BO₃ (500 mg), MnCl₂ 4H₂O (7.86 mg), NaMoO₄ 2H₂O (27.62 mg),

ZnSO₄ 7H₂O (17.17 mg), CuSO₄ (20.4 g). Après ajustement du volume à 800 ml, le milieu a été autoclavé, puis 1 ml de biotine, 1 ml de thiamine et 1 ml d'acide pantothénique ont été ajoutés, et enfin, le volume a été complété avec de l'eau distillée stérilisée à 1 L (Annexe 9).

Les souches positives ont été testées pour leur capacité de fixation biologique de l'azote atmosphérique par la méthode décrite par Döbereiner (1995). Les souches ont été cultivées sur un milieu semi-solide sans azote. Après 96 h d'incubation à 28 °C dans l'obscurité, la formation d'une couche de croissance blanche près de la surface des tubes indique un résultat positif (Quecine et al., 2012). Cette procédure a été réalisée en triple.

8. Activités antifongiques des souches bactériennes

Activité antagoniste : Elle a été étudiée en utilisant trois méthodes de confrontation *in vitro* entre des souches bactériennes et une souche de champignon phytopathogène *de Fusarium oxysporum*.

La méthode 1 consistait en une confrontation directe, dans laquelle le champignon et la bactérie sont cultivés côte à côte dans le milieu Potatoe Dextrose Agar (PDA). Les souches bactériennes ont d'abord été cultivées dans des tubes contenant le milieu NB pendant 24 heures à 28 °C, puis 5 µl de la suspension bactérienne est déposée dans chaque boîte PDA contenant un fragment du champignon de 1 cm² déposé sur le bord de la boîte. Dans les boîtes témoins, 5µl d'eau distillée stérilisée a été utilisée à la place des bactéries.

La méthode 2 a été conçue pour tester si la bactérie inhibe l'agent pathogène en sécrétant des substances diffusibles. Des suspensions de souches bactériennes préparées comme précédemment ont été déposées sur des membranes stériles de nitrocellulose (type Millipore, 0.45 µm) préalablement déposées à la surface du milieu PDA. Après absorption de la suspension, les boîtes ont été incubées à 28 °C pendant 24 heures. La membrane a été ensuite retirée de chaque boîte et un fragment de 1 cm² du champignon a été placé sur la surface de la gélose. Les boîtes ont été réincubées pendant une période supplémentaire d'une semaine (Lopes et al., 2015). La boîte de contrôle a été préparée de la même manière mais en déposant de l'eau distillée stérilisée à la place de la suspension bactérienne.

Dans la méthode 3, nous avons examiné si l'effet antagoniste des souches bactériennes contre l'agent pathogène est dû aux composés volatils émis par les bactéries. Les suspensions bactériennes préparées comme précédemment ont été striées dans une boîte de Petri contenant du milieu NB. Un fragment de *Fusarium* de 1 cm² a été placé au centre d'une deuxième boîte contenant du milieu PDA, puis il a été fermé par la boîte contenant les bactéries. Les 2 boîtes ont

été sellées avec du parafilm et incubées à 28 °C pendant une semaine (Lopes et al., 2015). La boîte servant de témoin a été réalisée de la même manière sauf que les bactéries étaient absentes.

Après incubation, l'inhibition de la croissance radiale de *Fusarium oxysporum* a été évaluée par la formule suivante :

$$I = T - C / T * 100$$

T = Diamètre du mycélium en absence de bactéries

C = Diamètre du mycélium en présence des bactéries

Production de protéase : Des isolats bactériens ont été inoculés sur une gélose au lait écrémé. Les boîtes ont été incubées à $28 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 96 h. Les isolats présentant des zones claires autour des colonies ont été considérés comme des producteurs de protéase (Ventosa et al., 1982 ; Smibert et Krieg, 1994). Pour confirmer les résultats, les souches positives ont été striées sur milieu contenant de la caséine et les boîtes ont été incubées à 28 °C pendant 24 h. La formation d'une zone claire autour des colonies bactériennes indique l'activité protéolytique de la souche (Smibert et Krieg, 1994).

Production de lipase : Le milieu minimal utilisé contenait 0.3 g de KH_2PO_4 , 0.6 g de Na_2HPO_4 , 0.05 g de NaCl, 0.1 g de NH_4Cl , 2 mM de MgSO_4 , 0.1 mM de CaCl_2 , 2 g d'agar, 2.5 g d'huile d'olive et 100 ml d'eau distillée. Le milieu a été ajusté à pH 8 et autoclavé à 121°C pendant 15 min. Après le dépôt des isolats, les boîtes ont été incubées à 28 °C pendant 48 h. Une réaction positive est marquée par l'apparition d'un halo autour des colonies (Gupta et al., 2007 ; Salgado, 2014 ; Smibert et Krieg, 1994). L'activité lipolytique des souches a été confirmée par une autre méthode, sur boîte de gélose contenant la tributyrine et du tween 20 (Kumar et al., 2012).

Production de cellulase : Selon la méthode décrite par Cattelan et al. (1999), cette activité enzymatique a été déterminée. Le milieu M9 (Miller, 1972) additionné de 10 g de carboxyméthylcellulose et 1.2 g d'extrait de levure a été utilisé. Les isolats ont été étalés et incubés pendant 8 jours à 28°C . Le développement d'un halo clair autour des colonies indique une réaction positive (Kumar et al., 2004).

Production de chitinase : Des boîtes de Petri de gélose à la chitine contenant 1 % de poudre de carapace de crevette (SSP), 0.1 % de K_2HPO_4 , 0.05 % de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 1.5 % de gélose amendée avec 2 % de rouge de phénol ont été préparées. Les boîtes ont été spotées avec des aliquotes de suspensions bactériennes et incubées à 30°C pendant 7 jours. Des zones claires autour des colonies indiquent la présence de chitinase (Goswami et al., 2014 ; Wang et al., 2008).

9. Effet de l'inoculation par des souches sélectionnées sur la croissance des plantes de *Sulla spinosissima*

9.1. Caractérisation des souches bactériennes

Six souches parmi les plus intéressantes lors des tests précédents ont été sélectionnées pour l'inoculation des plantes de *Sulla spinosissima* dans des conditions normales et sous stress métallique (LMR249, LMR250, LMR266, LMR283, LMR291 et LMR340). La tolérance aux ETMs de ces souches et leurs activités PGP ont été les principales propriétés prises en compte.

Elles ont aussi été testées pour leur capacité de fixation biologique de l'azote atmosphérique par la méthode décrite par Döbereiner (1995).

9.2. Evaluation de l'effet des PGPRs sur la croissance de *Sulla spinosissima* sous conditions normales

Pour étudier le potentiel phytobénéfique des souches bactériennes sélectionnées sur la croissance de *Sulla spinosissima*, du sable stérilisé a été utilisé comme substrat de culture (sable autoclavé à 121°C pendant 1 heure).

Les souches bactériennes (LMR249, LMR250, LMR266, LMR283, LMR291 et LMR340) ont été cultivées pendant une nuit dans du milieu NB et incubées à 28 °C à 180 tr/min pendant 24 h. Les cellules bactériennes ont été récoltées par centrifugation à 8000 rpm à 4 °C pendant 10 min. Les culots cellulaires ont été lavés deux fois, remis en suspension et ajustés avec de l'eau distillée stérile afin d'avoir une DO_{600} de 0.1 (équivalent à 10^8 cellules mL^{-1}).

Des graines de *Sulla spinosissima* préalablement récoltées dans les sites miniers de la région d'Oujda ont été scarifiées en surface manuellement, puis stérilisées avec de l'éthanol à 70 % pendant 1 min et rincées cinq fois avec de l'eau distillée stérilisée. Les graines ont été mises à germer sur des boîtes de gélose à 0.9 % à 25 °C dans l'obscurité pendant 4 jours. Les graines germées ont été cultivées dans des petits pots contenant 100 g de sable stérilisé (1 plante/pot et 12 répétitions/traitement). Chaque plante a été inoculée avec 1 mL d'inoculum bactérien correspondant. Des plantes témoins non inoculées étaient également prévues. Le dispositif expérimental était un bloc complet randomisé. Les pots ont été arrosés le long de l'expérience avec une solution minérale nutritive (Hoagland et Arnon 1950). La solution minérale contenait du K_2HPO_4 comme source de P, sauf pour les plantes inoculées par la souche LMR291 solubilisant le P où une poudre de phosphate naturel a été utilisée. Les pots ont été placés dans

une chambre de croissance contrôlée (16 h de lumière, 8 h d'obscurité) avec une température moyenne de 28 °C.

9.3. Effet des PGPRs sur la croissance des plantes *Sulla* dans les conditions de sol contaminé

Le sol fortement contaminé du site d'Oued El Heimer a été utilisé dans cette expérience. Ce sol est un sol alcalin peu fertile qui présente de faibles niveaux de carbone, d'azote et de phosphore, et une faible capacité d'échange cationique (CEC). De plus, le sol est extrêmement pollué par cinq ETMs (As, Cu, Zn, Cr et Pb) (Table 2). Les graines prégermées comme précédemment ont été cultivées dans des petits pots contenant 100 g de sol contaminée (1 plante/pot et 12 répétitions/traitement) selon le même dispositif expérimental et sous les mêmes conditions de culture. Les plantules ont été inoculées dans les mêmes conditions que précédemment et arrosées avec de l'eau distillée stérile tout au long de l'expérience.

9.4. Paramètres mesurés dans les essais d'inoculation

9.4.1. Mesure de la biomasse végétale et des teneurs en chlorophylle/caroténoïdes

Les plants de *Sulla* ont été récoltés après 100 jours de croissance. Les tiges ont été coupées à la surface du sol et les racines ont été soigneusement séparées du sable ou du sol. Les racines et les tiges ont été soigneusement lavées avec de l'eau distillée, puis séchées. La longueur et la biomasse des parties des plantes ont été mesurées.

Les teneurs en chlorophylle et en caroténoïdes des feuilles fraîches ont été estimées selon la méthode de Mackinney (1941). Un gramme de feuilles fraîchement coupées a été broyé à l'aide d'un mortier et d'un pilon après avoir versé 2 ml d'acétone à 80 %. Le mélange a été centrifugé à 5000 rpm pendant 5 min. Le surnageant a été recueilli et son absorbance a été lue par un spectrophotomètre à 645 et 663 nm pour la chlorophylle et à 480 et 510 nm pour les caroténoïdes contre le blanc (80 % d'acétone).

Les teneurs en chlorophylle et en caroténoïdes présents dans les extraits de feuilles ont été calculées selon l'équation donnée par Arnon (1949) :

$$\text{Chlorophylle totale (mg g}^{-1} \text{ masse fraîche foliaire)} = (20,2 (\text{OD}_{645}) + 8,02 (\text{OD}_{663})) \times V/1000 \times W$$

(1)

$$\text{Caroténoïde (mg g}^{-1} \text{ masse fraîche de feuilles)} = 7,6 (\text{DO}_{480}) - 1,49 (\text{DO}_{510}) \times V/d \times 1000 \times W$$

(2) où OD_{645} , OD_{663} , OD_{480} et OD_{510} = Densités optiques à 480, 663, 480, et 510 nm, respectivement, V = Volume d'un extrait, W = Masse des tissus foliaires, d = 1,4 cm.

9.4.2. Dosages d'enzymes antioxydantes

Trois activités d'enzymes antioxydantes différentes (catalase (CAT), ascorbate peroxydase (APX) et peroxydase (POD)) ont été mesurées. Le tissu frais (0,3 g) a été broyé dans des conditions réfrigérées avec un tampon d'extraction contenant du tampon phosphate (50 mM, pH 7,8), de l'EDTA (0,1 mM) et 1 % (p/v) de PVP. L'homogénat résultant a été centrifugé à 12 000 g pendant 10 min à 4 °C et le surnageant a été collecté pour des mesures d'activités enzymatiques. Les activités CAT, APX et POD ont été mesurées selon Aebi (1984) et Nakano et Asada (1981) ; Chen et Asada (1989) ; Chance et Maehly (1955), respectivement.

L'activité CAT a été déterminée par spectrophotométrie en suivant la baisse de H_2O_2 à 240 nm en fonction du temps dans un mélange réactionnel contenant l'extrait enzymatique, du tampon phosphate 50 mM (pH = 7) et du H_2O_2 15 mM. La détermination de l'activité de cette enzyme est calculée à partir du coefficient d'extinction $\varepsilon = 0,036 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ et exprimé en mM de H_2O_2 décomposé par minute et par μg de protéine.

L'activité APX a été mesurée en suivant la diminution de l'absorbance à 290 nm en fonction du temps provoquée par l'oxydation de l'ascorbate en présence de H_2O_2 . Le mélange réactionnel contenait l'extrait enzymatique, du tampon phosphate 50 mM (pH 7), de l'ascorbate 0,5 mM et du H_2O_2 0,2 mM. L'activité de cette enzyme a été calculée en utilisant le coefficient d'extinction $\varepsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Les variations d'absorbance à 470 nm et 25 °C ont été utilisées pour calculer l'activité POD. La réaction a été effectuée dans une solution de 3 mL. Une quantité de 10 μL d'extrait enzymatique a été ajoutée à 2,99 mL de tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 6,0) contenant les substrats (18,2 mM de gaïacol et 4,4 mM de H_2O_2). L'activité POD a été définie comme la quantité d'enzyme qui a provoqué une augmentation de 0,001 par minute de l'absorbance à 470 nm.

10. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel statistique XL STAT. Une analyse de la variance (ANOVA) a été faite, suivie d'une comparaison de plusieurs niveaux de traitement, en utilisant la différence significative de Duncan à $P \leq 0.05$. L'analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée à l'aide du logiciel R en utilisant les packages ade4.

Résultats

1. Contamination des sols par les éléments traces métalliques

Le Maroc oriental est connu pour ses sites miniers qui ont été exploités pendant plusieurs décennies. Leur exploitation a entraîné l'accumulation de tonnes de déchets, dont la plupart sont abandonnés à l'air libre. Les analyses des ETMs par spectrophotométrie d'absorption atomique confirment que les trois sites sont fortement pollués par les cinq ETMs analysés (As, Cu, Zn, Cd, et Pb) et qu'ils dépassent largement les valeurs normales (Bowen, 1979) et les valeurs seuils fixées par les organismes internationaux (Union européenne, 2002 ; OMS/FAO, 2007) (Tableau 3). Ces résultats indiquent aussi que les sols analysés présentent différents niveaux de contamination par les ETMs, qui dépendent du métal mesuré et de site.

Les sols des trois sites sont alcalins et présentent de faibles niveaux de carbone (C), d'azote (N) et de phosphore (P), par conséquent leurs indices de qualité et de fertilité sont faibles (Tableau 3). La capacité d'échange cationique (CEC) des sols était également faible, et ils peuvent donc développer des carences en magnésium, potassium et autres (Tableau 3).

Une analyse approfondie des résultats à l'aide de l'analyse en composantes principales (PCA) a montré que tous les éléments analysés sont bien corrélés entre eux, à l'exception du carbone total et de Zn. La PCA a révélé que les échantillons de sol du site de Touissit, qui est une ancienne exploitation minière polymétallique, et Oued El Heimer sont regroupés dans le côté positif de DIM1 plus proche de toutes les variables sauf le carbone et le Zinc. Ces sites présentent les niveaux les plus élevés de teneur en ETMs (Figure 19). Les échantillons de sol du site de Sidi Boubker, qui contenaient les plus faibles concentrations des ETMs, sont regroupés dans le côté négatif des deux DIM. L'analyse PCA a permis de caractériser et de classer les sites en termes de pollution par les ETMs toxiques.

Tableau 3 : Composition chimique des échantillons de sol des sites étudiés

Sites	Touissit	Sidi Boubker	Oued El Heimer
Pb mg Kg⁻¹ (SD)	19125.87 (3247.55)	9281.51 (32.21)	21992.32 (6683.34)
Zn mg Kg⁻¹ (SD)	3112.21 (117.18)	8384.23 (241.5)	14955.73 (1518.89)
Cu mg Kg⁻¹ (SD)	580.63 (277.44)	99.82 (31.69)	1678.34 (19.78)
Cr mg Kg⁻¹ (SD)	19 (5.38)	2.53 (0.2)	39.94 (19.78)
As mg Kg⁻¹ (SD)	59.74 (12.89)	33.16 (1.93)	617.87 (49.95)
N total (%) (SD)	0.06 (0.01)	0.01 (0.01)	0.006 (0.003)
C total (%) (SD)	6.04 (0.98)	12.05 (0.03)	0.33 (0.27)
P (mg Kg⁻¹) (SD)	10.66 (9.29)	3.33 (2.3)	10 (2)
Ca meq% (SD)	21.05 (4.05)	3.09 (0.29)	12.73 (10.77)
Mg meq% (SD)	2.96 (1.08)	1.46 (0.37)	0.73 (0.26)
Na meq% (SD)	0.14 (0.2)	0.02 (0.02)	0.14 (0.09)
K meq% (SD)	0.29 (0.01)	0.02 (0.01)	0.11 (0.03)
CEC meq% (SD)	8.17 (4.79)	0.06 (0.04)	0.82 (0.22)
pH (SD)	8.36 (0.31)	8.1 (0.29)	8.85 (0.23)

Valeurs normales (VN) (mg kg⁻¹) : Pb (35), Zn (90), Cu (30), Cr (70), As (0,35) (Bowen, 1979).

Valeurs seuils (VT) ((µg/g) : Pb (300), Zn (300), Cu (140), Cr (70), As (20) (Union européenne, 2002 ; OMS/FAO, 2007).

*SD : Écart-type.

*MEQ% : milli-équivalents pour 100 g de sol.

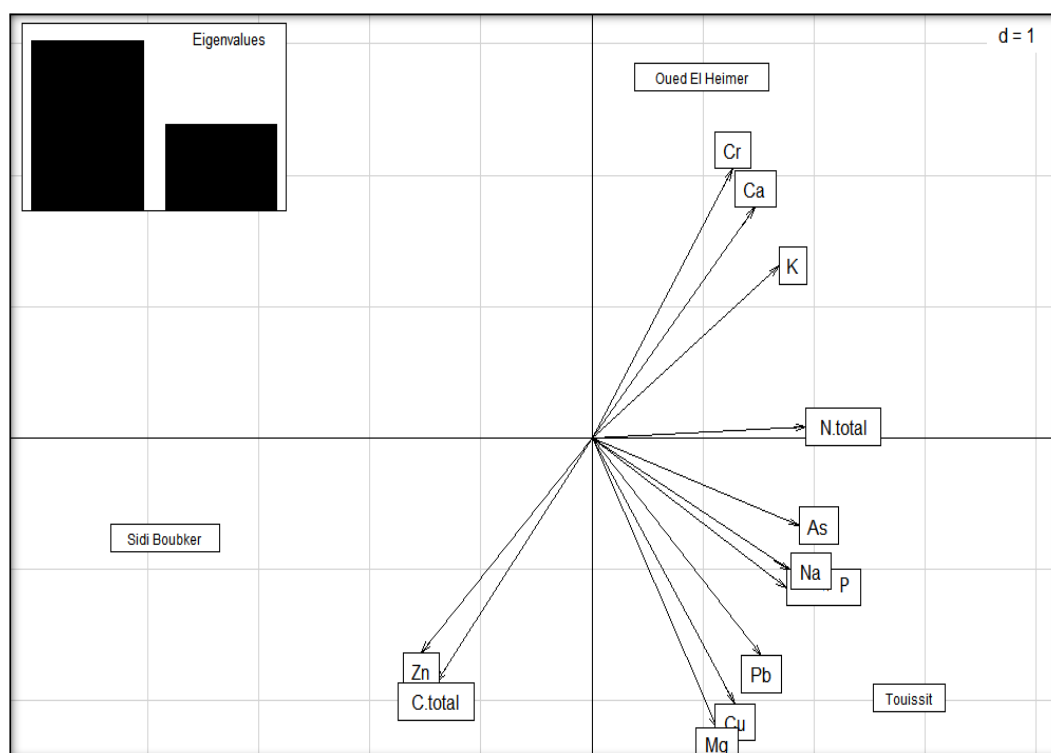


Figure 19 : Analyse en composantes principales (PCA) de la composition chimique des échantillons du sol (Touissit, Sidi Boubker, Oued El Heimer).

2. Isolement des bactéries à partir des sols nus et rhizosphériques

L'isolement des bactéries à partir de neuf échantillons de sol a conduit à une première collection de 700 isolats qui se répartissent de manière presque égale entre les trois sites étudiés (Touissit, Sidi Boubker, Oued El Heimer), avec 210 à 240 isolats par site (Figure 1). Le nombre de bactéries cultivables isolées des sols rhizosphériques était plus élevé que celui obtenu à partir des sols nus, quelle que soit la plante (*Acacia cyanophylla*, *Sulla spinosissima* ou *Stipa tenuissima*) (Figure 20, 21).

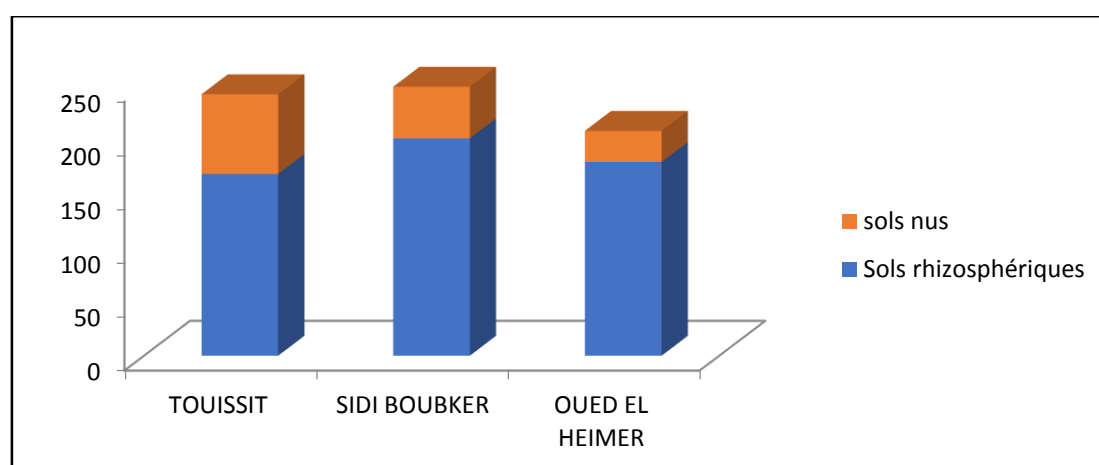


Figure 20 : Nombre total d'isolats obtenus dans les trois sites étudiés.

Au niveau du site Oued El Heimer, la rhizosphère de *Sulla spinosissima* (OH2) présente 50% de souches isolées suivie par la rhizosphère de *Stipa tenuissima* (37 %), alors que le sol nu ne présente que 13%.

Dans le site Sidi Boubker, le plus grand nombre d'isolats a été isolé à partir de la rhizosphère de *Stipa tenuissima* (B2) avec un pourcentage égale à 42%, suivie de celle de *Sulla spinosissima* (39%), alors que le sol nu ne représente que 19%.

Concernant le site Touissit, on remarque que le plus grand pourcentage est noté chez *Acacia cyanophylla* (T2) qui représente 43%, suivi du sol nu avec un pourcentage égal à 31%. Alors que la rhizosphère de *Sulla spinosissima* ne présente que présente 26%.

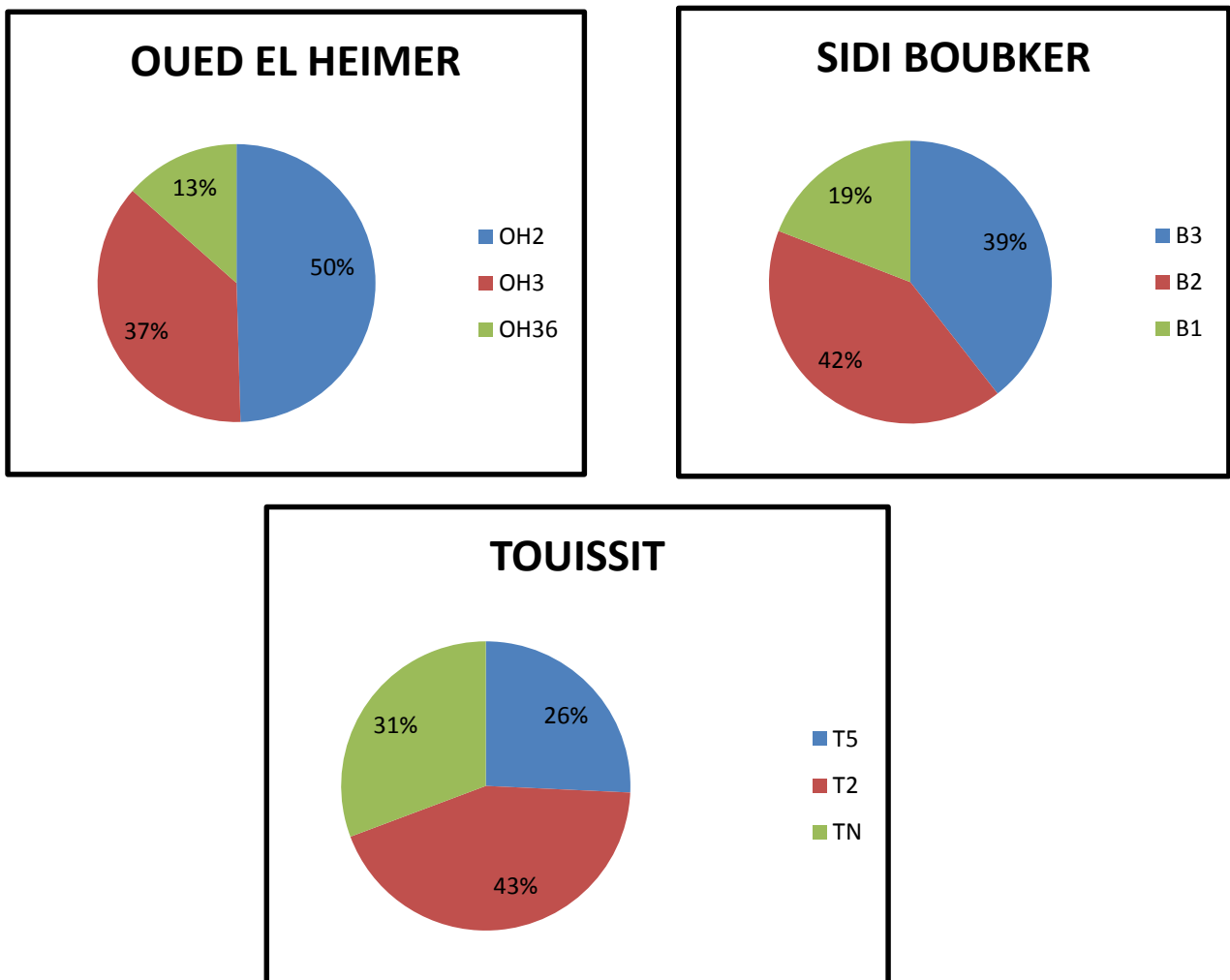


Figure 21 : Pourcentage des souches isolées de chaque échantillon de sol des trois sites : Oued El Heimer (OH), Sidi Boubker (B), Touissit (T) avec T5, B3 et OH2 correspondant aux échantillons de sol rhizosphérique de *Sulla spinosissima*, T2 (*Acacia cyanophylla*), B2 et OH3 (*Stipa tenuissima*), tandis que TN, B1 et OH36 sont des échantillons de sol nu.

3. Criblage des meilleurs isolats bactériens (tests qualitatifs)

Globalement, les résultats obtenus ont montré que les sols nus et rhizosphériques contenaient des isolats dotés d'activités biologiques susceptibles de promouvoir la croissance des plantes (activités PGP) et de tolérer les ETMs testés. Le nombre d'isolats actifs et tolérants diffère selon le type de plante, de sol et de site étudié (Figure 22).

3.1. Caractéristiques PGP

Les tests sur milieu Pikovskaya ont montré que 11.11% des bactéries isolées de la rhizosphère de *Sulla* (T5) poussant dans le site Touissit étaient capables de solubiliser le phosphate inorganique alors pour les autres activités ils ne représentent que de faibles pourcentages. A l'opposé, la rhizosphère d'*Acacia* (T2) a montré un nombre plus faible de souches ayant les activités PGP et aucun des isolats n'était capable de solubiliser le phosphate inorganique ou de produire des sidérophores. Ce n'était pas le cas des bactéries isolées du sol nu (TN), où 8 à 10% des isolats étaient capables de produire de l'AIA ou des sidérophores, ou de solubiliser le phosphate naturel.

Le sol nu du site Sidi Boubker (B1) contenait des pourcentages plus faibles de souches présentant des traits PGP par rapport à ceux enregistrés dans le sol nu de Touissit. Cependant, dans les sols rhizosphériques, les pourcentages des isolats producteurs d'AIA et d'ACC déaminase et de solubilisateurs de phosphate associés à *Stipa tenuissima* (B2) étaient plus élevés que ceux obtenus dans la rhizosphère de *Sulla* (B3).

Concernant le site d'Oued El Heimer, environ 16% des souches bactériennes isolées de la rhizosphère de *Sulla* (OH2) avaient la capacité de produire de l'AIA, mais aucune ne pouvait solubiliser le phosphate inorganique. Par contre, la rhizosphère de *Stipa tenuissima* (OH3) contenait une petite fraction de bactéries solubilisant le phosphate, cette population rhizobactérienne contenait également un pourcentage relativement plus élevé de souches capables de produire de l'AIA et des sidérophores (18% et 11.41% respectivement) et un très faible pourcentage de souches présentant une activité ACC déaminase. A l'opposé des sols rhizosphériques, le sol nu (OH36) contenait un très faible pourcentage de bactéries présentant les activités PGP étudiées.

En général, les résultats obtenus montrent que le nombre total de bactéries produisant des sidérophores et de l'AIA est plus élevé dans la rhizosphère que dans les sols nus. Il est également remarquable que la rhizosphère de *Stipa tenuissima* a montré le plus grand nombre de bactéries possédant les activités PGP.

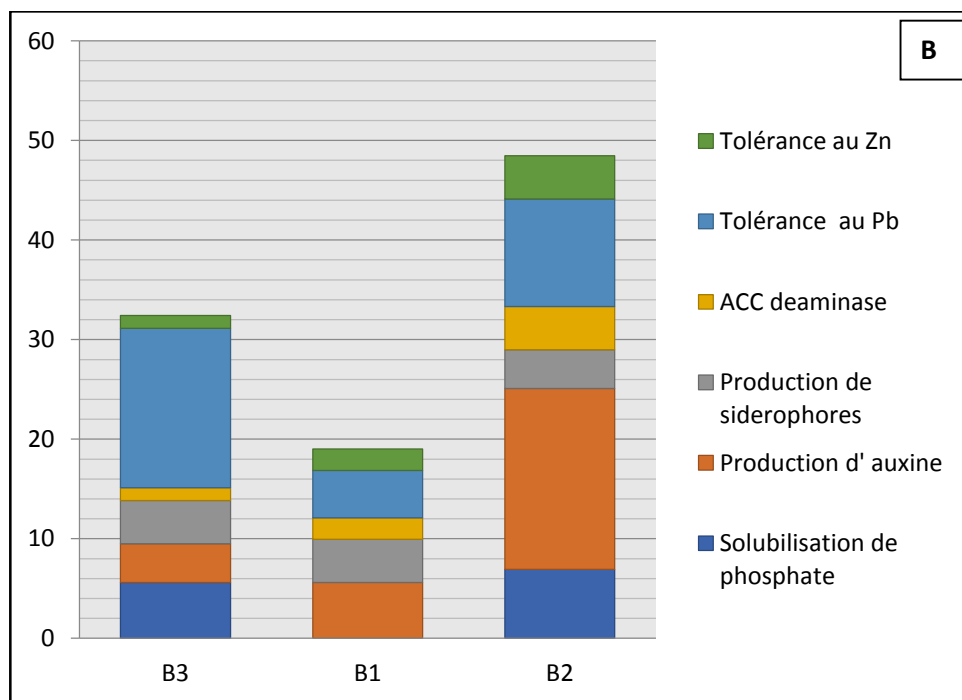
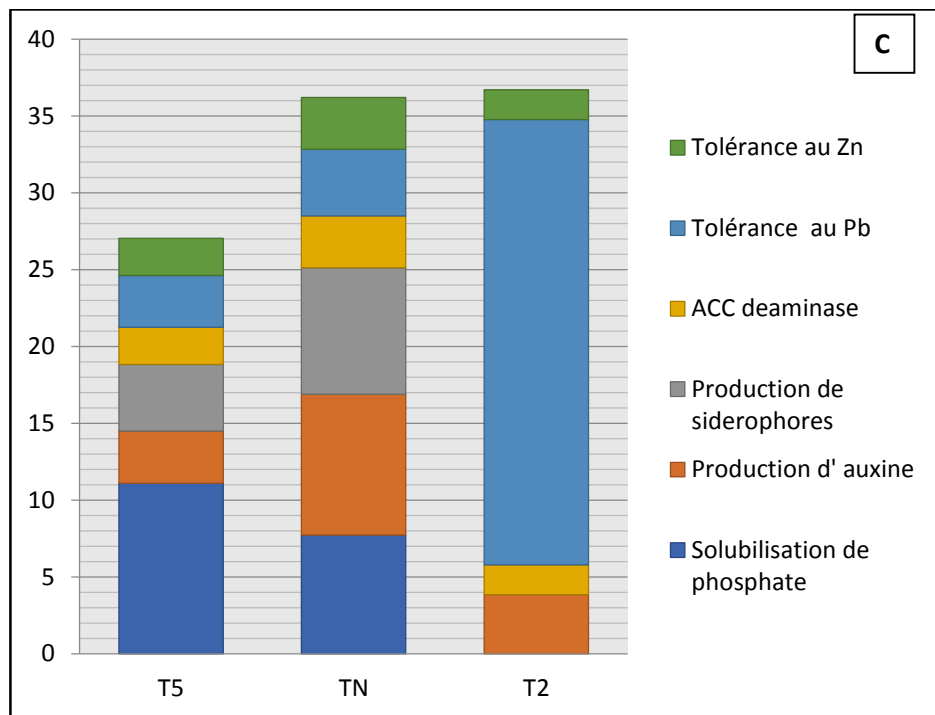
3.2.Tolérance aux éléments traces métalliques

En plus de leur capacité à favoriser la croissance des plantes, la tolérance aux ETMs est également une caractéristique importante pour réduire davantage la toxicité des ETMs qui affecte négativement les plantes associées. Pour cette raison, nous avons déterminé le nombre de bactéries tolérantes au Pb et au Zn dans les différents échantillons de sol.

De manière surprenante, nous n'avons pas obtenu d'isolats tolérants au Zn dans le sol nu d'Oued El Heimer (OH36), alors que seule une petite proportion d'isolats tolérants au Pb a été trouvée. Ceci contraste avec les quantités élevées des éléments traces métalliques mesurées dans ce sol (Tableau 3). Cependant, les isolats tolérants aux ETMs ont été trouvés dans des proportions plus élevées dans les échantillons de sol rhizosphérique de *Sulla spinosissima* (OH2) et *Stipa tenuissima* (OH3), respectivement 12.5% et 11.41% pour la tolérance au Pb, et 2.71% et 1.63% pour la tolérance au Zn.

Les pourcentages d'isolats tolérants les ETMs obtenus dans les sols de Touissit étaient généralement plus faibles que ceux isolés dans les sols d'Oued El Heimer. La majorité des bactéries isolées de la rhizosphère de *Sulla* (T3) et du sol nu (TN) étaient faiblement tolérantes au Pb et au Zn. L'exception était les bactéries isolées de la rhizosphère d'*Acacia* (T2) avec 29% d'isolats tolérants au Pb.

Dans le troisième site, Sidi Boubker, les souches tolérantes au Zn étaient une minorité dans le sol nu (B1) et la rhizosphère de *Sulla* et *Stipa*. A l'opposé, un pourcentage élevé de souches tolérantes au plomb a été trouvé dans les sols rhizosphériques (16% pour *Sulla* et 11% pour *Stipa*), alors que dans le sol nu, seul un faible pourcentage de bactéries tolérantes au Pb a été trouvé.



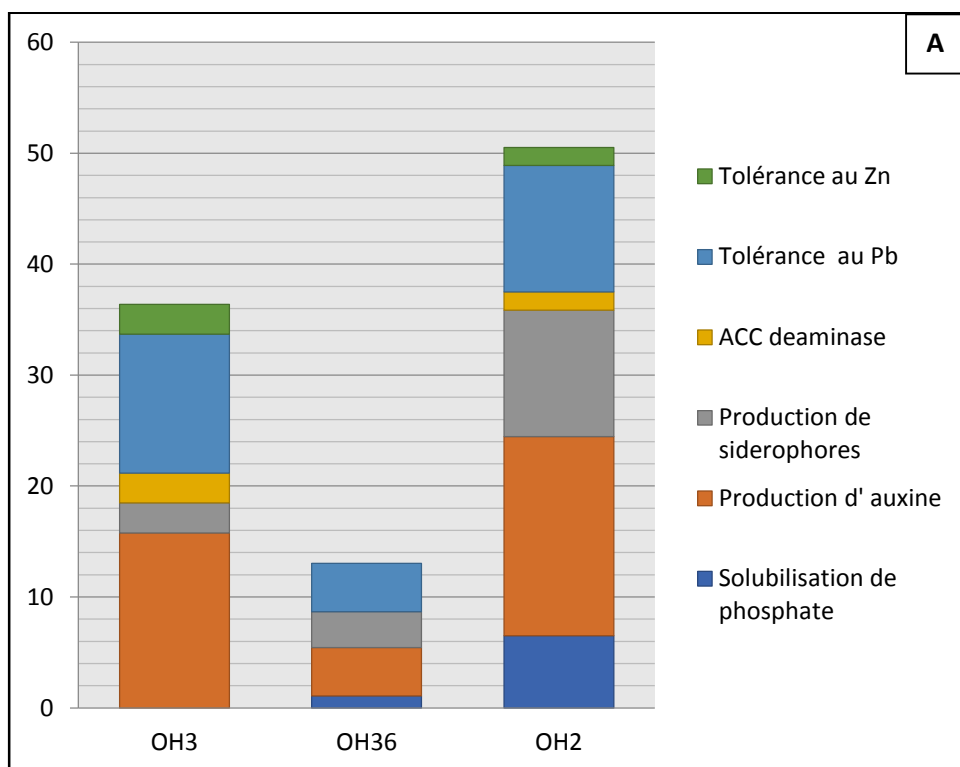


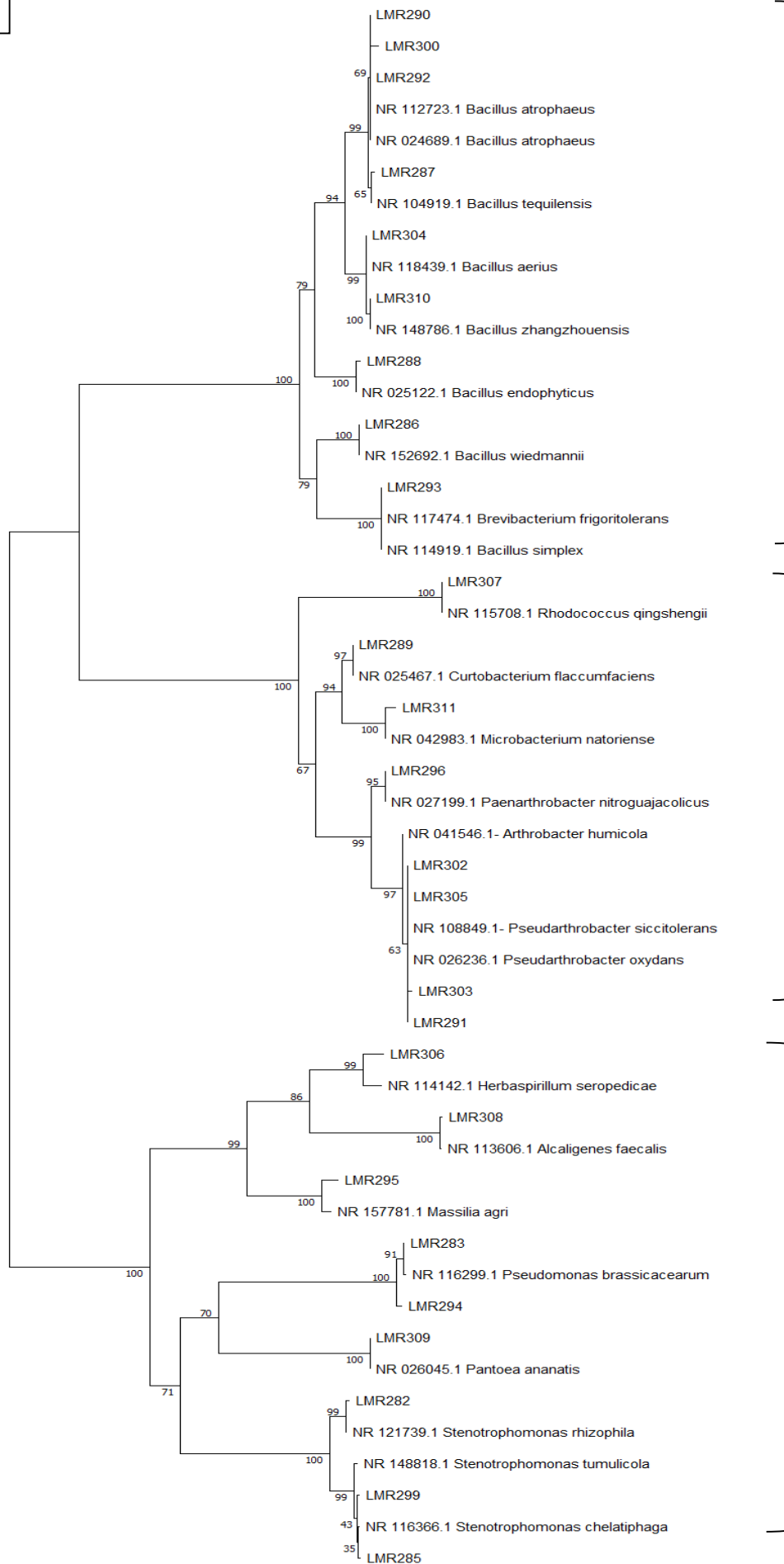
Figure 22 : Pourcentage de souches présentant des activités biologiques (production d'auxine et de sidérophore, solubilisation du phosphate, activité ACC déaminase) et une tolérance au Pb et au Zn.

A : Oued El Heimer (OH), B : Sidi Boubker (B), C : Touissit (T), avec T5, B3 et OH2 correspondant aux échantillons de sol rhizosphérique de *Sulla spinosissima*, T2 ceux d'*Acacia cyanophylla*, B2 et OH3 ceux de *Stipa tenuissima*, tandis que TN, B1 et OH36 sont des échantillons de sol nu.

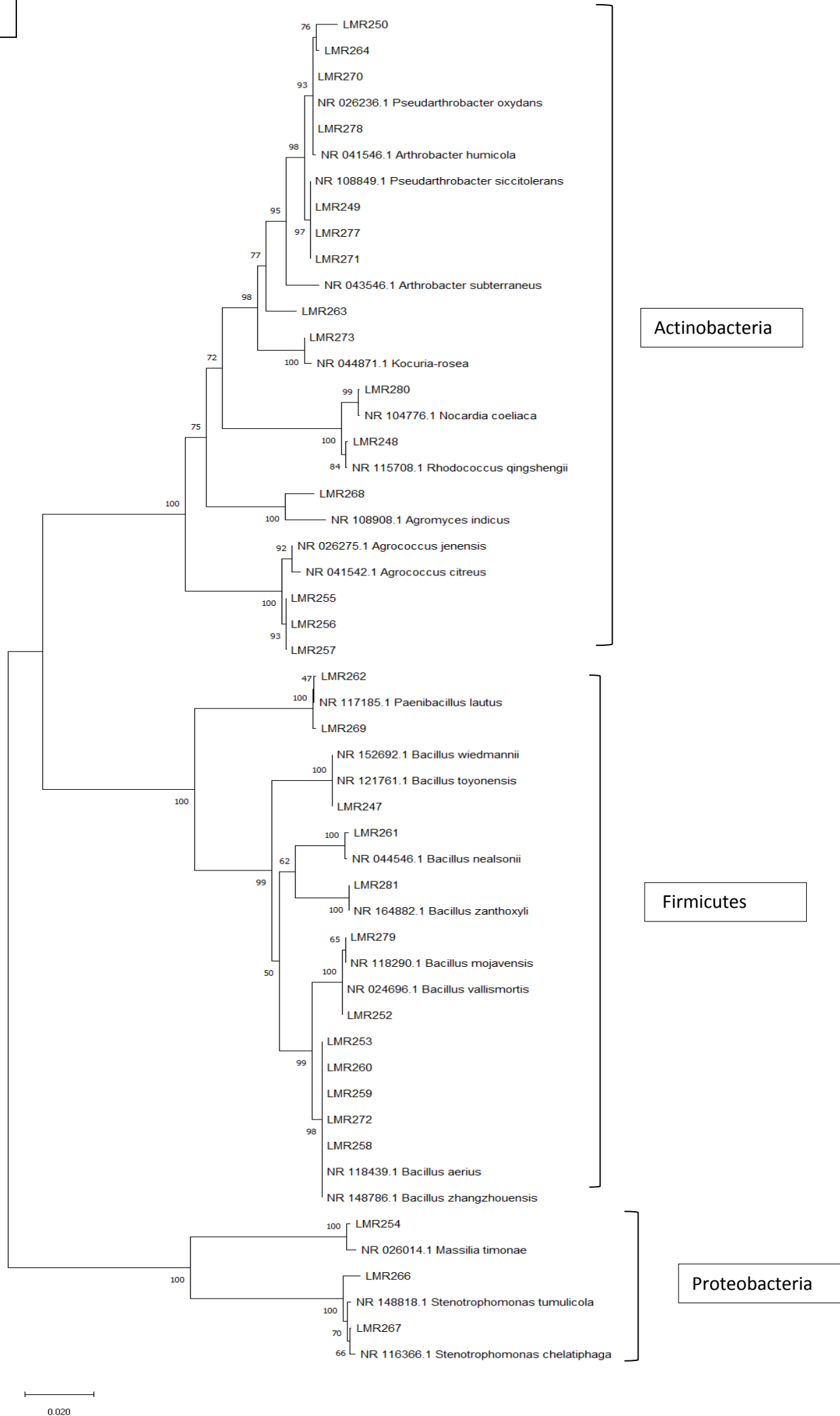
4. Identification moléculaire des meilleurs isolats bactériens

Après analyse des résultats des tests qualitatifs des activités PGP et le test de tolérance aux ETMs, les meilleures bactéries ont été identifiées par séquençage de l'ADNr 16S. Les différentes espèces bactériennes identifiées dans les trois sols sont présentées dans les arbres phylogénétiques (Figure 23).

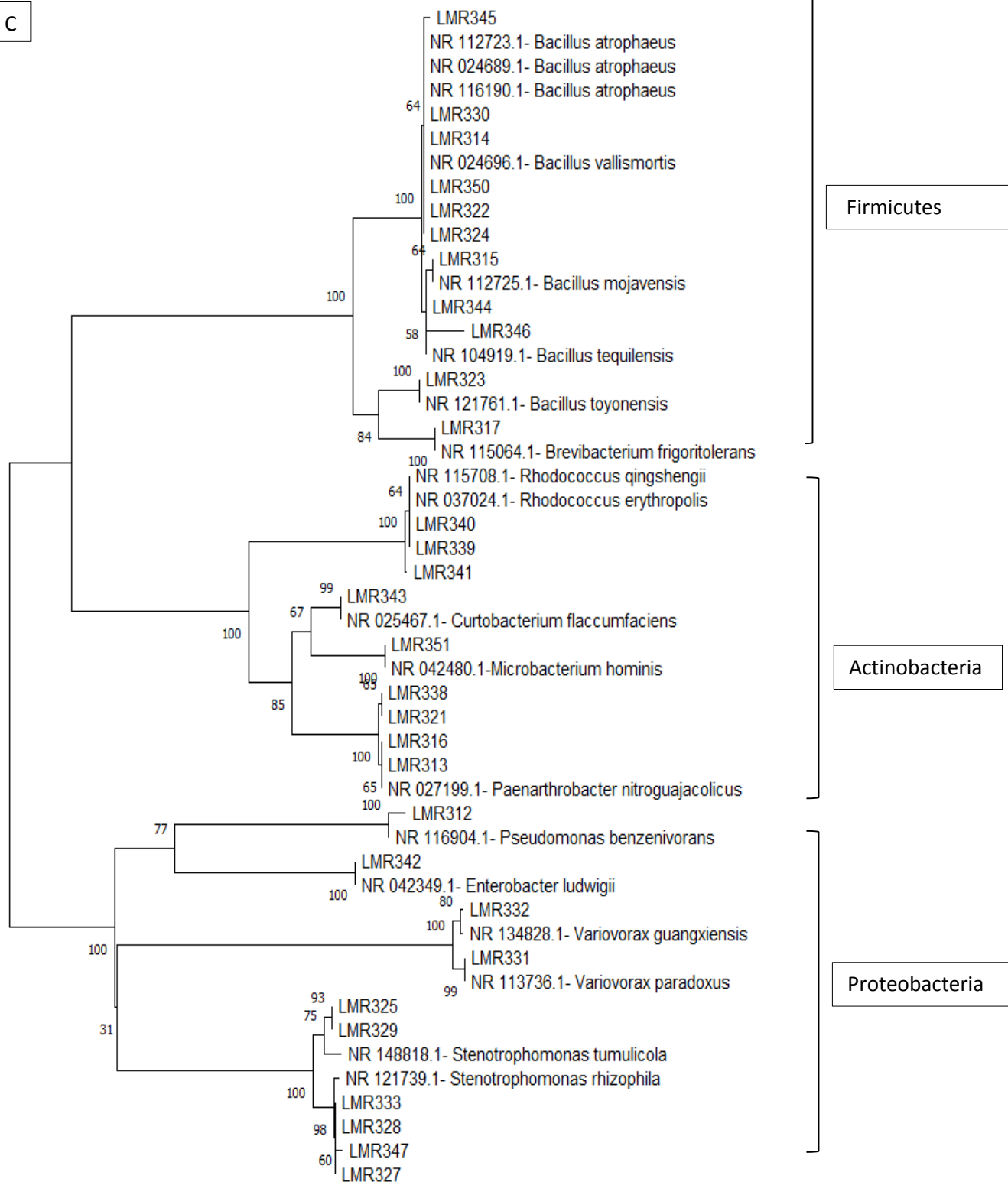
A



B



C



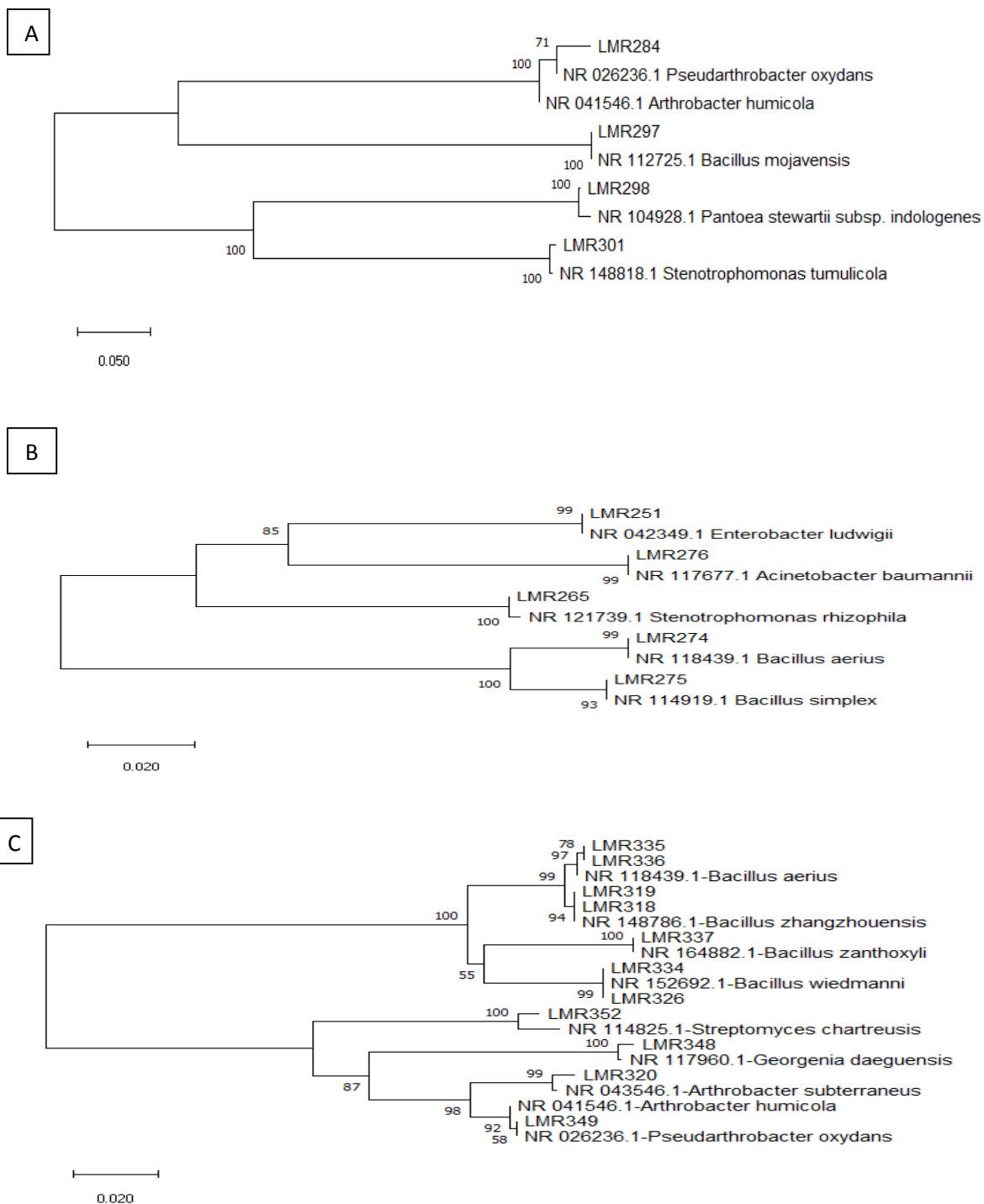


Figure 23 : Arbres phylogénétiques des séquences partielles d'ADNr 16S d'isolats représentatifs affiliés aux Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Actinobacteria et Firmicutes. A : souches d'Oued El Heimer, B : souches de Sidi Boubker, C : souches de Touissit.

Les résultats obtenus ont montré que les séquences appartenaient au moins à 48 espèces différentes connues et 23 genres qui sont associés aux trois phyla : Firmicutes, Actinobacteria et Proteobacteria (Figure 23).

Si on considère l'ensemble des sols des trois sites miniers analysés, les Firmicutes constituent le phylum le plus abondant avec 48% d'isolats (Figure 24), suivis des Actinobacteria et des Proteobacteria (respectivement 28% et 25% d'isolats). Les souches identifiées dans le phylum des protéobactéries appartiennent aux gammaproteobacteria et betaproteobacteria, ce dernier est le groupe minoritaire dans tous les sols étudiés.

L'abondance relative de chaque genre dans les sols nus et les sols rhizosphériques de chaque site est présentée dans la figure 25. A ce niveau, le genre *Bacillus* était dominant avec 50% de la population bactérienne cultivable des sols rhizosphériques et nus de Touissit. Dans le site de Sidi Boubker, le même genre a dominé dans la rhizosphère de *Stipa tenuissima* (B2) avec près de seize souches, suivi par d'autres genres à des niveaux inférieurs. Cependant, dans la rhizosphère de *Sulla* (B3), un deuxième genre *Arthrobacter* était également abondant en plus de *Bacillus* (respectivement 7 et 9 souches), alors que dans le sol nu (B1), *Bacillus* était clairement dominant.

Dans le troisième site minier prospecté, l'identification moléculaire des bactéries a révélé que les isolats associés à *Sulla-Stipa* étaient comme pour les sols précédents dominés par le genre *Bacillus*, d'autres genres minoritaires étaient représentés par 1 ou 2 souches chacun. A l'opposé, le sol nu du même site (OH36) était caractérisé par une faible diversité de bactéries isolées. Le genre *Bacillus* était représenté par deux souches, tandis qu'une seule souche a été identifiée pour chacun des trois genres *Arthrobacter*, *Stenotrophomonas* et *Pantoea*.

Globalement, l'identification moléculaire de la collection bactérienne des trois sites miniers a montré que ces sols contiennent des populations diversifiées de bactéries qui sont dominées par le genre *Bacillus*. Ce genre a été retrouvé dans chacun des neuf échantillons de sol prospectés. De légères différences existent entre les populations des sols rhizosphériques par rapport à celles des sols nus. Certains genres bactériens semblent être ubiquistes puisqu'ils ont été trouvés dans les trois sites, sols nus ou rhizosphériques et quelle que soit la plante hôte (*Sulla*, *Acacia* ou *Stipa*). C'est le cas des genres *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Stenotrophomonas* et *Rhodococcus*. D'autres genres semblent être spécifiques à certains environnements comme *Variovorax* qui n'a été trouvé que dans la rhizosphère d'*Acacia*, tandis que *Pseudomonas* et *Agrococcus* ont été isolés exclusivement de la rhizosphère de *Stipa tenuissima*.

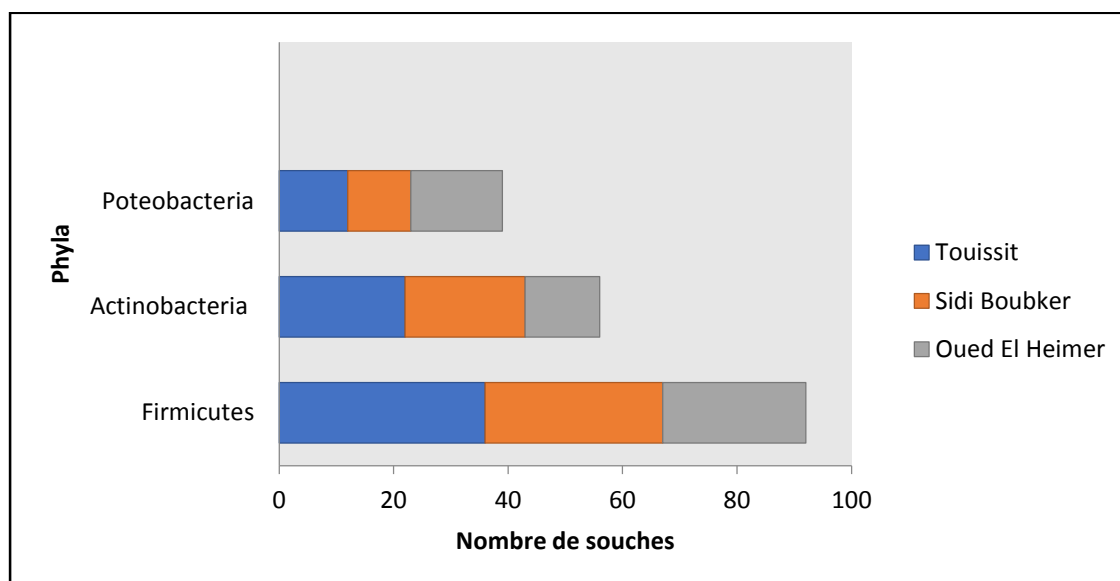
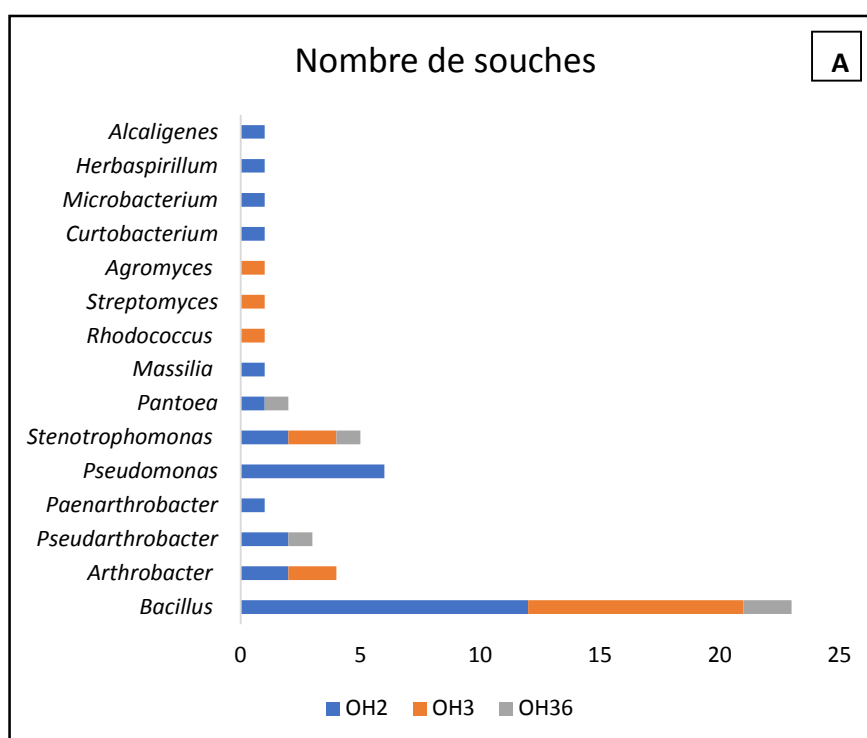


Figure 24 : Structure des communautés bactériennes au niveau embranchement dans les différents sites étudiés (T : Touissit, B : Sidi Boubker, OH : Oued El Heimer).



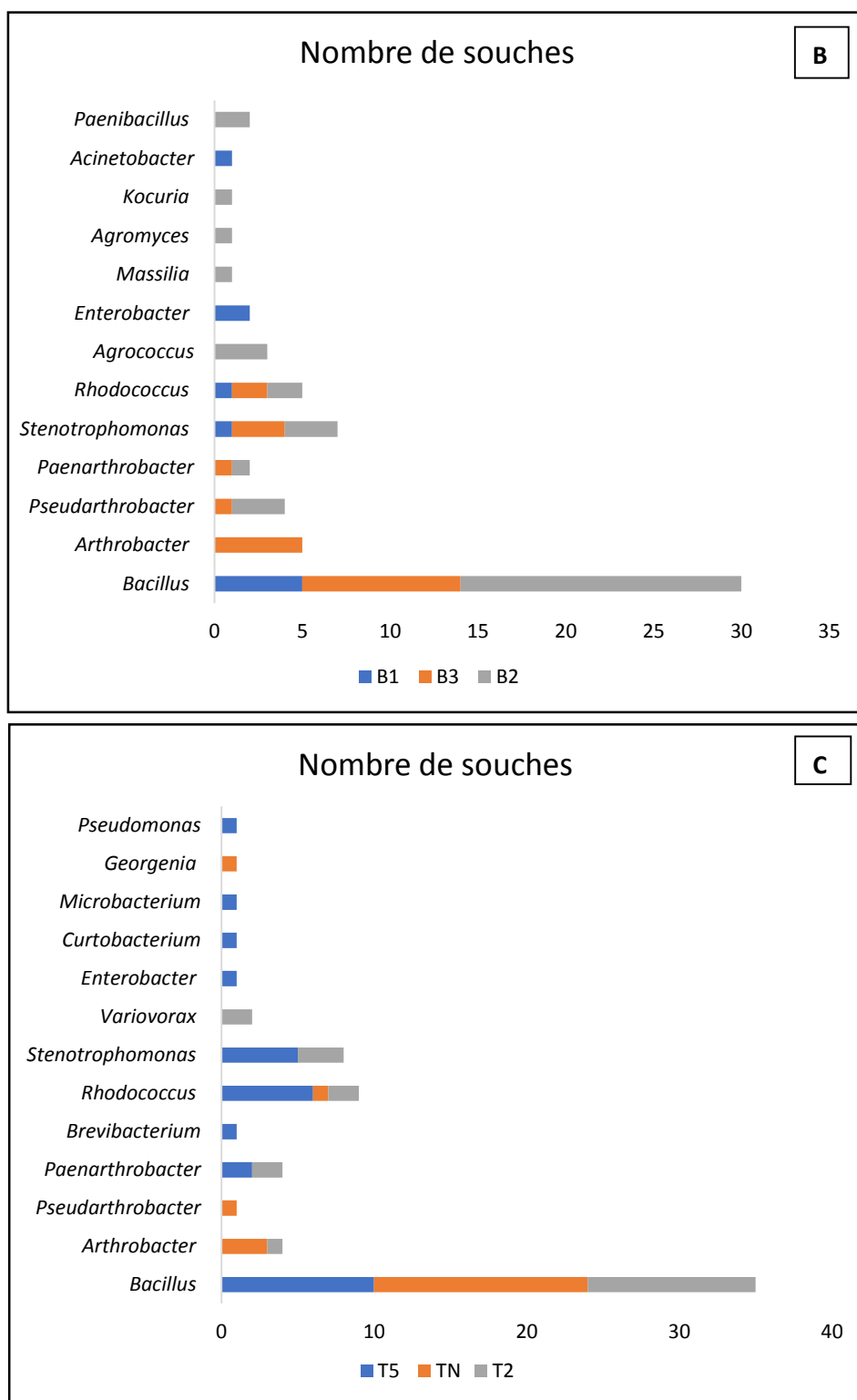


Figure 25 : Structure des communautés bactériennes au niveau genre dans les différents sites étudiés (A : Oued El Heimer (OH), B : Sidi Boubker (B), C : Touissit (T)).

5. Caractérisation physiologique des souches sélectionnées

5.1. Détermination des CMI de chaque souche

Après les tests qualitatifs, les meilleures souches ont été évaluées de manière plus approfondie quant à leur tolérance au Pb, Zn et As, en déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI) de chaque métal lourd étudié. Les résultats obtenus ont montré que 48 souches sont capables de tolérer le plomb, 16 souches pour le zinc et 6 souches pour l'arsenic (Annexe 1). On remarque que les souches *Rhodococcus erythropolis* (LMR341), *Rhodococcus qingshengii* (LMR340), *Rhodococcus erythropolis* (LMR339), *Stenotrophomonas rhizophila* (LMR333), *Variovorax paradoxus* (LMR331), *Pseudarthrobacter siccitolerans* (LMR277) sont capables de tolérer les trois ETMs étudiés avec des valeurs supérieures à 20 mM (Tableau 4).

Tableau 4 : La concentration minimal inhibitrice des éléments traces métalliques (Pb, Zn, As)

CODE LMR	Bactéries	Sites	Sols d'origine	CMI Pb	CMI Zn	CMI As
LMR248	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	35	15
LMR251	<i>Enterobacter ludwigii</i>	B	Sol nu	20	0	0
LMR252	<i>Bacillus vallismortis</i>	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	25	0	0
LMR254	<i>Massilia timonae</i>	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	25	15	0
LMR256	<i>Agrococcus jenensis</i>	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	20	0	0
LMR259	<i>Bacillus aerius</i>	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	20	10	0
LMR262	<i>Paenibacillus lautus</i>	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	25	0	25
LMR263	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	15	20
LMR264	<i>Arthrobacter humicola</i>	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	25	0
LMR265	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	B	Sol nu	25	35	10
LMR266	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	10	20	10
LMR268	<i>Agromyces indicus</i>	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	25	0	0
LMR269	<i>Paenibacillus lautus</i>	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	25	0	7,5
LMR270	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	25	30	0
LMR272	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	25	0	5
LMR273	<i>Kocuria rosea</i>	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	20	0	0
LMR277	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	20	25
LMR278	<i>Arthrobacter humicola</i>	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	0	0
LMR280	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	20	20	15
LMR282	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	20	10	7,5
LMR287	<i>Bacillus tequilensis</i>	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	25	35	7,5
LMR289	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	0	0
LMR290	<i>Bacillus atrophaeus</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	0	0
LMR292	<i>Bacillus atrophaeus</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	0	15
LMR294	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	20	10	7,5
LMR296	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	20	10	0
LMR297	<i>Bacillus mojavensis</i>	OH	Sol nu	20	0	0
LMR298	<i>Pantoea stewartii</i>	OH	Sol nu	20	0	7,5
LMR299	<i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i>	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	25	10	7,5
LMR300	<i>Bacillus atrophaeus</i>	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	25	0	7,5
LMR301	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	OH	Sol nu	25	10	7,5
LMR302	<i>Arthrobacter humicola</i>	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	25	0	7,5

LMR303	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	0	0
LMR304	<i>Bacillus aerius</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	15	0	30
LMR305	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	0	0
LMR309	<i>Pantoea ananatis</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	20	10	0
LMR311	<i>Microbacterium natoriense</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	0	0
LMR312	<i>Pseudomonas benzenivorans</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	35	7,5
LMR313	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	0	0
LMR314	<i>Bacillus vallismortis</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	20	15	7,5
LMR315	<i>Bacillus Mojavensis</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	10	0
LMR316	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	20	0	0
LMR317	<i>[Brevibacterium] frigoritolerans</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	35	0
LMR319	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	T	Sol nu	20	15	0
LMR320	<i>Arthrobacter subterraneus</i>	T	Sol nu	25	0	10
LMR321	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	25	15	5
LMR322	<i>Bacillus vallismortis</i>	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	25	10	7,5
LMR323	<i>Bacillus toyonensis</i>	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	25	0	0
LMR324	<i>Bacillus atrophaeus</i>	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	25	10	7,5
LMR325	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	25	10	5
LMR326	<i>Bacillus wiedmannii</i>	T	Sol nu	20	15	20
LMR327	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	35	10
LMR328	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	35	10
LMR329	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	15	35	0
LMR330	<i>Bacillus atrophaeus</i>	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	25	25	15
LMR331	<i>Variovorax paradoxus</i>	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	25	25	20
LMR332	<i>Variovorax guangxiensis</i>	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	25	10	10
LMR333	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	35	20
LMR334	<i>Bacillus wiedmannii</i>	T	Sol nu	25	0	7,5
LMR335	<i>Bacillus aerius</i>	T	Sol nu	25	0	0
LMR336	<i>Bacillus aerius</i>	T	Sol nu	25	0	0
LMR338	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	15	0	30
LMR339	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	25	30	35
LMR340	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	30	35
LMR341	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	20	35	20
LMR342	<i>Enterobacter ludwigii</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	10	15
LMR344	<i>Bacillus tequilensis</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	20	10	0
LMR346	<i>Bacillus tequilensis</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	15	10	20
LMR350	<i>Bacillus vallismortis</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	10	7,5

5.2. Quantification des activités phytobénéfiques des souches intéressantes

5.2.1. Solubilisation du phosphate

La capacité des meilleures souches criblées précédemment à solubiliser la roche phosphatée a été quantifiée. Les résultats obtenus ont montré que 25 souches sont capables de solubiliser le phosphate, ce qui représente 23% des souches testées. Il est intéressant de noter que les bactéries isolées de la rhizosphère de *Sulla spinosissima* représentent le plus grand nombre (Annexe 2).

Les souches les plus efficaces pour la solubilisation du phosphate naturel étaient la souche LMR291 de *Pseudarthrobacter oxydans*, la souche LMR312 de *Pseudomonas benzenivorans* et la souche LMR282 de *Stenotrophomonas rhizophila*, avec respectivement 67.6 mg L⁻¹, 50.7 mg L⁻¹ et 48.5 mg L⁻¹ de P soluble produit dans le milieu PVK. Les souches les plus faibles appartiennent au genre *Pseudomonas* (LMR283), *Stenotrophomonas* (LMR327 et LMR328) (Tableau 5).

5.2.2. Production d'auxine

La majorité des isolats (environ 60) sont capables de produire l'AIA, dont la dominance est notée chez les bactéries isolées de la rhizosphère de *Sulla spinosissima* (Tableau annexe 2). Parmi elles, 15 peuvent être très performantes avec des valeurs supérieures à 50 µg mL⁻¹ d'auxine produite. Il est intéressant de noter que les différents genres identifiés dans cette étude ont la capacité de produire de l'acide indol-acétique comme *Paenarthrobacter*, *Pseudarthrobacter*, *Kocuria*, *Pantoea*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, et *Curtobacterium*. Le meilleur producteur d'auxine *in vitro* était l'isolat LMR283 de *Pseudomonas brassicacearum* (144.9 µg mL⁻¹), suivi de LMR308 d'*Alcaligenes faecalis* (140.8 µg mL⁻¹) (Tableau 5), alors que le plus faible producteur était LMR326 *Bacillus wiedmannii* avec 2.8 µg mL⁻¹ (Annexe 2).

5.2.3. Production de sidérophores

D'après les résultats obtenus, la rhizosphère de *Sulla spinosissima* contient un grand nombre de souches capables de produire les siderophores par rapport aux autres rhizosphères (Annexe 2). Parmi les souches testées, cinq avaient une production importante de sidérophores : *Pseudarthrobacter oxydans* (LMR250), *Bacillus aerius* (LMR258), *Rhodococcus erythropolis* (LMR280), *Nocardia coeliaca* (LMR307) et *Bacillus zhangzhouensis* (LMR310) avec un rapport de 0.025, 0.029, 0.076, 0.078 et 0.045, respectivement (Tableau 5).

Tableau 5 : Quantification des activités phytobénéfiques chez les souches intéressantes

CODE LMR	Bactéries	Sites	Sols d'origine	P soluble (mg L ⁻¹)	AIA (µg mL ⁻¹)	Sidérophores
LMR249	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	2.31±0.1	66.66±1.6	0.402±0.1
LMR250	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	0	127±0.1	0.025±0.03
LMR251	<i>Enterobacter ludwigii</i>	B	Sol nu	-	12.86±1.2	0.0208±0.4
LMR257	<i>Agrococcus citreus</i>	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	-	27.38±1.4	-
LMR258	<i>Bacillus aerius</i>	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	-	17.62±0.2	0.029±0.05
LMR262	<i>Paenibacillus lautus</i>	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	12.7±0.8	1.79±0.03	-
LMR264	<i>Arthrobacter humicola</i>	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	11.82±0.75	-	-
LMR266	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	0	19.5±1	0.132±0.08
LMR273	<i>Kocuria rosea</i>	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	-	70.71±1.2	-
LMR279	<i>Bacillus mojavenis</i>	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	7.29±0.65	-	-
LMR280	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	-	0.076±0.04
LMR281	<i>Bacillus zanthoxyli</i>	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	10.16±1.5	-	-
LMR282	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	48.6±0.87	4.41±0.31	0.541±0.13
LMR283	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	2.4±0.3	144.98±0.9	0.243±0.1
LMR287	<i>Bacillus tequilensis</i>	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	-	21.67±1.46	-
LMR289	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	107.96±3.52	-
LMR291	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	67.65±0.1	134.15±0.6	0
LMR292	<i>Bacillus atrophaeus</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	4.294±0.22	0.178±0.04
LMR294	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	76.54±1.9	-
LMR297	<i>Bacillus mojavenis</i>	OH	Sol nu	-	25.59±1.5	-
LMR298	<i>Pantoea stewartii</i>	OH	Sol nu	-	55.59±2.2	-
LMR303	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	23.01±1.7	-	-
LMR305	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	104.03±2.8	-

LMR307	<i>Nocardia coeliaca</i>	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	-	-	0.078±0.033
LMR308	<i>Alcaligenes faecalis</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	140.81±3.87	-
LMR309	<i>Pantoea ananatis</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	15.49±1.21	100.1±2.7	-
LMR310	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	-	0.045±0.01
LMR312	<i>Pseudomonas benzenivorans</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	50.75±1.5	61.78±2	-
LMR317	<i>[Brevibacterium] frigiditolerans</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	21.07±1.4	-
LMR321	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	T	Rhizosphère od' <i>Acacia cyanophylla</i>	7.36±0.6	110.34±3.8	-
LMR323	<i>Bacillus toyonensis</i>	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	5.16±1.76	20.12±3.4	-
LMR329	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	24.7±1.2	-	-
LMR333	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	21.43±1.45	-
LMR337	<i>Bacillus zanthoxyli</i>	T	Sol nu	-	36.07±2.7	-
LMR340	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	0	26.67±1.2	0
LMR341	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	16.9±1.5	104.98±3.8	-
LMR342	<i>Enterobacter ludwigii</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	104.75±2.5	-
LMR343	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	10.83±1.32	-	-
LMR344	<i>Bacillus tequilensis</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	18.77±2	-	-
LMR345	<i>Bacillus tequilensis</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	13.03±1.7	-	-
LMR346	<i>Bacillus tequilensis</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	22.30±1	-	-
LMR347	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	23.7±0.6	-	-

5.2.4. Activité ACC déaminase et fixation libre d'azote

En plus de la croissance des souches sur le milieu minimal contenant de l'ACC comme seule source d'azote et de carbone, nous avons déterminé leur capacité à produire l' α -ketobutyrate, qui est produit lors de la dégradation de l'ACC. Les souches LMR249, LMR339, LMR307, LMR326 et LMR310 avaient les valeurs les plus élevées de l'activité (128, 122, 111, 105, 104 nmoL α -ketobutyrate $\text{mg}^{-1} \text{h}^{-1}$) suivies par les souches LMR293, LMR330 et LMR291 (93, 88, 71 nmoL α -ketobutyrate $\text{mg}^{-1} \text{h}^{-1}$) (Tableau 6).

La capacité des bactéries à fixer l'azote atmosphérique a été déterminée selon la méthode de Döbereiner (année). Les résultats obtenus montrent que la plupart des souches testées sont capables de fixer librement l'azote et elles appartiennent aux genres *Pseudarthrobacter*, *Paenarthrobacter*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas* et *Bacillus* (Tableau 6).

Tableau 6 : Activité ACC déaminase et fixation libre de l'azote chez les souches intéressantes

Code LMR	Bactéries	Sites	Sols d'origine	Quantité de α -ketobutyrate (nmoL $\text{mg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	Fixation libre d'azote
LMR249	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	B	<i>Stipa tenuissima</i>	128±0.8	0
LMR250	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	B	<i>Stipa tenuissima</i>	4±0.5	1
LMR251	<i>Enterobacter ludwigii</i>	B	Sol nu	0	1
LMR270	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	B	<i>Stipa tenuissima</i>	111±3	0
LMR291	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	OH	<i>Sulla spinosissima</i>	71.1±1.4	1
LMR293	<i>Bacillus simplex</i>	OH	<i>Sulla spinosissima</i>	93±1.5	0
LMR307	<i>Nocardia coeliaca</i>	OH	<i>Stipa tenuissima</i>	8±0.4	1
LMR309	<i>Pantoea ananatis</i>	OH	<i>Sulla spinosissima</i>	0	1
LMR310	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	OH	<i>Sulla spinosissima</i>	104±3.6	0
LMR316	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	T	<i>Sulla spinosissima</i>	0	1
LMR320	<i>Arthrobacter subterraneus</i>	T	Sol nu	0	1
LMR324	<i>Bacillus atrophaeus</i>	T	<i>Acacia cyanophylla</i>	40±1.98	0
LMR326	<i>Bacillus wiedmannii</i>	T	Sol nu	105±2.8	0
LMR330	<i>Bacillus atrophaeus</i>	T	<i>Acacia cyanophylla</i>	88±4.1	0
LMR331	<i>Variovorax paradoxus</i>	T	<i>Acacia cyanophylla</i>	57±1.5	0
LMR333	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	T	<i>Sulla spinosissima</i>	0	1
LMR335	<i>Bacillus aerius</i>	T	Sol nu	0	1
LMR339	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	T	<i>Acacia cyanophylla</i>	122±4	0
LMR340	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	T	<i>Sulla spinosissima</i>	58±2.3	1

LMR344	<i>Bacillus tequilensis</i>	T	<i>Sulla spinosissima</i>	0	1
LMR348	<i>Georgenia daeguensis</i>	T	Sol nu	20±1.6	0
LMR351	<i>Microbacterium hominis</i>	T	<i>Sulla spinosissima</i>	41±1.5	0

5.2.5. Activités antifongiques des souches intéressantes

Pour étudier l'activité antagoniste des bactéries PGP les plus performantes contre le champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum*, des techniques de confrontation directe et indirecte ont été réalisées. Selon le tableau 7, 17 souches ont dépassé une inhibition de 50 % de la croissance fongique en utilisant la méthode de confrontation directe. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les souches LMR333 (*Stenotrophomonas rhizophila*), LMR302 (*Arthrobacter humicola*), LMR252 (*Bacillus vallismortis*) et LMR294 (*Pseudomonas brassicacearum*), avec respectivement 90%, 87.6%, 81.5%, 81.4% d'inhibition. L'étude de l'inhibition des champignons par les substances diffusibles a montré que la plupart des bactéries testées inhibaient l'agent pathogène mais avec une intensité variable. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les souches LMR271 (*Pseudarthrobacter siccitolerans*), LMR292 (*Bacillus atrophaeus*), LMR339 (*Rhodococcus erythropolis*), et LMR303 (*Pseudarthrobacter siccitolerans*).

La troisième méthode de confrontation par les substances volatiles a montré que 23 bactéries avaient un effet inhibiteur sur le pathogène. Cinq souches ont montré un pourcentage d'inhibition supérieur à 80%. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les souches LMR302 (*Arthrobacter humicola*), LMR303 (*Pseudarthrobacter siccitolerans*), LMR340 (*Rhodococcus qingshengii*) et LMR271 (*Pseudarthrobacter siccitolerans*) (Tableau 7) (Annexe 5).

Parmi les 4 enzymes lytiques étudiées, la chitinase a été produite par la majorité des souches testées, suivie par la protéase, cellulase et lipase. Les résultats ont également montré que deux souches étaient capables de produire quatre enzymes (*Stenotrophomonas tumulicola* LMR266 et *Stenotrophomonas chelatiphaga* LMR267), vingt souches étaient capables de produire trois enzymes (18% des souches testées), tandis que 30% et 22% ont montré la production de respectivement deux/une enzymes lytiques, et 28% des souches n'ont produit aucune enzyme lytique. Les souches les plus performantes appartiennent aux genres *Stenotrophomonas*, *Pseudarthrobacter*, *Paenarthrobacte*, *Bacillus* et *Rhodococcus*, et la plupart d'entre elles ont été isolées de la rhizosphère des plantes étudiées (Annexe 4).

Tableau 7 : Activités antifongiques des souches intéressantes étudiées par 3 techniques différentes

CODE LMR	Bactéries	SITES	Sols d'origine	T1 (%)	T2 (%)	T3 (%)
LMR248	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	64 ±1	54.33±1.8	43.54±1.6
LMR249	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	76.3±1.4	83.4±2.03	67.6±0.79
LMR250	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	60.5±0.55	58.9±0.89	55±1.1
LMR252	<i>Bacillus vallismortis</i>	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	81.5±5.7	76±2.44	71.34±4.6
LMR255	<i>Agrococcus jenensis</i>	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	56.3±3.66	57.4±2.89	64.6±4.6
LMR256	<i>Agrococcus jenensis</i>	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	43.4±3.7	40.1±3.66	53.22±6.5
LMR257	<i>Agrococcus citreus</i>	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	67.4±7.83	66.3±4.22	56.3±1.66
LMR258	<i>Bacillus aerius</i>	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	75.4±1.22	77±5.33	75.29±1.3
LMR268	<i>Agromyces indicus</i>	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	79.1±7.8	79.4±4.2	75.29±2.3
LMR271	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	74.1±2.3	100	80.1±1.2
LMR274	<i>Bacillus aerius</i>	B	Sol nu	-	10±1	-
LMR280	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	12±1	-	-
LMR282	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	11.7±1.4	-
LMR285	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	41.33±2.54	54.89±1.4	60.54±2
LMR292	<i>Bacillus atrophaeus</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	12. 5±2.4	100	-
LMR293	<i>Bacillus simplex</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	-	80±1.8
LMR294	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	81.4±3	84.2±2.5	37.5±2.5
LMR302	<i>Arthrobacter humicola</i>	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	87.6±2.3	78±1.7	100
LMR303	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	79.41±1	94.11±0.6	92.9±1.8
LMR307	<i>Nocardia coeliaca</i>	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	52.45±1.5	43.1±2.4	61.75±1.4
LMR310	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	37.5±3	56.2±3.2
LMR321	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	55.6±4.6	49.3±1.7	43.5±1.33
LMR333	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	90±1.5	12.5±3.5	62.5±2.3
LMR339	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	54.11±2.4	91.41±1.9	70.58±3.6
LMR340	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	-	90.5±1.6
LMR341	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	68.3±3.4	82.9±2.6	36.2±2.7
LMR349	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	T	Sol nu	45.3±1.5	56.3±6	54±4.3

T1 : Méthode par confrontation directe

T2 : Méthode par substances diffusibles

T3 : Méthode par substances volatiles

6. Essais d'inoculation des plantes de *Sulla spinosissima* avec des souches sélectionnées

6.1. Caractéristiques des souches utilisées

Les souches utilisées dans les essais d'inoculation des plantes sont sélectionnées (LMR249, LMR250, LMR266, LMR283, LMR291, LMR340) en se basant sur leur tolérance aux éléments traces métalliques et leurs activités phytobénéfiques *in vitro*. Elles sont multi-tolérantes aux trois éléments traces métalliques testés (Pb, Zn, et As) mais à des degrés différents (Tableau 8). Les CMI les plus élevées ont été enregistrées chez la souche LMR340 (*Rhodococcus qingshengii*), suivie de la souche LMR266 (*Stenotrophomonas tumulicola*), toutes les deux ayant été isolées à partir du sol rhizosphérique de *Sulla spinosissima*. Au niveau des activités PGP, toutes les souches testées étaient capables de produire de l'auxine *in vitro*, même si elles appartiennent à trois genres différents, *Pseudarthrobacter*, *Stenotrophomonas* et *Pseudomonas*. La valeur la plus élevée était celle obtenue chez *Pseudomonas brassicacearum* LMR283 ($144.98 \mu\text{g mL}^{-1}$), suivie des deux souches de *Pseudarthrobacter* LMR291 et LMR250. Cette dernière est avérée être la meilleure souche productrice de sidérophores parmi les six choisies suivie de *Stenotrophomonas tumulicola* LMR266 et *Pseudomonas brassicacearum* LMR283. Par ailleurs, la souche LMR291 était la meilleure en termes de solubilisation de roche phosphatée avec 67.63 mg L^{-1} de P soluble produit. De plus, 3 souches appartenant aux genres *Pseudarthrobacter* et *Rhodococcus* possédaient aussi la capacité de fixer librement l'azote atmosphérique. Concernant l'activité d'ACC déaminase, quatre souches sur six en étaient capables mais la souche LMR249 dépasse largement les autres avec une valeur de $128 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ d' α -ketobutyrate produit.

Par ailleurs, les six souches sélectionnées sont aussi capables de contrôler le développement d'autres microorganismes. Plus précisément, elles ont un effet antagoniste vis-à-vis du champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum* et sont capables de produire un ou plusieurs enzymes lytiques (Tableau 8).

L'ensemble et la diversité d'activités mises en évidence font de ces souches de bons candidats pour l'inoculation de *Sulla spinosissima*.

Tableau 8 : Caractéristiques des souches sélectionnées pour les essais d'inoculation des plantes (Tolérance aux éléments traces métalliques et caractères PGP *in vitro*)

Souches	LMR249	LMR250	LMR266	LMR283	LMR291	LMR340
Genre/Espèce	<i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i>	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	<i>Rhodococcus qingshengii</i>
Sites	Sidi Boubker	Sidi Boubker	Sidi Boubker	Oued El Heimer	Oued El Heimer	Touissit
Origine	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>
MIC de Pb (mM)*	5	5	10	5	15	25
MIC de Zn (mM)*	10	5	20	10	3	30
MIC de As (mM)*	5	5	10	5	5	35
P soluble (mg L ⁻¹) *	2.31±0.1	0	0	2.44±0.3	67.63±0.1	0
Quantité d'α cetobutyrate (nmolmg ⁻¹ h ⁻¹) *	128±0.8	4±0.5	0	0	71.1±1.4	58±2.3
Production d'auxine (μg mL ⁻¹) *	66.66±1.6	127±0.1	19.5±1	144.98±0.9	134.15±0.6	26.67±1.2
Production de sidérophores*	0.4±0,1	0.025±0.03	0.13±0.08	0.24±0.1	0	0
Fixation d'azote	-	+	-	-	+	+
Antagonisme par confrontation directe	76.3±1.4	60.5±0.5	0	0	-	-
Antagonisme par substances diffusibles	83.4±2	58.9±0.9	0	0	-	-
Antagonisme par substances volatiles	67.6±0.8	55±1	0	0	-	90.5±1.6
Production d'enzymes lytiques	Chitinase, protease, lipase	Prptease	Chitnase, protease, lipase, cellulose	-	Protease	Chitinase, lipase, cellulase

CMI, concentration minimale inhibitrice; ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate;
Auxin, acide indole-3-acétique; P soluble, phosphate soluble;
+, présence d'activité; - absence d'activité
*: Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions $\pm$ les erreurs standard.

6.2. Effet de l'inoculation par les souches sélectionnées sur la croissance de *Sulla spinosissima* en conditions normales

6.2.1. Effet sur les paramètres de croissance

L'inoculation des plantes de *Sulla* poussant dans du sable stérilisé dans des conditions normales a montré que la souche LMR340 (*Rhodococcus qingshengii*) avait un effet bénéfique sur la croissance des plantes. Des poids secs de tiges et de racines significativement plus élevés ont été enregistrés (respectivement 81.74 et 1263.28 mg plant⁻¹) par rapport aux plantes témoins non inoculées (58.38 et 291 mg plant⁻¹) et aux plantes inoculées avec les autres souches (Figure 26). Une autre souche intéressante, *Pseudarthrobacter oxydans* LMR291, a eu un effet positif sur la longueur des tiges avec une valeur élevée égale à 110 mm plant⁻¹ qui était significativement différente de tous les autres traitements, y compris les plantes témoins (60 mm plant⁻¹). Plus intéressant encore est le fait que même si les plantes inoculées avec LMR291 ont été fertilisées uniquement avec du phosphate naturel, leurs racines et la biomasse de la partie aérienne étaient statistiquement équivalentes à celles des plantes témoins qui ont reçu un engrais phosphaté soluble (Figure 27).

On peut conclure qu'en général, par rapport aux plantes témoins, la plupart des inoculants bactériens testés n'ont pas stimulé la croissance des plantes *Sulla* poussant sur du sable stérilisé dans des conditions contrôlées, à l'exception de la souche LMR340 *Rhodococcus qingshengii* qui a eu un impact stimulant net sur la biomasse des plantes (Figure 26).

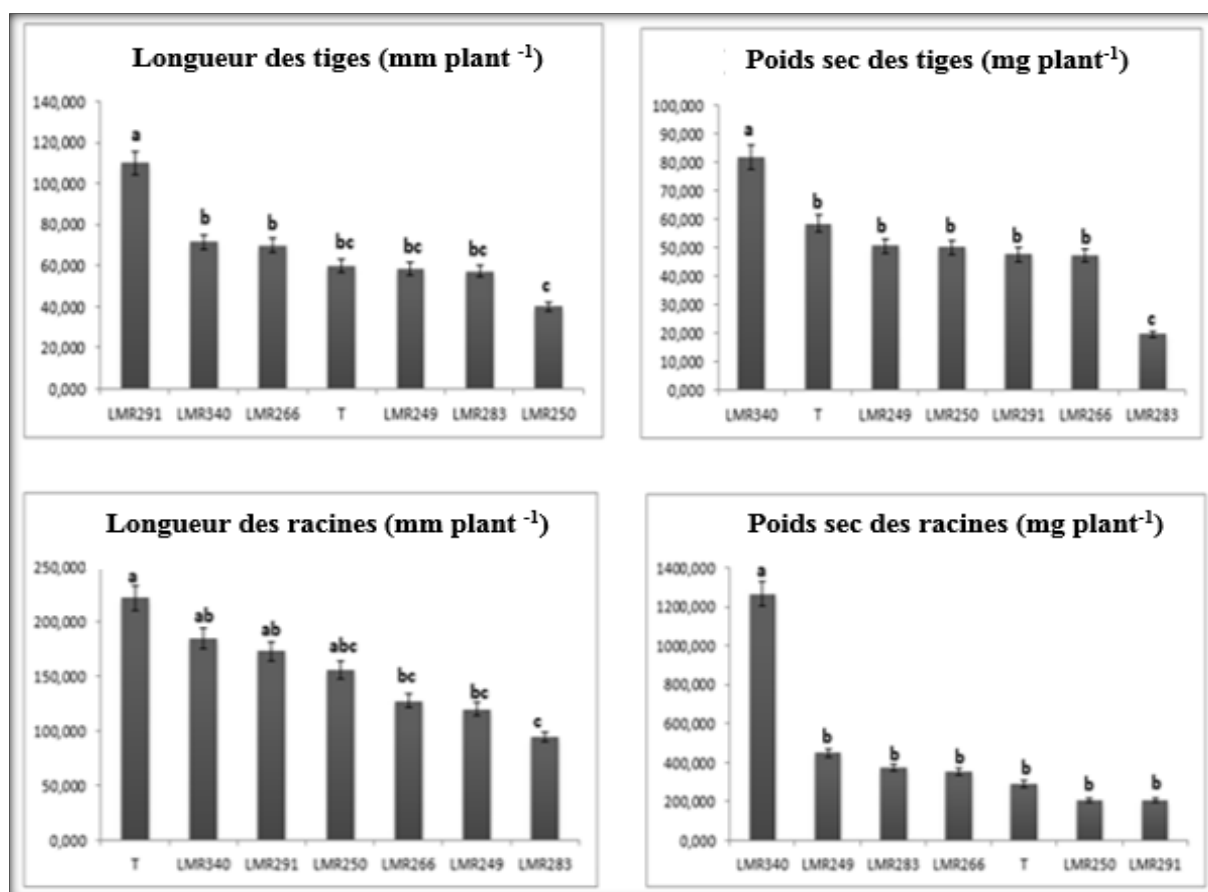


Figure 26 : Effet de différents inoculants bactériens sur les paramètres de croissance des plantes de *Sulla* cultivées dans du sable stérilisé

Toutes les valeurs sont des moyennes de 12 répétitions. Le test ANOVA a été réalisé pour déterminer l'influence des bactéries inoculées sur la biomasse des racines et des tiges des plantes. Les moyennes des différents traitements avec des lettres différentes sont significativement différentes les unes des autres ($P < 0,05$) selon le test de Duncan.

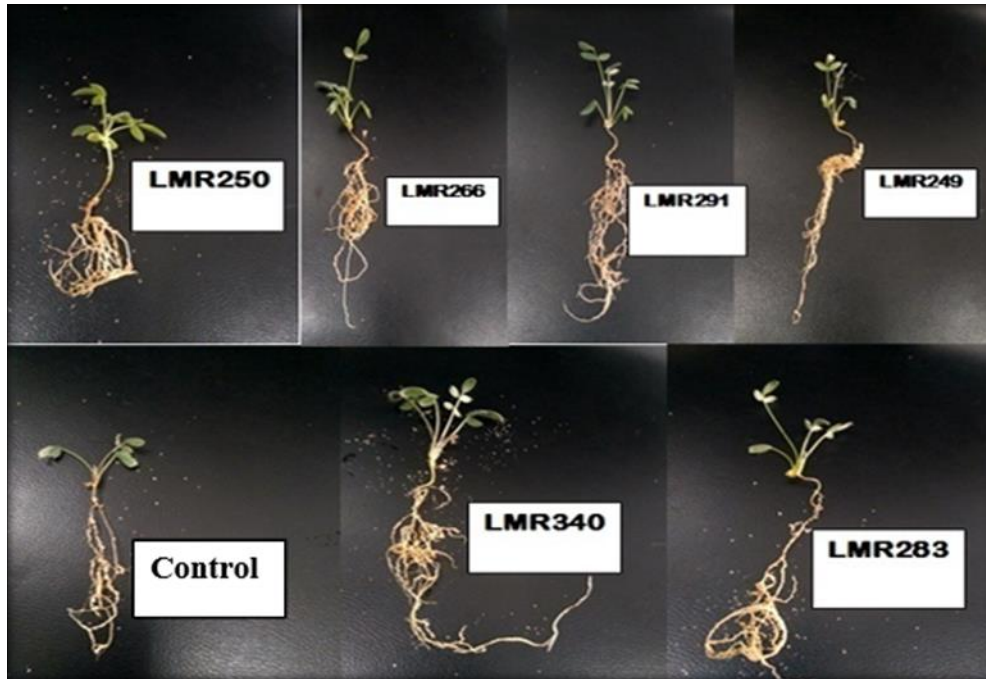


Figure 27. Photos montrant l'effet de l'inoculation avec des souches de PGPR tolérants aux éléments traces métalliques sur la croissance des plantes de *Sulla spinosissima* poussant sous serre sur du sable stérilisé

6.2.2. Effet sur les teneurs en chlorophylle et en caroténoïdes

L'inoculation des plantes de *Sulla* avec les souches sélectionnées, en particulier LMR340 (*Rhodococcus qingshengii*) et LMR291 (*Pseudarthrobacter oxydans*) a conduit à une élévation de la teneur en chlorophylle ($2.98 \text{ mg g}^{-1} \text{ FW}$), mais les valeurs n'étaient pas significativement différentes de celles des plantes témoins et de celles inoculées avec les quatres autres souches. La teneur en caroténoïdes des tiges a également montré des effets positifs pour toutes les souches utilisées comme inoculants, mais les différences n'étaient pas significatives (Figure 28).

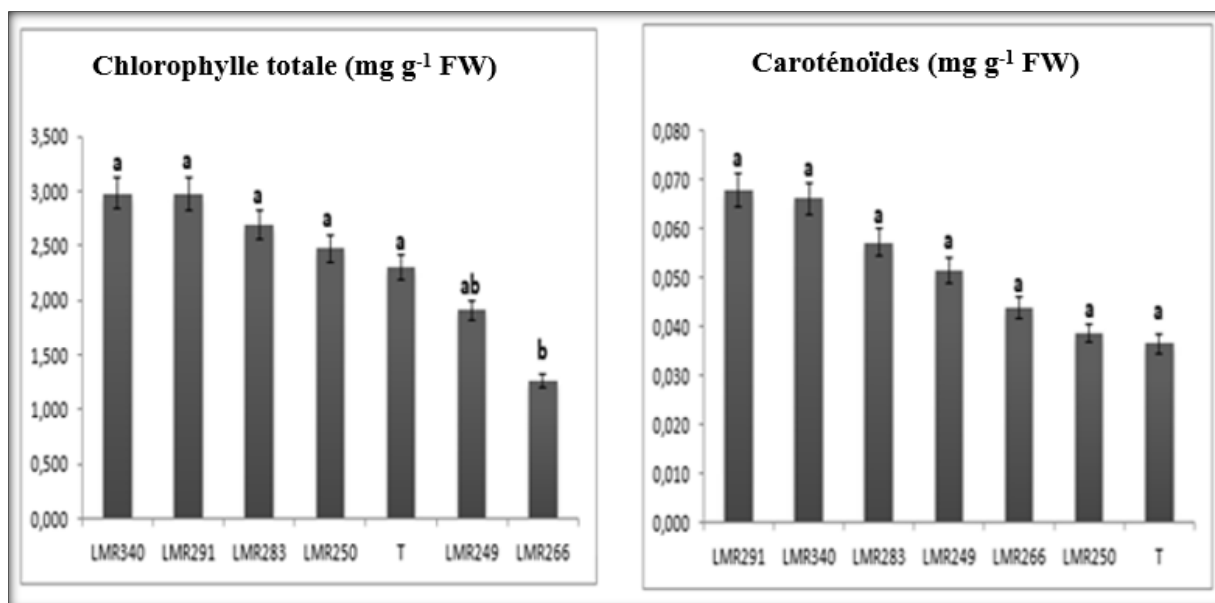


Figure 28 : Teneurs en chlorophylle totale (mg g⁻¹ FW) et en caroténoïdes (mg g⁻¹ FW) des plantes de *Sulla* inoculées cultivées sur du sable stérilisé.

Les résultats sont exprimés en moyennes $\pm$ SE (n = 3). Un test ANOVA a été réalisée pour chaque facteur. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes les unes des autres (P < 0,05) selon le test de Duncan.

6.2.3. Effet sur les activités des enzymes antioxydantes

L'activité peroxidase POD des racines était sensiblement plus élevée chez les plantes inoculées avec LMR283, LMR266 et LMR250 (respectivement 23.69, 17.32 et 16.10 U mg⁻¹ de protéine) que chez les plantes témoins (12.34 U mg⁻¹ de protéine), ou celles inoculées avec LMR249 qui ont montré le plus faible niveau d'activité (3.59 U mg⁻¹ de protéine). Pour les feuilles, l'activité POD était plus élevée dans les plantes inoculées avec LMR340 et LMR249 (respectivement 30.39 et 20.18 U mg⁻¹ de protéine) que dans les plantes témoins (14.75 U mg⁻¹ de protéine). Les plantes inoculées avec LMR291 ont présenté une faible activité POD de 4.45 U mg⁻¹ de protéine.

L'activité d'ascorbate peroxydase APX des racines était nettement plus élevée dans les plantes inoculées avec LMR283 et LMR266 (14.01 et 12.82 U mg⁻¹ de protéine, respectivement) que dans les plantes témoins (7.83 U mg⁻¹ de protéine). La valeur la plus faible a été mesurée dans les racines des plantes inoculées avec la souche LMR249 (2.35 U mg⁻¹ de protéine). Pour les feuilles, l'activité APX était nettement plus importante chez les plantes inoculées avec LMR340 ou LMR283 (respectivement 21.25 et 19.56 U mg⁻¹ de protéine) que chez les plantes témoins (12.53 U mg⁻¹ de protéine). Les plantes qui ont reçu LMR266 comme inoculum n'ont présenté qu'une activité modeste (5.24 U mg⁻¹ de protéine).

Les activités catalase CAT des racines des plantes inoculées avec les souches LMR340, LMR266, LMR250 et LMR283 étaient statistiquement équivalentes à celles des plantes témoins. Il est important de noter que les plantes inoculées avec les souches LMR291 et LMR249 n'ont pas montré d'activité CAT racinaire. Pour les feuilles, les plantes inoculées avec ces dernières souches ont montré des valeurs d'activité CAT similaires à celles des plantes témoins ($0.02 - 0.03 \text{ U mg}^{-1}$ de protéine), alors que les feuilles des plantes inoculées avec les souches LMR266, LMR250, LMR283 et LMR340 n'ont montré aucune activité CAT (Figure 29).

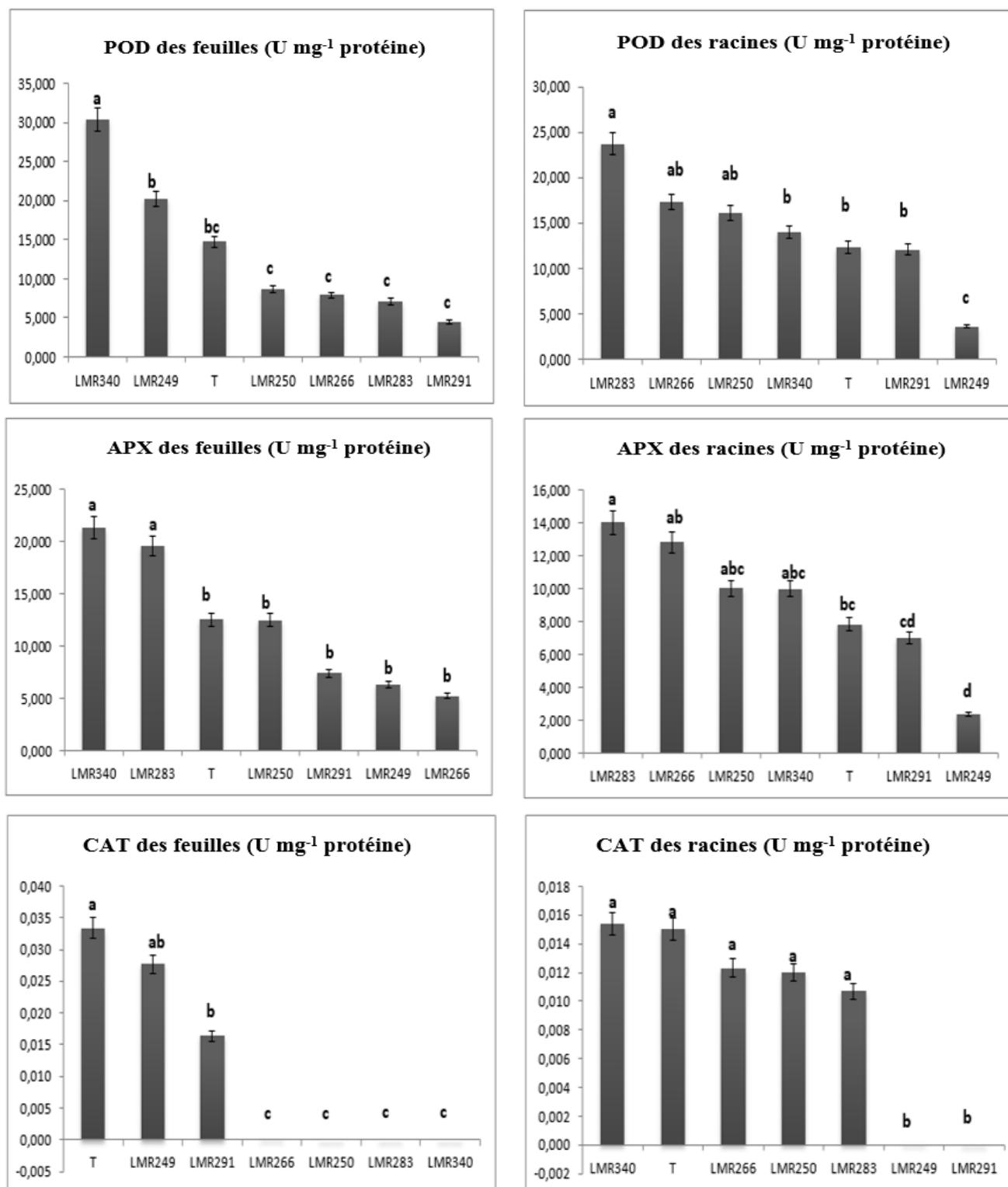


Figure 29 : Mesures des activités des enzymes antioxydantes dans les racines et les feuilles des plantes *Sula* 100 jours après l'inoculation bactérienne

Toutes les valeurs sont des moyennes de 4 répétitions. Une ANOVA a été réalisée pour déterminer l'influence des bactéries inoculées sur les enzymes antioxydantes des plantes poussant dans du sable stérilisé. Les moyennes des différents traitements avec des lettres différentes sont significativement différentes les unes des autres ($P < 0,05$) selon le test de Duncan.

6.2.4. Analyse PCA

Le biplot de corrélation entre le Dim1 et le Dim2 a montré une variation de 60.8 % dans laquelle le Dim 2 a contribué pour 29.5 % et le Dim 1 pour 31.3 % (Figure 31). Les variables fortement et positivement corrélées sont très proches les unes des autres et présentes dans le même quadrat. La couleur bleue montre la corrélation entre les paramètres (LS, LR, DWS, DWR, Chlor, Carot, PODL, PODR, APXL, APXR, CATL, CATR) tandis que la couleur noire montre la corrélation entre les traitements (Control, LMR249, LMR250, LMR266, LMR283, LMR291, LMR340).

L'analyse en composantes principales a mis en évidence l'effet positif de LMR340 sur la croissance des plantes, les teneurs en chlorophylle et en caroténoïdes, et les activités des enzymes antioxydantes. Les variables qui sont fortement corrélées positivement sont présentes dans le même quadrant et très proches les unes des autres. Pour le Dim 1, nous avons remarqué que PODL, DWS, LR, LS et CATL sont positivement corrélés, tandis que DWR, Chlor, APXL, CATR, APXR, PODR sont négativement corrélés. Pour le Dim 2, toutes les variables sont fortement corrélées, sauf APXR, PODR et CATL (Figure 30). L'analyse PCA a montré que LMR340 était un inoculum singulier par rapport aux autres traitements d'inoculation.

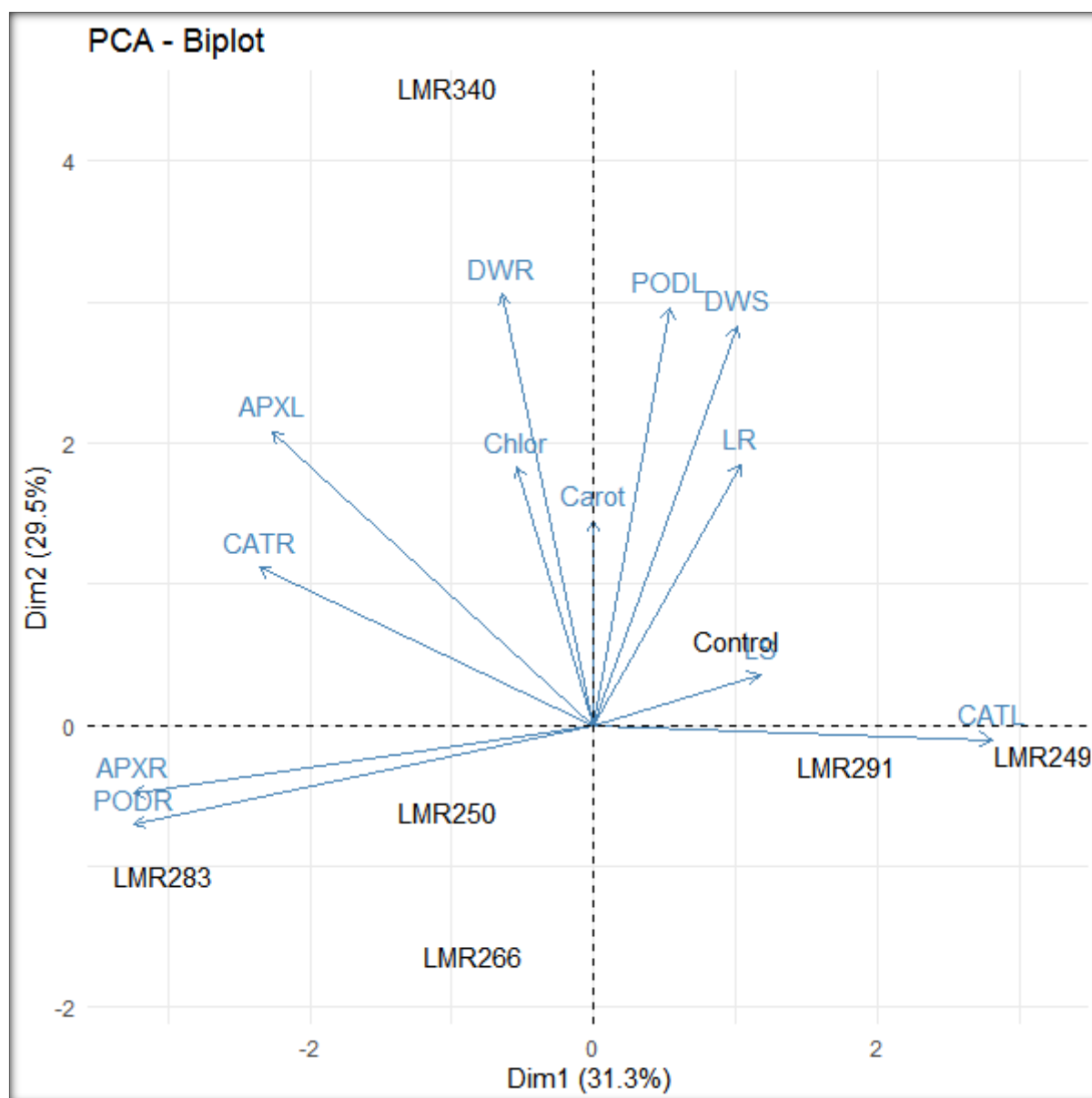


Figure 30 : Biplot de corrélation entre le Dim1 et le Dim2

LS : Longueur des tiges, LR : Longueur des racines, DWS : Poids sec des tiges, DWR : Poids sec des racines, Chlor : Chlorophylle totale, Carot : Caroténoïdes, PODL : POD des feuilles, PODR : POD des racines, APXL : APX des feuilles, APXR : APX des racines, CATL : CAT des feuilles, CATR : CAT des racines.

6.3. Effet de l'inoculation avec les souches sélectionnées sur la croissance de *Sulla spinosissima* poussant dans un sol contaminé

6.3.1. Effet de l'inoculation sur les paramètres de croissance des plantes

A l'exception de la souche LMR250, l'inoculation avec les bactéries PGPR tolérantes aux éléments traces métalliques (LMR291, LMR283, LMR249, LMR266, et LMR340) a eu un impact spectaculaire sur la croissance des plantes dans le sol fortement multi-pollué utilisé dans cette expérience, tandis que les plantes témoins non inoculées (T) n'ont pas réussi à se développer dans de telles conditions et sont mortes rapidement (Figure 31).

Les résultats ont révélé que la souche LMR291 avait le meilleur impact sur la croissance des plantes de *Sulla* dans le sol contaminé, avec une longueur de tiges et de racines significativement plus élevée (respectivement 75.71 et 132.85 mm) par rapport aux autres souches. En outre, le poids des racines était significativement plus élevé que celui obtenu avec les autres souches inoculées (123.84 mg plant⁻¹), tandis que tous les poids des tiges étaient significativement équivalents, sauf pour les plantes témoins et celles inoculées avec la souche LMR250 (Figure 32).

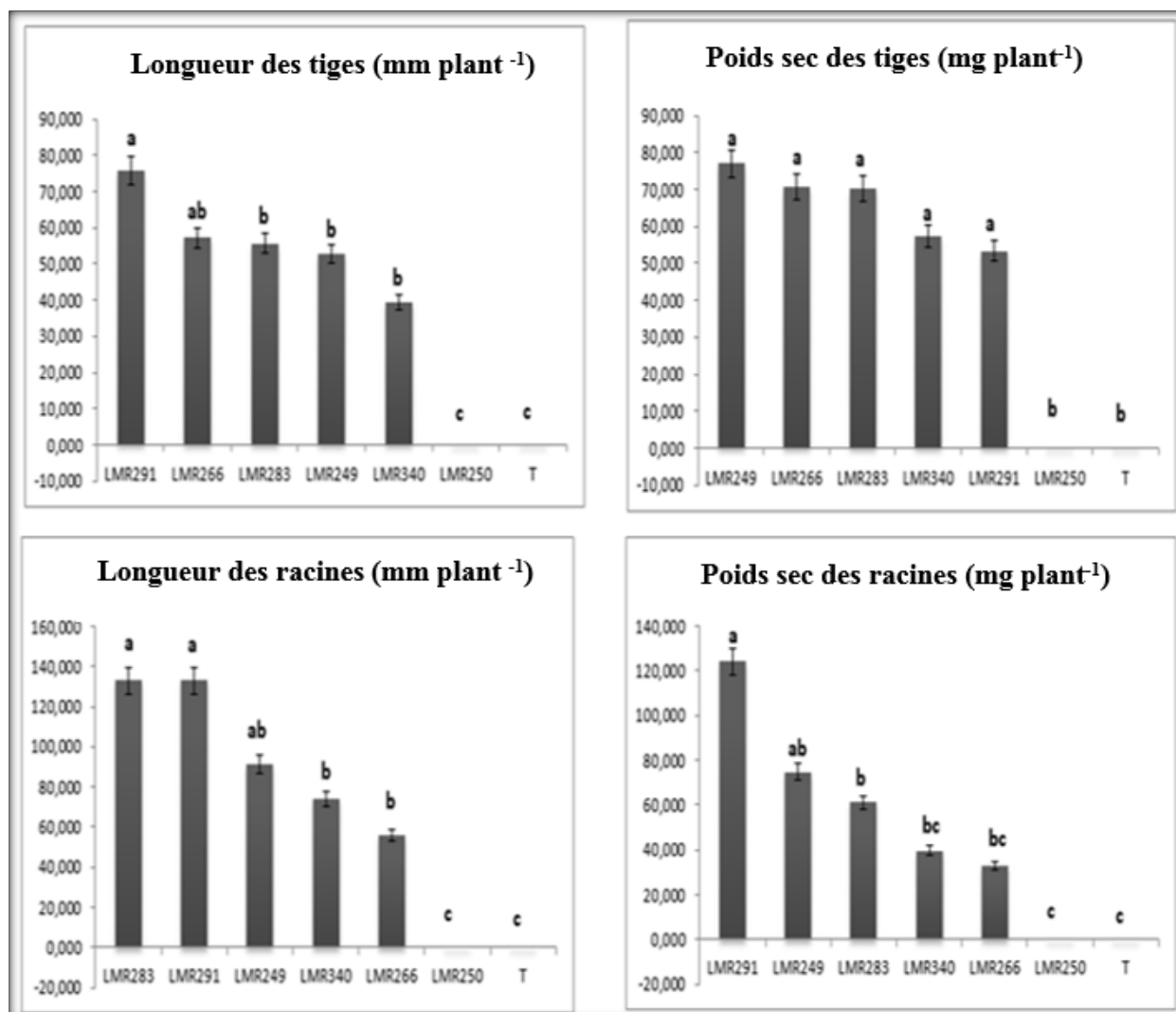


Figure 31 : Effet de l'inoculation bactérienne sur les tiges et les racines des plantes de *Sulla* poussant dans un sol contaminé par des éléments traces métalliques.

Toutes les valeurs sont des moyennes de 12 répétitions. Une ANOVA a été réalisée pour déterminer l'influence des bactéries inoculées sur la biomasse des racines et des tiges. Les moyennes des différents traitements avec des lettres différentes sont significativement différentes les unes des autres ($P < 0,05$) selon le test de Duncan.

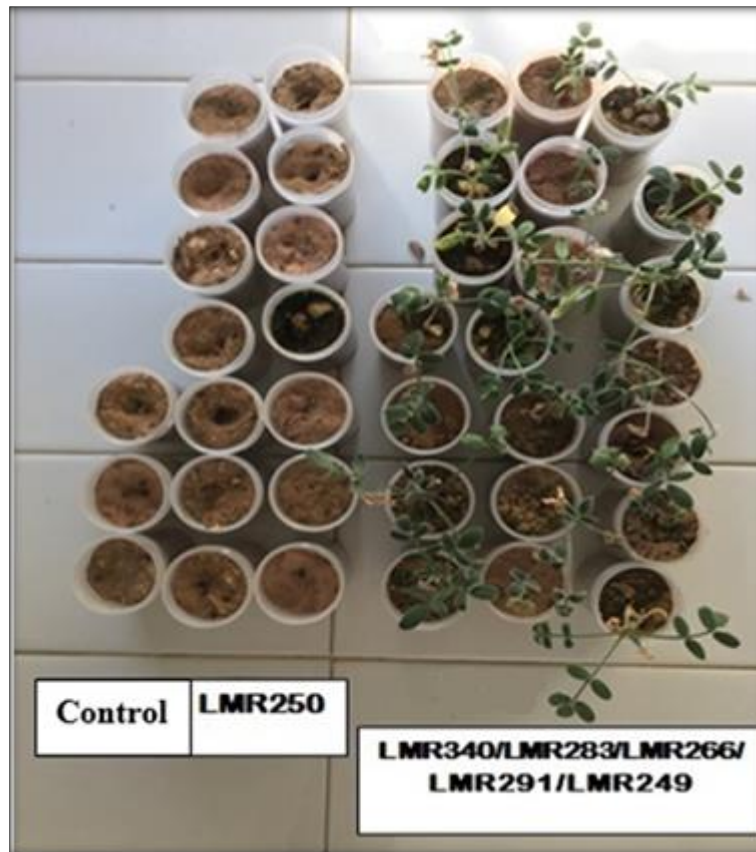


Figure 32 : Photos montrant l'état des plantes de *Sulla* inoculées par les souches sélectionnées poussant sous serre sur un sol contaminé par des éléments traces métalliques

6.3.2. Effet des inocula bactériens sur les teneurs en chlorophylle et en caroténoïdes des plantes

L'inoculation avec la souche LMR291 (*Pseudarthrobacter oxydans*) a augmenté de manière significative le niveau de chlorophylle chez les plantes de *Sulla* cultivées sous le stress des éléments traces métalliques par rapport aux autres souches, tandis que le contenu en caroténoïdes des plantes était similaire quelle que soit la souche utilisée comme inoculum (Figure 34).

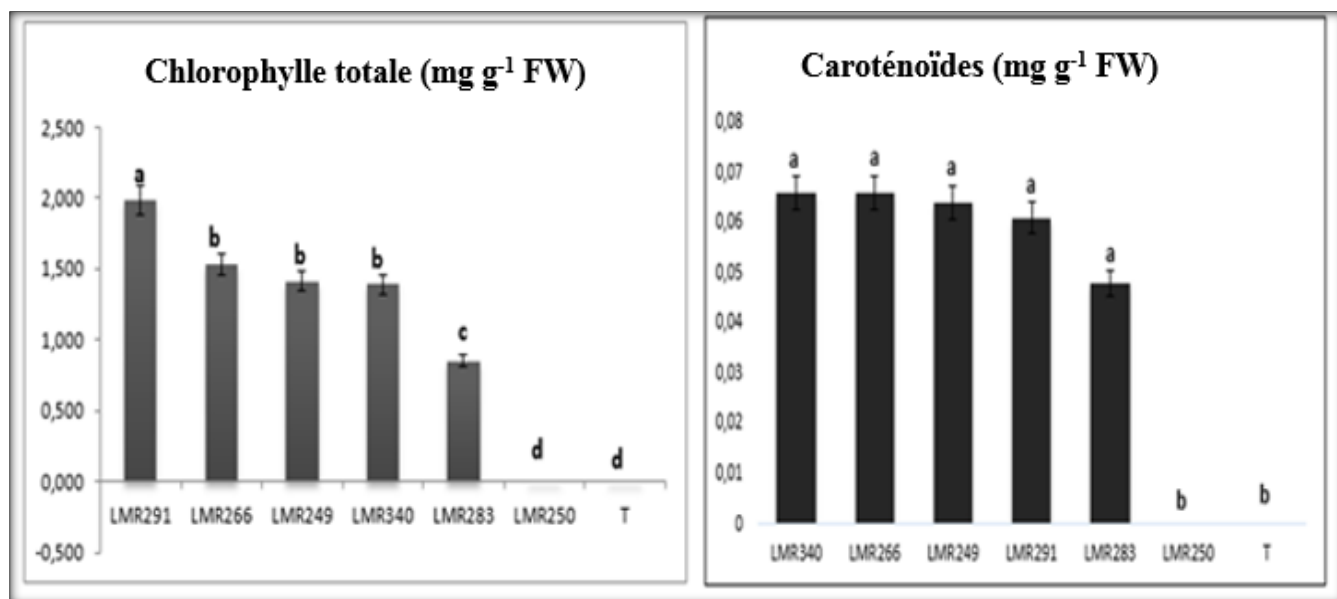


Figure 33 : Teneurs en chlorophylle totale (mg g⁻¹ FW) et en caroténoïdes (mg g⁻¹ FW) des plantes *Sulla* poussant dans des sols contaminés

Les résultats sont exprimés en moyennes $\pm$ SE (n = 3). Un test ANOVA a été réalisé pour chaque facteur. Les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes les unes des autres (P < 0,05) selon le test de Duncan.

6.3.3. Enzymes antioxydantes des plantes

Dans des conditions de stress métallique, les résultats de l'activité POD des racines étaient significativement similaires pour toutes les souches, à l'exception de LMR340, qui a présenté la valeur la plus faible de 7.51 U mg⁻¹ de protéine. Pour l'activité POD des feuilles, les valeurs étaient significativement plus élevées dans les plantes inoculées avec LMR266 (7.57 U mg⁻¹ de protéine) et LMR340 (7.01 U mg⁻¹ de protéine) que dans les plantes inoculées avec LMR283, LMR249, et LMR291 (respectivement 2.76, 2.32, 1.78 U mg⁻¹ de protéine). Alors que les plantes témoins non inoculées (T) et les plantes inoculées avec LMR250 n'ont pas réussi à se développer et sont mortes rapidement dans le sol multi-contaminé.

Les meilleurs résultats pour l'activité APX des racines ont été obtenus dans les plantes inoculées avec LMR266 (7.60 U mg⁻¹ de protéine) et LMR291 (6.52 U mg⁻¹ de protéine), alors que l'activité APX dans les feuilles était beaucoup plus importante dans les plantes inoculées avec LMR249 que dans les autres traitements.

Pour les feuilles, l'activité CAT était significativement plus élevée chez les plantes inoculées avec LMR266, LMR340 et LMR291 (0.01 U mg⁻¹ de protéine) que chez les plantes inoculées

avec LMR249. Concernant les racines, l'activité CAT était significativement plus élevée chez les plantes inoculées avec LMR283 (0.02 U mg⁻¹ de protéine) (Figure 34).

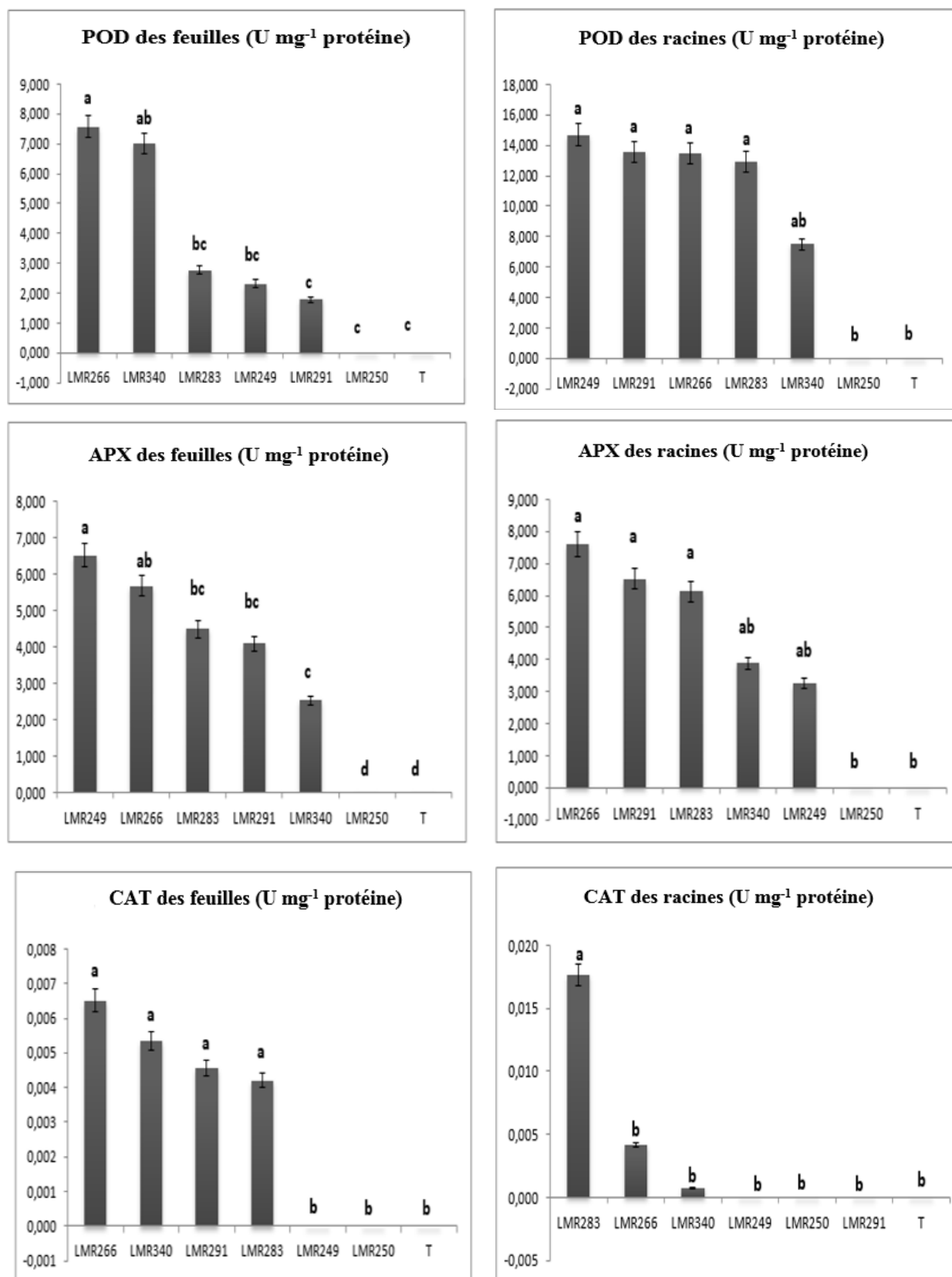


Figure 34 : Activités des enzymes antioxydantes dans les racines et les feuilles des plantes *Sulla* 100 jours après l'inoculation bactérienne.

Toutes les valeurs sont des moyennes de 4 répétitions. Un test ANOVA a été réalisée pour déterminer l'influence des bactéries inoculées sur les enzymes antioxydantes du sol contaminé. Les moyennes des différents traitements avec des lettres différentes sont significativement différentes les unes des autres ($P < 0.05$) selon le test de Duncan.

6.3.4. Analyse PCA

Le biplot de corrélation entre le Dim1 et le Dim2 a montré une variation de 83.7 % dans laquelle le Dim 2 a contribué pour 11.5 % et le Dim 1 pour 72.2 % (Figure 35). Les variables fortement et positivement corrélées sont très proches les unes des autres et présentes dans le même quadrat. La couleur bleue montre la corrélation entre les paramètres (LS, LR, DWS, DWR, Chlor, Carot, PODL, PODR, APXL, APXR, CATL, CATR) tandis que la couleur noire montre la corrélation entre les traitements (Control, LMR249, LMR250, LMR266, LMR283, LMR291, LMR340).

Il est pertinent de constater que toutes les variables sont fortement corrélées pour le Dim 1, tandis que pour le deuxième axe, toutes les variables sont fortement corrélées à l'exception de PODL, CATL, APXR et Carot. L'analyse PCA a indiqué que LMR266 et LMR340 sont des traitements spéciaux par rapport aux autres. D'autre part, LMR249, LMR291 et LMR283 sont rassemblés dans le même groupe, ce qui peut s'expliquer par le fait qu'ils possèdent les mêmes caractéristiques (Figure 36).

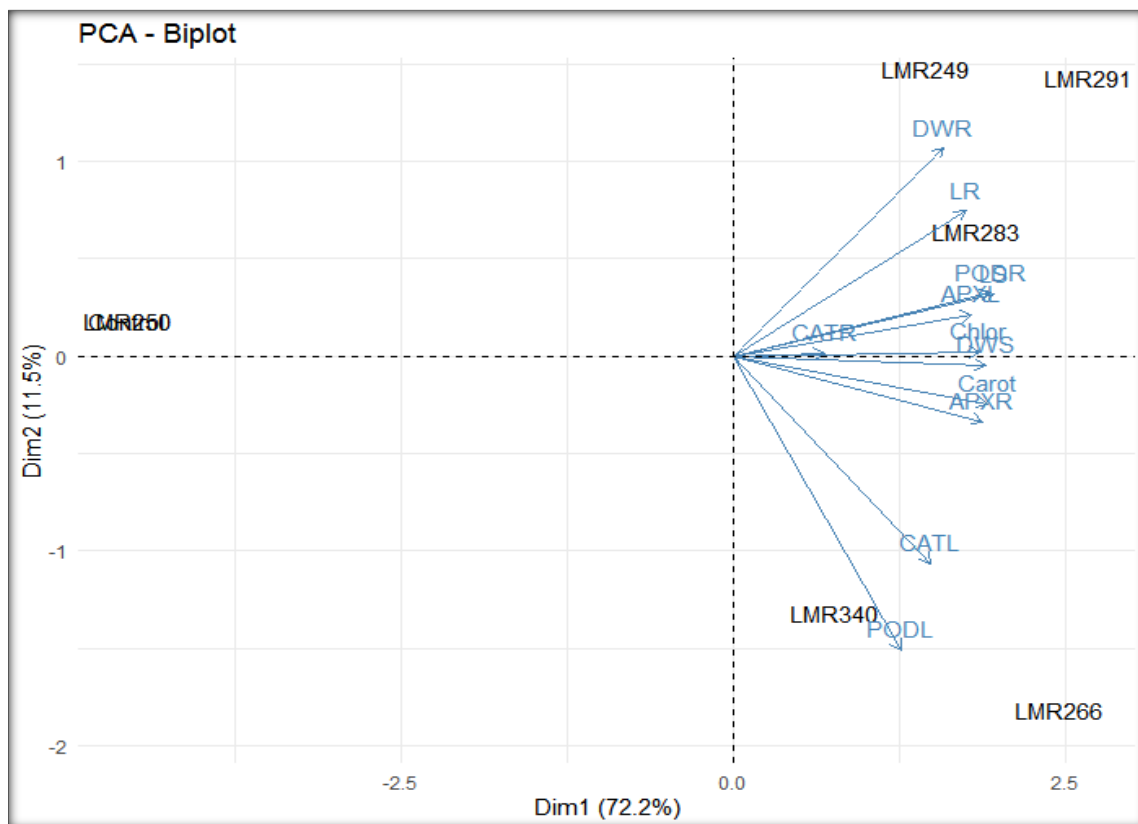


Figure 35 : Biplot de corrélation entre le Dim1 et le Dim2

LS : Longueur des tiges, LR : Longueur des racines, DWS : Poids sec des tiges, DWR : Poids sec des racines, Chlor : Chlorophylle totale, Carot : Caroténoïdes, PODL : POD des feuilles, PODR : POD des racines, APXL : APX des feuilles, APXR : APX des racines, CATL : CAT des feuilles, CATR : CAT des racines.

Discussion

Contamination par les éléments traces métalliques des sols étudiés

Dans la présente étude, nous nous sommes proposés d'étudier la diversité bactérienne génétique et fonctionnelle de la fraction cultivable des populations bactériennes rencontrées dans trois sites miniers différents situés dans la région d'Oujda (Touissit, Sidi Boubker, Oued El Heimer). L'analyse de la composition chimique par ICP-MS des échantillons de sol a montré des concentrations variables et élevées à très élevées de différents éléments traces métalliques étudiés (As, Cu, Ni, Zn, Cd et Pb). Ces sols sont également caractérisés par de faibles niveaux de carbone, d'azote, de phosphore et de potassium, ce qui indique que le niveau de fertilité des sols est très faible. Ce ci est normal compte tenu de l'origine de ces sols qui résultent d'activités minières intenses pendant plusieurs décennies. Les différences de concentration pour chaque métal peuvent s'expliquer par les activités minières dans chaque site, et la nature des rejets. Par conséquent, il serait intéressant de voir comment ces différences dans la composition des ETM affecteront la diversité des populations bactériennes présentes dans ces sols, leur tolérance aux éléments traces métalliques ou leurs activités bénéfiques.

En effet, les éléments traces métalliques sont connus pour poser de sérieux problèmes à l'environnement et aux organismes (Gołębiewski et al., 2014 ; Awasthi et al., 2020). Des concentrations supérieures aux valeurs seuils peuvent être impliquées dans des interactions complexes avec certains facteurs abiotiques qui affectent les propriétés du sol. En particulier, il a été signalé que les éléments traces métalliques peuvent modifier la composition et l'activité de la communauté microbienne (Vera et al., 2019). Le stress causé par ces éléments toxiques peut également affecter la morphologie et le métabolisme des bactéries (Wang et al., 2007 ; Giller et al., 1998 ; Oliveira et Pampulha, 2006). En général, la pollution environnementale par les éléments traces métalliques entraîne une augmentation du niveau de résistance de la communauté bactérienne locale (Malik et al., 2002 ; Bronstad et al., 1996). Par conséquent, plus la concentration en éléments traces métalliques est élevée, plus l'occurrence et la sélection de bactéries tolérantes aux éléments traces seront élevées (Nithya et Pandian, 2010). C'était le cas dans la présente étude où un grand nombre de souches tolérantes à Zn et Pb ont été isolées de sols affectés par une contamination chronique aux éléments traces métalliques.

Populations bactériennes des sites miniers prospectés

Dans notre étude, plus de 700 isolats ont été obtenus des différents sites analysés. L'analyse génétique a montré que trois phyla étaient dominants dans les sols : Firmicutes, Actinobacteria et Proteobacteria, ce qui est conforme aux résultats rapportés dans la littérature pour des conditions

de sol similaires (Janssen, 2006, Fajardo et al., 2019). Certaines études ont révélé que les Proteobacteria étaient couramment observés dans les sites contaminés par les ETMs (Ellis et al, 2003), alors que les Firmicutes étaient abondants dans un environnement de sédiments marins pollués (Briceno et al., 2012). Fajardo et son équipe (2019) ont montré dans leur étude que les Firmicutes (*Bacillus*) étaient le groupe le plus abondant tandis que Nguyen et al. (2016) ont constaté que le phylum Acidobacteria était dominant dans les sols et sédiments contaminés par les éléments traces métalliques.

Au niveau du genre et selon l'analyse des séquences d'ADNr 16S, quatre genres bactériens dominants ont été identifiés : *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Arthrobacter* et *Rhodococcus*. Ces genres sont dominants dans les trois sites étudiés (Sidi Boubker, Oued El Heimer, et Touissit) malgré la prvalence de conditions différentes dans les sites prospectés, telles que la texture des sols, la diversité des plantes existantes, l'histoire minière, le type et la concentration des éléments traces métalliques. Ces genres peuvent être considérés comme ubiquistes dans les sites contaminés par les ETMs prospectés et non spécifiques aux plantes.

Les bactéries dominantes et abondantes associées à la contamination par les éléments traces métalliques peuvent être des indicateurs de multi-pollution et peuvent être utilisées pour la surveillance de l'environnement (Sun et al., 2019 ; Babu et al., 2019 ; Rajkumari et al., 2019 ; Hou et al., 2018 ; Jaiswal et al., 2019 ; Yogalakshmi et al., 2020 ; Caputo et al., 2019). L'abondance de certains types de bactéries dans les sols contaminés peut s'expliquer par différents mécanismes d'adaptation ou de résistance à la toxicité des éléments traces métalliques, tels que la séquestration intracellulaire, les mutations, la production de sidérophores, la réduction de la sensibilité cellulaire, la perméabilité membranaire, les mécanismes de réparation de la stabilité de l'ADN et la vie au sein d'un biofilm (Presentato et al., 2019). Chaque genre dominant identifié dans notre étude est connu pour posséder plusieurs de ces propriétés. Ainsi la sporulation par exemple est un mécanisme particulier que l'on retrouve chez les espèces de *Bacillus*, chez qui des spores dormantes résistantes à des conditions extrêmes sont produites en réponse à des stress environnementaux (Cortês et al., 2019 ; Gillet et al., 2019). D'autre part, les souches bactériennes appartenant à l'ordre des Actinomycetales, qui comprend entre autres le genre *Rhodococcus*, sont connues pour surmonter les stress environnementaux comme les fortes concentrations de métal(loide)s notamment l'arséniate et le sélénite. D'autres espèces d'actinobactéries appartenant au genre *Arthrobacter* peuvent survivre dans des conditions difficiles et stressantes, y compris des niveaux élevés des ETMs (Igalavithana et al., 2019). Plusieurs souches d'actinobactéries peuvent dégrader les polluants en composés non toxiques de diverses manières, ce qui en fait de bons candidats pour la dégradation des polluants dans des

environnements très complexes (Guo et al., 2019 ; Cho et al., 2019 ; Gallo et al., 2019). Les *Stenotrophomonas*, ont également la propriété à tolérer les éléments traces métalliques grâce à leur génome, avec l'implication de nombreux gènes de tolérance contre différents éléments traces métalliques tels que le mercure, le cadmium, le sélénium, le tellure, le cobalt, le cuivre, le zinc, le nickel et le plomb (Agarwal et al., 2019 ; Yu et al., 2019). L'éventail diversifié des propriétés rencontrés chez les bactéries et les adaptations particulières qu'elles mettent en jeu pour survivre dans les environnements extrêmes soulignent pourquoi il est important d'explorer leur pertinence en tant que candidats pour la biorémédiation des sites contaminés par des éléments traces métalliques (Hou et al., 2018).

Caractéristiques phytobénéfiques des bactéries isolées des sites miniers

Comme signalé auparavant les sols des sites miniers prospectés dans la région d'Oujda sont extrêmement pollués et pauvres, de même les conditions climatiques sont très rudes, et malgré tout ça quelques plantes pionnières, herbacées ou arbustives, arrivent à s'y installer. Ces plantes adaptées représentent une ressource prometteuse pour le développement de stratégies de réhabilitation et de stabilisation des contaminants métalliques. Les microorganismes indigènes de ces sols constituent une autre ressource naturelle qui jouent un rôle important dans le fonctionnement de ces écosystèmes pollués, par leur implication dans la décontamination des sols miniers et surtout par leurs activités bénéfiques qui favorisent la croissance des plantes (activités PGP). En effet, ces bactéries peuvent aider les plantes à s'installer et à proliférer sur ces sols en leur apportant des éléments minéraux essentiels et en les aidant à surmonter les effets du stress métallique. Cela peut être le cas des isolats bactériens obtenus à partir des sols miniers de la région d'Oujda, qui se sont avérés posséder une panoplie d'activités PGP intéressantes comme la solubilisation du phosphate inorganique, la fixation biologique de l'azote, la production de sidérophore ou d'auxine, l'ACC déaminase, en plus d'activités en relation avec le contrôle des pathogènes.

Notre étude a montré que le nombre d'isolats présentant des traits PGP est variable d'un site d'échantillonnage à l'autre, entre les sols nus et les sols rhizosphériques et même au sein du même site entre les rhizosphères de différentes espèces de plantes. En général, les nombres de bactéries productrices de sidérophores et d'AIA étaient plus élevés dans la rhizosphère que dans les sols nus et les rhizobactéries associées aux racines de *Stipa tenuissima* constituent le meilleur groupe de bactéries PGP, car elles étaient en général positives pour la plupart des activités testées. De nombreuses espèces et souches appartenant aux genres identifiés dans nos sols ont été rapportées dans plusieurs études comme possédant au moins une activité PGP et comme étant tolérantes à nombreux éléments traces métalliques à des concentrations variables (Becerra-Castro

et al., 2012 ; Singh et al., 2018 ; Ortiz-Ojeda et al., 2017 ; Balan et al., 2018). Il est intéressant de souligner que de nombreuses souches de notre étude présentent des niveaux élevés d'activités PGP et des niveaux élevés de tolérance au Pb, Zn et As. C'est le cas de LMR249, LMR250, LMR266, LMR283, LMR291, LMR326, LMR310 et LMR340. Plusieurs de ces souches pourraient être potentiellement utiles pour améliorer la croissance et l'établissement des plantes dans les sols contaminés par des éléments traces et conduire à un environnement plus sain.

Par ailleurs, en plus de leurs propriétés favorisant directement la croissance des plantes, certaines PGPR peuvent influencer indirectement la croissance des plantes en agissant comme agents de biocontrôle (Chenniappan et al., 2019). Différentes études ont rapporté que de nombreuses souches bactériennes sont des agents de biocontrôle potentiels de *Fusarium*, comme *Paenibacillus polymyxa* WR-2 (Raza et al., 2015 ; 2016), *Bacillus amyloliquefaciens* JDF35 (Zhao et al., 2018 ; Lahlali et al., 2020) et *Bacillus subtilis* IBFCBF-4 (Zhu et al., 2020). Dans la présente étude, les souches LMR252, LMR258, LMR268 et LMR271, LMR302 ont montré *in vitro* différents taux d'inhibition de la croissance de *Fusarium oxysporum*, ce qui peuvent être liés aux espèces et modes d'action impliqués. Les principaux mécanismes d'action impliqués dans l'antagonisme bactérien on peut citer l'antibiose par sécrétion de métabolites antifongiques ou/et de composés organiques volatils (COV) ou le parasitisme par sécrétion d'enzymes lytiques (Jadhav et al., 2017 ; Lopes et al., 2015). Les enzymes lytiques sont connues pour jouer un rôle clé dans la dégradation de la paroi cellulaire ce qui empêche la croissance hyphale des pathogènes fongiques et d'autres microorganismes du sol. Les activités protéases, lipases, cellulases et chitinases bactériennes ont été testées pour toutes les souches de notre collection. Elles se sont avérées largement présentes parmi les souches et il est pertinent de noter que la majorité d'entre elles produisait plus d'une enzyme et qu'environ la moitié d'entre elles produisait deux enzymes lytiques. Cette activité enzymatique diversifiée peut conférer à ces souches un avantage compétitif pour leur survie parmi les autres composants des populations microbiennes habitant le sol et leur permettre en même temps d'avoir un effet protecteur contre les pathogènes menaçant les plantes avec lesquelles elles sont associées.

Pris ensemble, les résultats obtenus pour la tolérance aux éléments traces métalliques, les activités PGP, les activités antagonistes et la production d'enzymes lytiques indiquent que les sols miniers abandonnés prospectés dans la région d'Oujda et plus particulièrement le sol rhizosphérique des plantes étudiées est un grand réservoir de souches bactériennes diversifiées et très prometteuses. Toutes ces propriétés permettent aux souches bactériennes de se développer et de survivre sous des concentrations élevées de éléments traces métalliques et de rivaliser avec les autres microorganismes du sol. En même temps, ces souches peuvent améliorer la croissance des

plantes directement en augmentant la disponibilité des nutriments ou par la stimulation par des phytohormones, et indirectement en contrôlant le niveau d'éthylène des plantes par l'activité ACC déaminase et en protégeant les plantes contre les maladies bactériennes et fongiques.

De nombreux rapports indiquent que les souches présentant des activités PGP plus élevées et une résistance aux conditions difficiles peuvent être proposées comme candidats pour un programme de bioremediation (El-Sayed et al., 2014 ; Arora et al., 2020a, b) et même pour des applications industrielles (Raddadi et al., 2013). Étant donné qu'elles ont été isolées dans des environnements extrêmes, elles pourraient être appliquées à la biorémédiation des sols pollués (Mapelli et al., 2012 ; Hazen et al., 2019), notamment dans le cadre d'approches de phytoremédiation (Afzal et al., 2014 ; Santos et al., 2019). D'autre part il faut souligner qu'en plus de leurs activités PGP, certains microorganismes peuvent posséder d'autres propriétés intéressantes comme la séquestration de éléments traces métalliques. Ces microorganismes ont été utilisés pour la bioremédiation de sols contaminés par des ETMs (Kao et al., 2006 ; Umrana, 2006 ; Hazen et al., 2019). De nombreux études ont mis en avant que l'inoculation des plantes avec des PGPR sélectionnées est une approche capable de faciliter la croissance des plantes, d'enrichir les sols et de créer une couverture végétale dans ces sites contaminés (Glick, 2010 ; Kuffner et al., 2010 ; Rajkumar et al., 2010 ; Ma et al., 2011 ; Aafi et al., 2012 ; Dubey et al., 2020).

Dans ce contexte, il est nécessaire de confirmer le potentiel des meilleures souches PGP tolérantes aux éléments traces métalliques identifiées précédemment, en les associant dans des conditions contrôlées avec des plantes tolérantes aux ETMs, dans le but d'identifier les couples plantes-bactéries les plus performants. Ces derniers pourraient être introduits dans un deuxième temps dans les sols miniers abandonnés étudiés, dans lesquels la situation est plus compliquée à cerner en raison des interactions biotiques et abiotiques au niveau édaphique et des aléas climatiques prévalant dans la région de l'Orient. Les inocula à tester peuvent être constitués de souches élitaires uniques possédant des caractéristiques multiples (LMR249, LMR250, LMR266, LMR283, LMR291 LMR310, LMR326, LMR340 ou LMR341) ou de consortiums de souches possédant des propriétés complémentaires. L'objectif final étant de déterminer si ces inocula bactériens sont capables d'affecter positivement l'installation et la croissance des plantes sélectionnées dans les conditions toxiques sévères prévalant dans les sites miniers étudiés.

Effet des PGPR tolérant les éléments traces métalliques sur les plantes de *Sulla spinosissima*

Dans cette étude, nous avons choisi six souches (LMR249, LMR250, LMR266, LMR283, LMR291, LMR340) appartenant aux genres *Pseudarthrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, et *Stenotrophomonas*, qui sont multi-tolérantes à des niveaux élevés de trois éléments traces métalliques, Pb, Zn, et As. Le niveau de tolérance aux ETMs est un facteur important à prendre en compte lors de la bioremediation car il est directement lié à la survie des bactéries dans les sols contaminés par les ETMs. En comparaison avec d'autres souches tolérantes aux ETMs rapportées dans la littérature, nos isolats bactériens ont montré un niveau de tolérance relativement plus élevé (Wei et al., 2009 ; He et al., 2010 ; Sher et al., 2021).

En plus de leur tolérance aux éléments traces métalliques, les souches sélectionnées présentaient de nombreuses activités PGP tels que la production de sidérophores. Ces molécules chélatrices du fer libéré par certaines bactéries rhizosphériques pour attirer le fer vers la rhizosphère (Payne, 1994 ; Valencia-Cantero et al., 2007), peuvent promouvoir la croissance des plantes à différents niveaux, notamment en améliorant leur nutrition ferrique et en empêchant la croissance des pathogènes à travers la limitation de la disponibilité du fer dans le sol (Glick ,1995 ; Neubauer et al., 2000 ; Dimkpa et al., 2009 ; Ji et al., 2012). Les sidérophores réduisent aussi les effets de la pollution métallique et aident aux processus de phytoremédiation par leur capacité à lier d'autres ions d'éléments traces (Hider et Kong, 2010). Parmi les souches choisies pour l'inoculation, les sidérophores ont été produits par trois d'entre elles : *Pseudarthrobacter oxydans* LMR250, *Stenotrophomonas tumulicola* LMR266, et *Pseudomonas brassicacearum* LMR283.

Par ailleurs, les souches LMR250 et LMR291 (*Pseudarthrobacter oxydans*), et LMR340 (*Rhodococcus qingshengii*) possèdent la capacité de fixer l'azote moléculaire. Ce type de bactéries fournissent naturellement de l'azote pour la croissance des cultures et des plantes indigènes (Barua et al., 2012 ; Garcia de Salamone et al., 2012) et peuvent contribuer de manière significative aux bilans d'azote d'un certain nombre d'écosystèmes (Tang et al., 2018). Il est particulièrement intéressant de relever que la souche LMR291 (*Pseudarthrobacter oxydans*) possédaient aussi la capacité de solubiliser le phosphate naturel. Les souches appartenant aux espèces *Pseudarthrobacter* ont été signalées comme solubilisatrices de phosphate par de nombreux auteurs (Govindasamy et al., 2010 ; Goswami et al., 2013, 2014 ; Hassan et Bano, 2015). D'après ces résultats la souche LMR291 est une souche très intéressante car capable de contribuer à la nutrition phosphatée et azotée des plantes, deux minéraux connues pour être les deux facteurs limitants majeurs de la croissance végétale.

En plus des activités contribuant à la nutrition minérale des plantes, la production de phytohormones et en particuliers d'auxine, constitue l'une des activités phyto-bénéfiques les plus recherchées chez les souches PGPR et plus particulièrement pour leur utilisation dans des conditions de stress (Patten et Glick, 1996 ; Mirza et al., 2001 ; Gravel et al., 2007). A ce sujet, les souches de *Pseudomonas* (LMR283) et *Pseudarthrobacter* (LMR291, LMR250, LMR249) isolés des sols rhizosphériques de *Stipa* et *Sulla* ont produit des quantités élevées d'auxine, qui pourraient agir sur les plantes inoculées, entraînant une augmentation de leur croissance comme rapporté par Glick et al. (1998). En outre, 2 souches de *Pseudarthrobacter* (LMR249 et LMR291) ont produit l'ACC déaminase, une enzyme qui peut favoriser la croissance des plantes dans des conditions de stress en réduisant les niveaux d'éthylène dans les plantes stressées (Saleem et al., 2007 ; Onde re-Lemus et al., 2009).

Dans l'ensemble, chacune des six bactéries sélectionnées pour l'inoculation des plantes était hautement multirésistante aux trois éléments traces métalliques testés et possédait plusieurs activités PGP importantes, en particulier les souches LMR249, LMR291 et LMR340. Par conséquent, et comme démontré par de nombreux auteurs pour des souches équivalentes (Shahid et al., 2019; Barman et Jha, 2021; Ke et al., 2021; El Alaoui et al., 2021; Benidire et al., 2021), on peut postuler que nos souches sont des inocula bactériens potentiels prometteurs, qui pourraient améliorer la croissance des plantes, influencer positivement l'installation d'une couverture végétale dans les sols contaminés par des éléments traces métalliques et aider à diminuer ou à éliminer la pollution métallique.

Afin de vérifier ces hypothèses, des tests *in planta* ont été réalisés en utilisant l'espèce *Sulla spinosissima*, qui a été choisie comme plante hôte en raison de sa capacité à se développer spontanément dans des sols fortement multi-contaminés par des éléments traces métalliques dans le district minier d'Oujda (Sbabou et al., 2016). Dans un premier temps les souches de PGPR sélectionnées *in vitro* ont d'abord été inoculées à des plantes de *Sulla* poussant dans du sable stérilisé pour vérifier leur effet PGP sur les plantes dans des conditions normales en absence de stress métallique. Dans une seconde phase afin de tester la capacité des souches retenues à diminuer les effets négatifs des éléments traces métalliques sur les plantes, les plantules de *Sulla* inoculées ont été cultivées dans du sol prélevé dans le site d'Oued El Heimer, qui est extrêmement contaminé par divers éléments traces métalliques.

Dans des conditions normales contrôlées, les résultats des expériences d'inoculation ont montré que *Rhodococcus qingshengii* (LMR340), et dans une moindre mesure *Pseudarthrobacter*

oxydans (LMR291), avaient des effets positifs sur la croissance des plantes, ainsi que sur les teneurs en chlorophylle et en caroténoïdes. Ces résultats peuvent être corrélés avec les propriétés PGP *in vitro* des souches, en particulier l'augmentation de la disponibilité des nutriments (N et/ou P) grâce à la fixation biologique de l'azote et à la solubilisation du phosphate inorganique, la production d'auxine et l'activité ACC déaminase. Il est particulièrement important de souligner que les plantes inoculées avec LMR291 avaient été fertilisées uniquement avec du phosphate naturel et malgré cela elles avaient une biomasse statistiquement équivalente aux plantes témoins qui ont reçu un engrais à base de phosphate soluble. Ces résultats indiquent que l'activité de solubilisation de cette souche mesurée *in vitro* s'est exprimée dans la rhizosphère de la plante et était suffisante pour assurer un niveau de croissance normal des plantes de *Sulla* au dépend du phosphate naturel qui est naturellement insoluble et donc non assimilable par les plantes. L'inoculation avec cette souche pourrait être une solution prometteuse pour assurer une bonne croissance des plantes, et en particuliers *Sulla*, dans les sols caractérisés par une faible teneur en P total et une disponibilité réduite du P soluble, ce qui est le cas général des sols dans les sites miniers et ceux d'Oujda que nous avons analysés.

Chez les plantes inoculées, on a mesuré des niveaux variables des activités de la peroxydase (POD), de l'ascorbate peroxydase (APX) et de la catalase (CAT) selon la souche inoculée, l'organe de la plante et l'activité mesurée. Certaines souches ont entraîné une faible augmentation des activités des enzymes antioxydantes par rapport aux plantes témoins. Ceci pourrait être attribué à la stimulation par les souches inoculées des mécanismes de défense des plantes, comme suggéré par Amna et al. (2020).

En conclusion, cette première expérience d'inoculation de *Sulla* dans des conditions contrôlées et en absence de stress métallique a permis de montrer le potentiel phytobénéfique de certaines souches testées, en particuliers LMR340 et LMR291.

Dans la deuxième expérience d'inoculation les plantes de *Sulla* ont été cultivées dans des conditions de stress lié aux éléments traces métalliques. Le sol minier d'Oued El Heimer utilisé dans cette expérience est caractérisé par des niveaux toxiques des ETMs, en particulier l'As et le Pb qui étaient respectivement 2 et 10 fois supérieurs aux valeurs seuils. Dans ces conditions les plantes de *Sulla* non inoculées n'ont pas réussi à pousser et sont mortes rapidement. En revanche, pour les plantes inoculées cinq souches de PGPR tolérantes aux éléments traces métalliques sur les six testées, ont permis l'atténuation de la toxicité des éléments traces métalliques du sol sur les plantes de *Sulla*, qui ont pu pousser à des degrés divers (souches LMR291, LMR283, LMR249, LMR266, et LMR340).

Les meilleurs impacts positifs ont été attribués à la souche LMR291 de *Pseudarthrobacter oxydans* qui a induit des longueurs et des poids des tiges et des racines des plantes significativement plus élevés par rapport aux autres souches, de même que la teneur en chlorophylle des plantes. Cependant, et bien que les supports de culture ne soient pas comparables, la teneur en chlorophylle des plantes a été réduite de 30% par rapport celle des plantes cultivées sur du sable stérilisé non stressé. Ceci n'est pas étonnant car les éléments traces métalliques sont connus pour réduire le contenu des pigments photosynthétiques tels que la chlorophylle et les caroténoïdes, principalement en affectant la paroi cellulaire et l'intégrité de la membrane des thylakoïdes (Amirjani, 2012), de même que des changements dans les protéines et l'ADN en raison de l'interférence des ROS (Zayed et Terry, 2003 ; Khanna et al., 2019 ; Singh et al., 2020c). De plus, les éléments traces métalliques tels que Zn, Fe, Cu, Hg, Cr, et Pb peuvent conduire à une entrave des enzymes impliquées dans la synthèse de la chlorophylle comme la chlorophylle synthase et la protochlorophyllide réductase (Hashem, 2013). Cependant, plusieurs études ont rapporté que l'inoculation avec des souches PGPR peut améliorer la teneur en pigments photosynthétiques en cas de stress dû aux éléments traces métalliques (Tripathi et al., 2017 ; Mitra et al., 2018). Les mécanismes impliqués comprennent l'augmentation de l'absorption des nutriments par les plantes, la solubilisation du phosphate et l'exsudation de substances essentielles qui jouent un rôle crucial dans la synthèse des pigments photosynthétiques (Tanaka et al., 1998). Par ailleurs, la présence de caroténoïdes protège le mécanisme photosynthétique de la plante contre les perturbations photo-oxydatives en piégeant les ROS (Huang et Wang, 2010).

De nombreux facteurs contribuent au potentiel d'une souche à promouvoir la croissance des plantes soumises au stress par des éléments traces métalliques, tels que la solubilisation du phosphate, la production d'AIA, et la disponibilité des nutriments (Bilal et al., 2020 ; Rahbari et al., 2021). Dans la présente étude, la souche LMR291 a produit *in vitro* plus d'auxine et d'ACC déaminase que les autres souches testées, a été capable de solubiliser le phosphate naturel, et a toléré trois éléments traces métalliques (Pb, Zn, et As), ce qui pourrait expliquer pourquoi cette souche en particulier a permis la meilleure levée de l'effet toxique et inhibiteur des éléments traces métalliques sur les plantes de *Sulla* en comparaison aux autres souches testées. La grande capacité de LMR291 à solubiliser les phosphates inorganiques *in vitro* est d'une grande importance dans le contexte du sol post-minier utilisé ici qui ne contenait que 10 mg Kg⁻¹ de P disponible. L'activité de solubilisation du phosphate a un effet stimulant sur l'activité photosynthétique, comme l'a noté Demir (2005) dans ses recherches. Le phosphate joue

également un rôle crucial dans le transfert d'énergie chez les plantes et par conséquent les bactéries possédant cette caractéristique ont une influence stimulante sur l'activité photosynthétique. En outre, les PGPR présentant une tolérance au stress ont la capacité d'améliorer la tolérance des plantes au stress induit par les éléments traces métalliques en régulant la synthèse des hormones, la défense antioxydante et la réduction de l'éthylène (Singh et al. 2018).

La haute performance de LMR291 ne pourrait pas être liée au genre et à l'espèce de cette souche (*Pseudarthrobacter oxydans*), car l'autre souche LMR250 qui appartient au même genre et à la même espèce n'a pas pu améliorer la croissance des plantes *Sulla* dans le sol contaminé utilisé. Une explication possible est que la souche LMR291 a été isolée du sol d'Oued El Heimer et de la rhizosphère de *Sulla* alors que la souche LMR250 a été isolée du sol de Sidi Boubker et de la rhizosphère de *Stipa*. L'adaptation des souches aux conditions du sol, et des plantes, peut être un facteur important à prendre en considération lors de la sélection des souches pour l'inoculation des plantes dans les sols contaminés. Dans la présente étude, la quantité de Pb dans les sols semble être un facteur déterminant. En effet, même si les deux sols étaient fortement contaminés, la concentration de Pb dans le sol d'Oued El Heimer était le double de celle mesurée dans le sol de Sidi Boubker. De plus, la souche LMR291 a toléré *in vitro* cinq fois plus de Pb que la souche LMR250, et possédait des niveaux supérieurs d'activités PGP reconnues comme des traits importants pour qu'une souche soit plus performante avec des plantes poussant dans des sols contaminés par des éléments traces métalliques (niveaux plus élevés de solubilisation du P, de production d'auxine et d'activité ACC déaminase).

L'exposition des plantes au stress métallique provoque la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui entraîne des dommages oxydatifs élevés (Babu et al., 2015). Les plantes utilisent un système antioxydant de détoxification pour maintenir un niveau optimal de ROS, qui comprend différentes enzymes antioxydantes, telles que APX, CAT et POD. Ces enzymes éliminent ou équilibrent la production de ROS dans les plantes (Almeselmani et al., 2006 ; Gupta et al., 2018). Les activités des enzymes antioxydantes dans les plantes sous stress métallique montrent des tendances variables selon la concentration en métal, la durée d'exposition, l'ion métallique ou l'espèce végétale (Sharma et Dietz, 2008). Dans notre étude, la comparaison des résultats obtenus dans des conditions contaminées par plusieurs éléments traces métalliques avec ceux obtenus dans des conditions non contaminées, indiquent que les plantes poussant dans le sol multipollué et inoculées avec des souches PGPR tolérantes aux éléments traces métalliques ont présenté des activités enzymatiques antioxydantes réduites, en particulier dans les parties aériennes des plantes. Cependant, les plantes inoculées ont maintenu de bons niveaux de

biomasse, ainsi que des teneurs en chlorophylle et en caroténoïdes, par rapport à ceux des plantes poussant dans des conditions non contaminées. Ce qui pourrait indiquer que la baisse des activités des enzymes antioxydantes n'indiquerait pas que les plantes sont stressées, mais serait plutôt attribuée à l'effet des PGPR tolérantes sur les éléments traces métalliques dans la rhizosphère, comme l'ont rapporté différentes études (Hosseini et al., 2015 ; Khan et al., 2017a, b, 2018 ; Paredes-Páliz et al., 2018).

L'ensemble des résultats obtenus montrent un effet positif évident de l'inoculation bactérienne sur la croissance des plantes de *Sulla* cultivées sous des conditions de stress métallique très prononcé. Ces résultats prometteurs nécessitent une confirmation dans les conditions du terrain, où d'autres facteurs tels que les conditions climatiques peuvent avoir un impact sur les performances des bactéries, de la plante et de leur interaction, en particulier dans le district minier d'Oujda caractérisé par des conditions climatiques très rudes. Plus globalement, des efforts soutenus sont encore nécessaires pour faire de l'inoculation des plantes avec des bactéries sélectionnées une technique de bioremédiation efficace, reproductible et fiable.

Conclusions et perspectives

La présente étude s'est fixé comme objectif global de caractériser le système sols-plantes-microorganismes dans le district minier d'Oujda, à travers l'étude des microorganismes associés à certaines plantes spontanées poussant sur les différents types de déchets miniers laissés sur place à la fin de l'exploitation des mines. L'objectif ultime est de pouvoir proposer des solutions biotechnologiques pour la remédiation et/ou la stabilisation des polluants générés par cette activité, qui constituent une menace environnementale sérieuse.

Ainsi, nous avons identifié les principaux groupes de bactéries cultivables habitant ces sols, qui étaient dominés par des espèces de *Bacillus*. La distribution des populations bactériennes semble être liée au degré de contamination des sols par le Pb, Zn et As, et influencé par la présence ou non d'une couverture formée essentiellement par trois plantes (*Sulla spinosissima*, *Stipa tenuissima* et *Acacia cyanophylla*).

L'étude *in vitro* de la tolérance aux éléments traces métalliques des bactéries ainsi que leur activités PGP ont permis de repérer les souches bactériennes les plus prometteuses à tester avec les plantes. Au total six souches bactériennes (LMR249, LMR250, LMR266, LMR283, LMR291 et LMR340) isolées de la rhizosphère de *Stipa* et *Sulla* ont été retenues en se basant sur des caractères potentiellement phytobénéfiques comme la solubilisation du phosphate naturel, la production de l'auxine ou de sidérophores, la fixation biologique de l'azote et l'activité d'ACC deaminase. De plus, ces souches ont des activités antifongiques et enzymatiques intéressantes et sont tolérantes au Pb, Zn et As.

La légumineuse *Sulla spinosissima* a été choisie pour les études d'interaction plante-bactéries sélectionnées en raison de sa capacité à pousser spontanément dans les sites miniers de l'oriental. Les populations locales de cette espèce, qui sont adaptées aux concentrations élevées des éléments traces métalliques, pourraient être de bons candidats pour la phytoremédiation de ces sites pollués. Les résultats des essais d'inoculation des PGPR sélectionnées à *Sulla spinosissima* cultivée sous conditions normales puis dans le sol de Oued El Heimer, qui est extrêmement pollué par des éléments traces métalliques, sont particulièrement intéressants. En effet, certaines souches utilisées ont des effets biofertilisants et biostimulants sur la croissance de *Sulla* dans les conditions normales. Mieux encore, dans les conditions du sol hautement multipollué, cinq souches ont été capables de restaurer la croissance de *Sulla spinosissima*, qui était éliminée en absence d'inoculation. La souche LMR291 (*Pseudarthrobacter oxydans*) en particulier, et dans une moindre mesure LMR340 (*Rhodococcus qingshengii*), LMR249 (*Pseudarthrobacter phenanthrenivorans*), et LMR283 (*Pseudomonas brassicacearum*) ont amélioré substantiellement tous les paramètres de croissance des plantes *Sulla*, leurs teneurs en pigments photosynthétiques, et leurs activités enzymatiques antioxydantes.

Le présent travail souligne donc l'importance de sélectionner des souches indigènes tolérantes aux éléments traces métalliques et possédant de multiples caractéristiques phytobénéfiques en vue de la formulation de bio-inoculants pour les plantes à utiliser dans les programmes de phytoremédiation des sites pollués par les éléments traces métalliques. Les résultats obtenus améliorent également notre compréhension des mécanismes par lesquels les bactéries peuvent atténuer la toxicité des éléments traces métalliques chez les plantes. Ils confirment que l'inoculation par les PGPR est une approche innovante, durable et prometteuse qui permettrait la gestion des terres contaminées par les éléments traces métalliques à travers le contrôle ou l'arrêt de leur dissémination à partir des sites contaminés (bioremédiation ou phytostabilisation).

La collection bactérienne proposée dans ce travail, présente des bactéries ayant plusieurs activités intéressantes et très performantes, cela les rend de bons candidats pour des stratégies de traitement des milieux contaminés par les éléments traces métalliques. Comme perspectives, il serait particulièrement intéressant de :

- Tester des consortiums de bactéries aux activités complémentaires (LMR291 pour la solubilisation du phosphate, LMR250 pour la production de sidérophore, LMR283 pour la production d'auxine, et LMR249, LMR339 ou LMR270 pour l'activité ACC déaminase), à condition que les souches du mélange ne présentent pas d'antagonisme ou de compétition entre elles.
- Tester plusieurs espèces de plantes spontanées de la région, afin de déterminer celles qui représenteraient les meilleures solutions pour stopper la dissémination de la pollution métallique (phytostabilisation, phytoextraction,...).
- Réaliser des essais d'inoculation dans les conditions du terrain en utilisant les inoculums simples ou combinés les plus performants et les espèces végétales les plus prometteuses. L'objectif ultime étant de déterminer les inoculums qui ont le meilleur effet positif sur l'installation et la croissance d'espèces végétales *in situ* dans les conditions édaphiques et climatiques sévères prévalant dans les sites miniers étudiés.

Références

- Aafi, N.E., Brhada, F., Dary, M., Maltouf, A. F., Pajuelo, E., 2012. Rhizostabilization of metals in soils using *Lupinus luteus* inoculated with the metal resistant rhizobacterium *Serratia* sp. Int. J. Phytorem.14, 261–274.
- Abdullah, S.R.S., Al-Baldawi, I.A., Almansoor, A.F., Purwanti, I.F., Al-Sbani, N.H., Sharuddin, S.S.N., 2020. Plant-assisted remediation of hydrocarbons in water and soil: Application, mechanisms, challenges and opportunities. Chemosphere 247, 125932. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125932>
- Abubakari, M., Moomin, A., Nyarko, G., Dawuda, M., 2017. Heavy metals concentrations and risk assessment of roselle and jute mallow cultivated with three compost types. Annals of Agricultural Sciences. 62, 145–150.
- Adhikari, T., Kumar, A., 2012. Phytoaccumulation and tolerance of *Ricinus communis* L. to nickel. International Journal of Phytoremediation. 14:481–492. <https://doi.org/10.1080/15226514.2011.604688>
- Adriano, D. C., 1986. Trace Elements in the Terrestrial Environment. 533 Seiten, 99 Abb., zahlr. Tab. Springer- Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo 1986. Preis: 228, — DM.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. Methods enzymol. 105: 121-126.
- Aeron, A., Kumar, S., Pandey, P., Maheshwari, D.K., 2011. Emerging Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agrobiolgy, in: Maheshwari, D.K. (Ed.), Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1–36.
- Afzal, M., Khan Q. M., Sessitsch A., 2014. Endophytic bacteria: prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. Chemosphere 117, 232–242.
- Agrwal, K., Bhatt, A., Chaturvedi, V., Verma, P., 2020. Chapter 7 - Bioremediation: an effective technology toward a sustainable environment via the remediation of emerging environmental pollutants, in: Shah, M.P., Rodriguez-Couto, S., Şengör, S.S. (Eds.), Emerging Technologies in Environmental Bioremediation. Elsevier, pp. 165–196. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819860-5.00007-9>
- Agarwal, M., Rathore, R.S., Jagoe, C., Chauhan, A., 2019. Multiple lines of evidences reveal mechanisms underpinning mercury resistance and volatilization by *Stenotrophomonas* sp. MA5 isolated from the Savannah River Site (SRS), USA. Cells 8,309.
- Ahemad, M., Kibret, M., 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. Journal of King Saud University - Science 26, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Alexander, M., 1977. Introduction to soil microbiology. Introduction to soil microbiology.
- Alka, S., Shahir, S., Ibrahim, N., Chai, T.-T., Mohd Bahari, Z., Abd Manan, F., 2020. The role of plant growth promoting bacteria on arsenic removal: A review of existing perspectives. Environmental Technology & Innovation 17, 100602. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100602>

- Alloway, B.J., 1995. Heavy metals in soils. Edited by Alloway, B.J. London: Blackie
- Almeselmani, M., Deshmukh, P.S., Sairam, R.K., Kushwaha, S.R., and Singh, T.P., 2006. Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. *Plant Sci.* 171, 382-388.
- Altinozlu, H., Karagoz, A., Polat, T., Unver, I., 2012. Nickel hyperaccumulation by natural plants in Turkish serpentine soils. *Turkish Journal of Botany.* 36:269–280. <https://doi.org/10.3906/bot-1101-10>
- Amara, U., Khalid, R., Hayat, R., 2015. Soil bacteria and phytohormones for sustainable crop production. In: Maheshwari DK, editor. *Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem*. Springer Cham. pp. 87–103.
- Amirjani, M., 2012. Effects of cadmium on wheat growth and some physiological factors. *Int. J. Forest, Soil and Erosion* 2(1), 50-58.
- Amna, Xia, Y., Farooq, M.A., Javed, M.T., Kamran, M.A., Mukhtar, T., Ali, J., Tabassum, T., Rehman, S. ur, Hussain Munis, M.F., Sultan, T., Chaudhary, H.J., 2020. Multi-stress tolerant PGPR *Bacillus xiamenensis* PM14 activating sugarcane (*Saccharum de ficinarum* L.) red rot disease resistance. *Plant Physiol. Bioch.* 151, 640-649.
- Antonovics, J., Bradshaw, A.D., Turner, R.G., 1971. Heavy metal tolerance in plants. *Advances in Ecological Research* 7, 1-85.
- Argane, R., Benzaazoua, M., Bouamrane, A., Hakkou, R., 2014. Valorisation des rejets miniers du district Pb-Zn de Touissit-Boubker (région orientale-Maroc). *Déchets Sciences et Techniques* 66, 38-44.
- Arora, P.K. (Ed.), 2020a. *Microbial Technology for Health and Environment, Microorganisms for Sustainability*. Springer Singapore, Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-2679-4>
- Arora, N.K., Fatima, T., Mishra, I., Verma, S., 2020b. Microbe-based Inoculants: Role in Next Green Revolution, in: Shukla, V., Kumar, N. (Eds.), *Environmental Concerns and Sustainable Development: Volume 2: Biodiversity, Soil and Waste Management*. Springer Singapore, Singapore, pp. 191–246.
- Arnon, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24, 1–15.
- Atlas, R.M., Unterman, R., 1999. Bioremediation. In: Demain AL & Davies JE (Eds) *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2nd ed. ASM Press. Washington D.C. 666-681.
- Avinash, TS., Rai, RV., 2014. Antifungal Activity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria Against *Fusarium oxysporum* and *Phoma* sp. of Cucurbitaceae. *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*. New Delhi: Springer India. pp. 257–264. doi:10.1007/978-81-322-1801-2_23
- Awasthi, M. K., Guo, D., Awasthi, S. K., Wang, Q., Chen, H., Liu, T., Duan, Y., Soundari, P. G., Zhang, Z., 2020. Recent advances in phytoremediation of toxic metals from contaminated

- sites: A road map to a safer Environment, in: Bharagava, R.N., Saxena, G. (Eds.), Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety: Volume II: Biological Agents and Methods for Industrial Waste Management. Springer Singapore, Singapore, pp. 77–112.
- 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, J. Environ. Manage. 151, 160-166.
- Babu, A.G., Reja, S.I., Akhtar, N., Sultana, M., Deore, P.S., Ali, F.I., 2019. Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): Current practices and outlook, in: Arora, P.K. (Ed.), Microbial Metabolism de Xenobiotic Compounds, Microorganisms for Sustainability. Springer Singapore, Singapore, pp. 189–216.
- Baker, A.J.M., 1981. Accumulators and excluders - Strategies in the response of plants to heavy metals. Journal of Plant Nutrition 3 (1-4), 643-654.
- Baker, A.J.M., 1987. Metal tolerance. New Phytologist 106, 93-111.
- Bakshi, A., Wilson, R.L., Lacey, R.F., Kim, H., Wuppalapati, S.K., Binder, B.M., 2015. Identification of Regions in the Receiver Domain of the ETHYLENE RESPONSE1 Ethylene Receptor of Arabidopsis Important for Functional Divergence. Plant Physiol 169, 219–232.
- Balafrej, H., Bogusz, D., Triqui, Z.-E.A., Guedira, A., Bendaou, N., Smouni, A., Fahr, M., 2020. Zinc Hyperaccumulation in Plants: A Review. Plants 9, 562. <https://doi.org/10.3390/plants9050562>
- Balan, B.M., Shini, S., Krishnan, K.P., Mohan, M., 2018. Mercury tolerance and biosorption in bacteria isolated from Ny-Alesund, Svalbard, Arctic. J. Basic. Microbiol. 58, 286–295
- Bari, R., Jones, J.D.G., 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. Plant Mol Biol 69, 473–488.
- Barker, L.P., George, K.M., Falkow, S., Small, P.L., 1997. Differential trafficking of live and dead *Mycobacterium marinum* organisms in macrophages. Infect. Immun. 65, 1497–1504.
- Barman, D., Jha, D.K., 2021. Metallotolerant microorganisms and microbe-assisted phytoremediation for a sustainable clean environment, in: Singh, R.P., Manchanda, G., Bhattacharjee, K., Panosyan, H. (Eds.), Microbes in Microbial Communities: Ecological and Applied Perspectives. Springer, Singapore, pp. 307-336.
- Barnawal, D., Bharti, N., Maji, D., Chanotiya, C.S., Kalra, A., 2012. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-containing rhizobacteria protect *Ocimum sanctum* plants during waterlogging stress via reduced ethylene generation. Plant Physiol Biochem 58:277-235.
- Bar-Ness, E., Hadar, Y., Chen, Y., Shanzer, A., Libman, J., 1992. Iron uptake by plant from microbial siderophores. Plant Physiol. 99(4):1329–1335.
- Barua, S., Tripathi, S., Chakraborty, A., Ghosh, S., Chakrabarti K., 2012. Characterization and crop production efficiency of diazotrophic bacterial isolates from coastal saline soils. Microbiol. Res. 167, 95-102.

- Becerra-Castro, C., Prieto-Fernández, A., Alvarez-Lopez, V., Monterroso, C., Cabello-Conejo, M.I., Acea, M.J., Kidd, P.S., 2011. Nickel solubilizing capacity and characterization of rhizobacteria isolated from hyperaccumulating and non-hyperaccumulating subspecies of *Alyssum serpyllifolium*. *Int. J. Phytorem.* 1, 229–244.
- Becerra-Castro, C., Monterroso, C., Prieto-Fernández, A., Rodríguez-Lamas, L., Loureiro-Viñas, M., Acea, M.J., Kidd, P.S., 2012. Pseudometallophytes colonizing Pb/Zn mine tailings: a description of the plant-microorganism-Rhizosphere soil system and isolation of metal-tolerant bacteria. *J. Hazard. Mater.* 217–218, 350–359.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., Passaglia, L.M.P., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet Mol Biol* 35, 1044–1051.
- Benidire, L., Madline, A., Pereira, S.I.A., Castro, P.M.L., Boularbah, A., 2021. Synergistic effect of organo-mineral amendments and plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on the establishment of vegetation cover and amelioration of mine tailings. *Chemosphere.* 262, 127803.
- Bert, V., 2000. Tolérance aux éléments traces métalliques et accumulation chez *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). Thèse : Université des Sciences et Technologies de Lille, UFR de Biologie.
- Boyd, R.S., 1998. Hyperaccumulation as a plant defensive strategy. In: Brooks, R.R. (Ed.). *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 181-200.
- Bharagava, R.N., 2020. Emerging Eco-friendly Green Technologies for Wastewater Treatment, Microorganisms for Sustainability. Springer Singapore, Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-1390-9>
- Bhat, R.A., Hakeem, K.R., Dervash, M.A., 2020. Bioremediation and Biotechnology, Vol 2: Degradation of Pesticides and Heavy Metals. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-40333-1>
- Bhattacharyya, P.N., Jha, D.K., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1327–1350.
- Bian, F., Zhong, Z., Zhang, X., Yang, C., 2017. Phytoremediation potential of moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*) intercropped with *Sedum plumbizincicola* in metal-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research.* 24, 27244–27253. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0326-2>
- Bilal, S., Shahzad, R., Imran, M., Jan, R., Kim, K.Y., Lee, I.-J., 2020. Synergistic association of endophytic fungi enhances *Glycine max* L. resilience to combined abiotic stresses: heavy metals, high temperature and drought stress. *Ind Crops Prod.* 143, 111931.
- Bonanno, G., Cirelli, G.L., 2017. Comparative analysis of element concentrations and translocation in three wetland congener plants: *Typha domingensis*, *Typha latifolia* and *Typha angustifolia*. *Ecotoxicol Environ Saf* 143, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.05.021>

- Bonnot, B., 2009. Superoxyde réductase: Mécanisme de transfert d'électrons vers le site actif et rôle de la lysine 48 dans la catalyse. *Biochimie [q-bio.BM]*. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, p.262.
- Boopathy, R., 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology* 74, 63–67.
- Bowen, H.J.M., 1979. *Environmental Chemistry of the Elements*. Academic Press, London; New York (OCoLC)568731484.
- Bradl, H.B., 2004. Adsorption de heavy metal ions on soils constituents. *Journal of colloid and interface science* 277, 1–18.
- Braud, A., 2007. Procédé de phytoextraction couplé à la bioaugmentation d'un sol agricole polycontaminé par du chrome, du mercure et du plomb. *Interactions entre organismes*. Université de Haute Alsace - Mulhouse. fftel-00465806f, p.260.
- Briceño, G., Fuentes, M.S., Palma, G., Jorquera, M.A., Amoroso, M.J., Diez, M.C., 2012. Chlorpyrifos biodegradation and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol production by actinobacteria isolated from soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 73, 1–7.
- Briat, J.F., Lebrun, M., 1999. Plant responses to metal toxicity. *Plant Biology and Pathology* 322, 43–54. Brooks, R.R., 1998. Biogeochemistry and hyperaccumulators. In: Brooks, R.R. (Ed.). *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 95–118.
- Brierley, C.L., 1990. Bioremediation of metal- contaminated surface and groundwaters.
- Bronstad, K., K. Dronen and V. Torsvik, 1996. Phenotypic diversity and antibiotic resistance in soil bacterial communities. *Ind. J. Microbiol.* 17, 253–259.
- Brooks, R.R., 1998. Geobotany and hyperaccumulators. In: Brooks, R.R. (Ed.). *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 55–94.
- Buch, A., Archana, G., & Naresh-Kumar, G., 2008. Metabolic channeling of glucose towards gluconate in phosphate solubilizing *Pseudomonas aeruginosa* P4 under phosphorus deficiency. *Research in Microbiology*, 159, 635–642.
- Calmano, W., Hong J., Forstner, U., 1993. Binding and mobilization of heavy metals in contaminated sediments affected by pH and redox potential, *Wat. Sci. Tech.* 28, 223–235.
- Caporale, A.G., Violante, A., 2016. Chemical Processes Affecting the Mobility of Heavy Metals and Metalloids in Soil Environments. *Curr Pollution Rep* 2, 15–27. <https://doi.org/10.1007/s40726-015-0024-y>
- Caputo, S., Papale, M., Rizzo, C., Giannarelli, S., Conte, A., Moscheo, F., Graziano, M., Aspholm, P.E., Onor, M., De Domenico, E., Misericocchi, S., Michaud, L., Azzaro, M., Lo Giudice, A., 2019. Metal resistance in bacteria from contaminated arctic sediment is driven by metal local inputs. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 77, 291–307.
- Cattelan, A.J., Hartel, P.G., Fuhrmann, J.J., 1999. Screening for Plant Growth–Promoting Rhizobacteria to Promote Early Soybean Growth. *Soil Science Society of America Journal*

63, 1670–1680.

Chabot, R., Antoun, H., Cescas, M.P., 1993. Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Can. J. Microbiol.* 39, 941–947.

Chaignon, V., 2001. Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées. Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides. Thèse: Ecole doctorale, Sciences de l'Environnement: Système Terre, Université d'Aix-Marseille.

Chance, B., Maehly, A.C., 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol.* 2, 764–775.

Chen, G.C., Liu, Z., Zhang, J., Owens, G., 2012. Phytoaccumulation of copper in willow seedlings under different hydrological regimes. *Ecological engineering.* 44:285–289. <https://doi.org/10.1016/j.ecole ng.2012.04.018>

Chen, G.X., Asada, K., 1989. Ascorbate peroxidase in tea leaves: Occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant Cell Physiol.* 30, 897–998.

Chen, J.-H., Lion, L.W., Ghiorse, W.C., Shuler, M.L., 1995. Mobilization of adsorbed cadmium and lead in aquifer material by bacterial extracellular polymers. *Water Research* 29, 421–430.

Cheng, S., 2003. Effects of heavy metals on plants and resistance mechanisms. *Environmental Science and Pollution Research* 10 (4), 256–264.

Chenniappan, C., Narayanasamy, M., Daniel, G.M., Ramaraj, G.B., Ponnusamy, P., Sekar, J., Vaiyapuri Ramalingam, P., 2019. Biocontrol efficiency of native plant growth-promoting rhizobacteria against rhizome rot disease of turmeric. *Biol. Control.* 129, 55–64.

Cho, Y.-J., Cho, A., Hong, S.G., Choi, H.-G., Kim, O.-S., 2019. Draft Genome Sequence of *Arthrobacter oryzae* TNBS02, a bacterium containing heavy metal resistance genes, isolated from soil of Antarctica. *Microbiol. Resour. Announc.* 8, e01501-18.

Choudhary, S., Sar, P., 2009. Characterization of a metal resistant *Pseudomonas* sp. isolated from uranium mine for its potential in heavy metal (Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , and Cd^{2+}) sequestration. *Bioresource Technology* 100, 2482–2492.

Choudhary, S.B., Sharma, H.K., Karmakar, P.G., Kumar, A., Saha, A.R., Hazra, P., Mahapatra, B.S., 2013. Nutritional prde ile of cultivated and wild jute ('*Corchorus*') species. *Australian Journal of Crop Science.* 7, 1973.

Chuan, M.C., Shu, G.Y. and Liu, J.C., 1996. Solubility of heavy metals in a contaminated soil: Effects of redox potential and pH. *Water, Air and Soil Pollution*, 90, 543–556.

Cleiss-Arnold, J., 2010. Réponse bactérienne au stress arsénié. Université de Strasbourg.p.251.

Climat Oujda (Maroc). <https://fr.climate-data.org/afrique/maroc/oujda/oujda-374/>

- Cortês, M., Fuchs, F.M., Commichau, F.M., Eichenberger, P., Schuerger, A.C., Nicholson, W.L., Setlow, P., Moeller, R., 2019. *Bacillus subtilis* spore resistance to simulated Mars surface conditions. *Front. Microbiol.* 10,333.
- Costa, O.Y.A., Raaijmakers, J.M., Kuramae, E.E., 2018. Microbial Extracellular Polymeric Substances: Ecological Function and Impact on Soil Aggregation. *Front Microbiol* 9, 1636. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01636>
- Da Silva, E.C., de Albuquerque, M.B., de Azevedo Neto, A.D., da Silva Junior, C.D., 2013. Drought and its consequences to plants—From individual to ecosystem. In *Responses of Organisms to Water Stress* ; Akinci, S., Ed. ; IntechOpen : London, UK. pp. 18–47.
- Deb, V.K., Rabbani, A., Upadhyay, S., Bharti, P., Sharma, H., Rawat, D.S., Saxena, G., 2020. Microbe-Assisted Phytoremediation in Reinstating Heavy Metal-Contaminated Sites: Concepts, Mechanisms, Challenges, and Future Perspectives, in: Arora, P.K. (Ed.), *Microbial Technology for Health and Environment, Microorganisms for Sustainability*. Springer, Singapore, pp. 161–189. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2679-4_6
- Demir, S., 2005. Influence of arbuscular mycorrhiza on some physiological growth parameters of pepper. *Turk. J. Biol.* 28, 85-90.
- Deneux-Mustin, S., Roussel-Debet, S., Mustin, C., Henner, P., Munier-Lamy, C., Colle, C., Berthelin, J., Garnier-Laplace, J. and Leyval, C., 2003. Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces: Influence des microorganismes du sol. *TEC & DOC*, Paris.
- Devi, S.R., Prasad, M.N.V., 1999. Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. In: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 99-116.
- Desaunay, A., 2011. Etude et modélisation de la biosorption des métaux par les bactéries. Application au transfert du cadmium et du zinc, seuls ou en mélange par *Escherichia coli* et *Cupriavidus metallidurans* en colonnes de sable d'Hostun. *Sciences de la Terre. Université de Grenoble*.p.247.
- De Vos, C.H.R., Vonk, M.J., Vooijs, R., Schat, H., 1992. Glutathione depletion due to copperinduced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiology* 98, 853-858.
- Di, D.-W., Zhang, C., Luo, P., An, C.-W., Guo, G.-Q., 2015. The biosynthesis of auxin: how many paths truly lead to IAA? *Plant Growth Regul.* 1–11.
- Dimkpa, C.O., Merten, D., Svatos, A., Büchel, G., Kothe, E., 2009. Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1687-1696.
- Dinesh, M., Kumar, M.V., Neeraj, P., Shiv, B., 2014. Phytoaccumulation of heavy metals in contaminated soil using Makoy (*Solenum nigrum* L.) and Spinach (*Spinacia oleracea* L.) plant. *Sciences (New York)* 2:350–354.
- Döbereiner, J., 1995. Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil

- and plants in: K. Alef and P. Nannipieri (Eds.) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry* Academic Press London, UK 134-14.
- Dubey, R.K., Tripathi, V., Prabha, R., Chaurasia, R., Singh, D.P., Rao, C.S., El-Keblawy, A., Abhilash, P.C., 2020. Belowground microbial communities: Key players for soil and environmental sustainability, in: Dubey, R. K., Tripathi, V., Prabha, R., Chaurasia, R., Singh, D. P., Rao, C. S., El-Keblawy, A., Abhilash, P. C. (Eds.), *Unravelling the Soil Microbiome: Perspectives for Environmental Sustainability*, SpringerBriefs in Environmental Science. Springer International Publishing, Cham, pp. 5–22.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J., Guerinot, M.L., 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, 5624-5628.
- El Alaoui, A., Raklami, A., Bechtaoui, N., El Gharmali, A., Ouhammou, A., Imzilen, B., Achouak, W., Pajuelo, E., Oufdou, K., 2021. Use of native plants and their associated bacteria rhizobiomes to remediate-restore Draa Sfar and Kettara mining sites, Morocco. *Environ. Monit. Assess.* 193, 232.
- Ellis, R.J., Morgan, P., Weightman, A.J., Fry, J.C., 2003. Cultivation-dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in Heavy-Metal-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3223–3230.
- El-Sayed, W.S., Akhkha, A., El-Naggar, M.Y., Elbadry, M., 2014. In vitro antagonistic activity, plant growth promoting traits and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with wild plants grown in arid soil. *Front. Microbiol.* 5, 1-11.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.032>
- European Union, 2002. Heavy Metals in Wastes. European Commission on Environment. <http://ec.europa.eu/environment/waste/studies/pdf/heavymetalsreport.pdf>.
- Fajardo, C., Costa, G., Nande, M., Botías, P., García-Cantalejo, J., Martín, M., 2019. Pb, Cd, and Zn soil contamination: Monitoring functional and structural impacts on the microbiome. *Appl. Soil. Ecol.* 135, 56–64.
- Fekete, F.A., Spence, J.T., Emery, T., 1983. Siderophores Produced by Nitrogen-Fixing *Azotobacter vinelandii* OP in Iron-Limited Continuous Culture. *Appl Environ Microbiol* 46, 1297–1300.
- Figueiredo, D.D., Batista, R.A., Roszak, P.J., Hennig, L., Köhler, C., 2016. Auxin production in the endosperm drives seed coat development in *Arabidopsis*. *eLife* 5, e20542. <https://doi.org/10.7554/eLife.20542>
- Filloux, A., Vallet, I., 2003. [Biofilm: set-up and organization of a bacterial community]. *Med Sci (Paris)* 19, 77–83.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8, 623–633.

- Fogarty, A.M., Tuovinen, O.H., 1991. Microbiological degradation of pesticides in yard waste composting. *Microbiol Rev* 55, 225–233.
- Fournon, D., 1999. La phytoremédiation. *Sciences pharmaceutiques*. ffdumas-01617616f.P.118.
- Foy, C.D., Chaney, R.L., White, M.C., 1978. The Physiology of metal toxicity in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 29, 511-566.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytologist* 146, 359-388.
- Friedland, A. J., 1990. Movement of metals through soils and ecosystems. In *Heavy Metal Tolerance In Plants: Evolutionary Aspects*, ed. A. J. Shaw. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp 8-17.
- Fulekar, MH., 2009. Bioremediation de fenvalerate by *Pseudomonas aeruginosa* in a scale up bioreactor. *Romanian Biotechnological Letters*, 14(6), 4900-4905.
- Gadd, G.M., 1990. Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia* 46, 834–840.
- Gadd, G.M., 2009. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 84, 13–28.
- Gallo, I. F. L., Furlan, J. P. R., Sanchez, D. G., Stehling, E. G., 2019. Heavy metal resistance genes and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Arthrobacter* sp. isolated from Brazilian soils. *Antonie van Leeuwenhoek*. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01281-9>.
- Gamalero, E., Glick, B.R., 2015. Bacterial Modulation of Plant Ethylene Levels. *Plant Physiology* 169, 13–22.
- Garcia de Salamone, I.E., Funes, J.M., Di Salvo, L.P., Escobar-Ortega, J.S., D’Auria, F., Ferrando, L., Fernandez-Scavino, A., 2012. Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: impact of plant genotypes on Rhizosphere microbial communities and field crop production. *Applied Soil Ecol.* 61, 196-204.
- García-Salgado, S., García-Casillas, D., Quijano-Nieto, M.A., BonillaSimón, M.M., 2012. Arsenic and heavy metal uptake and accumulation in native plant species from soils polluted by mining activities. *Water Air Soil Pollution*. 223:559–572. <https://doi.org/10.1007/s11270-011-0882-x>
- Geesey, G. G., 1982. Microbial exopolymers: Ecological and economic considerations. *ASM News*, 48, 9-14.
- Giller, K.E., Witter, E., Mcgrath, S.P., 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol. Biochem.* 30, 1389–1414.
- Gillet, S., Lawarée, E., Matroule, J-Y., 2019. Functional diversity of bacterial strategies to cope with metal toxicity, in: Das, S., Dash, H.R. (Eds.), *Microbial Diversity in the Genomic Era*.

Academic Press, pp. 409–426.

Glick, B. R., 2010., Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* 28, 367–374.

Glick, B.R., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41, 109–117.

Glick, B.R., Penrose, D.M., Li, J., 1998. A Model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* 190, 63–68.

Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J., Duan, J., 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol* 119, 329–339.

Girardi, C.L., 2006. Caractérisation fonctionnelle d'un facteur d'elongation mitochondrial LeEF-T_{sm} chez la tomate. Approches par transgénèse et protéomique. Institut national polytechnique de Toulouse. p.130.

Gołębiewski, M., Deja-Sikora, E., Cichosz, M., Tretyn, A., Wróbel, B., 2014. 16S rDNA pyrosequencing analysis of bacterial community in heavy metals polluted soils. *Microb. Ecol.* 67, 635–647.

Gorbushina, A.A., 2007. Life on the rocks. *Environmental Microbiology* 9, 1613–1631.

Gordon, S.A., Weber, R.P., 1951., Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol.* 26, 192–195.

Goswami, D., Vaghela, H., Parmar, S., Dhandhukia, P., & Thakker, J. N., 2013. Plant growth promoting potentials of *Pseudomonas* spp. strain OG isolated from marine water. *Journal of Plant Interactions*, 8, 281–290.

Goswami, D., Dhandhukia, P., Patel, P., Thakker, J.N., 2014. Screening of PGPR from saline desert of Kutch: Growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus licheniformis* A2. *Microbiol Res.* 169, 66–75.

Goswami, D., Parmar, S., Vaghela, H., Dhandhukia, P., Thakker, J.N., 2015. Describing *Paenibacillus mucilaginosus* strain N3 as an efficient plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Cogent Food & Agriculture* 1, 1000714.

Govindasamy, V., Senthilkumar, M., Magheshwaran, V., Kumar, U., Bose, P., Sharma, V., & Annapurna, K., 2011. *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: Potential PGPR for sustainable agriculture. In D. K. Maheshwari (Ed.), *Plant growth and health promoting bacteria* (pp. 333–364). Berlin: Springer-Verlag.

Gowri, P.M., Srivastava, S., 1996. Encapsulation as a response of *Azospirillum brasilense* sp7 to zinc stress. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 12, 319–322.

Gravel, V., Antoun, H., Tweddell, R.J., 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol. Biochem.* 39, 1968–1977.

- Greger, M., 1999. Metal availability and bioconcentration in plants. In: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems. SpringerVerlag, Berlin, pp. 1-27.
- Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center (GWRTAC), 1997. Remediation of Metal-Contaminated Soils and Groundwater. Tech. Rep. TE-97-01, GWRTAC, Pittsburgh, PA, USA, GWRTAC-E Series.
- Guo, J.K., Ding, Y.Z., Feng, R.W., Wang, R.G., Xu, Y.M., Chen, C., Wei, X.L., Chen, W.M., 2015. *Burkholderia metalliresistens* sp. nov., a multiple metal-resistant and phosphate-solubilising species isolated from heavy metal-polluted soil in Southeast China. *Antonie van Leeuwenhoek* 107, 1591–1598.
- Guo, X., Xie, C., Wang, L., Li, Q., Wang, Y., 2019. Biodegradation of persistent environmental pollutants by *Arthrobacter* sp. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 8429–8443.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125823>
- Gupta, N., Sahai, V., Gupta, R., 2007. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: statistical medium optimization and production in a bioreactor. *Process. Biochem.* 42, 518-526.
- Gupta, D.K., Palma, J.M., Corpas, F.J., 2018. Generation and scavenging of reactive oxygen species (ROS) in plant cells: an overview. In: Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ (eds) *Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants*. Springer, Cham.
- Gurska, J., Wang, W., Gerhardt, K.E., Khalid, A.M., Isherwood, D.M., Huang, X.-D., Glick, B.R., Greenberg, B.M., 2009. Three Year Field Test of a Plant Growth Promoting Rhizobacteria Enhanced Phytoremediation System at a Land Farm for Treatment of Hydrocarbon Waste. *Environ. Sci. Technol.* 43, 4472–4479.
- Haas, D., Défago, G., 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol.* 3:307–319.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 95–108.
- Harter, R.R., 1979. Adsorption of copper and lead by Ap and B2 horizons of several northeastern United States soils. *Soil Sci.Soc.Am.J.* 43, 679-683.
- Hasanuzzaman, M. (Ed.), 2020. *Plant Ecophysiology and Adaptation under Climate Change: Mechanisms and Perspectives II: General Consequences and Plant Responses*. Springer, Singapore, pp. 865. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2156-0_26
- Hashem, H. A., 2013. Cadmium toxicity induces lipid peroxidation and alters cytokinin content and antioxidant enzyme activities in soybean. *Botany* 92(1), 1-7.
- Hassan, T.U., Bano, A., 2015. The stimulatory effects of L-tryptophan and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on soil health and physiology of wheat. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 15, 190-201.

- Hazen, T.C., 2019. Environmental systems biology approach to bioremediation, in: Hurst, C.J. (Ed.), *Understanding Terrestrial Microbial Communities, Advances in Environmental Microbiology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 103–127.
- He, L.Y., Zhang, Y.F., Ma, H.Y., Su, L.N., Chen, Z.J., Wang, Q.Y., Qian, M., Sheng, X.F., 2010. Characterization of copper-resistant bacteria and assessment of bacterial communities in Rhizosphere soils of copper-tolerant plants. *Appl. Soil Ecol.* 44, 49-55.
- Hider, R.C., Kong, X., 2010. Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* 27, 637-657.
- Hiltner, L., 1904. Über neue Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundung und Brace. *Arb. Dtsch. Landwirtsch. Gesellschaftswiss* 98,59.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950. The water culture method for growing plants without soil, *Circ.* 347. Berkeley, CA: California Agricultural Experiment Station.
- Hosseini, S., Kafi, M., Arghavani, M., 2015. The effect of Salicylic acid on physiological characteristics of *Lolium* grass (*Lolium perenne* cv. “Numan”) under drought stress. *Int. J. Agro. Agri. Res.* 7, 7-14.
- Hou, J., Liu, W., Wu, L., Ge, Y., Hu, P., Li, Z., Christie, P., 2018. *Rhodococcus* sp. NSX2 modulates the phytoremediation efficiency of a trace metal-contaminated soil by reshaping the Rhizosphere microbiome. *Applied Soil Ecology* 133. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.09.009>
- Huang, B., Gong, Z.T., 2005. geochemical barriers and element retention in soils in different landscapes of the tianshan mountain area, Xinjiang, china. *Geoderma* 126,337-351.
- Huang, M., Zhu, Y., Li, Z., Huang, B., Luo, N., Liu, C., Zeng, G., 2016. Compost as a Soil Amendment to Remediate Heavy Metal-Contaminated Agricultural Soil: Mechanisms, Efficacy, Problems, and Strategies. *Water Air Soil Pollut.* 227.
- Huang, G. Y., Wang, Y. S., 2010. Physiological and biochemical responses in the leaves of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*) exposed to multiple heavy metals. *J. Hazard. Mater.* 182(1-3), 848-854.
- Igalavithana, A.D., Kim, K-H., Jung, J-M., Heo, H-S., Kwon, E.E., Tack, F.M.G., Tsang, D.C.W., Jeon, Y. J., Ok, Y.S., 2019. Effect of biochars pyrolyzed in N₂ and CO₂, and feedstock on microbial community in metal (loid)s contaminated soils. *Environment International* 126, 791–801.
- Jadhav, H.P., Shaikh, S.S., Sayyed, R.Z., 2017. Role of hydrolytic enzymes of rhizoflora in biocontrol of fungal phytopathogens: An overview. In: Mehnaz S, editor. *Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation Microorganisms for Sustainability*. Singapore: Springer, pp. 183-203.
- Jaiswal, S., Dey, R., Bag, A., 2022. Effect of Heavy Metal Cadmium on Cell Proliferation and Chromosomal Integrity in *Allium cepa*. *Natl. Acad. Sci. Lett.* 45, 35–37. <https://doi.org/10.1007/s40009-021-01072-9>

- Jaiswal, S., Singh, D.K., Shukla, P., 2019. Gene editing and systems biology tools for pesticide bioremediation: A Review. *Front. Microbiol.* 10,87.
- Janssen, P. H., 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1719–1728.
- Jha, C.K., Patel, D., Rajendran, N., Saraf, M., 2010. Combinatorial assessment on dominance and informative diversity of PGPR from Rhizosphere of *Jatropha curcas* L. *J. Basic Microbiol.* 50, 211–217.
- Jha, C. K., & Saraf, M., 2015. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *E3 Journal of Agricultural Research and Development*, 5, 108–119.
- Ji, G., Silver, S., 1995. Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. *J. Indust. Microbiol.* 14:61–75.
- Ji, C., Juarez-Hernandez, R.E., Miller, M.J., 2012. Exploiting bacterial iron acquisition: siderophore conjugates. *Future Med. Chem.* 4, 297–313.
- Kabata-Pendias, A., 2004. Soil-Plant Transfer of Trace Elements—An Environmental Issue *Geoderma*, 122, 143–149.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. Trace elements in soils and plants. CRC Press, Boca Raton, London, New-York, Washington D.C. FL (3rd edition), pp. 413.
- Kalra, Y.P., 1995. Determination of pH of Soils by Different Methods: Collaborative Study. *J AOAC Int.* 78, 310–324.
- Kao, P.H., Huang, C.C., Hseu, Z.Y., 2006. Response of microbial activities to heavy metals in a neutral loamy soil treated with biosolid. *Chemosphere* 64, 63–70.
- Kapoor, R.T., Bani Mfarrej, M.F., Alam, P., Rinklebe, J., Ahmad, P., 2022. Accumulation of chromium in plants and its repercussion in animals and humans. *Environmental Pollution* 301, 119044. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119044>
- Kathiresan, K., Saravanakumar, K., Anburaj, R., Gomathi, V., Abirami, G., Sahu, S.K., Anandhan, S., n.d. Microbial enzyme activity in decomposing leaves of mangroves 8.
- Kazemalilou, S., Delangiz, N., Asgari Lajayer, B., Ghorbanpour, M., 2020. Chapter 9 - Insight into plant-bacteria-fungi interactions to improve plant performance via remediation of heavy metals: an overview, in: Sharma, V., Salwan, R., Al-Ani, L.K.T. (Eds.), *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture*. Academic Press, pp. 123–132. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818469-1.00010-9>
- Ke, T., Guo, G., Liu, J., Zhang, C., Tao, Y., Wang, P., Xu, Y., Chen, L., 2021. Improvement of the Cu and Cd phytostabilization efficiency of perennial ryegrass through the inoculation of three metal-resistant PGPR strains. *Environ. Pollut.* 271, 116314.
- Khan, A.G., 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18, 355–364. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.006>

- Khan, M.M.A., Haque, E., Paul, N.C., Khaleque, M.A., Al-Garni, S.M.S., Rahman, M., Islam, T.F., 2017a. Enhancement of growth and grain yield of rice in nutrient deficient soils by rice probiotic bacteria. *Rice Sci.* 24, 264-273.
- Khan, N., Bano, A., Babar, M.A., 2017b. The root growth of wheat plants, the water conservation and fertility status of sandy soils influenced by plant growth promoting rhizobacteria. *Symbiosis.* 72,195- 205.
- Khan, N., Bano, A., Zandi, P., 2018. Effects of exogenously applied plant growth regulators in combination with PGPR on the physiology and root growth of chickpea (*Cicer arietinum*) and their role in drought tolerance. *J. Plant Interact.* 13(1), 239-247.
- Khanna, K., Jamwal, V.L., Gandhi, S.G., Ohri, P., Bhardwaj, R., 2019. Metal resistant PGPR lowered Cd uptake and expression of metal transporter genes with improved growth and photosynthetic pigments in *Lycopersicon esculentum* under metal toxicity. *Sci. Rep.* 9, 5855.
- Kim, S., Krajmalnik-Brown, R., Kim, J-O., Chung, J., 2014. Remediation of petroleum hydrocarbon-contaminated sites by DNA diagnosis-based bioslurping technology. *Sci Total Environ.* 497,250–259.
- Kiseleva, A.A., Tarachovskaya, E.R., Shishova, M.F., 2012. Biosynthesis of phytohormones in algae. *Russ J Plant Physiol* 59, 595–610.
- Kohler, J., Caravaca, F., Carrasco, L., Rolden, A., 2007. Interactions between a plant growth-promoting rhizobacterium, an AM fungus and phosphate-solubilizing fungus in the Rhizosphere of *Lactuca sativa* *Appl. Soil Ecol.*, 35, pp. 480-487.
- Kramer, U., Cotter-Howells, J.D., Charnock, J.M., Baker, A.J.M., Smith, J.A.C., 1996. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 373, 635-638.
- Kuffner, M., De Maria, S., Puschenreiter, M., Fallmann, K., Wieshammer, G., Gorfer, M., Strauss, J., Rivelli, A.R., Sessitsch, A., 2010. Culturable bacteria from Zn- and Cd-accumulating *Salix caprea* with differential effects on plant growth and heavy metal availability. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1471–1484.
- Kumar, R., Sunish Ayyadurai, N., Pandiaraja, P., Reddy, A.V., Venkateswarlu, Y., Prakash, O., Sakthivel, N., 2004. Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broad- spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. *J. Appl. Microbiol.* 98, 145–154.
- Kumar, R., Sharma, A., Kumar, A. and Singh, D., 2012. Lipase from *Bacillus pumilus* RK31: Production, purification and some properties. *World Appl. Sci. J.* 16(7), 940-948.
- Kumar, L., Bharadvaja, N., 2020a. Microbial Remediation of Heavy Metals, in: Shah, M.P. (Ed.), *Microbial Bioremediation & Biodegradation*. Springer, Singapore, pp. 49–72. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1812-6_2
- Kumar, M., Kumar, V., Prasad, R. (Eds.), 2020b. *Phyto-Microbiome in Stress Regulation, Environmental and Microbial Biotechnology*. Springer Singapore, Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-2576-6>
- Kumar, S., Kumari, N., Karmakar, S., Ankit, Singh, R., Behera, M., Rani, A., Kumar, N., 2020c. Advances in Plant–Microbe-Based Remediation Approaches for Environmental Cleanup, in:

- Bharagava, R.N. (Ed.), Emerging Eco-Friendly Green Technologies for Wastewater Treatment, Microorganisms for Sustainability. Springer, Singapore, pp. 103–128. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1390-9_5
- Kuleff, I., Djingova, R., 1984. The dandelion (*Taraxacum officinale*) - A monitor for environmental pollution? *Water, Air, and Soil Pollution* 21, 77-85.
- Lahlali, R., Aksissou, W., Lyousfi, N., Ezrari, S., Blenzar, A., Tahiri, A., Ennahli, S., Hrustić, J., MacLean, D., Amiri, S., 2020. Biocontrol activity and putative mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* (SF14 and SP10), *Alcaligenes faecalis* ACBC1, and *Pantoea agglomerans* ACBP1 against brown rot disease of fruit. *Microb. Pathog.* 139,103914.
- Langella, F., Grawunder, A., Stark, R., Weist, A., Merten, D., Haferburg, G., Büchel, G., Kothe, E., 2014. Microbially assisted phytoremediation approaches for two multi-element contaminated sites. *Environmental Science and Pollution Research*. 21, 6845–6858. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2165-0>
- Lasat, M.M., 2002. Phytoextraction of toxic metals: A Review of Biological Mechanisms. *Journal of Environmental Quality* 31, 109-120.
- Lehmann, C., Rebele, F., 2004. Evaluation of heavy metal tolerance in *Calamagrostis epigejos* and *Elymus repens* revealed copper tolerance in a copper smelter population of *C. epigejos*. *Environmental and Experimental Botany* 51, 199-213.
- Levy, D.B., Barbarick, K. A., Siemer, E. G., and Sommers, L. E., 1992. Distribution and partitioning of trace metals in contaminated soils near Leadville, Colorado. *J. Environ. Qual.* 21, 185-195.
- Li, K., Ramakrishna, W., 2011. Effect of multiple metal resistant bacteria from contaminated lake sediments on metal accumulation and plant growth. *J. Hazard. Mater.* 189, 531-539.
- Lindsay, W.L., 1979. *Chemical Equilibrium in Soils*. John Wiley & Sons, New York.
- Liu, X., Zhang, A., Ji, C., Joseph, S., Bian, R., Li, L., Pan, G., and Paz-Ferreiro, J., 2013. Biochar's effect on crop productivity and the dependence on experimental conditions- a meta-analysis of literature data. *Plant Soil* 373, 583–594.
- Lopes, M.R., Klein, M.N., Ferraz, L.P., da Silva, A.C., Kupper, K.C., 2015. *Saccharomyces cerevisiae*: A novel and efficient biological control agent for *Colletotrichum acutatum* during pre-harvest. *Microbiol. Res.*, Special Issue: Biodiversity 175, 93–99.
- Ma, J.F., Zheng, S.J., Hiradate, S., Matsumoto, H., 1997. Detoxifying aluminium with buckwheat. *Nature* 390, 569-570.
- Ma, Y., Prasad, M.N.V., Rajkumar, M., Freitas, H., 2011. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnol. Adv.* 29, 248–258.
- Machemer, S.D., Wildeman, T.R., 1992. Adsorption compared with sulfide precipitation as metal removal processes from acid-mine drainage in a constructed wetland. *Journal of contaminant hydrology* 9,115-131.
- Mackinney, Q., 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.*, 140, 315-322.

- Macnair, M.R., 1993. The genetics of metal tolerance in vascular plants. *New Phytologist* 124, 541- 559.
- Malik, K., Mirza, M., Hassan, U., Mehnaz, S., Rasul, G., Haurat, J., Bally, R., Normand, P., 2002. The role of plant-associated beneficial bacteria in rice-wheat cropping system. In: Kennedy, I.R. and A.T.M.A. Choudhury (eds.). *Biofertilisers in Action*. Rural Industries Research and Development Corporation, Canberra. pp. 73–83.
- Manceau, A., Marcus, M.A., Tamura, N., 2002. Quantitative speciation of heavy metals in soils and sediments by synchrotron X-ray techniques. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 49:341-428.
- Manoj, S.R., Karthik, C., Kadirvelu, K., Arulselvi, P.I., Shanmugasundaram, T., Bruno, B., Rajkumar, M., 2020. Understanding the molecular mechanisms for the enhanced phytoremediation of heavy metals through plant growth promoting rhizobacteria: A review. *Journal of Environmental Management* 254, 109779. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109779>
- Manjanatha, M.G., Loynachan, T.E., Atherly, A.G., 1992. Tn5 mutagenesis of Chinese *Rhizobium fredii* for siderophore overproduction. *Soil Biol. Biochem.* 24, 151–155.
- Mapelli, F., Marasco, R., Balloi, A., Rolli, E., Cappitelli, F., Daffonchio, D., Borin, S., 2012. Mineral-microbe interactions: 481 Biotechnological potential of bioweathering. *J. Biotechnol.* 157 (4), 473-481.
- Matthews, D.J., Moran, B.M., McCabe, P.F., Otte, M.L., 2004. Zinc tolerance, uptake, accumulation and distribution in plants and protoplasts of five European populations of the wetland grass *Glyceria fluitans*. *Aquatic Botany* 80, 39-52.
- McBRIDE, M.B., 1989. Reactions controlling heavy metal solubility in soils. In: STEWART, B.A. (Ed.) *Advances in Soil Science*. New York: SpringerVerlag, p.1-56.
- McEntee, J.D., Woodrow, J.R., Quirk, A.V., 1986. Investigation of cadmium resistance in an *Alcaligenes* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 515–520.
- McLaughlin, M.J., Zarcinas, B.A., Stevens, D.P., Cook, N., 2000. Soil testing for heavy metals. *Communications in Soil Sciences and Plant Analysis* 31, 1661–1700.
- McNaughton, S.J., Folsom, T.C., Lee, T., Park, F., Price, C., Roeder, D., Schmitz, J., Stockwell, C., 1974. Heavy metal tolerance in *Typha latifolia* without the evolution of tolerant races. *Ecology* 55, 1163-1165.
- McNevin, D., Barford, J., 2000. Biofiltration as an odour abatement strategy. *Biochemical Engineering Journal* 5, 231–242.
- Meharg, A.A., 1993. The role of the plasmalemma in metal tolerance in angiosperms. *Physiologia Plantarum* 88, 191-198.
- Mergeay, M., 1991. Towards an understanding of the genetics of bacterial metal resistance. *Trends Biotechnol.* 9, 17-24.
- Mergeay, M., Lejeune, P., Sadouk, A., Gerits, J., Fabry, L., 1987. Shuttle transfer (or retrotransfer) of chromosomal markers mediated by plasmid pULB113. *Mol. Gen. Genet.* 209, 61–70.

- Miller, J.H., 1972. In: Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, CSH, New York.
- Miller, M.B., Bassler, B.L., 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual review of microbiology* 55:165-199.
- Mirza, M.S., Ahmad, W., Latif, F., Haurat, J., Bally, R., Normand, P., Malik, K.A., 2001. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. *Plant Soil*. 237, 47-54.
- Misra, S., Gedamu, L., 1989. Heavy metal tolerant transgenic Brassica napus and Nicotiana tabacum plants. *Theoretical and Applied Genetics* 78, 161-168.
- Mitra, S., Pramanik, K., Sarkar, A., Ghosh, P.K., Soren, T., Maiti, T.K., 2018. Bioaccumulation of cadmium by *Enterobacter* sp. and enhancement of rice seedling growth under cadmium stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 156, 183-196.
- Modi, M., Shah, K.S, Modi, V.V., 1985. Isolation and characterization of catechol-like siderophore from cowpea Rhizobium RA-1. *Arch. Microbiol.* 141, 156–158.
- Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z., 2010. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiol. Res.* 165, 363–375.
- Murphy, A., Taiz, L., 1995. Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten Arabidopsis ecotypes. Correlation with copper tolerance. *Plant Physiology* 109, 945-954.
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22: 867-880.
- Narayanasamy, P., 2013. Mechanisms of action of fungal biological control agents. In: Narayanasamy P(ed) *Biological management of diseases of crops, progress in biological control*. Springer Science+Business Media, Dordrecht, pp 99-200.
- Nautiyal, C.S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170, 265–270.
- Neilands, J.B., 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270, 26723–26726.
- Neubauer, U., Nowack, B., Furrer, G., Schulin, R., 2000. Heavy metal sorption on clay minerals affected by the siderophore Desferrioxamine B. *Environ. Sci. Technol.* 34, 2749-2755.
- Nguyen, N.-L., Kim, Y.-J., Hoang, V.-A., Subramaniam, S., Kang, J.-P., Kang, C.H., Yang, D.-C., 2016. Bacterial diversity and community structure in Korean ginseng field soil are shifted by cultivation time. *PLOS ONE* 11, e0155055.
- Nies, D. H., and Silver, S., 1995. Ion apex systems involved in bacterial metal resistances. *J. Ind. Microbiol.* 14, 189-199.
- Nies, D. H., 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* 51, 730-750.

- Nies, D.H., 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 27, 313–339.
- Nithya, C. and Pandian, S.K., 2010. Isolation of heterotrophic bacteria from Palk Bay sediments showing heavy metal tolerance and antibiotic production. *Microbiol. Res.* 165, 578-593.
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology* 49, 249-279.
- Nzengue, Y., 2008. Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc: place des métallothionéines et de p53. *Sciences du Vivant [q-bio]*. Université Joseph-Fourier - Grenoble I. p.300.
- Oberson, A., Frossard, E., Bühlmann, C., Mayer, J., Mäder, P., Lüscher, A., 2013. Nitrogen fixation and transfer in grass-clover leys under organic and conventional cropping systems. *Plant Soil* 371, 237–255.
- Oliveira, A., Pampulha, M.E., 2006. Effects of long-term heavy metal contamination on soil microbial characteristics. *J. Biosci. Bioeng.* 102, 157–161.
- Onde re-Lemus, J., Hernandez-Lucas, I., Girard, L. and Caballero-Mellado, J., 2009. ACC (1-aminocyclopropane-1- carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in *Burkholderia* species, and its growth-promoting effect on tomato plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6581-6590.
- Ortiz-Ojeda, P., Ogata-Gutiérrez, K., Zúñiga-Dávila, D., 2017. Evaluation of plant growth promoting activity and heavy metal tolerance of psychrotrophic bacteria associated with maca (*Lepidium meyenii* Walp.) Rhizosphere. *AIMS Microbiol.* 3, 279–292.
- Oteino, N., Lally, R.D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K.J., Dowling, D.N., 2015. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Front Microbiol* 6.
- Paez Espino, D., Tamames, J., Lorenzo, V., Cánovas, D., 2009. Microbial Responses to Environmental Arsenic. *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 22, 117–30. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9195-y>
- Paredes-Páliz, K., Rodríguez-Vázquez, R., Duarte, B., Caviedes, M.A., Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Caçador, M.I., Rodríguez-Llorente, I.D., Pajuelo, E., 2018. Investigating the mechanisms underlying phytoprotection by plant growth-promoting rhizobacteria in *Spartina densiflora* under metal stress. *Plant Biol.* 20, 497-506.
- Patten, C.L., Glick, B.R., 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42, 207-220.
- Payne, S.M., 1994. Detection, isolation, and characterization of siderophores. *Methods Enzymol.* 235, 329-344.
- Penrose, D.M., Glick, B.R., 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum* 118, 10–15.

- Philp, J.C., Atlas, R.M., 2005. Bioremediation of contaminated soils and aquifers. In: Atlas RM, Philp JC, editors. Bioremediation: applied microbial solutions for real-world environmental cleanup. Washington: American Society for Microbiology (ASM) Press; pp. 139–236.
- Pichhode, M., Nikhil, K., 2016. Effect of Heavy Metals on Plants: An Overview. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.27583.87204>
- Pilon-Smits, E., 2005. Phytoremediation. Annual Review of Plant Biology. 56, 15-39.
- Prasad, R., Kumar, M., Varma, A., 2015. Role of PGPR in Soil Fertility and Plant Health, in: Egamberdieva, D., Shrivastava, S., Varma, A. (Eds.), Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants, Soil Biology. Springer International Publishing, Cham, pp. 247–260. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13401-7_12
- Presentato, A., Piacenza, E., Cappelletti, M., Turner, R.J., 2019. Interaction of Rhodococcus with metals and biotechnological applications, in: Alvarez, H.M. (Ed.), Biology of Rhodococcus, Microbiology Monographs. Springer International Publishing, Cham, pp. 333–357.
- Qu, C., Chen, W., Hu, X., Cai, P., Chen, C., Yu, X.-Y., Huang, Q., 2019. Heavy metal behaviour at mineral-organo interfaces: Mechanisms, modelling and influence factors. Environment International 131, 104995. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.104995>
- Quecine, M.C., Araújo, W.L., Rossetto, P.B., Ferreira, A., Tsui, S., Lacava, P.T., Mondin, M., Azevedo, J.L., Pizzirani-Kleiner, A.A., 2012. Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans*. Appl. Environ. Microbiol. 78(21), 7511–7518.
- Raddadi, N., Cherif, A., Daffonchio, D., Fava, F., 2013. Halo-alkalitolerant and thermostable cellulases with improved tolerance to ionic liquids and organic solvents from *Paenibacillus tarimensis* isolated from the Chott El Fejej, Sahara Desert, Tunisia. Bioresour. Technol. 150, 121–128.
- Rahbari, A., Fatemi, H., Esmail Pour, B., Rizwan, M., Soltani, A.-A., 2021. Lead (Pb)-resistant bacteria inhibit Pb accumulation in dill (*Anethum graveolens* L.) by improving biochemical, physiological, and antioxidant enzyme response of plants. Environ Sci Pollut Res. 28, 5704–5713.
- Rahman, Z., Singh, V.P., 2020. Bioremediation of toxic heavy metals (THMs) contaminated sites: concepts, applications and challenges. Environ Sci Pollut Res. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08903-0>
- Raikwar, M., Kumar P., Singh M, Singh, A., 2008. Toxic effect of Heavy metals in livestock health. Vet. World 1(1), 28-30.
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M.N.V., Freitas, H., 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. Trends Biotechnol. 28, 142–149.

- Rajkumari, J., Bhuyan B, Das N, Pandey P. 2019. Environmental applications of microbial extremophiles in the degradation of petroleum hydrocarbons in extreme environments. *Environmental Sustainability*. <https://doi.org/10.1007/s42398-019-00065-1>
- Rana, D., Rana, V., and Ahring, B.K., 2012. Producing high sugar concentrations from loblolly pine using wet explosion pretreatment. *Bioresour Technol*, 121, 61–67.
- Raza, W., Ling, N., Yang, L.D., Huang, Q.W., Shen, Q.R., 2016. Response of tomato wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* to the volatile organic compounds produced by a biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR-9. *Sci Rep*. 6,24856.
- Raza, W., Yuan, J., Ling, N., Huang, Q.W., Shen, Q.R., 2015. Production of volatile organic compounds by an antagonistic strain *Paenibacillus polymyxa* WR-2 in the presence of root exudates and organic fertilizer and their antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Biol. Control*. 80,89–95
- Reeves, R.D. and Baker, A.J.M., 2000. Metal accumulating plants. In: Raskin, I. and Finsley, B.D., Eds., *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean up the Environment*, Wiley, New York, 193-229.
- Rehman, A.U., Nazir, S., Irshad, R., Tahir, K., ur Rehman, K., Islam, R.U., Wahab, Z., 2021. Toxicity of heavy metals in plants and animals and their uptake by magnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of Molecular Liquids* 321, 114455. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114455>
- Remans, R., Spaepen, S., Vanderleyden, J., 2006. Auxin Signaling in Plant Defense. *Science* (New York, N.Y.) 313, 171. <https://doi.org/10.1126/science.313.5784.171a>
- Rengel, Z., 1999. Heavy Metals as Essential Nutrients. In: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 231- 251.
- Rodriguez, H., Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17, 319–339.
- Rouch, D.A., Lee, B.T.O., Morby, A.P., 1995. Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. *Journal of Industrial Microbiology* 14, 132–141.
- Salgado, J. M., Abrunhosa, L., Venâncio, A., Domínguez, J.M., Belo, I., 2014. Integrated use of residues from olive mill and winery for lipase production by solid state fermentation with *Aspergillus* Sp. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 172, 1832–1845.
- Salt, D.E., Prince, R.C., Pickering, I.J., Raskin, I., 1995. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiology* 109, 1427-1433.
- Saier, M. H., Jr., Tam, R., Reizer, A. & Reizer, J., 1994. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol Microbiol* 11, 841- 847.
- Sakurai, I., Y. Kawamura, H. Koike, Y. Inoue, Y. Kosako, T. Nakase, Y. Kondou, and S. Saurai. 1990. Bacterial accumulation of metallic compounds. *Appl. Environ. Microbiol*. 56:2580-2583.

- Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S., Bhatti, A.S., 2007. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 34, 635-648.
- Sand, W. T. Gehrke, T., 2006. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron (III) and acidophilic bacteria Res. Microbiol., 157 (1) pp. 49-56.
- Sanita Di Toppi, L., Gabbrielli, R., 1999. Response to cadmium in higher plants. Environmental and Experimental Botany 41, 105-130.
- Santos, E., Pires, F. R., Ferreira, A.D., Filho, F.B.E., Madalão, J.C., Bonomo, R., Junior, P.R. da R., 2019. Phytoremediation and natural attenuation of sulfentrazone: mineralogy influence of three highly weathered soils. Int. J. of Phytorem. 21, 652–662.
- Saur, T., 2014. Structuration morphologique et microbiologique des biofilms multi-espèces : de l'adhésion au biofilm mature. Génie des procédés. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc.p.224.
- Saxena, G., Purchase, D., Mulla, S.I., Saratale, G.D., Bharagava, R.N., 2020. Phytoremediation of Heavy Metal-Contaminated Sites: Eco-environmental Concerns, Field Studies, Sustainability Issues, and Future Prospects, in: de Voogt, P. (Ed.), Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 249, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Springer International Publishing, Cham, pp. 71–131. https://doi.org/10.1007/398_2019_24
- Sbabou, L., Idir, Y., Bruneel, O., Quere, A.L., Aurag, J., Bena, G., Filali-Maltouf, A., 2016. Characterization of root-nodule bacteria isolated from *Hedysarum spinosissimum* L, growing in mining sites of Northeastern region of Morocco. SOJ Microbiol. Infect. Dis. 4, 1-8.
- Schild, F., 2013. Caractérisation biochimique et implication dans la réponse au stress de la protéine "Selenium-Binding Protein" (SBP1) chez *Arabidopsis thaliana*. Biologie végétale. Université de Grenoble.p.206.
- Schindler, P.W., Sposito, G., 1991. Surface complexation at (hydr)oxide surfaces: In interactions at the soil colloid-soil solution interface, G H Bolt, M F Deboodt, M H B hayes, and M B McBride, eds NATO ASI series; series E; Applied sciences vol 190, Kluwer academic publishers Dordrecht, Boston, London.
- Schwyn, B., Neilands, J. B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal. Biochem. 160, 47–56.
- Scott, J.A., Palmer, S.J., 1988. Cadmium bio-sorption by bacterial exopolysaccharide.
- Scott, J.A., Palmer, S.J., 1990. Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption. Appl Microbiol Biotechnol 33, 221–225.
- Seddoh, F.K., Pedro, G., 1975. Aspects microgéochemique de l'altération superficielle: application à l'étude de l'évolution des minéraux dans les arènes granitiques. Cahiers ORSTOM, série pédologie 8,7-25.

- Shah, M.P. (Ed.), 2020. Microbial Bioremediation & Biodegradation. Springer Singapore, Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-1812-6>
- Shahid, M., Ahmed, T., Noman, M., Manzoor, N., Hussain, S., Mahmood, F., Muhammad, S., 2019. Microbe-mediated reclamation of contaminated soils: current status and future perspectives, in: Singh, D.P., Gupta, V.K., Prabha, R. (Eds.), Microbial Interventions in Agriculture and Environment: Volume 1 : Research Trends, Priorities and Prospects. Springer, Singapore, pp. 261-279.
- Sharma, S.S., Dietz, K.J., 2008. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance, Trends Plant. Sci. 14, 43-50.
- Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H., Gobi, T.A., 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. Springer Plus 2,587.
- Shen, X., Hu, H., Peng, H., Wang, W., & Zhang, X., 2013. Comparative genomic analysis of four representative plant growth-promoting rhizobacteria in *Pseudomonas*. BMC Genomics, 14, 271.
- Sheng, X., He, L., Wang, Q., Ye, H., Jiang, C., 2008. Effects of inoculation of biosurfactant-producing *Bacillus* sp. J119 on plant growth and cadmium uptake in a cadmium-amended soil. J. Hazard. Mater. 155, 17–22.
- Sher, S., Ghani, A., Sultan, S., & Rehman, A., 2021. Bacterial strains isolated from heavy metals contaminated soil and wastewater with potential to oxidize arsenite. Environ. Process. 8(1), 333-347.
- Shrivastava, P., Kumar, R., 2015. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. Saudi Journal of biological Sciences 22, 123–131.
- Silver, S., Misra, T.K., Laddaga, R.A., 1989. DNA sequence analysis of bacterial toxic heavy metal resistances. Biol Trace Elem Res. 21,145–163.
- Sindhu, S.S., Dadarwal, K.R., 2001. Chitinolytic and cellulolytic *Pseudomonas* sp. antagonistic to fungal pathogens enhances nodulation by *Mesorhizobium* sp. Cicer in chickpea. Microbiol. Res. 156, 353–358.
- Singh, D., Singh, S.K., Singh, V.K., Gupta, A., Aamir, M., Kumar, A., 2020a. Chapter 8 - Plant growth-promoting bacteria and their role in environmental management, in: Singh, P., Kumar, A., Borthakur, A. (Eds.), Abatement of Environmental Pollutants. Elsevier, pp. 161–175. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818095-2.00008-4>
- Singh, S., Singh, Simranjeet, Kumar, V., Kumar, S., Dhanjal, D.S., Romero, R., Datta, S., Bhadreacha, P., Singh, J., 2020b. Microbial Remediation for Wastewater Treatment, in: Arora, P.K. (Ed.), Microbial Technology for Health and Environment, Microorganisms for Sustainability. Springer, Singapore, pp. 57–71. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2679-4_3.
- Singh, D., Sharma, N.L., Singh, C.K., Sarkar, S.K., Singh, I., Dotaniya, M.L., 2020c. Effect of chromium (VI) toxicity on morpho-physiological characteristics, yield, and yield components of two chickpeas (*Cicer arietinum* L.) varieties. PLoS ONE .15, e0243032.

- Singh, R.P., Mishra, S., Jha, P., Raghuvanshi, S., Jha, P.N., 2018. Effect of inoculation of zinc-resistant bacterium *Enterobacter ludwigii* CDP-14 on growth, biochemical parameters and zinc uptake in wheat (*Triticum aestivum* L.) plant. *Ecol. Eng.* 116, 163-173.
- Skinder, B.M., Uqab, B., Ganai, B.A., 2020. Bioremediation: A Sustainable and Emerging Tool for Restoration of Polluted Aquatic Ecosystem, in: Qadri, H., Bhat, R.A., Mehmood, M.A., Dar, G.H. (Eds.), *Fresh Water Pollution Dynamics and Remediation*. Springer, Singapore, pp. 143–165. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8277-2_9
- Smibert, R. M., Krieg, N.R., 1994. Phenotypic characterization. In: Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A. and Krieg, N.R., Eds., *Methods for General and Molecular Bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington DC, pp. 607-654.
- Smith, E., Thavamani, P., Ramadass, K., Naidu, R., Srivastava, P., Megharaj, M., 2015. Remediation trials for hydrocarbon-contaminated soils in arid environments: evaluation of bioslurry and biopiling techniques. *Int Biodeterior Biodegradation*. 101:56–65.
- Smouni, A., Ater, M., Auguy, F., Laplaze, L., Mzibri, M.E., Berhada, F., Filali-Maltouf, A., Doumas, P., 2010. Évaluation de la contamination par les éléments-traces métalliques dans une zone minière du Maroc oriental. *Cahiers Agricultures* 19, 273–279.
- Song, O.R., S.J. Lee, Y.S. Lee, S.C. Lee, K.K. Kim and Choi, Y.L., 2008. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by *Burkholderia* DA 23 isolated from cultivated soil. *Brazil J. Microbiol.* 39, 151-156.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R., 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 425–448.
- Sposito, G., Lund, J. and Chang, A.C., 1982. Trace metal chemistry in arid-zone field soils amended with sewage sludge: I. Fractionation of Ni, Cu, Zn, Cd and Pb in solid phases. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 46, 260–264.
- Srivastava, P., Kowshik, M., 2013. Mechanisms of Metal Resistance and Homeostasis in Haloarchaea. *Archaea* 2013, e732864. <https://doi.org/10.1155/2013/732864>
- Stowasser, F.W., 1973. The mineral industry of Morocco. *Minerals Yearbook, Area reports: international*, 3. Bureau of mines, Washington, DC.
- Stumm, W., and Morgan, J.J., 1981. *Aquatic Chemistry: An Introduction Emphasizing Chemical Equilibria in Natural Waters*. 2nd Edition, John Wiley & Sons Ltd., New York.
- Sun, W., Xiao, E., Krumins, V., Dong, Y., Li, B., Deng, J., Wang, Q., Xiao, T., Liu, J., 2019. Comparative analyses of the microbial communities inhabiting coal mining waste Dump and an adjacent acid mine drainage creek. *Microb Ecol.* <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01335-5>.
- Sundara, Rao, W. V. B., Sinha, M. K., 1963. Phosphate dissolving organisms in the soil and the Rhizosphere. *Indian J. Agr. Sci.* 33, 272-278.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.

- Tanaka, A., Ito, H., Tanaka, R., Tanaka, N.K., Yoshida, K., Okada, K., 1998. Chlorophyll an oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll b formation from chlorophyll a. PNAS 95, 12719-12723.
- Tang, A., Haruna, A.O., Majid, N.M.A., 2018. Potential PGPR properties of cellulolytic, nitrogen-fixing, and phosphate-solubilizing bacteria of a rehabilitated tropical forest soil. BioRxiv. 351916.
- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J., 2012. Heavy Metals Toxicity and the Environment. EXS 101, 133–164. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22, 4673–4680.
- Toklikishvili, N., Dandurishvili, N., Tediashvili, M., Giorgobiani, N., Szegedi, E., Glick, B.R., 2010. Inhibitory effect of ACC deaminase-producing bacteria on crown gall formation in tomato plants infected by *Agrobacterium tumefaciens* or *A. vitis* Plant Pathol, 59, pp. 1023-1030.
- Tortora, M.L., Díaz-Ricci, J.C., Pedraza, R.O., 2011. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. Arch. Microbiol. 193, 275–286.
- Trepreau, J., 2011. Perception du stress métallique (nickel/cobalt) par le système de signalisation transmembranaire Cnr chez *Cupriavidus metallidurans* CH34. Université de Grenoble.p.242.
- Tripathi, P., Singh, P.C., Mishra, A., Srivastava, S., Chauhan, R., Awasthi, S., Mishra, S., Dwivedi, S., Tripathi, P., Kalra, A., Tripathi, R.D., Nautiyal, C.S., 2017. Arsenic tolerant *Trichoderma* sp. reduces arsenic induced stress in chickpea (*Cicer arietinum*). Environ. Pollut. 223, 137-145.
- Tyagi, L., Garg, P.O., Gosavi, K.J., 2011. Bioremediation: An overview. Pure Appl Chem, 73(7), 1163-1172.
- Umrana, V.V., 2006. Bioremediation of toxic heavy metals using acidothermophilic autotrophes. Bioresour. Technol. 97, 1237–1242.
- UNIFA, <https://fertilisation-edu.fr/cycles-bio-geo-chimiques/le-cycle-de-l-azote-n.html>
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.-P., Frey-Klett, P., 2009. Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. Trends in Microbiology 17, 378–387.
- Valls, M., De Lorenzo, V., 2002. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. FEMS Microbiology Reviews 26, 327–338.
- Valencia-Cantero, E., Hernández-Calderón, E., Velázquez-Becerra, C., López-Meza, J.E., Alfaro-Cuevas, R., López-Bucio, J., 2007. Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. Plant Soil. 291, 263-273.

- Ventosa, A., Quesada, E., Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., Ramos-Cormenzana, A., 1982. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. *Microbiology* 128, 1959–1968.
- Vera, A., Moreno, J. L., García, C., Morais, D., Bastida, F., 2019. Boron in soil: The impacts on the biomass, composition and activity of the soil microbial community. *Sci. Total Environ.* 685, 564–573.
- Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers *Plant Soil*, 255, pp. 571–586.
- Vincent, J., 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. International Biological Programme, IBP Handbook No. 15, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, p.164.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., Cole, J.R., 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5261–5267.
- Wang, S. L., Peng, J. P., Liang, T. W., Liu, K. C., 2008. Purification and characterization of a chitosanase from *Serratia marcescens* TKU011. *Carbohydr. Res.* 343, 1316–1323.
- 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 of America Journal* 29, 677–678.
- Wei, G.H., Fan, L.M., Zhu, W.F., Fu, Y.Y., Yu, J.F., Tang, M., 2009. Isolation and characterization of the heavy metal resistant bacteria CCNWS33-2 isolated from root nodule of *Lespedeza cuneata* in gold mine tailings in China. *J. Hazard. Mater.* 162, 50–56.
- Welch, S.A., Ullman, W.J., 1993. The effect of organic acids on plagioclase dissolution rates and stoichiometry. *Geochim. Cosmochim. Acta* 57, 2725–2736.
- Weyens, N., van der Lelie, D., Taghavi, S., Newman, L., Vangronsveld, J., 2009. Exploiting plant–microbe partnerships to improve biomass production and remediation. *Trends in Biotechnology* 27, 591–598.
- WHO/FAO, 2007. Joint FAO/WHO food standard programme codex Alimentarius Commission 13th session. In: Report of the Thirty Eight Session of the Codex Committee on Food Hygiene. United States of America, Houston. ALINORM 07/30/13.
- Wu, L., Bradshaw, A.D., Thurman, D.A., 1975. The potential for evolution of heavy metal tolerance in plants. III. The rapid evolution of copper tolerance in *Agrostis Stolonifera*. *Heredity* 34 (2), 165–187.
- Xun, F., Xie, B., Liu, S., Guo, C. 2015. Effect of plant growth-promoting bacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculation on oats in saline-alkali soil contaminated by petroleum to enhance phytoremediation. *Environ Sci Pollut Res* 22:598–608.
- Yanful, E. K., Nesbitt, H. W. and Quigley, R. M., 1988. Heavy metal migration at a landfill site, Sarnia, Ontario, Canada--I. Thermodynamic assessment and chemical interpretations. *Appl. Geochem.* 3, 523–533.

- Yang, S., Liang, S., Yi, L., 2014. Heavy metal accumulation and phytostabilization potential of dominant plant species growing on manganese mine tailings. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*. 8:394–404. <https://doi.org/10.1007/s11783-013-0602-4>
- Yogalakshmi, K.N., Singh, S., 2020. Plastic waste: Environmental hazards, its biodegradation, and challenges, in: Saxena, G., Bharagava, R.N. (Eds.), *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety: Volume I: Industrial Waste and Its Management*. Springer Singapore, Singapore, pp. 99–133.
- Yong, R.N., and Phadungchewit, Y., 1993. pH influence on selectivity and retention of heavy metals in some clay soils. *Canadian Geotechnical Journal*, 30, 821–823.
- Yong, R. N., Warkentin, B. P., Phadungchewit, Y. and Galvez, R., 1990. Buffer capacity and lead retention in some clay materials. *Water, Air, and Soil pollution*, 53, 53–67.
- Yu, Y., Yin, H., Peng, H., Lu, G., Dang, Z., 2019. Biodegradation of decabromodiphenyl ether (BDE-209) using a novel microbial consortium GY1: Cells viability, pathway, toxicity assessment, and microbial function prediction. *Sci. Total Environ.* 668, 958–965.
- Zaidi, S., Usmani, S., Singh, B. R., Musarrat, J., 2006. Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ 101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. *Chemosphere* 64, 991–997.
- Zayed, A.M., Terry, N., 2003. Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. *Plant and Soil* 249, 139–156.
- Zhang, H., Zheng, L.C., Yi, X.Y., 2009. Remediation of soil co-contaminated with pyrene and cadmium by growing maize (*Zea mays* L). *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 6 (2), 249–258.
- Zhao, J., Wang, Y.G., Liang, H., Huang, J., Chen, Z., Nie, Y.J., 2018. The Rhizosphere microbial community response to a bio-organic fertilizer: finding the mechanisms behind the suppression of watermelon *Fusarium* wilt disease. *Acta. Physiol. Plant* 40, 17.
- Zhu, J., Tan, T., Shen, A., Yang, X., Yu, Y., Gao, C., Li, Z., Cheng, Y., Chen, J., Guo, L., Sun, X., Yan, Z., Li, J., Zeng, L., 2020. Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* IBFCBF-4 against *Fusarium* wilt of watermelon. *J. Plant Pathol.* 102, 433–441.
- Zhuang, X., Chen, J., Shim, H., Bai, Z., 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environ. Int.* 33: 406–413.

Annexes

Annexe 1

Concentrations minimales de éléments traces métalliques inhibitrices (CMI) de la croissance des bactéries sélectionnées à partir des trois sites étudiés

Code LMR	Genre/espèce	Code NCBI	Pourcentage de similitude	Sites	Sols	CMI Pb	CMI Zn	CMI As
LMR247	<i>Bacillus toyonensis</i>	KU182753	99.89	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	20	0	0
LMR248	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	KU182754	99.88	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	35	15
LMR249	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	KU182755	99.24	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	25	0	15
LMR250	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182756	98.65	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	5	5	5
LMR251	<i>Enterobacter ludwigii</i>	KU182757	100	B	Sol nu	20	0	0
LMR252	<i>Bacillus vallismortis</i>	KU182758	99.89	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	25	0	0
LMR253	<i>Bacillus aerius</i>	KU182759	100	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	15	10	0
LMR254	<i>Massilia timonae</i>	KU182760	98.42	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	25	15	0
LMR255	<i>Agrococcus jenensis</i>	KU182761	98.84	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	15	10	0
LMR256	<i>Agrococcus jenensis</i>	KU182762	99.13	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	20	0	0
LMR257	<i>Agrococcus citreus</i>	KU182763	99.23	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	10	0	0
LMR258	<i>Bacillus aerius</i>	KU182764	100	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	0	0	0
LMR259	<i>Bacillus aerius</i>	KU182765	100	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	20	10	0
LMR260	<i>Bacillus aerius</i>	KU182766	100	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	0	0	0
LMR261	<i>Bacillus nealsonii</i>	KU182767	98.67	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	10	10	7.5
LMR262	<i>Paenibacillus lautus</i>	KU182768	99.54	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	25	0	25
LMR263	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	KU182769	99.87	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	15	20
LMR264	<i>Arthrobacter humicola</i>	KU182770	99.42	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	25	0
LMR265	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KU182771	99.50	B	Sol nu	25	35	10
LMR266	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	KU182772	98.16	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	10	20	10
LMR267	<i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i>	KU182773	99.49	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	15	0	0
LMR268	<i>Agromyces indicus</i>	KU182774	97.53	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	25	0	0
LMR269	<i>Paenibacillus lautus</i>	KU182775	99.61	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	25	0	7.5
LMR270	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182776	100	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	25	30	0
LMR271	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	KU182777	99.86	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	0	0	0
LMR272	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	KU182778	99.8	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	30	0	5
LMR273	<i>Kocuria rosea</i>	KU182779	99.75	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	20	0	0
LMR274	<i>Bacillus aerius</i>	KU182780	100	B	Sol nu	10	0	0

LMR275	<i>Bacillus simplex</i>	KU182781	100	B	Sol nu	10	0	0
LMR276	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KU182782	100	B	Sol nu	15	0	0
LMR277	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	KU182783	99.24	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	20	25
LMR278	<i>Arthrobacter humicola</i>	KU182784	99.76	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	0	0
LMR279	<i>Bacillus Mojavensis</i>	KU182785	99.88	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	15	0	0
LMR280	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	KU182786	99.74	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	20	20	15
LMR281	<i>Bacillus zanthoxyli</i>	KU182787	99.86	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	15	15	0
LMR282	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KU182788	99.76	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	20	10	7.5
LMR283	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	KU182789	99.87	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	5	10	5
LMR284	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182790	98.65	OH	Sol nu	15	0	7.5
LMR285	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	KU182791	98.34	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	15	10	7.5
LMR286	<i>Bacillus wiedmannii</i>	KU182792	100	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	10	10	0
LMR287	<i>Bacillus tequilensis</i>	KU182793	99.22	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	25	35	7.5
LMR288	<i>Bacillus endophyticus</i>	KU182794	99.65	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	15	0	0
LMR289	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	KU182795	100	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	0	0
LMR290	<i>Bacillus atrophaeus</i>	KU182796	100	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	0	0
LMR291	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182797	99.86	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	15	3	5
LMR292	<i>Bacillus atrophaeus</i>	KU182798	99.88	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	0	15
LMR293	<i>Bacillus simplex</i>	KU182799	100	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	5	3	0
LMR294	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	KU182800	99.46	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	20	10	7.5
LMR295	<i>Massilia agri</i>	KU182801	98.40	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	15	0	0
LMR296	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	KU182802	100	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	20	10	0
LMR297	<i>Bacillus Mojavensis</i>	KU182803	99.88	OH	Sol nu	20	0	0
LMR298	<i>Pantoea stewartii</i>	KU182804	98.25	OH	Sol nu	20	0	7.5
LMR299	<i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i>	KU182805	99.37	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	25	10	7.5
LMR300	<i>Bacillus atrophaeus</i>	KU182806	99.17	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	25	0	7.5
LMR301	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	KU182807	98.29	OH	Sol nu	25	10	7.5
LMR302	<i>Arthrobacter humicola</i>	KU182808	99.61	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	25	0	7.5
LMR303	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	KU182809	99.38	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	0	0
LMR304	<i>Bacillus aerius</i>	KU182810	100	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	15	0	30
LMR305	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182811	100	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	0	0

LMR306	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	KU182812	97.97	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	15	0	0
LMR307	<i>Nocardia coeliaca</i>	KU182813	100	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>			
LMR308	<i>Alcaligenes faecalis</i>	KU182814	99.46	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	15	3	7.5
LMR309	<i>Pantoea ananatis</i>	KU182815	99.54	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	20	10	0
LMR310	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	KU182816	100	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	15	10	7.5
LMR311	<i>Microbacterium natoriense</i>	KU182817	98.56	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	0	0
LMR312	<i>Pseudomonas benzenivorans</i>	KU182818	97.81	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	35	7.5
LMR313	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	KU182819	100	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	0	0
LMR314	<i>Bacillus vallismortis</i>	KU182820	100	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	20	15	7.5
LMR315	<i>Bacillus mojavensis</i>	KU182821	100	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	10	0
LMR316	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	KU182822	100	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	20	0	0
LMR317	<i>[Brevibacterium] frigoritolerans</i>	KU182823	99.89	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	35	0
LMR318	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	KU182824	99.88	T	Sol nu	10	10	7.5
LMR319	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	KU182825	100	T	Sol nu	20	15	0
LMR320	<i>Arthrobacter subterraneus</i>	KU182826	99.51	T	Sol nu	25	0	10
LMR321	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	KU182827	99.87	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	30	15	5
LMR322	<i>Bacillus vallismortis</i>	KU182828	99.89	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	25	10	7.5
LMR323	<i>Bacillus toyonensis</i>	KU182829	99.89	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	25	0	0
LMR324	<i>Bacillus atrophaeus</i>	KU182830	100	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	25	10	7.5
LMR325	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	KU182831	98.36	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	25	10	5
LMR326	<i>Bacillus wiedmannii</i>	KU182832	100	T	Sol nu	20	15	20
LMR327	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KU182833	99.63	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	35	10
LMR328	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KU182834	99.64	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	35	10
LMR329	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	KU182835	98.45	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	15	35	0
LMR330	<i>Bacillus atrophaeus</i>	KU182836	100	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	25	25	15
LMR331	<i>Variovorax paradoxus</i>	KU182837	99.87	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	25	25	20
LMR332	<i>Variovorax guangxiensis</i>	KU182838	99.65	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	25	10	10
LMR333	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KU182839	99.63	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	35	20
LMR334	<i>Bacillus wiedmannii</i>	KU182840	100	T	Sol nu	25	0	7.5
LMR335	<i>Bacillus aerius</i>	KU182841	99.72	T	Sol nu	25	0	0
LMR336	<i>Bacillus aerius</i>	KU182842	99.85	T	Sol nu	25	0	0

LMR337	<i>Bacillus zanthoxyli</i>	KU182843	100	T	Sol nu	15	0	0
LMR338	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	KU182844	99.74	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	15	0	30
LMR339	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	KU182845	99.35	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	25	30	35
LMR340	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	KU182846	100	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	30	35
LMR341	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	KU182847	99.63	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	20	35	20
LMR342	<i>Enterobacter ludwigii</i>	KU182848	100	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	10	15
LMR343	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	KU182849	100	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	15	10	0
LMR344	<i>Bacillus tequilensis</i>	KU182850	100	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	20	10	0
LMR345	<i>Bacillus tequilensis</i>	KU182851	99.17	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	15	10	15
LMR346	<i>Bacillus tequilensis</i>	KU182852	98.95	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	15	10	20
LMR347	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KU182853	99.50	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	15	10	15
LMR348	<i>Georgenia daeguensis</i>	KU182854	99.60	T	Sol nu	15	0	0
LMR349	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182855	99.87	T	Sol nu	15	0	10
LMR350	<i>Bacillus vallismortis</i>	KU182856	100	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	25	10	7.5
LMR351	<i>Microbacterium hominis</i>	KU182857	99.87	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	15	0	0
LMR352	<i>Streptomyces chartreusis</i>	KU182858	98.93	T	Sol nu	10	0	0

Annexe 2

Quantification de 3 activités PGP des souches bactériennes sélectionnées à partir des sites étudiées (Solubilisation de la roche phosphatée (P), production d'auxine (AIA) et production de siderophores)

Code LMR	Genre/espèce	Code NCBI	Sites	Sols	P (mg L ⁻¹)	AIA (µg mL ⁻¹)	Sidérophores
LMR247	<i>Bacillus toyonensis</i>	KU182753	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR248	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	KU182754	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			0.432±0.07
LMR249	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	KU182755	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	2.31±0.1	66.66±1.6	0.402±0.1
LMR250	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182756	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	0	127±0.1	0.025±0.03
LMR251	<i>Enterobacter ludwigii</i>	KU182757	B	Sol nu		12.86±1.2	0.0208±0.4
LMR252	<i>Bacillus vallismortis</i>	KU182758	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>		10.48±1.4	
LMR253	<i>Bacillus aerius</i>	KU182759	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>		9.65±0.33	
LMR254	<i>Massilia timonae</i>	KU182760	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	7.69±1.24	8.46±0.86	
LMR255	<i>Agrococcus jenensis</i>	KU182761	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>		9.17±1.2	
LMR256	<i>Agrococcus jenensis</i>	KU182762	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>		15.83±2.05	
LMR257	<i>Agrococcus citreus</i>	KU182763	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>		27.38±1.41	
LMR258	<i>Bacillus aerius</i>	KU182764	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>		17.62±0.2	0,029±0.055
LMR259	<i>Bacillus aerius</i>	KU182765	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>		3.22±0.1	
LMR260	<i>Bacillus aerius</i>	KU182766	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>		8.69±0.112	
LMR261	<i>Bacillus nealsonii</i>	KU182767	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>		6.913±0.13	
LMR262	<i>Paenibacillus lautus</i>	KU182768	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	12.7±0.8	1.79±0.034	
LMR263	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	KU182769	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>		9.887±1.034	
LMR264	<i>Arthrobacter humicola</i>	KU182770	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	11.82±0.75		
LMR265	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KU182771	B	Sol nu			0.303±0.061
LMR266	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	KU182772	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	0	19.5±1	0.132±0.08
LMR267	<i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i>	KU182773	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>			
LMR268	<i>Agromyces indicus</i>	KU182774	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>		3.1±0.2	

LMR269	<i>Paenibacillus lautus</i>	KU182775	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>			
LMR270	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182776	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>			
LMR271	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	KU182777	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>			
LMR272	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	KU182778	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	6.67±0.56		
LMR273	<i>Kocuria rosea</i>	KU182779	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	70.71±1.21		
LMR274	<i>Bacillus aerius</i>	KU182780	B	Sol nu		0.25±0.091	
LMR275	<i>Bacillus simplex</i>	KU182781	B	Sol nu	14.17±0.32		
LMR276	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KU182782	B	Sol nu			
LMR277	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	KU182783	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	5.75±0.78	7.74±0.11	
LMR278	<i>Arthrobacter humicola</i>	KU182784	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR279	<i>Bacillus mojavensis</i>	KU182785	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	7.29±0.651		
LMR280	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	KU182786	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>		0.076±0.041	
LMR281	<i>Bacillus zanthoxyli</i>	KU182787	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	10.16±1.51		
LMR282	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KU182788	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	48.6±0.87	4.41±0.31	0.541±0.13
LMR283	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	KU182789	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	2.4±0.3	144.98±0.9	0.243±0.1
LMR284	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182790	OH	Sol nu		0.511±0.09	
LMR285	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	KU182791	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	13.81±1.41		
LMR286	<i>Bacillus wiedmannii</i>	KU182792	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	19.76±0.334		
LMR287	<i>Bacillus tequilensis</i>	KU182793	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	21.67±1.46		
LMR288	<i>Bacillus endophyticus</i>	KU182794	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	3.22±0.91		
LMR289	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	KU182795	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	107.96±3.52		
LMR290	<i>Bacillus atrophaeus</i>	KU182796	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	13.811±0.443		
LMR291	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182797	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	67.65±0.1	134.15±0.6	0
LMR292	<i>Bacillus atrophaeus</i>	KU182798	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	4.294±0.223	0.178±0.043	
LMR293	<i>Bacillus simplex</i>	KU182799	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	5.36±0.93		
LMR294	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	KU182800	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	76.54±1.87		
LMR295	<i>Massilia agri</i>	KU182801	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	10.84±1.66		
LMR296	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	KU182802	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	1.79±0.48		
LMR297	<i>Bacillus mojavensis</i>	KU182803	OH	Sol nu	25.59±1.55		
LMR298	<i>Pantoea stewartii</i>	KU182804	OH	Sol nu	55.5±2.191		
LMR299	<i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i>	KU182805	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>			

LMR300	<i>Bacillus atrophaeus</i>	KU182806	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>		
LMR301	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	KU182807	OH	Sol nu	15.83±1.66	
LMR302	<i>Arthrobacter humicola</i>	KU182808	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>		0.447±0.076
LMR303	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	KU182809	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	23.01±1.72	
LMR304	<i>Bacillus aerius</i>	KU182810	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>		
LMR305	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182811	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	104.03±2.817	
LMR306	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	KU182812	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	4.77±0.65	
LMR307	<i>Nocardia coeliaca</i>	KU182813	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>		0.078±0.033
LMR308	<i>Alcaligenes faecalis</i>	KU182814	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	140.81±3.87	
LMR309	<i>Pantoea ananatis</i>	KU182815	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	15.49±1.21	100.1±2.77
LMR310	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	KU182816	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>		0.045±0.011
LMR311	<i>Microbacterium natoriense</i>	KU182817	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>		
LMR312	<i>Pseudomonas benzenivorans</i>	KU182818	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	50.75±1.55	61.78±1.98
LMR313	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	KU182819	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>		0.606±0.055
LMR314	<i>Bacillus vallismortis</i>	KU182820	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>		10.48±1.54
LMR315	<i>Bacillus mojavenensis</i>	KU182821	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>		7.03±1.312
LMR316	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	KU182822	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>		6.55±0.67
LMR317	<i>[Brevibacterium] frigoritolerans</i>	KU182823	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>		21.07±1.43
LMR318	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	KU182824	T	Sol nu		9.65±2.65
LMR319	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	KU182825	T	Sol nu		2.27±0.77
LMR320	<i>Arthrobacter subterraneus</i>	KU182826	T	Sol nu		6.198±1.33
LMR321	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	KU182827	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	7.36±0.65	110.34±3.77
LMR322	<i>Bacillus vallismortis</i>	KU182828	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>		
LMR323	<i>Bacillus toyonensis</i>	KU182829	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	5.16±1.76	20.12±3.4
LMR324	<i>Bacillus atrophaeus</i>	KU182830	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>		
LMR325	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	KU182831	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>		
LMR326	<i>Bacillus wiedmannii</i>	KU182832	T	Sol nu		2.86±0.491
LMR327	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KU182833	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	2.49±0.44	
LMR328	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KU182834	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	2.6±0.32	
LMR329	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	KU182835	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	24.7±1.229	
LMR330	<i>Bacillus atrophaeus</i>	KU182836	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>		

LMR331	<i>Variovorax paradoxus</i>	KU182837	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>			
LMR332	<i>Variovorax guangxiensis</i>	KU182838	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>		3.818±0.331	
LMR333	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KU182839	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>		21.43±1.45	
LMR334	<i>Bacillus wiedmannii</i>	KU182840	T	Sol nu			
LMR335	<i>Bacillus aerius</i>	KU182841	T	Sol nu			
LMR336	<i>Bacillus aerius</i>	KU182842	T	Sol nu			
LMR337	<i>Bacillus zanthoxyli</i>	KU182843	T	Sol nu		36.07±2.75	
LMR338	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	KU182844	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>			
LMR339	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	KU182845	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>		9.41±0.45	
LMR340	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	KU182846	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	0	26.67±1.2	0
LMR341	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	KU182847	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	16.9±1.55	104.98±3.861	
LMR342	<i>Enterobacter ludwigii</i>	KU182848	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>		104.75±2.557	
LMR343	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	KU182849	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	10.83±1.32		
LMR344	<i>Bacillus tequilensis</i>	KU182850	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	18.77±1.97		
LMR345	<i>Bacillus tequilensis</i>	KU182851	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	13.03±1.66		
LMR346	<i>Bacillus tequilensis</i>	KU182852	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	22.30±1.062		
LMR347	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KU182853	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	23.7±0.59		
LMR348	<i>Georgenia daeguensis</i>	KU182854	T	Sol nu	17.03±1.54		
LMR349	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182855	T	Sol nu	14.03±0.88		
LMR350	<i>Bacillus vallismortis</i>	KU182856	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR351	<i>Microbacterium hominis</i>	KU182857	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR352	<i>Streptomyces chartreusis</i>	KU182858	T	Sol nu		0.432±0.096	

Annexe 3

Quantification de l'activité ACC deaminase et test de fixation d'azote de souches sélectionnées à partir des différents sites

Code LMR	Genre/espèce	Numéro d'accension	Sites	Sols	Quantité de α -ketobutyrate (nmol h ⁻¹)	Fixation libre d'azote
LMR249	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	KU182755	B	<i>Stipa tenuissima</i>	128±0.8	0
LMR250	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182756	B	<i>Stipa tenuissima</i>	4±0.5	1
LMR251	<i>Enterobacter ludwigii</i>	KU182757	B	Sol nu	0	1
LMR270	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182776	B	<i>Stipa tenuissima</i>	111±2.98	0
LMR291	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182797	OH	<i>Sulla spinosissima</i>	71.1±1.4	1
LMR293	<i>Bacillus simplex</i>	KU182799	OH	<i>Sulla spinosissima</i>	93±1.55	0
LMR307	<i>Nocardia coeliaca</i>	KU182813	OH	<i>Stipa tenuissima</i>	8±0.44	1
LMR309	<i>Pantoea ananatis</i>	KU182815	OH	<i>Sulla spinosissima</i>	0	1
LMR310	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	KU182816	OH	<i>Sulla spinosissima</i>	104±3.66	0
LMR316	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	KU182822	T	<i>Sulla spinosissima</i>	0	1
LMR320	<i>Arthrobacter subterraneus</i>	KU182826	T	Sol nu	0	1
LMR324	<i>Bacillus atrophaeus</i>	KU182830	T	<i>Acacia cyanophylla</i>	40±1.98	0
LMR326	<i>Bacillus wiedmannii</i>	KU182832	T	Sol nu	105±2.861	0
LMR330	<i>Bacillus atrophaeus</i>	KU182836	T	<i>Acacia cyanophylla</i>	88±4.11	0
LMR331	<i>Variovorax paradoxus</i>	KU182837	T	<i>Acacia cyanophylla</i>	57±1.55	0
LMR333	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KU182839	T	<i>Sulla spinosissima</i>	0	1
LMR335	<i>Bacillus aerius</i>	KU182841	T	Sol nu	0	1
LMR339	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	KU182845	T	<i>Acacia cyanophylla</i>	122±3.87	0
LMR340	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	KU182846	T	<i>Sulla spinosissima</i>	58±2.3	1
LMR344	<i>Bacillus tequilensis</i>	KU182850	T	<i>Sulla spinosissima</i>	0	1
LMR348	<i>Georgenia daeguensis</i>	KU182854	T	Sol nu	20±1.63	0
LMR351	<i>Microbacterium hominis</i>	KU182857	T	<i>Sulla spinosissima</i>	41±1.55	0

Annexe 4

Production d'enzymes lytiques par les souches

Code LMR	Genre/espèce	Code NCBI	Pourcentage	Site	Sol	Chitinase	Protease	Lipase	Cellulase
LMR247	<i>Bacillus toyonensis</i>	KU182753	99.89	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	1	-	1
LMR248	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	KU182754	99.88	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	1	-	1	-
LMR249	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	KU182755	99.24	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	1	1	1	-
LMR250	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182756	98.65	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	-	1	-	-
LMR251	<i>Enterobacter ludwigii</i>	KU182757	100	B	Sol nu	-	-	-	1
LMR252	<i>Bacillus vallismortis</i>	KU182758	99.89	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	-	-	-	1
LMR253	<i>Bacillus aerius</i>	KU182759	100	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	1	1	-	1
LMR254	<i>Massilia timonae</i>	KU182760	98.42	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	-	-	-	-
LMR255	<i>Agrococcus jenensis</i>	KU182761	98.84	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	-	-	-	-
LMR256	<i>Agrococcus jenensis</i>	KU182762	99.13	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	1	-	-	1
LMR257	<i>Agrococcus citreus</i>	KU182763	99.23	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	1	-	1	-
LMR258	<i>Bacillus aerius</i>	KU182764	100	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	-	1	1	1
LMR259	<i>Bacillus aerius</i>	KU182765	100	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	-	-	-	1
LMR260	<i>Bacillus aerius</i>	KU182766	100	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	-	1	1	-
LMR261	<i>Bacillus nealsonii</i>	KU182767	98.67	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	1	1	-	1
LMR262	<i>Paenibacillus lautus</i>	KU182768	99.54	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	-	1	-	1
LMR263	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	KU182769	99.87	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	1	1	-	1
LMR264	<i>Arthrobacter humicola</i>	KU182770	99.42	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	-	-	-
LMR265	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KU182771	99.50	B	Sol nu	1	-	-	1
LMR266	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	KU182772	98.16	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	1	1	1	1
LMR267	<i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i>	KU182773	99.49	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	1	1	1	1
LMR268	<i>Agromyces indicus</i>	KU182774	97.53	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	1	1	-	-
LMR269	<i>Paenibacillus lautus</i>	KU182775	99.61	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	-	1	-	1
LMR270	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182776	100	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	-	-	-	-
LMR271	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	KU182777	99.86	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	1	-	-	-
LMR272	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	KU182778	99.88	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	-	1	-	-

LMR273	<i>Kocuria rosea</i>	KU182779	99.75	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	1	-	-	-
LMR274	<i>Bacillus aerius</i>	KU182780	100	B	Sol nu	-	1	-	1
LMR275	<i>Bacillus simplex</i>	KU182781	100	B	Sol nu	1	-	-	-
LMR276	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KU182782	100	B	Sol nu	1	-	1	-
LMR277	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	KU182783	99.24	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	1	-	1
LMR278	<i>Arthrobacter humicola</i>	KU182784	99.76	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	1	1	-	1
LMR279	<i>Bacillus Mojavensis</i>	KU182785	99.88	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	1	1	-	-
LMR280	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	KU182786	99.74	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	1	-	-	1
LMR281	<i>Bacillus zanthoxyli</i>	KU182787	99.86	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	1	-	-
LMR282	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KU182788	99.76	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	1	-	1	1
LMR283	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	KU182789	99.87	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	-	-	-
LMR284	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182790	98.65	OH	Sol nu	-	-	-	-
LMR285	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	KU182791	98.34	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	1	1	1	-
LMR286	<i>Bacillus wiedmannii</i>	KU182792	100	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	-	-	-	-
LMR287	<i>Bacillus tequilensis</i>	KU182793	99.22	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	1	1	1	-
LMR288	<i>Bacillus endophyticus</i>	KU182794	99.65	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	-	1	-	-
LMR289	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	KU182795	100	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	-	-	-
LMR290	<i>Bacillus atrophaeus</i>	KU182796	100	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	-	-	-
LMR291	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182797	99.86	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	1	-	-
LMR292	<i>Bacillus atrophaeus</i>	KU182798	99.88	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	-	-	1
LMR293	<i>Bacillus simplex</i>	KU182799	100	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	-	-	-
LMR294	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	KU182800	99.46	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	-	1	1
LMR295	<i>Massilia agri</i>	KU182801	98.40	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	1	-	-
LMR296	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	KU182802	100	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	-	-	-
LMR297	<i>Bacillus Mojavensis</i>	KU182803	99.88	OH	Sol nu	1	1	-	-
LMR298	<i>Pantoea stewartii</i>	KU182804	98.25	OH	Sol nu	-	-	-	-
LMR299	<i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i>	KU182805	99.37	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	-	1	-	-
LMR300	<i>Bacillus atrophaeus</i>	KU182806	99.17	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	1	-	-	-

LMR301	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	KU182807	98.29	OH	Sol nu	1	1	-	-
LMR302	<i>Arthrobacter humicola</i>	KU182808	99.61	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	-	-	-	-
LMR303	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	KU182809	99.38	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	-	-	-
LMR304	<i>Bacillus aerius</i>	KU182810		100 OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	-	-	-
LMR305	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182811		100 OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	-	-	-
LMR306	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	KU182812	97.97	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	1	-	1	-
LMR307	<i>Nocardia coeliaca</i>	KU182813		100 OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	-	-	-	-
LMR308	<i>Alcaligenes faecalis</i>	KU182814	99.46	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	1	1	-	-
LMR309	<i>Pantoea ananatis</i>	KU182815	99.54	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	-	-	1
LMR310	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	KU182816		100 OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	1	-	1	1
LMR311	<i>Microbacterium natoriense</i>	KU182817	98.56	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	1	-	-
LMR312	<i>Pseudomonas benzenivorans</i>	KU182818	97.81	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	-	-	-
LMR313	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	KU182819		100 T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	1	1	1	-
LMR314	<i>Bacillus vallismortis</i>	KU182820		100 T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	1	-	-
LMR315	<i>Bacillus mojavenis</i>	KU182821		100 T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	1	1	-	-
LMR316	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	KU182822		100 T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	-	-	1
LMR317	<i>[Brevibacterium] frigoritolerans</i>	KU182823	99.89	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	-	-	-
LMR318	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	KU182824	99.88	T	Sol nu	1	-	1	-
LMR319	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	KU182825		100 T	Sol nu	1	1	-	1
LMR320	<i>Arthrobacter subterraneus</i>	KU182826	99.51	T	Sol nu	-	-	-	-
LMR321	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	KU182827	99.87	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	-	1	-	1
LMR322	<i>Bacillus vallismortis</i>	KU182828	99.89	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	-	1	1	-
LMR323	<i>Bacillus toyonensis</i>	KU182829	99.89	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	-	-	-	-
LMR324	<i>Bacillus atrophaeus</i>	KU182830		100 T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	-	-	1	-
LMR325	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	KU182831	98.36	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	-	-	-	-
LMR326	<i>Bacillus wiedmannii</i>	KU182832		100 T	Sol nu	-	-		-
LMR327	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KU182833	99.63	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	-	-	-

LMR328	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KU182834	99.64	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	1	-	1	1
LMR329	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	KU182835	98.45	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	1	-	-	-
LMR330	<i>Bacillus atrophaeus</i>	KU182836	100	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	1	1	-	1
LMR331	<i>Variovorax paradoxus</i>	KU182837	99.87	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	-	-	-	-
LMR332	<i>Variovorax guangxiensis</i>	KU182838	99.65	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	1	1	-	1
LMR333	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KU182839	99.63	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	1	1	1	-
LMR334	<i>Bacillus wiedmannii</i>	KU182840	100	T	Sol nu	-	1	1	1
LMR335	<i>Bacillus aerius</i>	KU182841	99.72	T	Sol nu	1	-	-	-
LMR336	<i>Bacillus aerius</i>	KU182842	99.85	T	Sol nu	1	-	-	1
LMR337	<i>Bacillus zanthoxyli</i>	KU182843	100	T	Sol nu	-	-	-	1
LMR338	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	KU182844	99.74	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	1	1	-	1
LMR339	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	KU182845	99.35	T	Rhizosphère d' <i>Acacia cyanophylla</i>	-	1	1	-
LMR340	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	KU182846	100	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	1	-	1	1
LMR341	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	KU182847	99.63	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	1	-	1	-
LMR342	<i>Enterobacter ludwigii</i>	KU182848	100	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	1	1	-	-
LMR343	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	KU182849	100	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	-	1	1	1
LMR344	<i>Bacillus tequilensis</i>	KU182850	100	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	1	-	-	1
LMR345	<i>Bacillus tequilensis</i>	KU182851	99.17	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	1	-	1	-
LMR346	<i>Bacillus tequilensis</i>	KU182852	98.95	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	1	-	-	1
LMR347	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KU182853	99.50	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	1	-	-	1
LMR348	<i>Georgenia daeguensis</i>	KU182854	99.60	T	Sol nu	-	1	-	1
LMR349	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182855	99.87	T	Sol nu	1	-	-	1
LMR350	<i>Bacillus vallismortis</i>	KU182856	100	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	1	-	-	1
LMR351	<i>Microbacterium hominis</i>	KU182857	99.87	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	1	1	1	-
LMR352	<i>Streptomyces chartreusis</i>	KU182858	98.93	T	Sol nu	1	-	-	-

Annexe 5

Résultats de l'étude de l'antagonisme des souches bactériennes sélectionnées vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* par trois techniques (T1 : Confrontation directe, T2 : Antagonisme des substances diffusibles, T3 : Antagonisme par des substances volatiles)

Code LMR	Genre/espèce	Code NCBI	Site	Sol	T1 %	T2 %	T3 %
LMR247	<i>Bacillus toyonensis</i>	KU182753	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR248	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	KU182754	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	64±1.01	54.33±1.82	43.54±1.58
LMR249	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	KU182755	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	76.3±1.4	83.4±2.03	67.6±0.79
LMR250	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182756	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	60.5±0.55	58.9±0.89	55±1.1
LMR251	<i>Enterobacter ludwigii</i>	KU182757	B	Sol nu			
LMR252	<i>Bacillus vallismortis</i>	KU182758	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	81.5±5.7	76±2.441	71.34±4.61
LMR253	<i>Bacillus aerius</i>	KU182759	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>			
LMR254	<i>Massilia timonae</i>	KU182760	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>			
LMR255	<i>Agrococcus jenensis</i>	KU182761	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	56.3±3.66	57.4±2.89	64.6±4.59
LMR256	<i>Agrococcus jenensis</i>	KU182762	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	43.4±3.66	40.1±3.66	53.22±6.5
LMR257	<i>Agrococcus citreus</i>	KU182763	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	67.4±7.83	66.3±4.22	56.3±1.66
LMR258	<i>Bacillus aerius</i>	KU182764	B		75.4±1.22	77±5.33	75.29±1.3
LMR259	<i>Bacillus aerius</i>	KU182765	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>			
LMR260	<i>Bacillus aerius</i>	KU182766	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>			
LMR261	<i>Bacillus nealsonii</i>	KU182767	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR262	<i>Paenibacillus lautus</i>	KU182768	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>			
LMR263	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	KU182769	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR264	<i>Arthrobacter humicola</i>	KU182770	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			

LMR265	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KU182771	B	Sol nu			
LMR266	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	KU182772	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR267	<i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i>	KU182773	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>			
LMR268	<i>Agromyces indicus</i>	KU182774	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	79.1±7.81	79.4±4.23	75.29±2.33
LMR269	<i>Paenibacillus lautus</i>	KU182775	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>			
LMR270	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182776	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>			
LMR271	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	KU182777	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	74.1±2.37	100	80.1±1.21
LMR272	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	KU182778	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>			
LMR273	<i>Kocuria rosea</i>	KU182779	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>			
LMR274	<i>Bacillus aerius</i>	KU182780	B	Sol nu		10±1.44	
LMR275	<i>Bacillus simplex</i>	KU182781	B	Sol nu			
LMR276	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KU182782	B	Sol nu			
LMR277	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	KU182783	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR278	<i>Arthrobacter humicola</i>	KU182784	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR279	<i>Bacillus Mojavensis</i>	KU182785	B	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>			
LMR280	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	KU182786	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	12±0.98		
LMR281	<i>Bacillus zanthoxyli</i>	KU182787	B	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR282	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KU182788	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>		11.7±1.4	
LMR283	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	KU182789	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR284	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182790	OH	Sol nu			

LMR285	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	KU182791	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	41.33±2.54	54.89±1.441	60.54±2.03
LMR286	<i>Bacillus wiedmannii</i>	KU182792	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>			
LMR287	<i>Bacillus tequilensis</i>	KU182793	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>			
LMR288	<i>Bacillus endophyticus</i>	KU182794	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>			
LMR289	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	KU182795	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR290	<i>Bacillus atrophaeus</i>	KU182796	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR291	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182797	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR292	<i>Bacillus atrophaeus</i>	KU182798	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	12.5±2.4	100	
LMR293	<i>Bacillus simplex</i>	KU182799	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			80±1.8
LMR294	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	KU182800	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	81.4±3	84.2±2.5	37.5±2.53
LMR295	<i>Massilia agri</i>	KU182801	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR296	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	KU182802	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR297	<i>Bacillus mojavensis</i>	KU182803	OH	Sol nu			
LMR298	<i>Pantoea stewartii</i>	KU182804	OH	Sol nu			
LMR299	<i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i>	KU182805	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>			
LMR300	<i>Bacillus atrophaeus</i>	KU182806	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>			
LMR301	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	KU182807	OH	Sol nu			
LMR302	<i>Arthrobacter humicola</i>	KU182808	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	87.6±2.33	78±1.56	100
LMR303	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	KU182809	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	79.41±1.01	94.11±0.7	92.9±1.8
LMR304	<i>Bacillus aerius</i>	KU182810	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			

LMR305	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182811	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR306	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	KU182812	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR307	<i>Nocardia coeliaca</i>	KU182813	OH	Rhizosphère de <i>Stipa tenuissima</i>	52.45±1.5	43.1±2.431	61.75±1.44
LMR308	<i>Alcaligenes faecalis</i>	KU182814	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR309	<i>Pantoea ananatis</i>	KU182815	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR310	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	KU182816	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>		37.5±3	56.2±3.2
LMR311	<i>Microbacterium natoriense</i>	KU182817	OH	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR312	<i>Pseudomonas benzenivorans</i>	KU182818	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR313	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	KU182819	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR314	<i>Bacillus vallismortis</i>	KU182820	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR315	<i>Bacillus Mojavensis</i>	KU182821	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR316	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	KU182822	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR317	<i>[Brevibacterium] frigiditolerans</i>	KU182823	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR318	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	KU182824	T	Sol nu			
LMR319	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	KU182825	T	Sol nu			
LMR320	<i>Arthrobacter subterraneus</i>	KU182826	T	Sol nu			
LMR321	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	KU182827	T	Rhizosphère d'Acacia <i>cyanophylla</i>	55.6±4.66	49.3±1.7	43.5±1.33
LMR322	<i>Bacillus vallismortis</i>	KU182828	T	Rhizosphère d'Acacia <i>cyanophylla</i>			
LMR323	<i>Bacillus toyonensis</i>	KU182829	T	Rhizosphère d'Acacia <i>cyanophylla</i>			
LMR324	<i>Bacillus atrophaeus</i>	KU182830	T	Rhizosphère d'Acacia <i>cyanophylla</i>			

LMR325	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	KU182831	T	Rhizosphère d'Acacia cyanophylla			
LMR326	<i>Bacillus wiedmannii</i>	KU182832	T	Sol nu			
LMR327	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KU182833	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR328	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KU182834	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR329	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	KU182835	T	Rhizosphère d'Acacia cyanophylla			
LMR330	<i>Bacillus atrophaeus</i>	KU182836	T	Rhizosphère d'Acacia cyanophylla			
LMR331	<i>Variovorax paradoxus</i>	KU182837	T	Rhizosphère d'Acacia cyanophylla			
LMR332	<i>Variovorax guangxiensis</i>	KU182838	T	Rhizosphère d'Acacia cyanophylla			
LMR333	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KU182839	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	90±1.5	12.5±3.5	62.5±2.3
LMR334	<i>Bacillus wiedmannii</i>	KU182840	T	Sol nu			
LMR335	<i>Bacillus aerius</i>	KU182841	T	Sol nu			
LMR336	<i>Bacillus aerius</i>	KU182842	T	Sol nu			
LMR337	<i>Bacillus zanthoxyli</i>	KU182843	T	Sol nu			
LMR338	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	KU182844	T	Rhizosphère d'Acacia cyanophylla			
LMR339	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	KU182845	T	Rhizosphère d'Acacia cyanophylla	54.11±2.44	91.41±1.92	70.58±3.65
LMR340	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	KU182846	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			90.5±1.6
LMR341	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	KU182847	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>	68.3±3.4	82.9±2.6	36.2±2.7
LMR342	<i>Enterobacter ludwigii</i>	KU182848	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR343	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	KU182849	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR344	<i>Bacillus tequilensis</i>	KU182850	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR345	<i>Bacillus tequilensis</i>	KU182851	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			

LMR346	<i>Bacillus tequilensis</i>	KU182852	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR347	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	KU182853	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR348	<i>Georgenia daeguensis</i>	KU182854	T	Sol nu			
LMR349	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	KU182855	T	Sol nu	45.3±1.54	56.3±5.9	54±4.33
LMR350	<i>Bacillus vallismortis</i>	KU182856	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR351	<i>Microbacterium hominis</i>	KU182857	T	Rhizosphère de <i>Sulla spinosissima</i>			
LMR352	<i>Streptomyces chartreusis</i>	KU182858	T	Sol nu			

Annexe 6

Mise en évidence de la production d'auxine

Milieu YEM-try

Mannitol	5g
Extrait de levure	1g
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	0.46 g
KH ₂ PO ₄	0.12g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.2g
NaCl	0.1g
Tryptophane	0.5 g
Eau distillée	1L

Pour le YEM solide, ajouter 15g d'Agar par litre

Stériliser par autoclavage à 121°C pendant 20min.

Préparation du réactif de Salkowsky

Composition globale :

FeCl ₃	20g
Acide Sulfurique	421.9 ml
Eau distillée	1000 ml

Préparation :

Dans un erlenmeyer placé dans un bain d'eau froide :

- Verser 2g de FeCl₃ dans 50 ml d'eau stérile, puis mélanger
- Après dissolution complète du chlorure ferrique, verser lentement 42.19 ml d'acide sulfurique concentré en agitant constamment avec une baguette de verre.
- Laisser reposer jusqu'à ce que le mélange soit froid, puis ajouter 50ml d'eau distillée.

Annexe 7

Mise évidence de la solubilisation de phosphate inorganique

Milieu PVK

Glucose	1g
KCl	0.02g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.01g
FeSO ₄ , 7H ₂ O	Traces
MnSO ₄ , 7H ₂ O	Traces
Phosphate naturel broyé	0,5g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.05g
Extrait de levure	0.01g

pH 6.7

Volume final=1000ml

Réactif Vanadate-Molybdate

Solution A:

(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O	25g
Eau distillée	400ml

Solution B:

NH ₄ VO ₃	1.25g
Eau distillée	300ml

Dans un bêcher, on chauffe de l'eau distillée jusqu'à ébullition, puis on rajoute du NH₄VO₃ et on laisse le bêcher en ébullition.

Après refroidissement de cette solution, on ajoute sous la hotte chimique 250ml d'acide nitrique concentré (60%) et on complète l'ensemble des deux solutions (A+B) jusqu'à 1 litre.

Annexe 8

Mise en évidence de la production des sidérophores

Milieu modi

Mannitol	10g
Sodium glutamate	1g
NaCl	0.1g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2g
K ₂ HPO ₄	0.5g
NH ₄ NO ₃	1g
EAU DISTILLEE	1litre

Réactif de CAS

Solution 1

HDTMA (hexa-decyl tri-methyl ammonium bromide) à 10mM (« 36.4mg/10ml d'eau distillée).

Solution 2

FeCl₃.6H₂O à 1mM à préparer dans l'HCl à 10mM (27mg de FeCl₃ + 0.083ml HCl à 37%) dans 100ml d'eau.

Solution 3

CAS (chrome azurol S) à 2mM.

Solution 4

Pipérasine neutralisée (4.307g de pipérasine anhydre dans 20 ml d'eau + 6.25ml de HCl 12N ou 7.4 ml de HCl à 37%).

Annexe 9

ACC déaminase

- Le culot de cellules bactériennes préparées, a été mis en suspension avec 1 ml de Tris-HCl, pH 7.6 (0.1 M), et transféré dans un microtube de 1.5 ml.
- Les microtubes sont centrifugés à 16 000 g pendant 5 min et le surnageant a été éliminé. Après, le culot est mis en suspension dans 600 µl de Tris-HCl, pH 8.5 (0.1 M), puis 30 µl de toluène sont ajoutés à la suspension de cellules et mélangé vigoureusement pendant 30 secondes.
- Un aliquote de 200 µl de "cellules" toluenisées sont placées dans un nouveau microtube et 20 µl de 0.5 M ACC ont été ajoutés à la suspension.
- Agiter au vortex brièvement, puis incubées à 30 °C pendant 15 minutes.
- Ajout de 1 ml de HCl 0.56 M, le mélange a été agité et centrifugé pendant 5 min à 16 000 g à température ambiante.
- 1 ml du surnageant agité au vortex est supplémenté avec 800 µl de HCl 0.56 M.
- 300 µl de réactif de 2,4 dinitrophénylhydrazine (0.2% de 2,4-dinitrophénylhydrazine dans HCl 2 M) est ajouté à des tubes en verre, puis incubés à 30 °C pendant 30 min.
- Ajout de 2 ml de NaOH 2 N, et mesure de l'absorbance du mélange à 540 nm. Toutes les mesures sont effectuées en triple.
- Une courbe standard de l' α -kétobutyrate comprise entre 0.1 et 1.0 mmol a été préparé.