



**UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES-FES**



Thèse

Présentée pour l'obtention du diplôme de

Doctorat National

UFR : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Par

Hanane SAYEL

Bactéries, Champignons Mycorhiziens et Plantes : Application en Bioaugmentation/Phytoremédiation, des Sols Contaminés par le Chrome

Soutenue publiquement le 08 Juin 2013 devant le jury composé de :

Président

Pr. Khalid DERRAZ

Faculté des Sciences et Techniques – Fès

Rapporteurs

Pr. Jamal IBIBIJEN

Faculté des Sciences – Meknès

Pr. Samir EL JAAFARI

Faculté des Sciences – Meknès

Pr. Saad RACHIQ

Faculté des Sciences et Techniques – Fès

Examineurs

Pr. Kawtar FIKRI BENBRAHIM

Faculté des Sciences et Techniques – Fès

Pr. Saad IBNSOUDA KORAICHI

Faculté des Sciences et Techniques – Fès

Directeur de thèse

Pr. Naïma EL GHACHTOULI

Faculté des Sciences et Techniques – Fès

**Laboratoire de Biotechnologie Microbienne
Faculté des Sciences et Techniques-Fès**

RESUME

La pollution par les métaux lourds présente des risques pour la santé humaine et l'environnement. La prise de conscience de ces risques a conduit à la nécessité d'établir des diagnostics de la pollution et de mettre en œuvre des moyens pour y remédier.

L'objectif de cette thèse est de contribuer à la mise au point de bioprocédés pour traiter les sols contaminés par le chrome en impliquant des bactéries, des champignons mycorhiziens et des plantes.

Nous nous sommes intéressés à des sites pollués de la région de Fès. L'étude a révélé que la pollution a affecté la taille et la diversité de la population bactérienne, de la population végétale et des champignons MA associés. Toutefois certaines plantes et microorganismes de ces sites peuvent être intéressants pour des projets de bioremédiation/phyto-rémédiation.

Nous avons isolé 35 isolats bactériens résistants au Cr(VI) à partir de ces sites. Trois isolats ont été sélectionnés sur la base de leur résistance et de leur vitesse de réduction du Cr(VI). Ces isolats ont été identifiés comme *Pseudomonas fluorescens* PF28, *Enterobacter amnigenus* EA31 et *Enterococcus gallinarum* EG34.

La concentration minimale inhibitrice de Cr(VI) est de 500 mg/L pour *P. fluorescens* et *E. gallinarum* et de 400 mg/L pour *E. amnigenus*. Pour les autres métaux, ces trois souches présentent une CMI variable de 300 à 1500 mg/L. L'optimisation des conditions de la réduction du Cr(VI) a montré que ces souches sont capables de réduire le Cr(VI) sous différentes conditions de pH (7-11, optimum à 9 pour *P. fluorescens* PF28 et *E. amnigenus*, à 10 pour *E. gallinarum* EG34), de température (25 à 45°C, optimum à 30-37°C) et à différentes concentrations initiales du Cr(VI) (100-400 mg/L) avec une réduction à zéro de 100 mg/L du Cr(VI) en 48 h par *P. fluorescens* PF28 et *E. gallinarum* EG34 et en 72 h pour *E. amnigenus* EA31. Ces souches sont capables de réduire le Cr(VI) en présence de différents métaux lourds (Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} et Zn^{2+}) et de différents donneurs d'électrons (glucose, glycérol, fructose, éthanol et acétate) avec une réduction maximale en présence, respectivement de Cu^{2+} et de glucose.

L'étude du mécanisme de réduction a montré que chez les trois souches, l'activité chromate réductase serait enzymatique, reliée à la fraction cytosolique et serait activée en présence du Cr(VI).

Les essais de phyto-rémédiation associée de bioaugmentation par les trois bactéries ont montré que l'inoculation de microcosmes de sol par les bactéries a conduit à une amélioration de la germination des graines et de la croissance du trèfle sous traitement par le chrome en comparaison avec le témoin non inoculé.

L'inoculation du sol par *P. fluorescens* PF28 a permis d'améliorer la croissance du tournesol et de blé cultivés sous serre, la colonisation des racines par les champignons MA et l'accumulation du Cr(VI) dans les parties aériennes et racinaires des plantes. L'application combinée de *P. fluorescens* PF28 et de champignons mycorhiziens MA a permis une augmentation de la croissance du tournesol et de blé, et de l'accumulation du Cr(VI) dans les parties aériennes et racinaires des plantes en comparaison avec les plantes non inoculées. Ce qui suggère la potentialité de ces microorganismes en tant que promoteurs de croissance des plantes et comme bioremédiateurs efficaces.

Les résultats obtenus dans ce travail ont une importance pour la bioremédiation de sites pollués par le chrome.

Mots clés : Cr(VI), bioremédiation, phyto-rémédiation, champignons MA, bactéries, plantes, résistance, réduction, microcosme, interaction plante-bactérie-champignon MA.

SOMMAIRE

Résumé

Abstract

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Origine du chrome dans l'environnement et sources de pollution	7
1. Origine du chrome dans l'environnement	7
1.1. Chrome dans le sol.....	7
1.2. Chrome dans l'eau.....	9
1.3. Chrome dans l'atmosphère.....	10
2. Sources de pollution.....	10
3. Exemple d'une pollution par le chrome: Fès et ses tanneries.....	11
II. Réactivité chimique du chrome dans l'environnement	12
1. Propriétés du chrome.....	12
1.1. Propriétés physiques.....	12
1.2. Propriétés chimiques.....	12
1.2.1. Etats d'oxydation.....	12
1.2.2. Spéciation.....	13
2. Réactions et comportement.....	15
III. Toxicité du chrome.....	19
1. Effet du chrome sur la santé humaine et animale.....	19
2. Effet du chrome sur les plantes.....	20
3. Effet du chrome sur les microorganismes.....	21
IV. Techniques de traitement des sites pollués par le chrome.....	22

1. Techniques de traitements physico-chimiques.....	23
1.1. Extraction du chrome	23
1.1.1. Lavage du sol.....	23
1.2. Immobilisation du chrome	24
1.2.1. Stabilisation.....	24
1.2.2. Atténuation naturelle.....	24
1.3. Exemple de traitement des rejets du chrome dans les tanneries de Fès.....	24
2. Techniques de traitement biologiques.....	25
2.1 Bioremédiation.....	25
2.2. Phytoremédiation.....	28
2.3. Optimisation de la phytoremédiation	30
V. Résistance microbienne au chrome et mécanismes de réduction.....	31
1. Résistance au chrome	31
1.1. Mutation du système de transport du sulfate.....	31
1.2. Système d'efflux : la protéine ChrA.....	32
2. Réduction du Cr(VI) par les bactéries.....	33
VI. Phytoremédiation – rôle des mycorhizes à arbuscules et des bactéries rhizosphériques.....	36
1. Généralités sur les mycorhizes.....	36
2. Champignons MA et phytoremédiation.....	40
3. Bactéries rhizosphériques (PGPR).....	42
4. Interactions champignons MA-bactéries rhizosphériques.....	44

MATERIEL ET METHODES

I. Sites d'étude.....	48
1. Choix des sites.....	48
2. Prélèvement du sol	50
3. Analyses physico-chimiques du sol.....	50
3.1. Mesure du pH et de la température.....	50
3.2. Dosage du chrome total et d'autres métaux lourds.....	50

II. Etude de la végétation et des champignons MA des sites d'étude.....	50
1. Prélèvement des plantes et identification.....	50
2. Dosage des métaux lourds au niveau des plantes.....	51
3. Estimation de la colonisation mycorhizienne des racines.....	51
4. Etude de la population des champignons MA des sites d'étude (cultures pièges).....	51
5. Etude de l'effet des métaux lourds sur la croissance des plantes et la colonisation mycorhizienne des racines (Essai au laboratoire).....	52
5.1. Matériel végétal.....	52
5.2. Sol utilisé et Dispositif expérimental.....	52
5.3. Estimation de l'infection mycorhizienne des racines.....	53
III. Isolement des bactéries du sol - résistance et réduction du Cr(VI).....	53
1. Préparation des suspensions-dilutions du sol.....	53
2. Dénombrement de la population bactérienne du sol.....	54
3. Isolement et caractérisation des bactéries résistantes au chrome.....	54
3.1. Isolement.....	54
3.2. Caractérisation morphologique et macroscopiques des isolats.....	54
4. Evaluation de la résistance à différentes concentrations de chrome et d'autres métaux lourds.....	55
5. Evaluation de la réduction du Cr(VI).....	55
6. Conservation des isolats.....	56
IV. Caractérisation et identification des isolats sélectionnés	56
1. Croissance.....	56
2. Identification.....	57
2.1. Identification moléculaire.....	57
2.1.1. Extraction de l'ADN génomique.....	57
2.1.2. Amplification de l'ADNr 16S.....	57
2.2. Identification biochimique.....	61
3. Résistance aux antibiotiques.....	61
4. Production d'acide indole-3-acétique (AIA).....	61
V. Etude de la réduction du Cr(VI) par les isolats sélectionnés.....	62

1. Milieux de culture.....	62
2. Optimisation de la réduction du Cr(VI) en milieu liquide.....	62
2.1. Effet du pH et de la température.....	62
2.2. Effet de la concentration initiale du Cr(VI).....	63
2.3. Effet de différents métaux lourds.....	63
2.4. Effet des donneurs d'électrons.....	63
2.5. Effet de la répétition de la contamination par le Cr(VI).....	64
3. Etude de l'activité réductrice du Cr(VI) chez les souches sélectionnées.....	64
3.1. Réduction par les «Resting cells».....	64
3.2. Réduction par les cellules perméabilisées.....	65
3.3. Réduction par l'extrait sans cellules.....	65
3.4. Effet de l'induction de l'activité réductrice du chrome.....	66
VI. Essais de phytoremédiation assistée de bioaugmentation par les souches sélectionnées.....	66
1. Réduction du Cr(VI) dans un sol contaminé artificiellement.....	66
1.1. Sol utilisé.....	66
1.2. Microcosmes.....	67
1.3. Contamination artificielle et inoculation du sol.....	67
1.4. Suivi de la réduction du Cr(VI) dans le sol en fonction du temps.....	67
2. Effet des souches sur les plantes en microcosmes.....	67
2.1. Matériel végétal.....	67
2.2. Etude de l'effet des isolats sur la germination et la croissance des plantes en boîtes de Petri.....	68
2.2.1. Microcosmes.....	68
2.2.2. Contamination artificielle et inoculation du sol.....	68
2.2.3. Prélèvement des plantules et mesure de la croissance.....	68
2.3. Etude de l'effet des isolats sur la germination et la croissance des plantes en pot.....	68
VII. Etude de l'interaction souche résistante au chrome-plante-champignon MA.....	69
1. Matériel végétal.....	69
2. Etude de l'effet de la souche PF28 sur la croissance des plantes et la colonisation MA des racines.....	69

2.1. Contamination artificielle du sol et inoculation du sol.....	69
2.2. Mise en culture des plantes	
2.3. Prélèvement des plantules et analyses.....	69
3. Etude de l'effet de la souche PF28 et des champignons MA sur la croissance des plantes de tournesol et du blé.....	70
3.1. Sol utilisé et inoculation.....	70
3.2. Mise en culture des plantes	70
3.3. Prélèvement des plantes et analyses.....	70

VIII. Techniques analytiques.....

1. Dosage des métaux lourds.....	71
1.1. Dans le sol – Minéralisation acide.....	71
1.2. Dans les plantes- Minéralisation acide.....	71
1.3. Dosage du chrome total et autres métaux lourds.....	71
2. Dosage du chrome hexavalent.....	72
2.1. Dans le sol- Minéralisation alcaline.....	72
2.2. En milieu liquide (milieu de culture).....	72
3. Calcul du facteur d'accumulation et translocation du chrome.....	73
3.1. Calcul du facteur de translocation	73
3.2. Calcul du facteur d'accumulation.....	73
4. Colonisation mycorhizienne du système racinaire.....	73
4.1. Mise en évidence de la mycorhization.....	73
4.2. Technique d'estimation des paramètres de mycorhization	74
5. Analyse statistique.....	76

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Caractéristiques des sites d'étude.....	78
1. Caractéristiques physico-chimiques du sol.....	78
1.1. pH et température.....	78
1.2. Teneurs en métaux lourds.....	79
1.2.1. Chrome.....	79
1.2.2. Autres métaux lourds.....	80
II. Etude de la végétation et des champignons MA des sites d'étude.....	82

1. Phytoaccumulation des métaux lourds par les plantes prélevées sur les sites pollués.....	82
2. Colonisation mycorhizienne des racines des plantes.....	85
3. Etude de la population des champignons MA des sites d'étude.....	86
4. Etude de l'effet des métaux lourds sur la croissance des plantes et la colonisation mycorhizienne des racines (Essai au laboratoire).....	88
III. Bactéries du sol - résistance et réduction du Cr(VI).....	93
1. Caractéristiques microbiologiques-Flore bactérienne du sol.....	93
2. Bactéries résistantes au chrome.....	94
2.1. Isolement des bactéries résistantes au chrome.....	94
2.2. Caractères morphologique des isolats.....	95
3. Résistance au Cr(VI) et à d'autres métaux lourds.....	98
3.1. Résistance au Cr(VI).....	98
3.2. Résistance aux autres métaux lourds.....	99
4. Réduction du Cr(VI).....	100
IV. Caractéristiques des isolats sélectionnés	102
1. Identification des trois isolats.....	102
1.1. Identification moléculaire.....	102
1.2. Identification biochimique.....	102
1.3. Arbre phylogénétique.....	107
2. Résistance aux antibiotiques	108
3. Production d'AIA (acide indole acétique).....	109
V. Réduction du Cr(VI) par les isolats sélectionnés, en milieu liquide.....	112
1. Réduction du Cr(VI) en milieu M63.....	112
2. Réduction du Cr(VI) en milieu liquide LB.....	113
2.1. Effets de différents paramètres sur la réduction	113
2.1.1. Effet du pH	113
2.1.2. Effet de la température.....	116
2.1.3. Effet de la concentration initiale du Cr(VI).....	118
2.1.4. Effet de différents métaux lourds.....	120

2.1.5. Effet des donneurs d'électron.....	123
2.1.6. Effet de la répétition d'addition du Cr(VI).....	125
3. Activité réductrice du Cr(VI)	127
3.1. Réduction par les «resting cells» et les cellules perméabilisées.....	127
3.2. Localisation de l'activité réductrice du Cr(VI) (Fractionnement).....	129
3.3. Induction de l'activité chromate réductase.....	131
VI. Phytoremédiation assistée de Bioaugmentation par les souches sélectionnées.....	133
1. Réduction du Cr(VI) en microcosme de sol.....	133
2. Essais de phytoremédiation assistée de bioaugmentation par les souches sélectionnées.....	134
VII. Etude de l'interaction <i>P. fluorescens</i> PF28/plante/champignon MA	139
1. Effet de PF28 sur le poids de blé et de tournesol.....	139
2. Effet de PF28 sur la colonisation mycorhizienne des racines de blé et de tournesol.....	139
3. Effet de PF 28 sur les teneurs en chrome des plantes de tournesol et de blé.....	143
4. Effet de PF28 et des champignons MA sur la croissance et les teneurs en chrome des plantes de tournesol et de blé.....	146
4.1. Effet sur la croissance des plantes.....	147
4.2. Effet sur les teneurs en chrome.....	148
	152
<i>Conclusions et perspectives</i>.....	
	157
<i>Références bibliographiques</i>.....	