

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

Master : *Sciences et Technologies*

Mention : *Biologie, Géosciences, Agroressources, Environnement*

Spécialité : *Ecologie Fonctionnelle et Développement Durable*

Parcours : *Fonctionnement des Ecosystèmes Naturels Et Cultivés*

Développement d'une méthode de criblage pour évaluer l'influence de micro-organismes sur l'assimilation de métaux par le blé et le tournesol

par Antoine VACHEY



Eidgenössische Technische Hochschule Zürich
Swiss Federal Institute of Technology Zurich

Stage de M2

réalisé sous la direction de Brett ROBINSON
Swiss Federal Institute of Technology Zurich,

ETHZ, CHN F24 Universitätstrasse 16, 8092 Zürich SWITZERLAND.

Soutenu le 12 juin 2008 à Montpellier

Résumé

Un excès d'éléments traces métalliques (ETMs) dans l'environnement peut être toxique pour les plantes alors que la déficience des ETMs essentiels peut entraîner des troubles physiologiques. Les micro-organismes du sol sont capables d'affecter la tolérance des plantes vis-à-vis des ETMs à travers divers mécanismes. Le premier objectif de cette étude a consisté à développer une méthode de criblage permettant d'évaluer l'influence de micro-organismes sur l'assimilation des ETMs par les plantes. Afin de simplifier le système d'étude, les expériences ont été réalisées en gel d'agar dans des boîtes en plastique qui permettent de travailler en conditions stériles contrôlées. Le système développé a permis aux micro-organismes de se développer le long des racines et de générer des effets sur l'assimilation des métaux. Le second objectif de cette étude a consisté à tester l'effet de plusieurs souches microbiennes sur l'assimilation de divers métaux par le blé et le tournesol. Alors qu'aucune différence n'a été générée sur le blé, plusieurs micro-organismes ont entraîné une diminution de l'assimilation des éléments sur le tournesol. La biomasse des parties aériennes des plantes n'a pas été affectée par les micro-organismes. Trois souches microbiennes, *Paenibacillus polymyxa*, *Rhizoctonia solani* et *Pythium ultimum*, ont généré une diminution significative sur l'assimilation de la plupart des éléments mesurés. D'autres micro-organismes, comme *Bacillus subtilis*, ont affecté l'assimilation plus spécifiquement. Afin d'évaluer la pertinence de cette méthode de criblage, il s'avère nécessaire de répéter ces expériences en sol.

Mots clés : Agar; Plomb; Zinc; Nickel; Cuivre; *Triticum sp.*; *Heliantus sp.*

Abstract

An excess of metallic trace elements in soil may produce toxicity effects on plants whereas a deficiency of essential elements may lead to physiological disturbances. Soil microorganisms affect plant metal uptake and may alter the plant's tolerance range. The first aim of this study was to develop a screening method to test the influence of microbes on plant metal uptake. To simplify the system, experiments were performed in agar gel with plastic boxes. This produces controlled and sterile conditions. The system allows the microorganisms to grow along the roots and to generate effects on plant metal uptake. The second aim of this study was to test the effect of several microbial strains on metal uptake by wheat and sunflower. Whereas no difference has been shown on wheat, several microbes led to decrease metal uptake by sunflower. No effect caused by microorganisms was recorded on shoot biomass. Three microorganisms, *Paenibacillus polymyxa*, *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum* caused a significant decrease in the shoot concentration of most elements. Other microorganisms such as *Bacillus subtilis*, have affected metals more specifically. To evaluate the relevance of the method, experiments must be repeated in soil.

Key words: Agar; Lead; Zinc; Nickel; Copper; *Triticum sp.*; *Heliantus sp.*

Liste des abréviations

| | | |
|---------|---|---|
| PGPR | = | Plant Growth Promoting Rhizobacteria |
| ICP-OES | = | Inductively Coupled Plasma Spectroscopy |
| ETMs | = | Eléments Traces Métalliques |
| DRB | = | Deleterious RhizoBacterium |
| LB | = | Lysogeny Broth |
| Bs | = | <i>Bacillus subtilis</i> |
| Eh | = | <i>Erwinia herbicola</i> |
| Pae | = | <i>Paenibacillus polymyxa</i> |
| Ph | = | <i>Phytium ultimum</i> |
| Bj | = | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> |
| Cy | = | <i>Cytophaga sp.1</i> |
| Rh | = | <i>Rhizoctonia solari</i> |
| PM | = | <i>Pseudomonas MnB1</i> |
| PP | = | <i>Pseudomonas putida</i> |
| PF | = | <i>Pseudomonas fluorescens CHA0</i> |
| PG | = | <i>Pseudomonas GB1</i> |

Introduction

D'un point de vue biologique, les éléments traces métalliques (ETMs) réfèrent aux métaux présents en infime quantité dans les tissus des êtres vivants (Pais & Jones, 2000). Certains de ces éléments sont impliqués dans des processus biologiques et sont des composants essentiels de nombreuses protéines (Domy, 1986a). Chez les plantes, on dénombre six ETMs essentiels qui composent la majeure partie des micronutriments (Zn, Mn, Cu, Fe et Mo). Leur déficience peut entraîner une inhibition du développement et prématurer la senescence ou la mort du végétal (Domy, 1986a). Les ETMs sont acquis essentiellement par les racines et sont généralement tolérés dans une gamme de concentration relativement restreinte. Sur le plan humain, il a été estimé que 2,7 milliards de personnes souffraient de carences en oligo-éléments dû à la déficience en ETMs essentiels dans leur alimentation (Qaim *et al.*, 2007). Ces carences sont souvent la cause de maladies et peuvent affecter l'économie d'un pays. Bien que les ETMs essentiels soient indispensables en quantités infimes, ils deviennent rapidement toxiques à plus forte concentration (Domy, 1986b). Un excès d'ETMs dans l'environnement peut générer un risque pour la santé humaine et affecter l'économie locale à travers la détérioration de l'environnement (Domy, 1986c). Les ETMs non essentiels génèrent de plus fortes toxicités (Annexe 1). Il en résulte un intérêt grandissant de la part des communautés scientifiques d'une part pour mieux comprendre les relations entre plantes et micro-organismes et d'autre part pour innover afin de résoudre ces problèmes.

La biodisponibilité est un facteur clé de la compréhension des réponses biologiques des plantes vis-à-vis des ETMs. Pour qu'un élément soit assimilé dans les parties aériennes, il est nécessaire qu'il soit mobilisé, absorbé et transporté. Dans des environnements pauvres en ETMs, les plantes peuvent développer des stratégies permettant d'optimiser l'acquisition des nutriments déficitaires (Rengel, 2002). Dans des environnements contaminés ou pollués, elles peuvent au contraire développer des stratégies permettant d'exclure les éléments toxiques et de tolérer ces fortes concentrations (Eraenen, 2008). La capacité des plantes à assimiler et accumuler les ETMs est aussi fortement corrélée à d'autres facteurs tels que les caractéristiques du sol, la nature et la spéciation des métaux et plus généralement au contexte environnemental. La biosphère du sol influence aussi largement la biodisponibilité des ETMs (Metting, 1992). Les micro-organismes du sol peuvent interagir sur le système plante-ETMs à travers trois groupes de mécanismes : le premier concerne les mécanismes qui contribuent à promouvoir le développement des plantes, le second concerne les mécanismes qui affectent directement la mobilité des ETMs et le dernier ceux qui entraînent un changement de la physiologie des plantes.

Les bactéries exerçant un effet positif sur la plante ont été définies par Joseph Kloepper et Milton Schroth comme « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » (PGPR) (Kloepper & Schroth, 1978). Ces bactéries, qu'elles soient libres ou symbiotiques, sont utilisées pour promouvoir le développement des plantes dans divers domaines de l'agriculture (Lucy *et al.*, 2004). Sur sol contaminés, les PGPR peuvent affecter l'assimilation des ETMs de deux manières : en augmentant la biomasse des parties aériennes des plantes, les PGPR pourraient entraîner un taux de transpiration supérieur ; en favorisant le développement du système racinaire, elles pourraient augmenter la surface d'échange avec les ETMs. Les mécanismes par lesquels les PGPR peuvent

intervenir sont nombreux. Elles peuvent affecter la plante de manière indirecte en produisant des antibiotiques contre les pathogènes (Araujo *et al.*, 2005) et en rentrant en compétition avec d'autres micro-organismes néfastes. De manière plus directe, elles peuvent affecter la plante en facilitant l'assimilation du phosphore et du fer (Lin *et al.*, 1983) et en favorisant la fixation de l'azote (Mallik *et al.*, 2008). Kamnev *et al.*, (1999) ont découvert plusieurs rhizobactéries capables d'améliorer le développement des plantes et la fertilité des sols contaminés. Lucy *et al.*, (2004) ont répertoriés plusieurs PGPR qui ont influencé l'assimilation des ETMs de divers plantes (Annexe 2).

Le deuxième groupe englobe les micro-organismes qui interagissent directement avec les ETMs. L'adaptation des organismes aux environnements riches en métaux est en partie due à l'activité de microbes capables de changer la dynamique des métaux du sol (Gadd *et al.*, 1993; Gadd *et al.*, 2000; Gadd *et al.*, 2004; Vanbroekhoven *et al.*, 2007; Whiting *et al.*, 2001). En modifiant les conditions géochimiques du sol ou en affectant directement la spéciation des ETMs, certains micro-organismes pourraient influencer la biodisponibilité des ETMs. Plusieurs types de mécanismes tels que la chélation, la protonation et la transformation chimique peuvent entraîner la mobilisation des métaux alors que des mécanismes comme la précipitation, la sorption, la séquestration intracellulaire et la dégradation d'agents chélateurs tendent à les immobiliser (Tabak *et al.*, 2005)(Annexe 3). Dans cette optique, un large spectre de micro-organismes pourrait être exploité en vue d'impacter l'assimilation des ETMs par les plantes.

Le dernier groupe concerne les micro-organismes capables de modifier la physiologie et/ou la morphologie du système racinaire. Bien que les mécanismes d'absorption de certains éléments métalliques soient encore mal connus, il est désormais accepté qu'un large spectre de métaux sont assimilés par des canaux non-spécifiques (Reid & Hayes, 2003). Pour la plupart, ils suivent la voie apoplastique et sont transférés à travers l'endoderme vers les vaisseaux vasculaires (Annexe 4). Les bandes de Caspary empêchent les transports passifs vers le cylindre central ce qui permet à la plante de garder le contrôle sur l'assimilation des composés. En altérant la perméabilité de l'endoderme, il serait possible de faire transférer les métaux vers les parties aériennes de la plante. L'endommagement de l'endoderme peut être provoqué par des phytopathogènes ou des micro-organismes endophytiques par action physique ou chimique. Lodewyckx *et al.*, (2001) ont observé une augmentation de la concentration de nickel dans le lupin jaune après avoir été inoculé par la bactérie endophytique *Burkholderia cepacia*.

Plusieurs études ont été réalisées sur l'influence des micro-organismes sur l'assimilation des ETMs (Belinov *et al.*, 1998 ; Belinov & Dietz, 2000 ; Hoflich & Metz, 1997 ; Huang *et al.*, 2003). Cependant, Lucy *et al.*, (2004) ont montré que ces recherches restaient relativement superficielles. Peu d'études ont abouti à des essais en champs et seulement quelques bactéries ont été testées sur un nombre restreint d'espèces de plantes. Il n'existe pas encore de méthodes d'étude consensus ou de lignes directrices à suivre dans ce domaine. Le premier objectif de cette étude consiste à développer une méthode de criblage reproductible permettant d'évaluer l'influence de micro-organismes sur l'assimilation des ETMs par les plantes. Dans cette optique, nous avons développé un système d'étude simple utilisant le gel d'agar comme milieu de culture. Le second objectif consiste à tester plusieurs souches microbiennes en utilisant la méthode développée précédemment. Une liste assez exhaustive de plusieurs micro-organismes a été conçue pour ce criblage. Ces micro-organismes ont été testés sur le tournesol, comme exemple

de dicotylédone, et le blé, comme exemple de monocotylédone, dans un agar contaminé par du plomb, du cuivre, du zinc et du nickel. Les teneurs de ces éléments ont été mesurées dans les plantes puis comparées et discutées.

Materiel et méthodes

Développement de la méthode de criblage

La méthode de criblage consiste à faire pousser des plantes en présence de micro-organismes sélectionnés sur un gel d'agar contaminé par divers polluants. Dans cette étude, du cuivre, du zinc, du plomb et du nickel (sous forme metal-nitrate) ont été ajoutés au gel d'agar dans une gamme de concentration non toxique. Les expériences ont été réalisées sur le blé et le tournesol. La figure 1 schématise le système d'étude. Des boîtes en plastique transparent d'un litre ont été utilisées comme support de ces expériences. Ces boîtes, faites de polypropylène, peuvent être autoclavées et fermées à l'aide de couvercles hermétiques. Un microfiltre positionné sur le couvercle permet les échanges gazeux entre l'intérieur et l'extérieur tout en empêchant le passage des micro-organismes. Trois graines, préalablement stérilisées et germées, ont été semées dans chaque boîte puis inoculées par un seul type de micro-organisme. Après avoir poussé pendant 14 jours, les plantes ont été récoltées, séchées et digérées puis les teneurs en métaux ont été analysées par ICP-OES.

Préparation du gel d'agar : Les gels d'agar ont été préparés à partir de poudre d'agar pure et d'une solution nutritive à la concentration de 10g de matière sèche par litre de solution. La solution nutritive présentait les caractéristiques suivantes : $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 400 μM , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 200 μM , KH_2PO_4 : 100 μM , KNO_3 : 500 μM , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 20 μM , H_3BO_3 : 10 μM , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 2 μM , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,1 μM , NaCl : 20 μM . Les gels ont été conçus en mélangeant 8 g de poudre d'agar à 800 ml de solution nutritive dans des bouteilles de verre de un litre. L'utilisation de bouteille de un litre s'est avérée le meilleur compromis pour minimiser la quantité de travail tout en gardant une bonne homogénéité du mélange. Exactement 0.8 ml d'une solution contenant 1000 mg kg^{-1} de plomb, 310 mg kg^{-1} de cuivre, 320 mg kg^{-1} de zinc et 280 mg kg^{-1} de nickel a été ajoutée à chaque bouteille de sorte que la concentration en plomb, cuivre, zinc et nickel des gels soit respectivement de 1 mg kg^{-1} , 0,31 mg kg^{-1} , 0,32 mg kg^{-1} et 0,28 mg kg^{-1} (quantité molaire équivalente). Une expérience antérieure a montré que les plantes ne souffraient d'aucune toxicité quand elles poussaient dans un gel contaminé de la sorte. Les bouteilles ont ensuite été fermées puis autoclavées à 120 °C pendant 20 min. Une fois la température redescendue en dessous de 50 °C, 250 ml d'agar ont été coulés dans chaque boîte.

Stérilisation et pré-germination des graines : Etant donné qu'il était primordial de réduire au maximum le risque de contaminations microbiennes dans le système, nous avons privilégié une stérilisation forte au détriment d'un taux de germination élevé. La surface des semences a été stérilisée pendant 20 min à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 5 %. Cela s'est avéré être le meilleur compromis entre stérilisation totale et taux de germination acceptable. Les graines ont ensuite été rincées cinq fois en conditions stériles avec de l'eau autoclavée puis placées dans des boîtes de Pétri contenant du papier absorbant stérile et humide. Les semences ont été prégermées à 25 °C dans le noir pendant 48 h pour le blé et 72 h pour le tournesol avant d'être

semées. Seules les graines germées, saines et entières ont été utilisées. Toutes graines présentant des signes de contamination ont rapidement été écartées.

Semis des plantes : Sous conditions stériles, trois tubes en plastique d'environ 10 mm de long et 14 mm de diamètre ont été positionnés en triangle isocèle dans le gel de chaque boîte (Figure 1). Ces tubes ont ensuite été enfoncés dans l'agar de sorte que la moitié soit dans le substrat et l'autre en dehors. Par la suite, une graine germée a été placée dans chaque tube en orientant la racine vers le bas. L'objectif de cette manoeuvre étant d'orienter la progression de la racine vers le bas. Les tubes en plastique ont pour rôle de forcer la racine à s'enfoncer dans le gel et d'éviter que la solution bactérienne ne se répande sur la surface du gel. Une fois les trois graines mise en place, les boîtes ont été refermées et placées à température ambiante dans le noir pendant 3 jours.

Inoculation : A la suite des 3 jours pendant lesquels les graines sont devenues des plantules, les micro-organismes ont été inoculés dans chaque boîte. Afin de faciliter leur insertion le long des racines, ils ont été introduits à partir d'un milieu liquide. La veille de l'inoculation, les micro-organismes stockés sur milieu nutritif solide « Lysogeny Broth » (LB) composé de 1,5 % de bacto-agar, 1 % de tryptone, 1 % de NaCl et 0,5 % d'extrait de levure ont été transférés dans 25 ml d'un milieu de culture LB liquide (sans agar). Pour cela, nous avons piqué une colonie de chaque isolation avec la pointe d'un cure-dent stérile puis chaque cure-dent a été mis dans un Erlenmeyer de 100 ml contenant les 25 ml de milieu de culture liquide. L'opération a été réalisée de sorte que seule la pointe du cure-dent contenant les micro-organismes soit en contact avec la solution nutritive. Les Erlenmeyers ont ensuite été couverts avec de l'aluminium puis placés sur agitateur à 30 °C dans le noir pendant 16 h à 140 rpm. A la suite de cette période, la densité optique de chaque solution a été mesurée. Le nombre de cellules n'a pas été déterminé mais une valeur critique minimum de densité optique a été fixée ($Abs\ 0,1\ à\ 600\ nm^{-1}$). Toute solution n'ayant pas atteint cette limite a été laissé dans l'incubateur jusqu'à ce que la densité optique soit suffisante. En ce qui concerne l'inoculation dans les boîtes, 100 μ l de solution microbienne ont été répandus à la base des plantules dans chaque tube en plastique. Au total, étant donné qu'il y a trois plantes sur chaque gel d'agar, 300 μ l de solution microbienne ont été injectés dans chaque boîte. Les boîtes ont ensuite été refermées puis placées en chambre de culture pendant 14 jours (cycle jour 22°C, cycle nuit 14°C, intensité de la lumière 11000 lux).

Analyse de certaines caractéristiques du gel d'agar : L'agar est un polymère composé de deux polysaccharides différents nommés agarose et agaropectine. L'agarose est un polymère de charge neutre avec un degré de complexité chimique relativement bas alors que l'agaropectine est un polymère plus complexe contenant des groupes acides tels que les sulfates, les pyruvates et les glucuronates. Bien que le gel d'agar soit un support simple, pratique et facilement reproductible, il présente des caractéristiques très différentes de celles du sol. La fraction de métaux précipitée ou absorbée sur le gel a été estimé. Pour cela, une partie de la fraction liquide du gel a été extraite en centrifugant six fois 30 g de gel à 10000 rpm pendant 15 min. Les surnageants (fraction liquide sans agar) ont été transférés dans des tubes de 10ml et le pH a été mesuré. Les échantillons ont ensuite été analysés par ICP-OES.

Criblage des micro-organismes

Le criblage consiste à tester plusieurs souches microbiennes sur le blé et le tournesol en utilisant la méthode développée précédemment. Quatorze micro-organismes ont été sélectionnés (Tableau 1) soit pour leur capacité à influencer l'assimilation des métaux soit pour leur capacité à produire les mécanismes énumérés précédemment. Deux pathogènes ont été testés et trois souches non caractérisées ont été isolées d'un sol contaminé par des métaux lourds (sol de Losone : Ni 57,2 mg kg⁻¹ ; Cu 104.4 mg kg⁻¹ ; Zn 96.8 mg kg⁻¹ ; Pb 511,2 mg kg⁻¹). Les expériences ont été réalisées en cinq réplifications pour chaque micro-organisme et chaque espèce de plante. Au total, en incluant les contrôles, 150 boîtes ont été nécessaires pour ce criblage (Figure 2). Les concentrations en cuivre, zinc, plomb, nickel, fer, potassium, calcium, magnésium et manganèse des plantes ont été mesurées à la fin de l'expérience.

Sources des micro-organismes et conditionnement : Les souches microbiennes ont été obtenues sous forme lyophilisée ou sur milieu nutritif en boîte de Pétri. Les micro-organismes reçus sur milieu nutritif ont été conservés à 4 °C en chambre froide. Toutes les trois semaines les souches ont été soigneusement réisolées sur milieu LB solide. Les micro-organismes reçus sous forme lyophilisé ont simplement été stockés dans un lieu sec à 4 °C. Afin d'élargir le nombre de candidats pour le criblage, certains micro-organismes ont été extraits et isolés à partir d'un sol contaminé. Pour cela, environ 1 g de sol a été ajouté à 50 ml d'une solution liquide contenant 2,25 g de NaCl, 0,1 g de KCl et 0,12 g de CaCl₂ par litre d'eau. Des dilutions de dix en dix ont été réalisées jusqu'à un facteur 10⁻⁷ et 1 mL de la solution diluée à 10⁻⁷ a été étalé sur un milieu solide LB sur boîte de Pétri. La boîte a été ensuite placée dans un incubateur à 28°C dans le noir pendant 16 heures. Après cette période, des colonies d'aspect différent pouvaient être identifiées sur le milieu. Trois d'entre elles ont été isolées, observées au microscope et stockées sur milieu LB (Tableau 1 : micro-organismes M1, M2 et M3). Ces microorganismes n'ont pas été caractérisés pour cette étude. Quelques jours avant d'être inoculés dans le système agar, les micro-organismes lyophilisés ont été réactivés. Pour cela, quelques milligrammes de leur biomasse ont été ajoutés à 25 ml d'un milieu de culture liquide LB dans des Erlenmeyers de 50 ml. Les Erlenmeyers, contenant le milieu nutritif et les inoculats, ont été fermés à l'aide de papier aluminium stéril puis agités toute la nuit à 30°C dans le noir. Une nouvelle isolation sur milieu LB solide a été réalisée pour chaque micro-organisme. Quand l'isolation présentait des contaminations (présence de colonies différentes), l'opération était recommencée jusqu'à ce que l'on obtienne satisfaction. A ce stade, tous les micro-organismes se trouvaient sous forme de colonies en boîtes de Pétri prêts à être inoculés.

Digestion des plantes : Quatorze jours après l'inoculation des micro-organismes, les tiges et les feuilles des plantes ont été récoltées, rincées à l'eau distillée et placées dans un four à 60 °C pendant 3 jours. A la suite de cette période, le poids sec de chaque plante a été déterminé et les trois plantes de chaque boîte ont été broyées et mélangées ensemble. Environ 70 µg de matériel végétal ont été pesés dans des tubes en téflon de 5 mL et 3,5 mL d'acide nitrique concentré ont été ajoutés. Plusieurs blancs et différents matériels de référence ont aussi été préparés. Les échantillons ont été digérés par microondes (180 °C pendant 15 min). A la fin de la digestion, les contenus des tubes en téflon ont été transférés dans des tubes en plastique gradués puis chaque tube a été

rempli jusqu'à 10 mL avec de l'eau ultra pure. Les échantillons ont ensuite été analysés par ICP-OES.

Vérification de la présence des micro-organismes dans le système : Une fois les plantes extraites des boîtes, nous avons vérifié si les micro-organismes s'étaient développés le long des racines. Pour cela, le gel d'agar de chaque boîte a été coupé en deux sous conditions stériles et un bout de racine a été extrait. La racine a été frottée sur un milieu de culture LB solide puis le tout a été placé en incubateur à 30 °C dans le noir. Une fois les micro-organismes assez développés, ils ont été reconnus par simple observation au microscope. Cette méthode nous a aussi permis de mettre en évidence d'éventuelles contaminations et d'écarter les boîtes contaminées.

Analyse statistique : L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du programme SPSS. Des analyses de variance (ANOVA) ont été réalisées sur tous les jeux de données et le test de comparaison de Tuckey a été utilisé pour établir les différences entre moyennes. Une corrélation de Spearman a été effectuée pour mettre en évidence les corrélations entre variables sur la base des rangs des valeurs. Les P-values ont été considérées statistiquement significatives sous 0,005.

Résultats

Caractéristiques du gel d'agar

Le pH de la solution des gels d'agar extraite par centrifugation a été mesuré à $6,1 \pm 0,15$. Cette valeur étant proche de la neutralité, aucun ajustement n'a été nécessaire. L'analyse du gel d'agar par ICP-OES nous indique que la plupart des éléments sont libres dans la solution du gel (Tableau 2). La valeur mesurée de potassium semble aberrante et résulte probablement d'une erreur de mesure ou de manipulation. Seul le fer et le plomb sont présents en plus faibles proportions dans la solution avec respectivement 49 % et 17 %. Ces éléments ont pu être absorbés par le gel ou en partie précipité lors de l'ajout des autres métaux.

Vérification de la présence des micro-organismes dans le système

Bien qu'une simple observation au microscope ne nous donne pas la certitude de l'identité des micro-organismes, ils ont été retrouvés dans toutes les boîtes le long des racines. Cela montre que le système est suffisamment adapté pour permettre aux micro-organismes de se développer dans la rhizosphère des plantes. Des contaminations de plusieurs ordres ont été mises en évidence. Dans la plupart des cas ces contaminations ont été mineures ne prédominant pas sur l'espèce étudiée. Cependant, 6 boîtes ont été fortement contaminées ce qui nous a contraint à les écarter de l'analyse. La présence de micro-organismes étrangers dans le système peut être due à une contamination lors des manipulations, à une mauvaise stérilisation de la graine ou parce que des micro-organismes ont pu traverser le filtre. Une contamination mineure du système reste acceptable tant que les souches étrangères ne prédominent pas sur les souches étudiées.

Criblage

Aucune différence n'a été observée entre les biomasses des parties aériennes des plantes. Les micro-organismes n'ont donc ni stimulé, ni inhibé leur croissance. Bien que les micro-organismes pathogènes se soient développés le long des racines, aucun effet néfaste n'a été observé. Il en est de même pour les PGPR qui n'ont pas généré d'effet positif significatif.

La première divergence observée entre les deux plantes concerne les concentrations des divers éléments dans les tiges et les feuilles. Dans tous les cas, les teneurs en métaux du tournesol sont supérieures à celles du blé (Figure 3 et 4). Ceci est particulièrement significatif pour le nickel dont la concentration est d'environ 6 mg kg^{-1} dans le blé et 65 mg kg^{-1} dans le tournesol (Figure 3.H et 4.H). La deuxième divergence observée concerne la magnitude de l'influence des micro-organismes sur l'assimilation des métaux. Les différences entre traitements sont beaucoup plus prononcées chez le tournesol que chez le blé (Figure 3 et 4). Ceci est particulièrement significatif pour le zinc où de nombreuses différences ont été mises en évidence par l'analyse statistique chez le tournesol alors que très peu ont été observées chez le blé (Figure 3.E et 4.E). La dernière divergence concerne la force des tendances des micro-organismes à générer des effets sur l'assimilation des éléments. Les figures 5 et 6 représentent les moyennes des rangs des micro-organismes pour chaque élément rapportées à la moyenne des rangs du contrôle. Plus l'écart est grand plus les tendances à diminuer ou augmenter l'assimilation des métaux sont fortes. Sur le tournesol, l'écart des moyennes des rangs est beaucoup plus important que sur le blé. Cela signifie que l'effet généré par les microbes est plus régulier et plus important chez le tournesol.

Bien qu'il y ait quelques différences significatives entre les traitements les plus extrêmes, aucune différence n'a été générée sur le blé par rapport au contrôle (Figure 3). Sur le tournesol, la plupart des micro-organismes ont produit des effets négatifs qui se sont avérés significatifs pour certains (Figure 4). Les microbes les plus efficaces ont généré une diminution des teneurs en calcium, potassium et manganèse (macronutriments) de respectivement 164 %, 80 % et 110 % (Figure 4.A, 4.B et 4.C). Les teneurs en zinc, cuivre et nickel (ETMs) ont été diminuées respectivement de 165 %, 130 % et 156 % (Figure 4.E, 4.F et 4.H). Aucune différence significative n'a été mise en évidence pour le magnésium et le fer. Les concentrations en plomb du tournesol étant inférieures à la limite de détection de l'ICP-OES (évaluée à 2 mg kg^{-1} dans les plantes), aucun résultat n'est disponible pour cet élément. Le test de corrélation de Spearman nous indique que les valeurs de rang assignées aux micro-organismes pour le blé (Figure 5) ne sont pas significativement corrélées aux valeurs de rang des micro-organismes pour le zinc, le plomb, le nickel et le manganèse. Cela signifie que les tendances (définies par les moyennes des rangs moins la moyenne des rangs du contrôle) ne sont pas statistiquement valables pour ces éléments. En ce qui concerne le tournesol, l'analyse a révélé que l'assignation des rangs était significative pour tous les éléments (Figure 6). L'analyse de comparaison de moyennes sur les valeurs des rangs montre qu'il y a moins de tendances significatives chez le blé.

Sur le tournesol, trois espèces de micro-organismes, *Paenibacillus polymyxa*, *Rhizoctonia solani* et *Pythium ultimum*, ont généré un effet négatif significatif sur l'assimilation de la plupart des éléments. Cette capacité à diminuer l'accumulation des

métaux est bien représenté par l'analyse des rangs (Figure 6). L'écart important entre la moyenne des rangs de ces microbes et l'écart moyen du contrôle atteste de la forte tendance de ces micro-organismes à diminuer l'assimilation des métaux. Deux micro-organismes extraits du sol de Losone, M1 et M2, ont aussi généré quelques différences. M1 a diminué l'assimilation du calcium et du potassium alors que M2 a diminué l'assimilation du zinc. Ces deux microbes, qui présentent des écarts de rangs plus faibles, semblent affecter l'assimilation des métaux plus spécifiquement. En ce qui concerne le blé, deux micro-organismes ont montré des tendances supérieures à réduire l'assimilation des éléments, *Bacillus subtilis* et M3. A l'exception de *Paenibacillus polymyxa* le comportement des microbes semble complètement diverger entre le blé et le tournesol. *B. subtilis* qui diminue l'assimilation des éléments pour le blé a une tendance légèrement positive pour le tournesol (Figure 5 et 6). A l'opposé, *Rhizoctonia solani* qui diminue l'assimilation pour le tournesol a une tendance légèrement positive pour le blé. L'influence des micro-organismes semble donc fortement dépendre de l'espèce de la plante. Aucun microbe n'a généré d'augmentation de l'accumulation des éléments dans les tiges et les feuilles des plantes.

Discussion

Validité de la méthode de criblage

Dans l'optique de développer une méthode de criblage qui servirait de référence, le gel d'agar présente plusieurs avantages. Ses propriétés physico-chimiques sont bien définies et sa faible complexité chimique fait qu'il interagit peu avec les métaux (FAO, 2008). A l'exception du plomb et du fer, l'analyse de la solution du gel a montré que les éléments sont essentiellement contenus dans la fraction liquide. Outre ces aspects, il peut être stérilisé par autoclavage et reproduit à l'identique dans le temps et dans l'espace. Cependant, le gel d'agar présente aussi quelques désavantages. C'est un milieu artificiel dont les propriétés physico-chimiques sont très différentes de celles du sol. L'absence de différence significative entre les biomasses des plantes témoigne de ces limites. Les deux pathogènes, *Pythium ultimum* et *Rhizoctonia solani*, n'ont pas diminué le rendement de biomasse des parties aériennes et les PGPR n'ont pas stimulé la croissance des plantes. Il est donc possible que le gel ait affecté le comportement des micro-organismes et modifié les relations qu'ils entretiennent avec les plantes. Il est aussi important de souligner que l'agar est un milieu anoxique qui n'est pas favorable au développement de toutes les plantes. Les résultats sur la diffusion de l'encre nous permettent de penser que le blé et le tournesol ont élaboré des stratégies différentes pour fournir l'oxygène aux racines. Malgré ces désagréments, le gel d'agar s'est avéré un milieu favorable au développement des micro-organismes dans la rhizosphère. Tous les micro-organismes inoculés ont pu être réisolés à partir des racines à la fin des expériences. Ce milieu semble avoir un certain potentiel pour l'étude des interactions plantes-microbes sans que les propriétés du sol ne soient prises en compte.

De part la nature spécifique du système d'étude, certains mécanismes microbiens qui résultent en une modification de l'assimilation des ETMs ne peuvent être opérés dans ce système. L'effet généré par les PGPR qui fonctionnent en rentrant en compétition avec d'autres microbes et/ou en protégeant la plante des pathogènes ne peuvent être mis en

évidence dans un système où seule une espèce de micro-organisme est présente. Il en est de même pour les micro-organismes qui fonctionnent en contribuant à solubiliser les éléments contenus dans les fractions solides des sols. Etant donné que la plupart des éléments sont essentiellement présents dans la solution du gel, il semble difficile pour les microbes d'interagir significativement sur la mobilisation des ETMs. De ce fait, le système d'étude ne semble pas vraiment adapté aux mécanismes qui promouvraient une augmentation de l'assimilation. Les micro-organismes capables de produire des agents chélateurs favorisant l'assimilation pourraient générer des différences positives mais aucune augmentation n'a été répertoriée dans cette étude. A l'opposé, plusieurs mécanismes qui peuvent entraîner une diminution de l'assimilation des ETMs peuvent être entrepris dans ce système. Les micro-organismes affectant la spéciation des ETMs et/ou diminuant la biodisponibilité des ETMs par précipitation, absorption ou accumulation (Gadd, 2000) ont plus de chance de générer un effet en gel d'agar. La plupart des éléments sont présents sous forme ionique et peuvent être sujet à des transformations chimiques les rendant moins disponibles pour la plante. L'effet des micro-organismes qui fonctionnent en altérant la physiologie du système racinaire est aussi largement influencé par le milieu de culture. Dans cette étude, aucune diminution de la biomasse n'a été générée par les micro-organismes phytopathogènes. La virulence d'une pathogénicité dépend en majeure partie du pathogène mais aussi des conditions de culture et du contexte environnant. Les pathogénicités ou autres interactions entre plante et micro-organismes sont parfois difficiles à générer en milieu artificiel en laboratoire et peuvent s'exprimer de différentes manières. Il est possible que certaines interactions nécessitent des conditions particulières qui ne peuvent pas être fournies par le gel d'agar.

En dépit de cette argumentation, la validité de la méthode peut s'avérer acceptable selon les objectifs que l'on se fixe. Plusieurs points positifs ressortent de cette étude : le blé et le tournesol peuvent se développer sur gel d'agar et les micro-organismes peuvent coloniser leurs racines ; il est possible de faire pousser les plantes en conditions stériles ; et la méthode est rapide, simple et reproductible. Il est aussi évident que ce système a certaines limites : l'agar a des propriétés différentes de celles du sol et les conditions de culture de la chambre de culture sont différentes de celles du champ ; le système ne tolère que des plantes jeunes (saturation de l'espace des boîtes) ; et n'est pas adapté pour certains mécanismes microbiens. Bien que le protocole développé ne permette pas de valoriser tous les mécanismes par lesquels les micro-organismes peuvent influencer l'assimilation des ETMs, il peut servir de base à une enquête et être modifié selon les besoins.

Influence des micro-organismes sur l'assimilation des ETMs

Les résultats ont confirmé que certains micro-organismes pouvaient diminuer l'assimilation des métaux dans les conditions expérimentales étudiées. L'amplitude de cette réduction dépend en partie du micro-organisme, de la plante et des relations qu'ils entretiennent dans le gel d'agar. D'un point de vue pratique, ces microbes pourraient être utilisées pour diminuer la biodisponibilité des ETMs dans les sols contaminés. Un tel effet permettrait de stabiliser la pollution, de diminuer les risques d'accumulation des ETMs dans la chaîne alimentaire et de favoriser le développement d'un couvert végétal. *P.polymyxa*, *R.solani* et *P.ultimum* ont eu un effet sur l'accumulation de la plupart des éléments. Cette

caractéristique pourrait s'avérer idéale pour réhabiliter les sites contaminés par plusieurs ETMs. Cependant, la diminution de l'assimilation des macronutriments (Ca, K et Mn) pourrait aussi entraîner une diminution du rendement de biomasse des plantes. La fertilité des sols reste un des enjeux majeurs de la phyto-réhabilitation des sites contaminés. Si la plante est perturbée au niveau de l'acquisition des éléments nutritifs essentiels, la production de biomasse risque d'être réduite. Le micro-organisme idéal serait donc celui qui diminuerait la biodisponibilité des polluants sans réduire celle des éléments essentiels.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer les réductions de l'assimilation des métaux : la morphologie et/ou la physiologie du système racinaire ont été modifiées; les éléments ont été consommés et/ou séquestrés par les micro-organismes ; les conditions chimiques de la rhizosphère ont été modifiées. Etant donné que *P.polymyxa*, *R.solani* et *P.ultimum* ont affecté la plupart des éléments, l'hypothèse d'un changement de la structure du système racinaire semble la plus probable pour ces micro-organismes. En consommant l'oxygène et en modifiant le pH il est aussi possible qu'ils aient modifié les conditions chimiques de la rhizosphère. Il aurait été intéressant de travailler avec des métalloïdes pour donner plus de sens à cette hypothèse. *R.solani* et *P.ultimum* sont des champignons phytopathogènes qui agissent sur une large gamme d'espèces de plantes (Jenkins & Averre, 1983; Farr *et al.*, 1989). Ils peuvent entre autres induire un pourrissement des racines qui peut entraîner une diminution du rendement de biomasse (Chérif *et al.*, 1991). Bien qu'aucune diminution de la biomasse n'ait été mise en évidence pour les parties aériennes, il est possible que ces pathogènes aient affecté le développement du système racinaire. Une diminution de la surface d'échange entre les racines et les ETMs pourrait résulter en une diminution de l'assimilation des ETMs. Il est aussi possible que les pathogènes aient modifié la physiologie de la racine. En réponse à un stress, la plante a pu activer des processus de défense qui ont aussi résulté en une diminution de l'accumulation des éléments. Il aurait été nécessaire d'évaluer l'impact des microbes sur le système racinaire pour justifier qu'il y a bien eu un changement de la structure de la plante.

Paenibacillus polymyxa est une PGPR bénéfique pour une large gamme de plantes (Egamberdiyeva & Hoflich, 2004; Egamberdiyeva, 2007; Haggag & Timmusk, 2008; Khan *et al.*, 2008). Elle protège son hôte des pathogènes en sécrétant des antibiotiques et augmente la tolérance à la sécheresse (Timmusk *et al.*, 2005). Cependant, Timmusk *et al.* (2003) ont montré que dans certaines conditions, cette rhizobactérie pouvait générer un léger effet pathogénique. Dans cette situation elle est considérée comme bactérie délétère (DRB). Les mêmes auteurs ont montré que *P.polymyxa* colonisait les racines en formant un biofilm et qu'elle se comportait comme une bactérie invasive en se développant entre les cellules des racines. L'effet généré sur le développement de l'hôte est dépendant des conditions de culture. Shishido *et al.* (1994) ont reporté que l'inoculation de la souche *P.Polymyxa* L6-16R promouvait le développement du pin Lodgepole sur un site, qu'elle l'inhibait sur un autre et qu'elle n'avait pas d'effet sur un troisième. Alors que nous avons observé que l'inoculation de *P.Polymyxa* avait significativement diminuée l'assimilation du potassium pour le tournesol, Egamberdiyeva (2007) a montré qu'elle contribuait à l'augmenter lorsque le tournesol poussait en sol. Les interactions entre les plantes et cette bactérie semblent donc fortement dépendre des conditions expérimentales.

Conclusion

La méthode de criblage développée dans cette étude a permis de mettre en évidence des micro-organismes capables de diminuer l'assimilation de divers métaux par le blé et le tournesol. Cependant, les interactions entre les plantes et la faune du sol sont largement dépendantes des conditions de culture. Il s'avère donc nécessaire d'évaluer l'effet de ces microbes en sol, puis en champ, afin d'évaluer la pertinence de cette méthode de criblage. La compréhension des interactions plantes-microbes et des mécanismes par lesquels les micro-organismes peuvent influencer l'assimilation des métaux semble primordiale pour avancer dans ce domaine. Si le système d'étude est validé par des essais en champ, il sera possible de tester le potentiel de nombreux micro-organismes sur de nombreuses espèces de plantes. L'utilisation de mutants permettrait de valider les hypothèses sur les mécanismes et de mieux comprendre le fonctionnement des micro-organismes.

Le criblage a révélé que les micro-organismes pathogènes généraient les diminutions les plus significatives sur l'assimilation des métaux par le tournesol. Bien que cela n'ait pas été vérifié, il est possible que cette diminution soit due à une modification de la morphologie et/ou de la physiologie du système racinaire. Une étude plus approfondie sera nécessaire pour déterminer de quelle manière ces pathogènes ont affecté l'accumulation des métaux. D'un point de vue pratique, l'utilisation de pathogènes ne semble pas adaptée aux techniques de réhabilitation qui consistent à immobiliser les polluants et limiter leur diffusion dans l'environnement (phytostabilisation) (Salt *et al.*, 1995). La production de biomasse et la diminution des risques pour l'environnement restent les points clés de ces technologies. L'utilisation de pathogènes ne semble pas aller dans ce sens.

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement Monica Marchetti et Dr. Brett Harvey Robinson pour leurs conseils et leur assistance tout au long de cette période. Merci à Prof. Rainer Schulin qui m'a été d'une grande aide sur certains points critiques.

Je suis aussi très reconnaissant pour Björn Studer qui a eu la patience de me former sur l'ICP-OES. J'ai énormément apprécié sa bonne humeur et ses encouragements.

Merci à tous les étudiants du groupe pour leur amitié et pour m'avoir si bien intégré à Zurich.

Figures et Tableaux

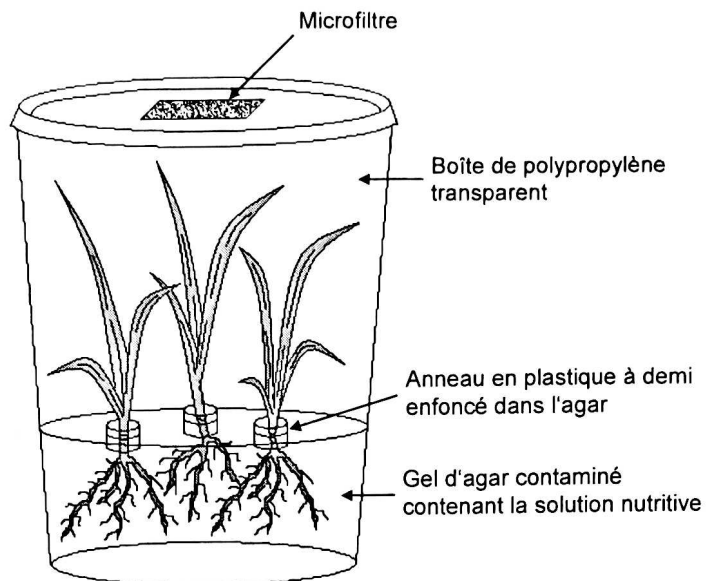


Figure 1 : Schéma du système développé pour le criblage des micro-organismes. Le criblage a été réalisé en gel d'agar dans des boîtes en polypropylène. Un microfiltre permet les échanges gazeux tout en empêchant les micro-organismes de l'air de rentrer dans le système. Des anneaux en plastique ont été utilisés pour faciliter l'inoculation des micro-organismes et le développement des plantes. Trois graines ont été semées dans chaque boîte.

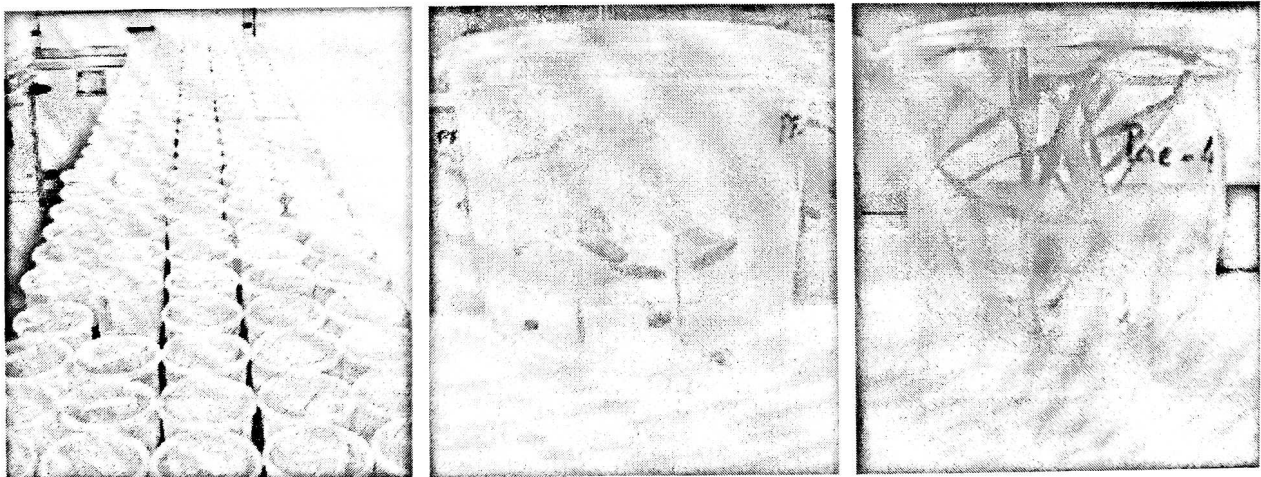


Figure 2 : Photos du système d'étude. La photo A représente les boîtes contenant les plantes inoculées par les micro-organismes dans la chambre de culture. Les photos B et C montrent respectivement le tournesol et le blé dans les boîtes après avoir poussés 14 jours.

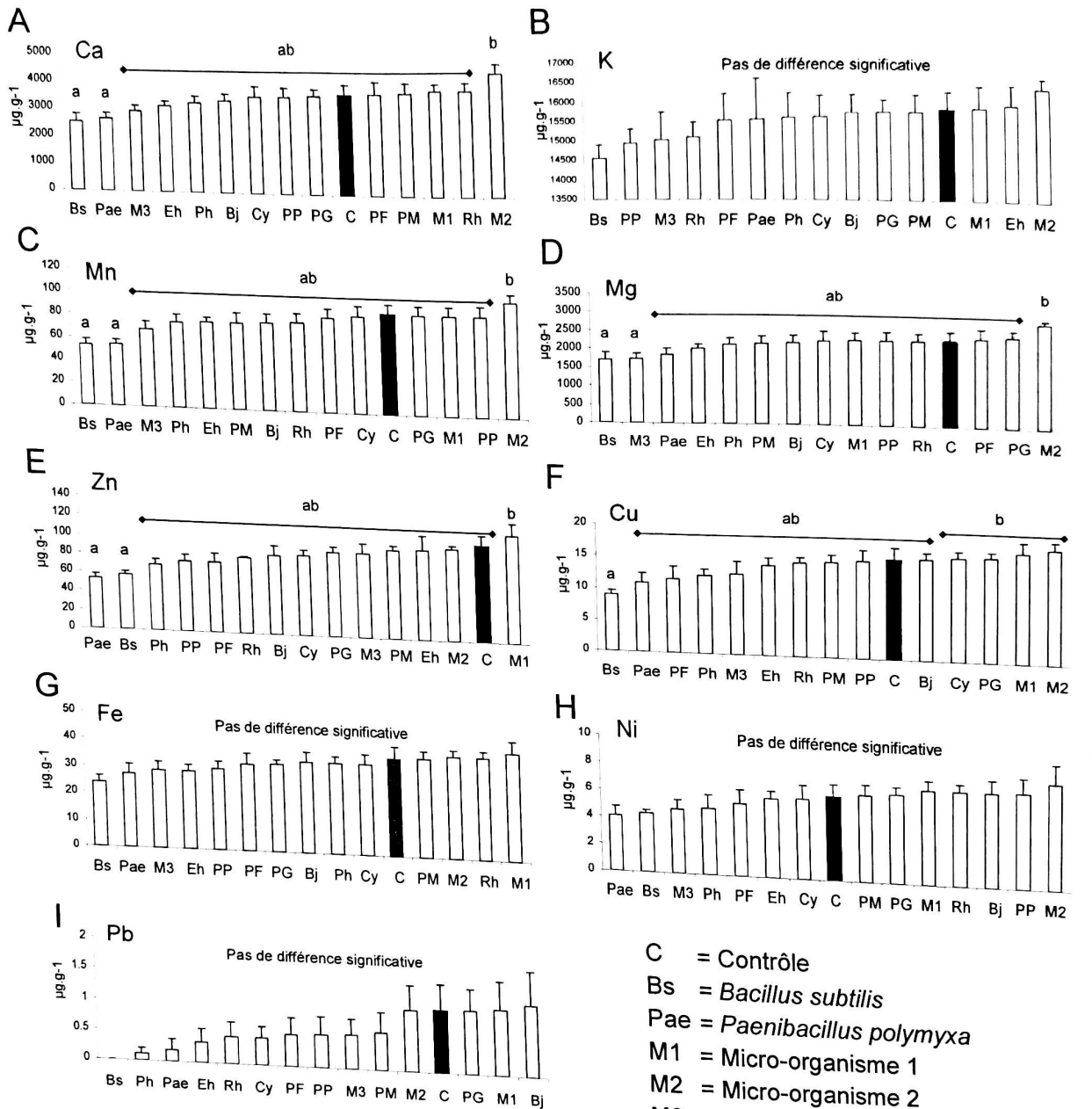


Figure 3: Concentrations en éléments des tiges et feuilles du blé en fonction des micro-organismes testés. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard des valeurs. Les lettres (a,b,c) désignent les différentes catégories statistiques. Deux traitements marqués de la même lettre ne sont pas significativement différents. L'analyse statistique a été réalisée au seuil de probabilité de 0,005.

- C = Contrôle
- Bs = *Bacillus subtilis*
- Pae = *Paenibacillus polymyxa*
- M1 = Micro-organisme 1
- M2 = Micro-organisme 2
- M3 = Micro-organisme 3
- Eh = *Erwinia herbicola*
- Ph = *Pythium ultimum*
- Bj = *Bradyrhizobium japonicum*
- Cy = *Cytophaga sp.1*
- Rh = *Rhizoctonia solani*
- PM = *Pseudomonas MnB1*
- PP = *Pseudomonas putida*
- PF = *Pseudomonas fluorescens CHA0*
- PG = *Pseudomonas GB1*

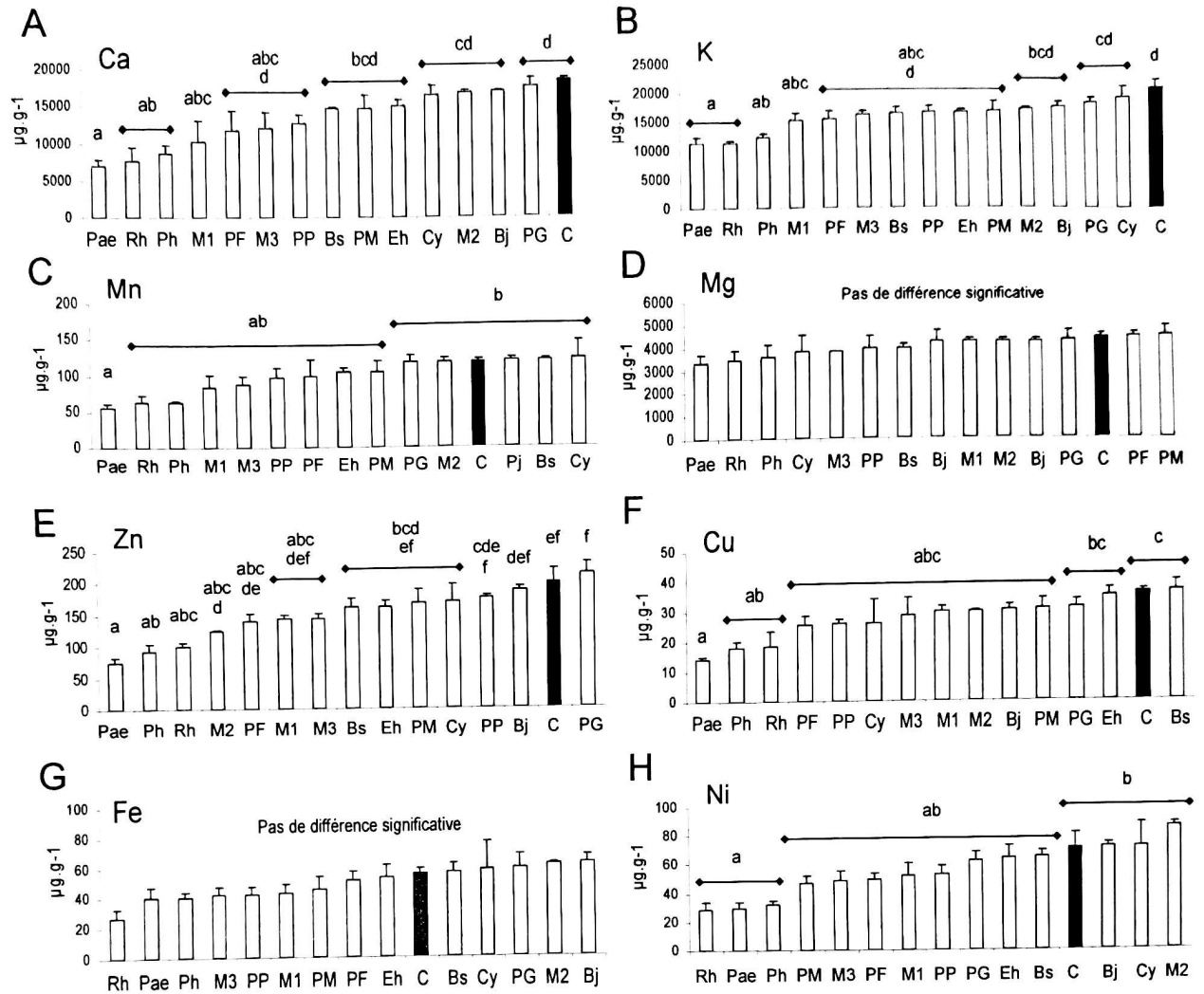


Figure 4: Concentrations en éléments des tiges et feuilles du tournesol en fonction des micro-organismes testés.

Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard des valeurs. Les lettres (a,b,c,d,e,f) désignent les différentes catégories statistiques. Deux traitements marqués de la même lettre ne sont pas significativement différents. L'analyse statistique a été réalisée au seuil de probabilité de 0,005.

- C = Contrôle
- Bs = *Bacillus subtilis*
- Pae = *Paenibacillus polymyxa*
- M1 = Microorganisme 1
- M2 = Microorganisme 2
- M3 = Microorganisme 3
- Eh = *Erwinia herbicola*
- Ph = *Pythium ultimum*
- Bj = *Bradyrhizobium japonicum*
- Cy = *Cytophaga sp.1*
- Rh = *Rhizoctonia solani*
- PM = *Pseudomonas MnB1*
- PP = *Pseudomonas putida*
- PF = *Pseudomonas fluorescens CHA0*
- PG = *Pseudomonas GB1*

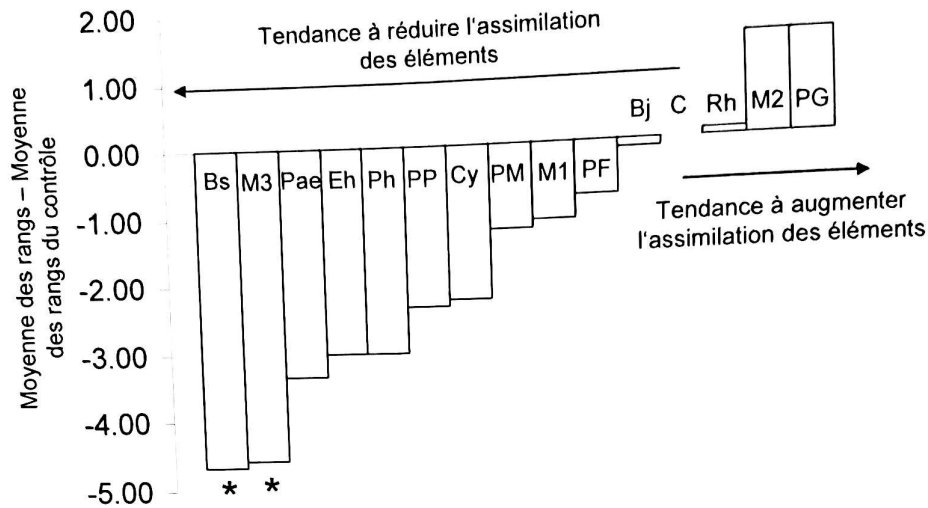


Figure 5: Tendances des microorganismes à réduire ou augmenter l'assimilation des éléments par le blé

L'axe des ordonnées représente la moyenne des rangs des microorganismes pour chaque élément moins la moyenne des rangs du contrôle. Plus la valeur de rang est négative (positive) plus le microorganisme a une tendance à réduire (augmenter) l'assimilation des éléments. L'étoile marque les traitements qui sont significativement différents du contrôle (ANOVA).

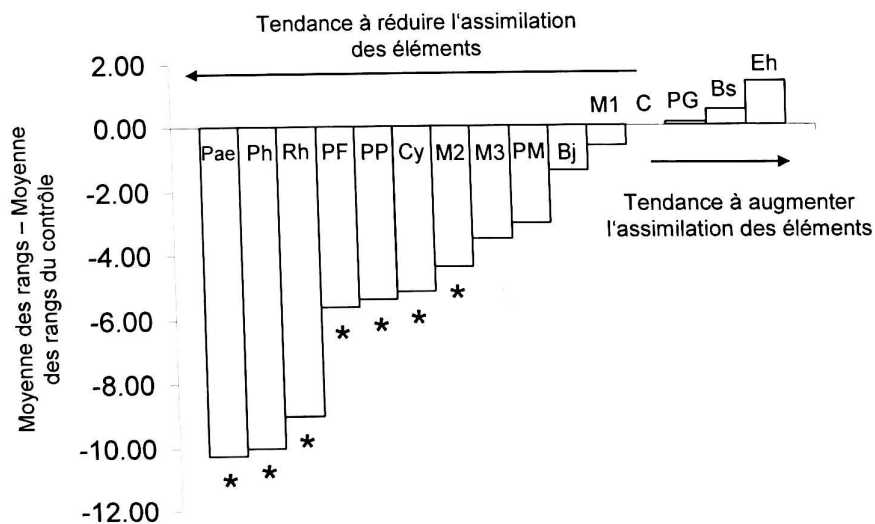


Figure 6: Tendances des microorganismes à réduire ou augmenter l'assimilation des éléments par le tournesol.

L'axe des ordonnées représente la moyenne des rangs des microorganismes pour chaque élément moins la moyenne des rangs du contrôle. Plus la valeur de rang est négative (positive) plus le microorganisme a une tendance à réduire (augmenter) l'assimilation des éléments. L'étoile marque les traitements qui sont significativement différents du contrôle (ANOVA).

Tableau 1 : Liste des micro-organismes et de leurs caractéristiques

| Micro-organismes | Abréviations | Coloration de Gram | Type | Références |
|-------------------------------------|--------------|--------------------|----------------------|--|
| <i>Pseudomonas putida</i> | PP | négatif | PGPR | Ahmad <i>et al.</i> , 2008 ; Cakmakci <i>et al.</i> , 2006 ; Cakmakci <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Pseudomonas GB1</i> | PG | négatif | PGPR | |
| <i>Pseudomonas fluorescens CHA0</i> | PF | négatif | PGPR | Ahmad <i>et al.</i> , 2008 ; Behn, 2008 ; Castro-Sowinski <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Pseudomonas MnB1</i> | PM | négatif | PGPR | |
| Micro-organisme 1 | M1 | | | |
| Micro-organisme 2 | M2 | | | |
| Micro-organisme 3 | M3 | | | |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Bs | positif | | Farag <i>et al.</i> , 2006 ; Araujo <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Cytophaga sp.1</i> | Cy | négatif | PGPR | |
| <i>Paenibacillus polymyxa</i> | Pae | positif | PGPR | Cakmakci <i>et al.</i> , 2007 ; Timmusk <i>et al.</i> , 2005 ; Shishido <i>et al.</i> , 1994 ; Timmusk & Wagner, 1999 ; Timmusk <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Erwinia herbicola</i> | Eh | négatif | PGPR | Rodriguez <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | Bj | | | Ahmad <i>et al.</i> , 2008 ; Dey <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>Pythium ultimum</i> | Ph | | Champignon pathogène | Farr <i>et al.</i> , 1989 ; Chérif <i>et al.</i> , 1991 |
| <i>Rhizoctonia solani</i> | Rh | | Champignon pathogène | Farr <i>et al.</i> , 1989 |

Tableau 2 : Teneurs en élément de la solution du gel d'agar

| Elément | Unité | Concentrations mesurées | Cocentrations totales | % dans la solution du gel |
|---------|---------------------|-------------------------|-----------------------|---------------------------|
| Mg | mg kg ⁻¹ | 5.14 ± 0.06 | 4.86 | 106 |
| Ca | mg kg ⁻¹ | 25.67 ± 0.23 | 31.99 | 80 |
| K | mg kg ⁻¹ | 35.80 ± 1.61 | 23.48 | 152 |
| Mn | µg kg ⁻¹ | 110.83 ± 1.13 | 110 | 101 |
| Fe | µg kg ⁻¹ | 272.67 ± 4.79 | 560 | 49 |
| Pb | µg kg ⁻¹ | 165.80 ± 2.15 | 1000 | 17 |
| Ni | µg kg ⁻¹ | 253.93 ± 7.96 | 280 | 91 |
| Zn | µg kg ⁻¹ | 286.77 ± 10.17 | 320 | 90 |
| Cu | µg kg ⁻¹ | 315.13 ± 14.07 | 310 | 102 |

Bibliographie

- Ahmad F., Ahmad I., Khan M.S. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163, 173-181.
- Araujo F.F., Henning A., Hungria M. 2005. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21, 1639-1645.
- Behn O. 2008. Influence of *Pseudomonas fluorescens* and arbuscular mycorrhiza on the growth, yield, quality and resistance of wheat infected with *Gaeumannomyces graminis*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 115, 4-8.
- Belinov A.A., Kunakova A.M., Kozhemiakov A.P., Stepanok V.V., Yudkin L.Y. 1998. Effect of associative bacteria on barley grown in heavy metal contaminated soil. In: Proceedings of the International Symposium on Agro-environmental issues and future strategies. Towards the 21st Century. Faisalabad, Pakistan, May 25-30.
- Belinov A.A., Diet K. 2000. Effect of associative bacteria on element composition of barley seedlings grown in solution culture at toxic cadmium concentrations. *Microbiological Research*, 155, 113-121.
- Cakmakci R., Donmez F., Aydin A., Sahin F. 2006. Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biology & Biochemistry*, 38, 1482-1487.
- Cakmakci R., Donmez M.F., Erdogan U. 2007. The effect of plant growth promoting rhizobacteria on barley seedling growth, nutrient uptake, some soil properties, and bacterial counts. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 31, 189-199.
- Castro-Sowinski S., Herschkovitz Y., Okon Y., Jurkevitch E. 2007. Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. *Fems Microbiology Letters*, 276, 1-11.
- Chérif M., Benhamou N., Bélanger R.R. 1991. Ultrastructural and cytochemical studies of fungal development and host reactions in cucumber plants infected with *Pythium ultimum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39, 353-375.
- Dey R., Pal K.K., Bhatt D.M., Chauhan S.M. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 159, 371-394.
- Domy C.A. 1986a. Definition and functions of trace element. In: Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metal (2nd ed). Springer-Verlag, New York, pp.3-5.

Domy C.A. 1986b. Relevance of bioavailability to biological response and risk. In: Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metal (2nd ed). Springer-Verlag, New York, pp.63-64.

Domy C.A. 1986c. Ecological and Health Risks of Metal. In: Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metal (2nd ed). Springer-Verlag, New York, pp.133-165.

Egamberdiyeva D. 2007. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied soil ecology*, 36, 184-189.

Egamberdiyeva D., Hoflich G. 2004. Effect of plant growth-promoting bacteria on growth and nutrient uptake of cotton and pea in a semi-arid region of Uzbekistan. *Journal of Arid Environments*, 56, 293-301.

Eraenen J.K. 2008. Rapid evolution towards heavy metal resistance by mountain birch around two subarctic copper-nickel smelters. *Journal of evolutionary biology*, 21, 492-501.

FAO, 2008. Properties, manufacture and application of seaweed polysaccharides- agar, carrageenan and algin. Source:
<http://www.fao.org/docrep/field/003/AB730E/AB730E03.htm>

Farag M.A., Ryu C.M., Sumner L.W., Pare P.W. 2006. GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. *Phytochemistry*, 67, 2262-2268.

Farr D.F., Bills G.F., Chamuris G.P., Rossman A.Y. 1989. Fungi on Plants and Plant Products in the United States. APS Press. St. Paul, Minnesota. pp 1252-1262.

Gadd G.M. 2000. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Current opinion in biotechnology*, 11, 271-279.

Gadd G.M. 2004. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *GEODERMA*, 122, 109-119.

Gadd G.M., White C. 1993. Microbial treatment of metal pollution- a working biotechnology? *Trends in biotechnology*, 11, 353-359.

Haggag W.M., Timmusk S. 2008. Colonization of peanut roots by biofilm-forming *Paenibacillus polymyxa* initiates biocontrol against crown rot disease. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 961-969.

Hoflich G., Metz R. 1997. Interactions of plant-microorganism-associations in heavy metal containing soils from sewage farms. *Bodenkultur*, 48, 239-247.

- Huang X.D., El-Alawi Y., Penrose D.M., Glick B.R., Greenberg B.M. 2003. Responses of plant to creosote during phytoremediation and their significance for remediation processes. *Environ. Pollut. In press.*
- Jenkins S.F., Averre C.W. 1983. Root diseases of vegetables in hydroponic culture systems in North-Carolina greenhouse. *Plant Disease*, 67, 968-970.
- Kamnev A.A., Antonyuk L.P., Ignatov V.V. 1999. Biodegradation of organic pollution involving soil iron(III) solubilized by bacterial siderophores as an electron acceptor: possibilities and perspectives. In: Novel approaches for bioremediation of organic pollution, Kluwer Acad/Plenum Publ. New York, pp 205-217.
- Khan Z., Kim S.G., Jeon Y.H., Khan H.U., Son S.H., Kim Y.H. 2008. A plant growth promoting rhizobacterium, *Paenibacillus polymyxa* strain GBR-1, suppresses root-knot nematode. *Bioresource Technology*, 99, 3016-3023.
- Kloepper J.W., Schroth M.N. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *Proceedings of the Fourth International Conference on Plant Pathogen Bacteria, INRA*, 2, 879-882.
- Lin W., Okon Y., Hardy R.W.F. 1983. Enhanced mineral uptake by Zea mays and Sorghum bicolor roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 1775-1779.
- Lodewyckx C., Mergeay M., Vangronsveld J., Clijsters H., Van Der Lelie D. 2001. The effect of recombinant heavy metal-resistant endophytic bacteria on heavy metal uptake by their host plant. *Internal Journal of Phytoremediation*, 3, 173-187.
- Lucy M., Reed E., Glick B.R. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek International journal of general and molecular microbiology*, 86, 1-25.
- Mallik M.A.B., Williams R.D. 2008. Plant growth promoting rhizobacteria and mycorrhizal fungi in sustainable agriculture and forestry. *Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry*, 321-345.
- Metting F.B. 1992. Bioremediation technology. In: Soil Microbial Ecology, Applications in Agricultural and Environmental Management. Marcel Dekker, Inc. pp 497-504.
- Pais I., Jones J.B. 2000. Terminology. In: The handbook of trace elements. St. Lucie Press Boca Raton, Florida, pp.1-5.
- Pais I., Jones J.B. 2000. Terminology. In: The Handbook of Trace Elements. St. Lucie Press, Boca Raton, Florida, pp 1-5.
- Qaim M., Stein A.J., Meenakshi J.V. 2007. Economics of biofortification. *Agricultural economics*, 37, 119-133.

Reid R., Hayes J. 2003. Mechanisms and control of nutrient uptake in plants. *International Review of Cytology- a survey of cell biology*, 229, 73-114.

Rengel Z. 2002. Genetic control of root exudation. *Plant and Soil*, 245, 59-70.

Rodriguez H., Gonzalez T., Selman G. 2000. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. *Journal of Biotechnology*, 84, 155-164.

Salt D.E, Blaylock M., Kumar, Npba, Dushenkov V., Ensley B.D., Chet I., Raskin I. 1995. Phytoremediation – a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Bio-technology*, 13, 468-474.

Shishido M., Chanway C.P. 1994. Colonization and growth promotion of outplanted spruce seedlings pre-inoculated with plant growth-promoting rhizobacteria in the greenhouse. *Canadian journal of Forest Research*, 30, 845-854.

Tabak H., Lens P., Van Hullebusch E., Dejonghe W. 2005. Microbial processes and mechanisms affecting bioremediation of metal contamination and influencing metal toxicity and transport. *Environmental Science and Bio/Technology*, 4, 115-156.

Timmusk S., Grantcharova N., Gerhart E., Wagner H. 2005. *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 71, 7292-7300.

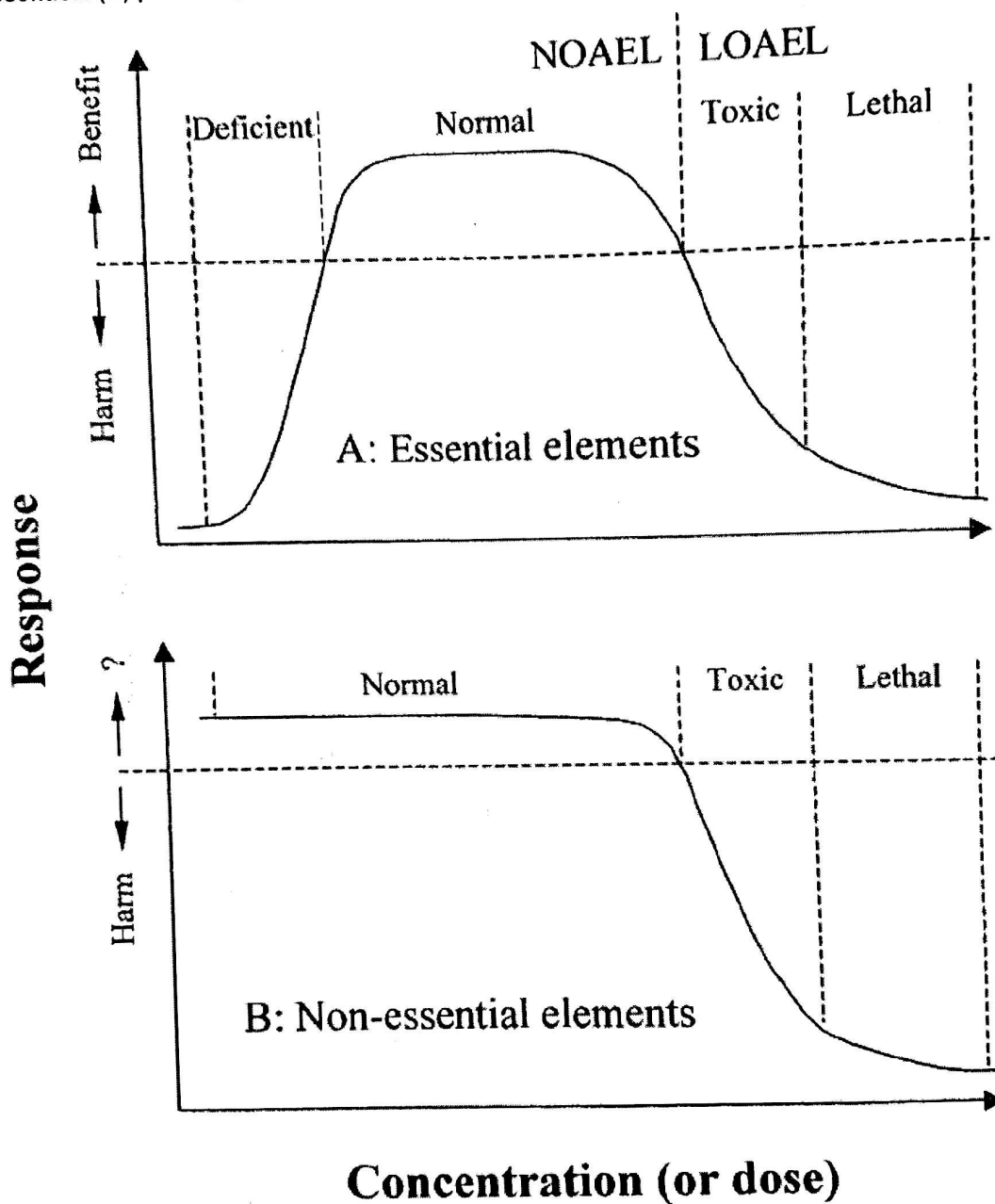
Timmusk S., Van West P., Gow N.A.R., Wagner E.G.H. 2003. Antagonist effects of *Paenibacillus polymyxa* towards the oomycete plant pathogens *Phytophthora palmivora* and *Phythium aphanidermatum*. In: Mechanisms of action of the plant growth-promoting bacterium *Paenibacillus polymyxa*. Uppsala University, Sweden, pp 1-28.

Timmusk S., Wagner E.G.H. 1999. The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: A possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12, 951-959.

Vanbroekhoven K., Van Roy S., Gielen, C., Maesen M., Ryngaert A., Diels L., Seuntjens P. 2007. Microbial processes as key drivers for metal (im)mobilization along a redox gradient in the saturated zone. *Environmental Pollution*, 148, 759-769.

Whiting S.N., De Souza M.P., Terry N. 2001. Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. *Environmental Science & Technology*, 35, 3144-3150.

Annexe 1 : Relations entre dose et réponse des éléments essentiels (A) et des éléments non-essentiels (B) pour les plantes



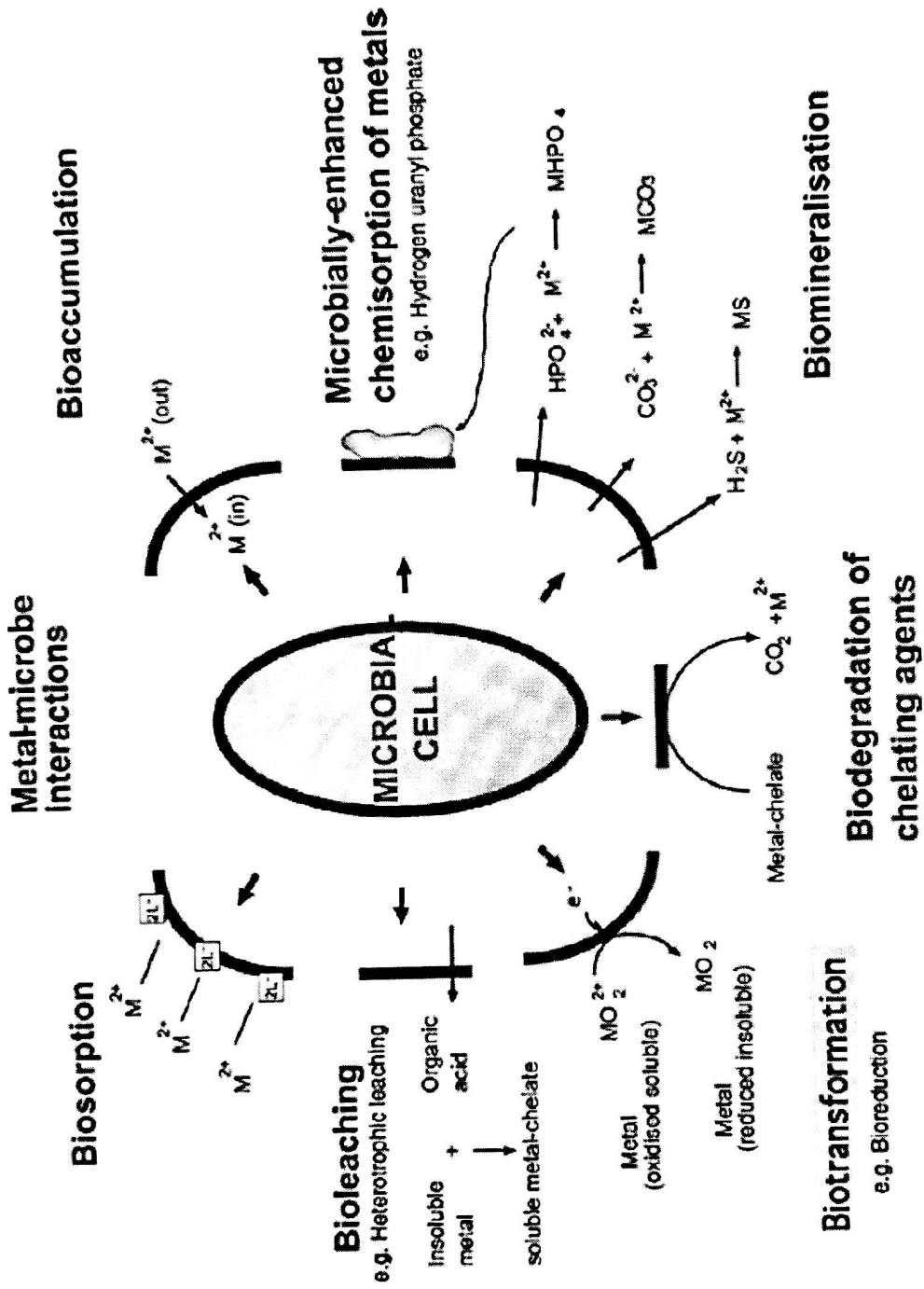
Source : Domy C.A. 1986. Relevance of bioavailability to biological response and risk. In: Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metal (2nd ed). Springer-Verlag, New York, pp.63-64.

Annexe 2: Exemples de PGPR qui ont influencé l'assimilation de métaux par les plantes

| Bacteria | Plant | Contaminant | Conditions | Results of pairing of bacteria and plant | Reference |
|---|------------------------|---|-----------------------------------|---|------------------------------|
| <i>Agrobacterium radiobacter</i> 10 <i>Arthrobacter mysoarens</i> 7 <i>Azo-spirillum lipoferum</i> 137 <i>Flavobacterium</i> sp. L30 | Barley | Cadmium, Lead | Pot experiments in greenhouse | <ul style="list-style-type: none"> - <i>Flavobacterium</i> sp. L30 very negatively sensitive to cadmium - <i>Flavobacterium</i> sp. L30 and <i>A. mysoarens</i> 7 give increases of grain yield - enhanced lead accumulation by plants inoculated with <i>A. radiobacter</i> 10 and <i>A. mysoarens</i> 7 - significant growth improvements seen in plants inoculated by all strains at higher cadmium concentrations | Belimov et al. 1998b |
| <i>Agrobacterium radiobacter</i> 10 <i>Arthrobacter mysoarens</i> 7 <i>Azo-spirillum lipoferum</i> 137 <i>Flavobacterium</i> sp. L30 | Barley | ¹³⁴ Cesium | Pot experiments in greenhouse | <ul style="list-style-type: none"> - <i>Flavobacterium</i> sp. L30 increases ¹³⁴Cs uptake by barley, but not significantly, due to increased plant biomass - <i>A. lipoferum</i> 137 significantly decreases the total accumulation of ¹³⁴Cs | Belimov et al. 1998c |
| <i>Agrobacterium radiobacter</i> 10 <i>Arthrobacter mysoarens</i> 7 <i>Azo-spirillum lipoferum</i> 137 <i>Flavobacterium</i> sp. L30 | Barley | Cadmium | Pot experiments in growth chamber | <ul style="list-style-type: none"> - increased absorption of essential nutrients from contaminated growth medium - slight stimulation of root length and biomass in contaminated growth medium - <i>A. lipoferum</i> 137 increased concentration of cadmium in roots, but no change in cadmium uptake by plants inoculated with other strains | Belimov and Dietz 2000 |
| <i>Agrobacterium</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Sinorhizobium</i> sp. | Maize, Rye, Pea, Lupin | Cadmium, Copper, Lead, Nickel, Zinc, Chromium | Pot experiments in growth chamber | <ul style="list-style-type: none"> - bacteria stimulates growth of maize and increases metal uptake by maize; this effect more pronounced on more weakly polluted soils compared to heavily-polluted soils - growth and metal uptake of lupin, pea and rye not affected by bacteria addition | Hoflich and Metz 1997 |
| <i>Azo-spirillum brasilense</i> Cd <i>Enterobacter cloacae</i> CAL 2 <i>Pseudomonas putida</i> UW3 | Tall fescue | Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) | Pot experiments in growth chamber | <ul style="list-style-type: none"> - accelerated and more complete PAH removal from the soil with inoculation - effectiveness of PAH removal further enhanced in combination with the use of land-farmed soil and inoculation with PAH-degrading bacteria | Huang et al. 2003a, in press |

Source: Lucy M., Reed E., Glick B.R. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek International journal of general and molecular microbiology*, 86, 1-25.

Annexe 3: Interactions métal-microbe impactant la mobilité des métaux dans les sols



Source: Tabak H.H., Lens P., Hullebusch E., Dejonghe W. 2005. Microbial processes and mechanisms affecting bioremediation of metal contamination and influencing metal toxicity and transport. *Environmental Science and BioTechnology*, 4, 115–156.

Annexe 4: Voies d'assimilation des éléments à l'intérieur de la racine

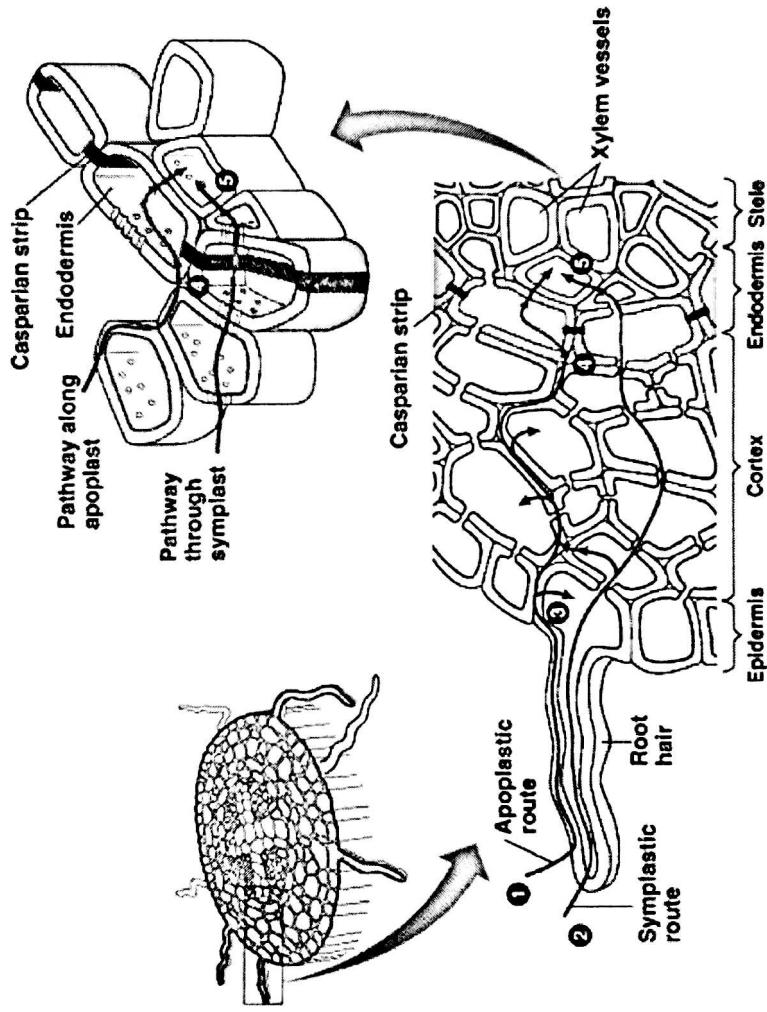


Image adapted from Pearson Education Inc., publishing as Benjamin Cummings